

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 591 029**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
C07K 14/00	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
C12N 15/11	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12N 1/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2007 PCT/US2007/008853**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.10.2007 WO07120673**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2007 E 07755205 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2010209**

54 Título: **Péptidos WT-1 inmunogénicos y métodos para su uso**

30 Prioridad:

10.04.2006 US 790526 P
17.10.2006 US 852009 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.11.2016

73 Titular/es:

SLOAN KETTERING INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH (100.0%)
1275 York Avenue 460, East 63rd Street
New York, NY 10021, US

72 Inventor/es:

SCHEINBERG, DAVID, A. y
MAY, RENA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 591 029 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 WT-1 inmunogénicos y métodos para su uso

Campo de la invención

5 Esta invención proporciona péptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos SGQAYMFPNAPYLPSCLLES, composiciones y vacunas que comprenden dicho péptido y sus usos médicos, en particular para tratar y reducir la incidencia de un cáncer que expresa WT1 e inducir respuestas inmunológicas contra este.

Antecedentes de la invención

10 El tumor de Wilms (WT), un nefroblastoma pediátrico que aparece con una frecuencia de 1 cada 10.000 nacimientos, ha sido sujeto de profundas investigaciones básicas y clínicas durante varios años. El tumor tiene origen embrionario, se detecta en infantes habitualmente durante los primeros 5 años de vida y puede aparecer de forma unilateral o bilateral. Un WT surge cuando las células mesenquimáticas metanéficas condensadas del riñón en desarrollo no pueden diferenciarse de modo adecuado. La implicación del gen supresor del tumor de Wilms 1 (WT1) en la etiología del WT ilustra el impacto que pueden tener las alteraciones genéticas sobre el desarrollo y la tumorigénesis.

Sumario de la invención

15 En la presente se describen péptidos, composiciones y composiciones inmunogénicas, tales como vacunas, que comprenden el mismo péptido y sus usos médicos, en particular para tratar y reducir la incidencia de un cáncer que expresa WT1 e inducir una respuesta inmunológica contra este, que comprende administrar los antedichos.

20 Las realizaciones de la presente invención son como se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos SGQAYMFPNAPYLPSCLLES (SEQ ID NO:41). La presente invención también se refiere a una composición que comprende el péptido aislado, según se describió anteriormente, y un vehículo fisiológicamente aceptable. La presente invención también se refiere a una vacuna que comprende el péptido aislado, según se describió anteriormente, y que comprende además un adyuvante o un vehículo, o una célula presentadora de antígenos. Preferiblemente, la composición o la vacuna, según se describió anteriormente, comprende además otro péptido de WT1 distinto de dicho péptido aislado, preferiblemente cuando dicho péptido de WT1 distinto se selecciona del grupo que consiste en: LVRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO:1), RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO:2), NKRYFKLSHLQMHSR (SEQ ID NO:3), y PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO:4). La presente invención también se refiere al uso del péptido, según se describió anteriormente, para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de un linfocito T citotóxico (CTL) específico de la proteína de WT1. La presente invención también se refiere al uso del péptido, según se describió anteriormente, para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de (a) un linfocito CD8+ específico de la proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4+ específico para dicha proteína de WT1. La presente invención se refiere también a la composición de vacuna, según se describió anteriormente, para su uso para tratar un cáncer que expresa WT1 o reducir la incidencia de un cáncer que expresa WT1 o su recaída en un sujeto, preferiblemente cuando dicho cáncer que expresa WT1 es una leucemia mielógena aguda (AML), un mesotelioma maligno, un síndrome mielodisplásico (MDS), un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), o un linfoma. La presente invención se refiere también a un uso del péptido, según se describió anteriormente, para la preparación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa WT1 o para reducir la incidencia de un cáncer que expresa WT1 o su recaída en un sujeto. La presente invención se refiere también a una célula presentadora de antígenos que comprende el péptido aislado, según se describió anteriormente. La presente invención se refiere también a una vacuna que comprende la célula presentadora de antígenos, según se describió anteriormente. La presente invención se refiere también a una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido aislado, según se describió anteriormente. La presente invención se refiere también a una vacuna o vector que comprende la molécula de ácido nucleico, según se describió anteriormente. La presente invención también se refiere a un linfocito T citotóxico humano que reconoce una célula de cáncer que expresa WT1 maligna para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa WT1, en el que el linfocito T citotóxico humano se induce *ex vivo* para que se forme y prolifere poniendo en contacto una población de linfocitos *ex vivo* con el péptido, según se describió anteriormente.

25 Así, el péptido de la presente invención es un péptido de WT1 mutado y aislado de SEQ ID NO:41, que comprende: (a) un motivo de unión de una molécula de antígeno de leucocito humano (HLA) de clase II; y (b) un motivo de unión de una molécula de HLA de clase I que comprende una mutación puntual en otro resto de anclaje del motivo de unión de una molécula de HLA de clase I.

30 La presente invención proporciona un péptido aislado que consiste en la SEQ ID NO:41. Tal como se describe en la presente, la secuencia de AA de un péptido aislado comprende un fragmento de SEQ ID NO:41.

35 En la presente se describe un péptido aislado que comprende la secuencia de AA SGQARMFPNAPYLPSCLLES (SEQ ID NO:39). Tal como se describe también en la presente, la secuencia de AA del péptido aislado consiste en SEQ ID NO:39. Tal como se describe también en la presente, la secuencia de AA del péptido aislado consiste en un

fragmento de SEQ ID NO:39. Tal como se describe también en la presente, la secuencia de AA del péptido aislado comprende un fragmento de SEQ ID NO:39.

En la presente se describe un péptido aislado que comprende la secuencia de AA QAYMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO:42). Tal como se describe también en la presente, la secuencia de AA del péptido aislado consiste en SEQ ID NO: 42. Tal como se describe también en la presente, la secuencia de AA del péptido aislado consiste en un fragmento de SEQ ID NO: 42. Tal como se describe también en la presente, la secuencia de AA del péptido aislado comprende un fragmento de SEQ ID NO: 42.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende el péptido aislado de la invención, en combinación con al menos un péptido de WT1 adicional. En ciertas realizaciones, se proporciona una composición que comprende el péptido de la presente invención, y al menos un péptido aislado diferente descrito en la presente. En ciertas realizaciones, se proporciona una composición que comprende el péptido de la presente invención, y al menos dos o al menos tres péptidos aislados diferentes descritos en la presente. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención. En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención es una vacuna.

El péptido de WT1 adicional, en otra realización, tiene la secuencia QARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO:40). En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia QARMFPNAPYLPSC; LVRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO:1); RDELVRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO:2) NKRYFKLSHLQMHSR (SEQ ID NO:3), y PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO:4). En otra realización, la secuencia de AA del péptido de WT1 adicional se selecciona de las secuencias indicadas en SEQ ID NO:5-38. En otra realización, el péptido de WT adicional es un péptido heteroclítico seleccionado de SEQ ID NO:5-38. En otra realización, el péptido de WT adicional es un péptido de tipo salvaje seleccionado de SEQ ID NO:5-38. En otra realización, el péptido de WT adicional es otro péptido de WT1 heteroclítico. En otra realización, el péptido de WT adicional es otro péptido de WT1 de tipo salvaje. En otra realización, el péptido de WT adicional es cualquier otro péptido de WT1 conocido en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona el péptido aislado de SEQ ID NO:41 para su uso para tratar un sujeto con un cáncer que expresa WT1, que comprende administrar al sujeto dicho péptido o composición que comprende el péptido de la presente invención, tratando con ello al sujeto con un cáncer que expresa WT1.

En otra realización, la presente invención proporciona el péptido aislado de SEQ ID NO:41 para su uso para reducir la incidencia de un cáncer que expresa WT1, o su recaída, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto dicho péptido o composición que comprende el péptido de la presente invención, reduciendo con ello la incidencia de un cáncer que expresa WT1, o su recaída, en un sujeto.

En otra realización, la presente invención proporciona el péptido aislado de SEQ ID NO:41 para su uso para inducir la formación y proliferación de un CTL específico de la proteína de WT1, que comprende poner en contacto una población de linfocitos con dicho péptido o composición que comprende el péptido de la presente invención, induciendo con ello la formación y la proliferación de un CTL específico de la proteína de WT1.

En otra realización, la presente invención proporciona un uso del péptido aislado de SEQ ID NO:41 para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de (a) un linfocito CD8⁺ específico de la proteína WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico de la proteína de WT1, que comprende poner en contacto una población de linfocitos con dicho péptido o composición que comprende dicho péptido de la presente invención, induciendo con ello la formación y la proliferación de (a) un linfocito CD8⁺ específico de la proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico para la proteína de WT1.

Breve descripción de las figuras

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

Figura 2: ELISPOT de gamma-interferón (IFN) de CD8⁺/CD3⁺ (A) y citotoxicidad (B) de donantes HLA A0201 sanos frente a células T2 pulsadas con los siguientes péptidos: 1^a barra en cada serie: sin péptido; 2^a barra: el mismo péptido empleado para la estimulación; 3^a barra: el correspondiente péptido nativo; 4^a barra: péptido de control negativo. Eje X: péptidos empleados para las estimulaciones. Los experimentos se realizaron por triplicado y se confirmaron 3-5 veces.

Figura 3: ELISPOT de gamma-IFN de CD8⁺ (A) y CD3⁺ (B-D) de donantes HLA A0201 sanos empleando los péptidos indicados; la asignación de las barras en cada serie es la misma que en la figura 2. Cada subfigura en B-D representa una repetición distinta del experimento.

Figura 4: Ensayos de citotoxicidad empleando células T CD8⁺ estimuladas con péptidos de WT-1 A1 sintéticos procedentes de un donante HLA A0201 frente a blastos de CML con el mismo HLA que presentan secuencias del péptido nativo. A. Gráfica de barras de los resultados. 1^a barra en cada serie: SKLY-16 (WT1); 2^a barra: BV173

(WT1⁺); 3ª barra: LAMA81 (WT1⁺); 4ª barra: CMLA (control negativo adicional). B. Curvas de muerte. Cuadrados: SKLY-16. Rombos: células 697. G3, F4, C5, y G5 son los clones de células T generados a partir de un donante HLA-A0201 sano después de múltiples estimulaciones *in vitro*. Eje Y: porcentaje de citotoxicidad. Eje X: proporción de célula T:célula diana.

5 Figura 5: Parte 1. ELISPOT de gamma-interferón después de una estimulación con péptidos de WT1 de células T CD3⁺ de donantes sanos con diferentes tipos de HLA-DRB1. Parte 2. las células T CD3⁺ (A: HLA-DRB1*1001/1501; B: HLA-DRB1*0701/1202; C: HLA-DRB1*0301/901; D: HLA-DRB1*0407/1302) se estimularon dos veces con el péptido WT1DR 328 o WT1DR 423. Las células T estimuladas se expusieron en un ensayo ELISPOT de gamma-IFN a lo siguiente: Barras grises: control sin exponer; Barras negras: células CD14⁺ pulsadas con péptidos estimulantes (WT1DR 328 o WT1DR 423); Barras blancas: células CD14⁺ pulsadas con un epitopo de péptido de CD4⁺ irrelevante (RAS); Barras rayadas: células CD14⁺ sin pulsar. * - p < 0,05 comparado con los controles. Eje Y: número de manchas por 1 x 10⁵ células T CD3⁺. Eje X: péptido empleado par las estimulaciones de células T.

15 Figura 6: Los péptidos de la presente invención son procesados, presentados y reconocidos por célula T humanas. A. Células T CD3⁺ de un donante HLA A0201/301 DRB1*1301/1302 sano fueron estimuladas con DC autólogas previamente incubadas con lisados de tumor 697, después se expusieron en un ensayo ELISPOT de gamma-IFN a DC autólogas previamente incubadas con lisado de tumor 697, péptidos de WT1 individuales, péptidos control o DC no pulsadas (eje X). B. Células T CD3⁺ de un donante HLA A0201/101 DRB1*0301/1601 de un donante sano fueron estimuladas con DC previamente incubadas con lisados de tumores JMN (barras negras), o MeWo (barras blancas). Las células T se expusieron en un ensayo ELISPOT de gamma-IFN a DC autólogas previamente incubadas con lisados de tumor JMN o MeWo, péptidos de WT1DR individuales, o péptido de clase II control (eje X). Barras rayadas: nivel de fondo de las manchas procedentes de DC autólogas incubadas en ausencia de células T. * - p < 0,05 comparado con péptidos control. Eje Y: número de manchas por 1 x 10⁵ células T CD3⁺.

25 Figura 7A-B: A. Un ELISPOT de gamma-interferón de CD3⁺ con los péptidos WT1DR 122 y WT1DR 122A 1. Células T CD3⁺ de donantes sanos con diferentes tipos de HLA-DRB1 (A: HLA-DRB 1*1401; B: HLA-DRB1*0104/1104) fueron estimuladas dos veces con el péptido WT1DR 122 o el péptido WT1DR 122A1, y después se expusieron en un ensayo ELISPOT de gamma-IFN a lo siguiente: células CD14⁺ pulsadas con el péptido WT1DR 122 (barras grises); células CD14⁺ pulsadas con el péptido WT1DR 122A1 (barras negras); células CD14⁺ pulsadas con un epitopo de péptido de CD4 irrelevante (barras blancas; RAS); células CD14⁺ no pulsadas (barras rayadas). * - p < 0,05 comparado con los controles. Eje Y: número de manchas por 1 x 10⁵ células T CD3⁺. Eje X: péptido empleado para las estimulaciones.

30 Figura 7C: Los péptidos WT1DR 122 y 122A1 estimulan respuestas de células T CD8⁺. Panel izquierdo: Células T CD3⁺ de un donante HLA-A0201/DRB1*1401 fueron estimuladas dos veces con WT1DR 122, después se expusieron en un ensayo ELISPOT de gamma-IFN a células CD14⁺ autólogas. Panel derecho: Células T CD3⁺ de un donante HLA-A0201/DRB1*1501 fueron estimuladas dos veces con WT1DR 122A 1, después se expusieron en un ensayo ELISPOT de gamma-IFN a una línea celular de melanoma control MeWo (A0201/DRB1*15XX, WT1⁻). * - p < 0,05 comparado con los controles sin péptido. El eje Y representa el número de manchas por 1 x 10⁵ células CD3⁺. El eje X muestra los diferentes péptidos de ensayo empleados en el ELISPOT.

35 Figura 8: ELISPOT de gamma-interferón de CD3⁺ frente a líneas celulares de mesotelioma. Panel izquierdo: Las PBMC totales de un donante HLA-A0201 fueron estimuladas dos veces con los diferentes péptidos de WT1DR, después las células T se expusieron a un ensayo ELISPOT de gamma-inteferón con lo siguiente: línea celular de mesotelioma H-Meso1A (barras negras; WT1+, A0201+); línea celular de melanoma MeWo control (WT1-, A0201+; barras grises). * - p ≤ 0,01 comparado con los controles de MeWo. Eje Y: número de manchas por 2 x 10⁵ PBMC. Eje X: péptido empleado par la estimulación de células T. Panel derecho: Células T CD3⁺ de un donante HLA-A0201/DRB1*1501 fueron estimuladas dos veces con WT1DR 122A1, después células T fueron expuestas en un ensayo ELISPOT de gamma-IFN a las siguientes células diana: JMN, una línea celular de mesotelioma positiva a A0201/DRB1*1505 WT1, o MeWo, una línea celular de melanoma negativa a A0201/DRB1*15XX WT1. Las células diana fueron pulsadas con WT1DR 122A1 (barras negras) o no pulsadas (barras grises). * p < 0,05 comparado con la línea diana Mewo no pulsada. Eje Y: número de manchas por 1 x 10⁵ células T CD3⁺. Eje X: líneas celulares empleadas como células diana.

40 Figura 9: Panel izquierdo. Las células T CD3⁺ de un donante HLA-A0201/DRB1*0101/15XX fueron estimuladas dos veces con WT1 DR 122A1, después las células T CD8⁺ fueron aisladas mediante selección negativa y empleadas como células efectoras en un ensayo de citotoxicidad de liberación de ⁵¹Cr. Las células T CD8⁺ fueron incubadas con células diana radiomarcadas (697 (A0201⁺, WT1⁺) o SKLY16 (A0201⁺, WT1⁻) pulsadas o no pulsadas a 3 proporciones de E:T diferentes: barras grises 100:1; barras negras 30:1; barras blancas 10:1. Eje Y: porcentaje de citotoxicidad. Eje X: condiciones de la célula diana. * - p < 0,05 comparado con los controles de SKLY16 a la misma proporción de E:T. Panel derecho: Células T CD8⁺ aisladas como se ha descrito para el panel izquierdo fueron incubadas con células diana radiomarcadas JMN (línea continua A0201+ WT1+) o MeWo (línea discontinua A0201+, WT1-) a 4 proporciones de E:T diferentes: Eje Y: porcentaje de citotoxicidad. Eje X: proporciones de E:T. p era < 0,001 comparado con los controles de MeWo.

Figura 10: RT-PCR cuantitativa. Niveles de expresión de WT1 relativos en una diversidad de líneas celulares hematopoyéticas y de mesotelioma. Los niveles de WT1 se muestran como valores relativos comparados con la línea celular de leucemia humana K562, que se define como 1.0.

Descripción detallada de la invención

5 Esta invención proporciona un péptido inmunogénico que consiste en la secuencia de aminoácidos SGQAYMFPNAPYLPSICLES (SEQ ID NO:41), y composiciones y vacunas que comprenden dicho péptido y sus usos médicos, en particular para reducir la incidencia de un cáncer que expresa WT1 e inducir respuestas inmunológicas contra este, que comprende administrar una o más de las mismas.

10 Los péptidos inmunogénicos son conocidos, por ejemplo, por el documento WO02/28414. El documento WO02/28414 describe el péptido inmunogénico de WT1 p117-139 (PSQASSGQARMFPNAPYLPSICLE) que tiene motivos apropiados para su unión a MHC de clase I y de clase II. El péptido de WT1 descrito es capaz de suscitar una respuesta de células T auxiliares y CTL específicos de WT1 capaces de lisar células tumorales positivas a WT1. Además, Kobayashi *et al.*, 2005, indican que el péptido de WT1 WT124-138 (QARMFPNAPYLPSCL), que es capaz de inducir una respuesta de células T CD4+, es procesado por APC de lisados de células tumorales, y es expresado sobre moléculas de MHC de clase II sobre tumores positivos a WT1. El documento WO2005/053618 describe análogos de péptidos de WT1 sintéticos (por ejemplo, YMFPNAPYL) de un péptido nativo (por ejemplo, RMFPNAPYL) que se unen específicamente a moléculas de HLA A0201 sobre una célula característica de un estado patofisiológico, tal como una célula de cáncer, en un mamífero. Los análogos de péptidos sintéticos con capaces de generar células T CD8+ o CD3+ específicas con mucha más eficacia que los péptidos nativos, y son capaces de estimular respuestas heteroclíticas de CTL CD8+ o CD3+ humanos que presentan reactividad cruzada con las secuencias nativas presentadas sobre células leucémicas o sobre otras células que presentan estos péptidos de WT-1 nativos.

15 El péptido de la invención es un péptido de WT1 mutado y aislado que comprende: (a) un motivo de unión de una molécula de antígeno de leucocito humano (HLA) de clase II; y (b) un motivo de unión de una molécula de HLA de clase I que tiene una mutación puntual en un resto de anclaje del motivo de unión de una molécula de HLA de clase I. En la presente se describen otros péptidos de WT1 mutados y aislados que comprenden: (a) un motivo de unión de una molécula de antígeno de leucocito humano (HLA) de clase II; y (b) un motivo de unión de una molécula de HLA de clase I que tiene una mutación puntual en uno o más de los restos de anclaje del motivo de unión de una molécula de HLA de clase I. Tal como se describe en la presente, el péptido tiene una longitud de 11 o más aa.

20 Una "mutación puntual" indica que el fragmento está mutado con respecto a la secuencia nativa de la proteína, creando así el motivo de unión a la molécula de HLA de clase I. La "mutación puntual" refuerza la capacidad de unión de un motivo de unión de una molécula de HLA de clase I presente en la secuencia nativa.

25 En un aspecto, la mutación puntual está en un resto de anclaje del motivo de unión de una molécula de HLA de clase I. Tal como se describe en la presente, la mutación puntual está en 1-3, 2, 1-2, 2-3 o 1-4 restos de anclaje del motivo de unión de una molécula de HLA de clase I.

Tal como se describe en la presente, un péptido tiene una longitud de 11-453, 12-453, 13-453, 14-453, 15-453, 16-453, 17-453, 18-453, 9-453 o 20-453 aminoácidos (AA).

Tal como se describe en la presente, la longitud es de 11-449 AA, 12-449 AA, 13-449 AA, 14-449 AA, 15-449 AA, 16-449 AA, 17-449 AA, 18-449 AA, 19-449 AA o 20-449 AA.

30 Tal como también se describe en la presente, la longitud es de 11-30 AA, 16-22 AA, 19 AA, 15-23 AA, 15-24 AA, 15-25 AA, 15-26 AA, 15-27 AA, 15-28 AA, 14-30 AA, 14-29 AA, 14-28 AA, 14-26 AA, 14-24 AA, 14-22 AA, 14-20 AA, 16-30 AA, 16-28 AA, 16-26 AA, 16-24 AA, 16-22 AA, 18-30 AA, 18-28 AA, 18-26 AA, 18-24 AA, 18-22 AA, 18-20 AA, 20-30 AA, 20-28 AA, 20-26 AA, 20-24 AA, 22-30 AA, 22-28 AA, 22-26 AA, 24-30 AA, 24-28 AA o 24-26 AA.

35 El péptido de los métodos y las composiciones de la presente descripción es más largo que la longitud mínima para la unión a una molécula de HLA de clase II, que es de aproximadamente 12 AA. El aumento en la longitud del péptido de unión a HLA de clase II puede permitir la unión a más de una molécula de HLA de clase II. El aumento en la longitud puede permitir la unión a una molécula de HLA de clase II cuyo motivo de unión se desconozca. El aumento en la longitud puede permitir la unión a una molécula de HLA de clase I.

El motivo de unión de la molécula de HLA de clase I puede ser conocido o desconocido.

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

En otra realización, el péptido de la presente invención es inmunogénico. En otra realización, el término "inmunogénico" se refiere a la capacidad para estimular, suscitar o participar en una respuesta inmunológica. En otra realización, la respuesta inmunológica suscitada es una respuesta inmunológica mediada por células. En otra realización, la respuesta inmunológica es una combinación de respuestas mediadas por células y humorales.

5 En otra realización, las células T que se unen al complejo de molécula de HLA-péptido se activan e inducen a las células que expresan una proteína que comprende el péptido para que proliferen y lisen. Las células T generalmente son activadas en un principio por células presentadoras de antígenos "profesionales" ("APC"; por ejemplo, células dendrítica, monocitos y macrófagos), que presentan moléculas coestimuladoras que alientan la activación de las células T, en lugar de una anergia o apoptosis. En otra realización, la respuesta es heteroclítica, según se describe
10 en la presente, de modo que el CTL lisa una célula neoplásica que expresa una proteína que tiene una secuencia de AA homóloga con un péptido de esta invención, o un péptido diferente que el empleado para estimular en primer lugar a la célula T.

En otra realización, un encuentro de una célula T con el péptido de esta invención induce su diferenciación en una célula efectora y/o T de memoria. Los posteriores encuentros entre la célula efectora o T de memoria y el mismo péptido o, en otra realización, con un péptido heteroclítico de esta invención, conducen a una respuesta
15 inmunológica más rápida e intensa. Estas respuestas son calibradas, en otra realización, midiendo el grado de proliferación de la población de células T expuesta al péptido. En otra realización, estas respuestas son calibradas mediante cualquiera de los métodos enumerados a continuación.

En otro aspecto, según se describe en la presente, el sujeto se expone a un péptido o a una composición/población celular que comprende un péptido de la invención, que se diferencia de la proteína nativa expresada, tras lo cual se
20 desarrolla una reacción cruzada de respuesta inmunológica del receptor con el antígeno/proteína nativa.

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

En otra realización, el motivo de unión a la molécula de HLA de clase I del péptido de la presente invención está contenido dentro del motivo de unión a la molécula de HLA de clase I del péptido. Tal como se describe en la presente, el motivo de unión a la molécula de HLA de clase I se solapa con el motivo de unión a la molécula de HLA de clase II. Tal como se describe en la presente, el motivo de unión a la molécula de HLA de clase I no se solapa
25 con el motivo de unión a la molécula de HLA de clase II.

La molécula de HLA de clase II cuyo motivo de unión está contenido en un péptido de la presente invención es, en otra realización, una molécula de HLA-DR. Tal como también se describe en la presente, la molécula de HLA de clase II es una molécula de HLA-DP o una molécula de HLA-DQ.

En otra realización, la molécula de HLA de clase II es una molécula de HLA-DRB. En otra realización, la molécula de HLA de clase II es DRB101. En otra realización, la molécula de HLA de clase II es DRB301. En otra realización, la molécula de HLA de clase II es DRB401. En otra realización, la molécula de HLA de clase II es DRB701. En otra
35 realización, la molécula de HLA de clase II es DRB1101. En otra realización, la molécula de HLA de clase II es DRB1501. La molécula de HLA de clase II puede ser cualquier otra molécula de HLA-DRB conocida en la técnica. Tal como también se describe en la presente, la molécula de HLA de clase II es una molécula de HLA-DRA, una molécula de HLA-DQA1, una molécula de HLA-DQB1, una molécula de HLA-DPA1, una molécula de HLA-DPB1, una molécula de HLA-DMA, una molécula de HLA-DMB, una molécula de HLA-DOA o una molécula de HLA-DOB.
40 Tal como también se describe en la presente, la molécula de HLA de clase II es cualquier otra molécula de HLA de clase II conocida en la técnica.

En otra realización, un péptido de la presente invención se une a 2, 3, 4, 5, 6 o más de 6 moléculas de HLA de clase II diferentes.

En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II que se unen a un péptido de la presente invención están codificadas por dos o más alelos diferentes en un locus de HLA de clase II concreto. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por tres alelos diferentes en un locus. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por cuatro alelos diferentes en un locus. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por cinco alelos diferentes en un locus. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por seis alelos diferentes en un locus. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas
50 por más de seis alelos diferentes en un locus.

En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II unidas por el péptido son codificadas por genes de HLA de clase II en dos loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en dos o más loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en tres loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en tres o más loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en cuatro loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en cuatro o más loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en cinco loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en cinco loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II
55 son codificadas por genes de HLA de clase II en cinco loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en cinco loci distintos.

son codificadas por genes de HLA de clase II en cinco o más loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en seis loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en seis o más loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II son codificadas por genes de HLA de clase II en más de seis loci distintos. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

En otro aspecto, un péptido de la presente invención se une a dos moléculas de HLA-DRB distintas. En otro aspecto, el péptido se une a tres moléculas de HLA-DRB distintas. En otro aspecto, el péptido se une a cuatro moléculas de HLA-DRB distintas. En otro aspecto, el péptido se une a cinco moléculas de HLA-DRB distintas. En otro aspecto, el péptido se une a seis moléculas de HLA-DRB distintas. En otro aspecto, el péptido se une a más de seis moléculas de HLA-DRB distintas.

En otro aspecto, las moléculas de HLA de clase II unidas por el péptido de WT1 son codificadas por genes de HLA de clase II en dos loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA unidas son codificadas por genes de HLA de clase II en dos o más loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA unidas son codificadas por genes de HLA de clase II en tres loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA unidas son codificadas por genes de HLA de clase II en tres o más loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA unidas son codificadas por genes de HLA de clase II en cuatro loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA unidas son codificadas por genes de HLA de clase II en cuatro o más loci distintos. En otro aspecto, las moléculas de HLA unidas son codificadas por genes de HLA de clase II en más de cuatro loci distintos. En otros aspectos, los loci se seleccionan de loci de HLA-DRB. En otro aspecto, el péptido de unión a HLA de clase II es un péptido de unión HLA-DRA. En otro aspecto, el péptido es un péptido de unión HLA-DQA1. En otro aspecto, el péptido es un péptido de unión HLA-DQB1. En otro aspecto, el péptido es un péptido de unión HLA-DPA1. En otro aspecto, el péptido es un péptido de unión HLA-DPB1. En otro aspecto, el péptido es un péptido de unión HLA-DMA. En otro aspecto, el péptido es un péptido de unión HLA-DMB. En otro aspecto, el péptido es un péptido de unión HLA-DOA. En otro aspecto, el péptido es un péptido de unión HLA-DOB. En otro aspecto, el péptido se une a cualquier otra molécula de HLA de clase II conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

En otro aspecto, un péptido de la presente invención se une a moléculas HLA-DRB que son codificadas por dos alelos HLA-DRB distintos seleccionados de DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101, y DRB 1501. En otro aspecto, el péptido se une a moléculas HLA-DRB codificadas por tres alelos HLA-DRB distintos seleccionados de DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101, y DRB 1501. En otro aspecto, el péptido se une a moléculas HLA-DRB codificadas por cuatro alelos HLA-DRB distintos seleccionados de DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101, y DRB 1501. En otro aspecto, el péptido se une a moléculas HLA-DRB codificadas por cinco alelos HLA-DRB distintos seleccionados de DRB 101, DRB 301, DRB 401, DRB 701, DRB 1101, y DRB 1501. En otro aspecto, el péptido 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 un aspecto separado de la presente descripción.

Cada una de las moléculas de HLA de clase II, sus tipos, clases y combinaciones representan una realización separada de la presente descripción.

La molécula de HLA de clase I cuyo motivo de unión está contenido en un péptido de la presente invención es, en otro aspecto, una molécula de HLA-A. En otra realización, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA-B. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA-C. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA-A0201. En otro aspecto, la molécula es HLA A1. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA A2. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA A2.1. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA A3. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA A3.2. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA A11. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA A24. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA B7. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA B27. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA B8. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

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

En otro aspecto, un motivo de unión de una molécula de HLA de clase I de un péptido de la presente invención muestra una mayor afinidad por la molécula de HLA de clase I, con relación al homólogo no mutado del péptido. En otro aspecto, la mutación puntual aumenta la afinidad del péptido de WT1 mutado y aislado por la molécula de HLA de clase I. En otro aspecto, el aumento en la afinidad está en relación con la afinidad (por la misma molécula de HLA

de clase I) del péptido de WT1 no mutado y aislado a partir del cual se deriva el péptido de WT1 aislado y mutado. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

5 Tal como se describe en la presente, un péptido de WT de unión a una molécula de HLA de clase I de los métodos y las composiciones tiene una longitud de 9-13 AA. Tal como se describe también en la presente, la longitud es de 8-13 AA.

10 Tal como se describe en la presente, el péptido de WT de unión a una molécula de HLA de clase I tiene una longitud de 8 AA. Tal como se describe también en la presente, el péptido tiene una longitud de 9 AA. Tal como se describe también en la presente, el péptido tiene una longitud de 10 AA. Tal como se proporciona en la presente, los péptidos nativos y heteroclíticos de 9-10 AA muestran una unión sustancial a moléculas de HLA de clase I para suscitar la secreción de citoquinas y la citolisis por CTL.

Tal como se describe en la presente, un péptido de WT1 de unión a una molécula de HLA de clase I incluido dentro de un péptido de WT1 tiene una de las anteriores longitudes.

15 En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I que se une al péptido de WT1 de unión a una molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA-A. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA-A2. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA-A3. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA-A11. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA-B8. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I es una molécula de HLA-0201. En otro aspecto, la molécula de HLA de clase I se une a cualquier otra molécula de HLA de clase I conocida en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

20 En otro aspecto, un péptido de la presente descripción conserva la capacidad para unirse a múltiples moléculas de HLA de clase II, según muestra el péptido de WT1 aislado del cual se deriva el péptido de la presente descripción.

La molécula de WT1 del cual se deriva un péptido de la presente invención tiene, en otras realizaciones, la secuencia:

**MGSDVVDLNALLPAVPSLGGGGCALPVSGAAQWAPVLDFAAPPASAYGSLGGPAPPAPP
PPPPPHSFIKQEPSWGGAEPEHEEQCLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPPSQASSGQAR
MFPNAPYLPSCLESQPAIRNQGYSTVTFDGTSPYGHTPSHHAAQFPNHSFKHEDPMGQQGSL
GEQQYSVPPVYGCHTPTDSTGSQALLLRTPYSSDNLYQMTSQLECMTWNQMNLGATLKG
VAAGSSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHTTPILCGAQYRIHHTGVFRGIQDVRRVPGVAPTLV
RSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHRSKHTGEKPYQCDFKDCERRFSRSDQLKRH
QRRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRHTGKTFSEKPFSCRWPSCQKKFARSDDELVRHH
NMHQRNMTKLQLAL (GenBank n.º de registro AY245105; SEQ ID No: 46)**

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

**AAEASAERLQGRRSRGASGSEPQQMGSDVVDLNALLPAVPSLGGGGCALPVSGAAQWAPV
LDFAPPASAYGSLGGPAPPAPPAPPAPPAPPSPHSFIKQEPSWGGAEPEHEEQCLSAFTVHFSGQFTG
TAGACRYGPFPPPPSQASSGQARMFPNAPYLPSCLESQPAIRNQGYSTVTFDGTSPYGHTPSH
HAAQFPNHSFKHEDPMGQQGSLGEQQYSVPPVYGCHTPTDSTGSQALLLRTPYSSDNLYQ
MTSQLECMTWNQMNLGATLKGHSTGYESDNHTTPILCGAQYRIHHTGVFRGIQDVRRVPGV
APTLVRSASETSEKRPFMCAYPGCNKRYFKLSHLQMHRSKHTGEKPYQCDFKDCERRFSRSD
QLKRHQRRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRHTGKTFSEKPFSCRWPSCQKKFARSDDELVR
HHNMHQRNMTKLQLAL (GenBank n.º de registro NM_000378; SEQ ID No: 47).**

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

**MQDPASTCVPEPASQHTLRSRGPGLQPEQQGVRDPGGIWAKLGAAEASAERLQGRRSRGA
SGSEPPQMGSDVRDLNALLPAVPSLGGGGCALPVSQAAQWAPVLDFAAPPASAYGSLGGP
APPPAPPPPPPPPHSFIKQEPSWGGAEPEEQCLSAFTVHFSGQFTGTAGACRYGPFPPPSQ
ASSGQARMFPNAPYLPSCLSQPAIRNQGYSTVTFDGTSPYGHTPSHHAAQFPNHSFKHEDPFM
GQQGSLGEQQYSVPPPVYGCHTPTDSCTGSQALLLRTPYSSDNLQMTSQLECMTWNQMNL
GATLKGVAAGSSSVKWTEGQSNHSTGYESDNHTTPILCGAQYRIHHTGVFRGIQDVRVPG
VAPTLVRSASETSEKRPFMCA YPGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTGEKPYQCDFKDCERRFSRS
DQLKRHRQRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKTHTRTHTGEKPFSCRWPSCQKKFARSDELV
RHHNMHQRNMTKLQAL (GenBank n.º de registro NP_077742; SEQ ID No: 48).**

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

**MGHHHHHHHHHSSGHIEGRHMRRVPGVAPTLVRSASETSEKRPFMCA YPGCNKRYFKLSH
LQMHSRKHTGEKPYQCDFKDCERRFFRSQDLKRHRQRHTGVKPFQCKTCQRKFSRSDHLKT
HTRTHTGEKPFSCRWPSCQKKFARSDELVRHHNMHQRNMTKLQAL (SEQ ID No: 43).**

- 5 En otras realizaciones, la proteína de WT1 comprende una de las secuencias indicadas en una de las siguientes entradas de secuencias de GenBank: NM_024426, NM_024425, NM_024424, N_000378, S95530, D13624, D12496, D12497, AH003034, o X77549. En otras realizaciones, la proteína de WT1 tiene una de las secuencias indicadas en una de las anteriores entradas de secuencias de GenBank. En otra realización, la proteína de WT1 es cualquier proteína de WT1 conocida en la técnica. En otra realización, la proteína de WT1 tiene cualquiera otra secuencia de WT1 conocida en la técnica.
- 10 En otro aspecto, un péptido de la presente invención se deriva de un fragmento de una proteína de WT1. En otro aspecto, el proceso de derivación comprende la introducción de la mutación puntual en los restos de anclaje del motivo de unión a la molécula de HLA de clase I. En otro aspecto, el proceso de derivación consiste en la introducción de la mutación puntual en los restos de anclaje del motivo de unión a la molécula de HLA de clase I. En otro aspecto, un péptido de la presente invención se diferencia del correspondiente fragmento de una proteína de
- 15 WT1 solo por la mutación puntual en el resto de anclaje del motivo de unión de una molécula de HLA de clase I. En otro aspecto, un motivo de unión de una molécula de HLA de clase I de un péptido de la presente invención se diferencia de la correspondiente secuencia de WT1 solo por la mutación puntual en el resto de anclaje. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.
- 20 En otro aspecto, el proceso de derivación de un péptido de la presente invención comprende además una o más modificaciones de un aminoácido (AA) para producir un análogo de AA. En otro aspecto, el proceso de derivación comprende además una modificación de uno o más enlaces peptídicos que conectan dos o más de los AA. En otro aspecto, el análogo de AA o la modificación del enlace peptídico es uno de los análogos de AA o una de las modificaciones del enlace peptídico enumeradas a continuación. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.
- 25 El fragmento no mutado de una proteína de WT1 de la cual se deriva un péptido de la presente invención (el "homólogo" en la secuencia de tipo salvaje), en otra realización, tiene la secuencia SGQARMFPNAPYLPSCL (SEQ ID NO:39). Con respecto al péptido adicional de las composiciones de la invención, el fragmento de WT1 no mutado puede tener la secuencia QARMFPNAPYLPSCL (SEQ ID NO:40), LVRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO:1, ejemplo 3), RDELVRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO:2; ejemplo 3), NKRYFKLSHLQMHSR (SEQ ID NO:3; ejemplo 3), o PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO:4; ejemplo 3). El fragmento de WT1 no mutado puede ser cualquier otro fragmento de WT1 que contenga un motivo de unión de una molécula de HLA de clase II. El fragmento de WT1 no mutado puede ser cualquier otro fragmento de WT1 que contenga un motivo de unión de una molécula de HLA-DR. El fragmento de WT1 no mutado puede contener múltiples motivos de unión a una molécula de HLA-DR. El fragmento de WT1 no mutado puede ser cualquier otro fragmento de WT1 que contenga un motivo
- 30 de unión de una molécula de HLA-DRB. El fragmento de WT1 no mutado puede contener múltiples motivos de unión a una molécula de HLA-DRB. Los métodos para diseñar y derivar el péptido de la presente invención se describen, por ejemplo, en los ejemplos 3 y 5.
- 35 En otro aspecto, un péptido de la presente invención se diferencia de su homólogo solo en la mutación puntual que contiene. En otro aspecto, un péptido de la presente invención se diferencia de su homólogo solo en una mutación en el resto o restos de anclaje de HLA de clase I. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.
- 40 En otra realización, un péptido de la presente invención conserva la capacidad para unirse a una molécula de HLA de clase II, tal como muestra el fragmento de WT1 no mutado del que se deriva el péptido. En otra realización, un péptido de la presente invención conserva la capacidad para unirse a múltiples moléculas de HLA de clase II, tal

como muestra el fragmento de WT1 no mutado. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

El motivo de unión de una molécula de HLA de clase I contenido en un péptido de la presente invención, en otra realización, tienen la secuencia YMFPNAPYL (SEQ ID NO:6). En los péptidos adicionales de las composiciones de la invención, el motivo puede tener la secuencia YLGEQQYSV (SEQ ID NO: 8), YLLPAVPSL (SEQ ID NO:10), YLGATLKGV (SEQ ID NO:12), YLNALLPAV (SEQ ID NO:14), GLRRGIQDV (SEQ ID NO:16), KLYFKLSHL (SEQ ID NO:18), ALLLRTPYV (SEQ ID NO:20), YMTWNQMNL (SEQ ID NO:22), NMYQRNMTK (SEQ ID NO:24), NMHQVRMTK (SEQ ID NO:25), NMYQVRMTK (SEQ ID NO:26), QMYLGATLK (SEQ ID NO:28), QMNLGVTLK (SEQ ID NO:29), QMYLGVTLK (SEQ ID NO:30), FMYAYPGCNK (SEQ ID NO:32), FMCAYPFCNK (SEQ ID NO:33), FMYAYPFCNK (SEQ ID NO:34), KLYHLQMHSR (SEQ ID NO:36), KLSHLQMHSK (SEQ ID NO:37) o KLYHLQMHSK (SEQ ID NO:38). El motivo puede contener cualquier otro motivo de HLA de clase I conocido en la técnica. El motivo puede contener cualquier otro motivo de HLA-A conocido en la técnica.

En la presente también se describe un péptido aislado que comprende la secuencia de AA GATLKGVAAGSSSVKWT (SEQ ID NO:44, "WT1 244" de los ejemplos). Tal como se describe también en la presente, la secuencia de AA del péptido aislado consiste en SEQ ID NO: 44. Tal como se describe también en la presente, la secuencia de AA del péptido aislado consiste en un fragmento de SEQ ID NO: 44. Tal como se describe también en la presente, la secuencia de AA del péptido aislado comprende un fragmento de SEQ ID NO: 44.

Un "péptido," en otra realización de los métodos y las composiciones de la presente invención, se refiere a un compuesto de subunidades de AA conectadas mediante enlaces peptídicos. En otro aspecto, el péptido comprende un análogo de AA. En otro aspecto, el péptido es un peptidomimético. En otro aspecto, un péptido de la presente invención comprende uno de los análogos de AA enumerados a continuación. Las subunidades, en otro aspecto, están unidas mediante enlaces peptídicos. En otro aspecto, la subunidad está unida mediante otro tipo de enlace, por ejemplo, éster, éter, etc. En otro aspecto, un péptido de la presente invención es uno de los tipos de peptidomiméticos enumerados a continuación. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

En otra realización, un péptido de los métodos y las composiciones de la presente invención se une con alta afinidad a la molécula de HLA de clase I cuyo motivo de unión está contenido en su interior. Por ejemplo, los péptidos WT1-A1, B1, y C1 muestran una unión estable a HLA-A0201 (ejemplo 1). En otras realizaciones, la molécula de HLA de clase I es cualquier molécula de HLA de clase I enumerada en la presente. En otra realización, el péptido se une a la molécula de HLA de clase I con afinidad intermedia. En otra realización, el péptido se une a la molécula de HLA de clase I con afinidad significativa. En otra realización, el péptido se une a la molécula de HLA de clase I con afinidad mensurable. En otra realización, el péptido muestra una unión estable a la molécula de HLA de clase I. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, un péptido de los métodos y las composiciones de la presente invención se une con alta afinidad a la molécula de HLA de clase II cuyo motivo de unión está contenido en su interior. En otras realizaciones, la molécula de HLA de clase I es cualquier molécula de HLA de clase II enumerada en la presente. En otra realización, el péptido se une con alta afinidad a más de una molécula de HLA de clase II. En otra realización, el péptido se une a la molécula de HLA de clase II con afinidad intermedia. En otra realización, el péptido se une con afinidad intermedia a más de una molécula de HLA de clase II. En otra realización, el péptido se une a la molécula de HLA de clase II con afinidad significativa. En otra realización, el péptido se une con afinidad significativa a más de una molécula de HLA de clase II. En otra realización, el péptido se une a la molécula de HLA de clase II con afinidad mensurable. En otra realización, el péptido se une con afinidad mensurable a más de una molécula de HLA de clase II. En otra realización, el péptido muestra una unión estable a la molécula de HLA de clase II. En otra realización, el péptido muestra una unión estable a más de una molécula de HLA de clase II. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, un péptido de los métodos y las composiciones de la presente invención se une a una molécula de HLA de clase I y a una molécula de HLA de clase II con afinidad significativa. En otra realización, el péptido se une a una molécula de HLA de clase I y a una molécula de HLA de clase II con alta afinidad. En otra realización, el péptido se une a una molécula de HLA de clase I y a una molécula de HLA de clase II con afinidad intermedia. En otra realización, el péptido se une a una molécula de HLA de clase I y a una molécula de HLA de clase II con afinidad mensurable. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

Un "fragmento," tal como se describe en la presente, se refiere a un péptido con una longitud de 11 o más AA. Tal como también se describe en la presente, un fragmento de péptido tiene una longitud de 16 o más AA, o el fragmento tiene una longitud de 12 o más AA, o el fragmento tiene una longitud de 13 o más AA, o el fragmento tiene una longitud de 14 o más AA, o el fragmento tiene una longitud de 15 o más AA, o el fragmento tiene una longitud de 17 o más AA, o el fragmento tiene una longitud de 18 o más AA, o el fragmento tiene una longitud de 19 o más AA, o el fragmento tiene una longitud de 22 o más AA, o el fragmento tiene una longitud de 8-12 AA, o el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 8-12 AA, o el fragmento tiene una longitud de 16-19 AA, o el fragmento tiene una longitud de 16-19 AA, o el fragmento tiene una longitud de 10-25 AA, o el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 10-25 AA, o el fragmento tiene cualquier otra longitud.

El péptido de WT1 adicional, en otra realización, tiene la secuencia QARMFPNAPYLPSC (SEQ ID NO:40). En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia QARMFPNAPYLPSC; En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia LVRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO:1). En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia LVRHHNMHQRNMTKL. En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia RDELVRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO: 2). En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia RDELVRHHNMHQRNMTKL. En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia NKRYFKLSHLQMHSR (SEQ ID NO: 3). En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia NKRYFKLSHLQMHSR. En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO:4). En otra realización, el péptido de WT1 adicional comprende la secuencia PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG. En otra realización, el péptido de WT1 adicional tiene una secuencia seleccionada de las secuencias indicadas en SEQ ID NO:5-38. En otra realización, el péptido de WT1 adicional es un péptido heteroclitico que tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:5-38. En otra realización, el péptido de WT1 adicional es un péptido de tipo salvaje que tiene una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:5-38. En otra realización, el péptido de WT1 adicional es otro péptido de WT1 heteroclitico. En otra realización, el péptido de WT1 adicional es otro péptido de WT1 de tipo salvaje.

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

Cada combinación del péptido es de SEQ ID NO:41 y al menos otro péptido de WT1 representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el péptido de WT1 adicional tiene una longitud de 8-22 AA. En otra realización, el péptido de WT1 adicional tiene una longitud de 8-30 AA. En otra realización, el péptido de WT1 adicional tiene una longitud de 11-30 AA. En otra realización, la longitud es de 16-22 AA. En otra realización, la longitud es de 19AA. En otra realización, el péptido tiene una longitud de 15-23 AA. 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 16-24 AA. En otra realización, la longitud es de 16-22 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.

En otra realización, el péptido de WT1 adicional tiene cualquier otra longitud. Cada posibilidad representa una realización separada de las composiciones de la presente invención.

En otra realización, un péptido de los métodos y las composiciones de la presente invención se une a una molécula de HLA de clase II con una afinidad significativa, mientras que un péptido derivado del péptido original se une a una molécula de HLA de clase I con una afinidad significativa.

En otro aspecto, la "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 otro aspecto, una "alta afinidad" se refiere a una afinidad que es tal que se requiere una concentración de aproximadamente 500 nanomolar (nM) o menor del péptido para lograr una inhibición del 50% de la unión de un péptido patrón. En otro aspecto, se requiere una concentración de aproximadamente 400 nM o menor del péptido. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 300 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 200 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 150 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 100 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 80 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 60 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 40 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 30 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 20 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 15 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 10 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 4 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 3 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 2 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 1,5 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 1 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 0,8 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 0,6 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 0,5 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 0,4 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de 0,3 nM. En otro aspecto, la afinidad de unión es de menor que 0,3 nM.

En otro aspecto, la "afinidad" se refiere a una medida de la fuerza de unión a la molécula de MHC. En otro aspecto, la afinidad se mide empleando un método conocido en la técnica para medir las afinidades de unión competitiva. En

otro aspecto, la afinidad se mide empleando un método conocido en la técnica para medir las afinidades de unión relativa. En otro aspecto, el método es un ensayo de unión competitiva. En otro aspecto, el método es un radioinmunoensayo o RIA. En otro aspecto, el método es un análisis BiaCore. En otro aspecto, el método es cualquier otro método conocido en la técnica. En otro aspecto, el método produce una IC50 relacionada con una IC50 de un péptido de referencia de afinidad conocida.

Cada tipo de afinidad y el método de medir la afinidad representan un aspecto separado de la presente descripción.

En otro aspecto, una "alta afinidad" se refiere a una IC50 de 0,5-100 nM. En otros aspectos, la IC50 es de 1-100 nM, la IC50 es de 1,5-200 nM, la IC50 es de 2-100 nM, la IC50 es de 3-100 nM, la IC50 es de 4-100 nM, la IC50 es de 6-100 nM, la IC50 es de 10-100 nM, la IC50 es de 30-100 nM, la IC50 es de 3-80 nM, la IC50 es de 4-60 nM, la IC50 es de 5-50 nM, la IC50 es de 6-50 nM, la IC50 es de 8-50 nM, la IC50 es de 10-50 nM, la IC50 es de 20-50 nM, la IC50 es de 6-40 nM, la IC50 es de 8-30 nM, la IC50 es de 10-25 nM, la IC50 es de 15-25 nM. Cada afinidad e intervalo de afinidades representa un aspecto separado de la presente descripción.

En otro aspecto, una "afinidad intermedia" se refiere a una IC50 de 100-500 nM. En otros aspectos, la IC50 es de 100-300 nM, la IC50 es de 100-200 nM, la IC50 es de 50-100 nM, la IC50 es de 50-80 nM, la IC50 es de 50-60 nM. Cada afinidad e intervalo de afinidades representa un aspecto separado de la presente descripción.

Una "afinidad significativa" se refiere, en otro aspecto, a una afinidad suficiente para mediar en el reconocimiento de una célula diana por una célula T que porta un receptor de células T (TCR) que reconoce el complejo de molécula de MHC-péptido. En otro aspecto, la expresión se refiere a una afinidad suficiente para mediar en el reconocimiento de una célula de cáncer por una célula T que porta un TCR que reconoce el complejo de molécula de MHC-péptido. En otro aspecto, el término se refiere a una afinidad suficiente para mediar en la activación de una célula T no expuesta por una célula dendrítica que presenta el péptido. En otro aspecto, el término se refiere a una afinidad suficiente para mediar en la activación de una célula T no expuesta por una APC que presenta el péptido. En otro aspecto, el término se refiere a una afinidad suficiente para mediar en la reactivación de una célula T de memoria por una célula dendrítica que presenta el péptido. En otro aspecto, el término se refiere a una afinidad suficiente para mediar en la reactivación de una célula T de memoria por una APC que presenta el péptido. En otro aspecto, el término se refiere a una afinidad suficiente para mediar en la reactivación de una célula T de memoria por una célula somática que presenta el péptido. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

Una "afinidad mensurable" se refiere, en otro aspecto, a una afinidad suficiente para ser mensurable en un ensayo inmunológico. En otro aspecto, el ensayo inmunológico es cualquier ensayo enumerado en la presente. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

En otro aspecto, un péptido de los métodos y las composiciones de la presente invención se une a una superfamilia de moléculas de HLA. Las superfamilias de moléculas de HLA comparten motivos de unión muy similares o idénticos. En otra realización, la superfamilia es una superfamilia de HLA de clase I. En otra realización, la superfamilia es una superfamilia de HLA de clase II. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

Las expresiones "péptido de unión a HLA," "péptido de unión a una molécula de HLA de clase I," y "péptido de unión a una molécula de HLA de clase II" se refieren a un péptido que se une a una molécula de HLA con afinidad mensurable. Las expresiones se refieren a un péptido que se une a una molécula de HLA con alta afinidad. Las expresiones se refieren a un péptido que se une a una molécula de HLA con afinidad suficiente para activar un precursor de células T. En otro aspecto, las expresiones se refieren a un péptido que se une a una molécula de HLA con una afinidad suficiente para mediar en el reconocimiento por una célula T. La molécula de HLA es, en otro aspecto, cualquiera de las moléculas de HLA enumeradas en la presente. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

En otro aspecto, un péptido de los métodos y las composiciones de la presente invención es heteroclítico. "Heteroclítico" se refiere, en otra realización, a un péptido que genera una respuesta inmunológica que reconoce el péptido original del cual se deriva el péptido heteroclítico (por ejemplo, el péptido que no contiene las mutaciones de los restos de anclaje). En otro aspecto, el "péptido original" se refiere a un fragmento de una proteína de WT1. Por ejemplo, un péptido denominado "WT1 122A1," que tiene la secuencia SGQAYMFPNAPYLPSCLLES (SEQ ID NO:41), se genera a partir del péptido de WT1 de tipo salvaje SGQARMFPNAPYLPSCLLES (SEQ ID NO:39) mediante una mutación del resto 5 a arginina (ejemplo 5). La mutación introduce el péptido heteroclítico WT1A1 de CD8⁺ YMFNAPYL (SEQ ID NO:6) en el péptido de WT1. "Heteroclítico" puede referirse a un péptido que genera una respuesta inmunológica que reconoce el péptido original del cual se deriva el péptido heteroclítico, siendo la respuesta inmunológica generada por una vacunación con el péptido heteroclítico mayor que la respuesta inmunológica generada por una vacunación con el péptido original. Una respuesta inmunológica "heteroclítica" puede referirse a una respuesta inmunológica que reconoce el péptido original del cual se deriva el péptido mejorado (por ejemplo, el péptido que no contiene las mutaciones de los restos de anclaje) o a una respuesta inmunológica que reconoce el péptido original del cual se deriva el péptido heteroclítico, siendo la respuesta inmunológica generada por una vacunación con el péptido heteroclítico mayor que la respuesta inmunológica generada por una

vacunación con el péptido original. La magnitud de la respuesta inmunológica generada por una vacunación con el péptido heteroclítico puede ser mayor que una respuesta inmunológica sustancialmente igual a la respuesta a una vacunación en el péptido original. La magnitud de la respuesta inmunológica generada por una vacunación con el péptido heteroclítico puede ser mayor que una respuesta inmunológica menor que la respuesta a una vacunación en el péptido original.

Un péptido heteroclítico puede ser un péptido heteroclítico de HLA de clase I o un péptido heteroclítico de HLA de clase II. Un péptido heteroclítico de clase II puede estar mutado en un resto de unión de clase II. Un péptido heteroclítico de clase II puede identificarse y ensayarse de una manera análoga a la identificación y el ensayo de péptidos heteroclíticos de HLA de clase I, tal como se ejemplifica en la presente.

Los "motivos de anclaje" o "restos de anclaje" pueden referirse a uno o a un conjunto de restos preferidos en posiciones concretas de una secuencia de unión a HLA. Por ejemplo, los restos en las posiciones 1, 2, 3, 6, y 9 se emplean como restos de anclaje en los ejemplos en la presente. 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 que se corresponden con los motivos de anclaje pueden ser las posiciones que desempeñan un papel significativo en la unión de la molécula de HLA. El resto de anclaje puede ser un motivo de anclaje primario o un motivo de anclaje secundario.

Los métodos para identificar epitopos de MHC de clase II son muy conocidos en la técnica. El epitopo de MHC de clase II puede ser predicho empleando TEPITOPE (Meister G.E., Roberts C.G. *et al.*, Vaccine, 1995, 13:581-591). El epitopo de MHC de clase II puede identificarse empleando EpiMatrix (De Groot A.S., Jesdale B.M. *et al.*, AIDS Res Hum Retroviruses, 1997, 13:529-531). El epitopo de MHC de clase II puede identificarse empleando el método Predict (Yu K., Petrovsky N. *et al.*, Mol. Med., 2002, 8:137-148). El epitopo de MHC de clase II puede identificarse empleando el algoritmo de predicción de epitopos SYFPEITHI (ejemplos). SYFPEITHI es una base de datos que comprende más de 4500 secuencias peptídicas que se sabe que se unen a moléculas de MHC de clase I y de clase II. SYFPEITHI proporciona una puntuación basada en la presencia de ciertos aminoácidos en ciertas posiciones a lo largo del surco de unión a MHC. Los anclajes de aminoácidos ideales se valoran con 10 puntos, los anclajes poco habituales valen 6-8 puntos, los anclajes auxiliares valen 4-6 puntos, y los restos preferidos valen 1-4 puntos; el efecto negativo sobre la unión de un aminoácidos puntúa entre -1 y -3. La puntuación máxima para HLA-A*0201 es 36.

El epitopo de MHC de clase II puede identificarse empleando Rankpep. Rankpep emplea matrices de puntuación específicas de posición (PSSM) o perfiles procedentes de conjuntos de péptidos alineados que se sabe que se unen a una molécula de MHC concreta como predictor de la unión del péptido a MHC. Rankpep incluye información acerca de la puntuación del péptido y el porcentaje óptimo o la puntuación percentil del péptido predicha, con relación a una secuencia consenso que produce la puntuación máxima, con el perfil seleccionado. Rankpep incluye una selección de 102 y 80 PSSM para la predicción de la unión del péptido a moléculas de MHC I y MHC II, respectivamente. Habitualmente están disponibles varios PSSM para la predicción de ligantes peptídicos de diferente tamaño para cada molécula de MHC I.

El epitopo de MHC de clase II puede identificarse empleando SVMHC (Donnes P., Elofsson A., Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC, BMC Bioinformatics, 11 de sep., 2002, 3:25). El epitopo de MHC de clase II puede identificarse empleando cualquier otro método conocido en la técnica. Los anteriores métodos pueden utilizarse para saber si la unión de MHC de clase II pueda resultar perturbada por la introducción de una mutación de un resto de anclaje de MHC de clase I en la secuencia de WT1.

Los métodos para identificar epitopos de MHC de clase I son muy conocidos en la técnica. El epitopo de MHC de clase I puede predecirse empleando el programa informático BIMAS (ejemplo 1). La puntuación de BIMAS se basa en el cálculo de la semivida teórica del complejo de MHC-I/ β_2 -microglobulina/péptido, que es una medición de la afinidad de unión del péptido. El programa emplea información acerca de péptidos de HLA-I con una longitud de 8-10 aminoácidos. Cuanto mayor sea la afinidad de unión de un péptido por el MHC, mayor es la probabilidad de que este péptido represente un epitopo. El algoritmo BIMAS supone que cada aminoácido en el péptido contribuye independientemente a la unión a la molécula de clase I. Los restos de anclaje dominantes, que son fundamentales para la unión, tienen unos coeficientes en las tablas que son significativamente mayores que 1. Los aminoácidos desfavorables tienen unos coeficientes positivos menores que 1. Si no se sabe si un aminoácidos tiene una contribución favorable o desfavorable a la unión, entonces se le asigna el valor de 1. Todos los valores asignados a los aminoácidos se multiplican, y la puntuación de actuación resultante se multiplica por una constante para producir un cálculo de la semivida de disociación.

El epitopo de MHC de clase I puede identificarse empleando SYFPEITHI. El epitopo de MHC de clase I puede identificarse empleando SVMHC (Donnes P., Elofsson A., Prediction of MHC class I binding peptides, using SVMHC, BMC Bioinformatics, 11 de sep., 2002, 3:25). El epitopo de MHC de clase I puede identificarse empleando NetMHC-2.0 (Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a 'Query by Committee' artificial neural network approach, Buus S., Lauemoller S.L., Worning P., Kesmir C., Frimurer T., Corbet S., Fomsgaard A., Hilden J., Holm A., Brunak S., Tissue Antigens., 62:378-384, 2003). El epitopo de MHC de clase I puede identificarse empleando cualquier otro método conocido en la técnica. Los anteriores métodos pueden utilizarse para identificar los epitopos

de MHC de clase II que pueden ser creados por la introducción de una mutación de un resto de anclaje en la secuencia de WT1.

5 Una mutación que potencia la unión de MHC puede producirse en el resto en la posición 1 del motivo de unión de HLA de clase I. En una realización el resto se cambia a tirosina. Tal como se describe en la presente, el resto se cambia a glicina, o el resto se cambia a treonina, o el resto se cambia a fenilalanina, o el resto se cambia a cualquier otro resto conocido en la técnica. Una sustitución en la posición 1 a tirosina puede estabilizar la unión del resto de anclaje de la posición 2.

10 La mutación puede estar en la posición 2 del motivo de anclaje de HLA de clase I. Tal como se describe en la presente, el resto se cambia a leucina, a valina, a isoleucina, a metionina o a cualquier otro resto conocido en la técnica.

La mutación puede estar en la posición 6 del motivo de anclaje de HLA de clase I. Tal como se describe en la presente, el resto se cambia a valina, a cisteína, a glutamina, a histidina o a cualquier otro resto conocido en la técnica.

15 La mutación puede estar en la posición 9 del motivo de anclaje de HLA de clase I. Tal como se describe también en la presente, la mutación cambia el resto en su posición C-terminal. Tal como se describe también en la presente, el resto se cambia a valina, a treonina, a isoleucina, a leucina, a alanina, a cisteína o a cualquier otro resto conocido en la técnica.

20 La mutación puntual puede ser en un resto de anclaje primario. Tal como se describe también en la presente, los restos de anclaje primarios de HLA de clase I están en las posiciones 2 y 9. La mutación puntual puede ser en un resto de anclaje secundario. Tal como se describe también en la presente, los restos de anclaje secundarios de HLA de clase I están en las posiciones 1 y 8. Tal como se describe también en la presente, los restos de anclaje secundarios de HLA de clase I están en las posiciones 1, 3, 6, 7 y 8. Tal como se describe también en la presente, la mutación puntual está en una posición seleccionada entre las posiciones 4, 5, y 8.

25 Tal como se describe también en la presente, la mutación puntual está en uno o más restos en las posiciones seleccionadas de las posiciones 1, 2, 8, y 9 del motivo de unión de HLA de clase I. Tal como se describe también en la presente, la mutación puntual está en uno o más restos en las posiciones seleccionadas de las posiciones 1, 3, 6, y 9. Tal como se describe también en la presente, la mutación puntual está en uno o más restos en las posiciones seleccionadas de las posiciones 1, 2, 6, y 9. Tal como se describe también en la presente, la mutación puntual está en uno o más restos en las posiciones seleccionadas de las posiciones 1, 6, y 9. Tal como se describe también en la presente, la mutación puntual está en uno o más restos en las posiciones seleccionadas de las posiciones 1, 2, y 9. Tal como se describe también en la presente, la mutación puntual está en uno o más restos en las posiciones seleccionadas de las posiciones 1, 3, y 9. Tal como se describe también en la presente, la mutación puntual está en uno o más restos en las posiciones seleccionadas de las posiciones 2 y 9. Tal como se describe también en la presente, la mutación puntual está en uno o más restos en las posiciones seleccionadas de las posiciones 6 y 9.

35 La mutación puede estar en la posición 4, la posición 5, la posición 7 o la posición 8 del motivo de unión de HLA de clase I.

40 Tal como se proporcionan en la presente, ciertos péptidos de la presente descripción muestran una capacidad significativa para estimular células T CD4⁺ y CD8⁺ (ejemplos 6-10). Además, los péptidos muestran una actividad inmunoestimuladora potenciada, con relación a los péptidos nativos de los cuales se derivan. Además, los péptidos muestran una capacidad para coestimular respuestas inmunológicas CD4⁺ y CD8⁺ a la proteína de WT1. Además, los péptidos muestran una capacidad para estimular una respuesta inmunológica anti-WT1 que comprende células T CD4⁺ y CD8⁺.

45 En otro aspecto, el sitio de unión de HLA de clase II en un péptido adicional de las composiciones de la presente invención se crea o se mejora mediante la mutación de un resto de anclaje del motivo de HLA de clase II. En otro aspecto, el resto de anclaje que se modifica está en la posición P1. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P2. En otra realización, el resto de anclaje está en la posición P6. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P9. En otro aspecto, el resto de anclaje se selecciona de las posiciones P1, P2, P6, y P9. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P3. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P4. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P5. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P6.

50 En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P8. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P10. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P11. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P12. En otro aspecto, el resto de anclaje está en la posición P13. En otro aspecto, el resto de anclaje está en cualquier otro resto de anclaje de una molécula de HLA de clase II que sea conocido en la técnica. En otro aspecto, los restos distintos de P1, P2, P6, y P9 actúan como restos de anclaje secundarios; por tanto, su mutación puede mejorar la unión de HLA de clase II. En otro aspecto, se muta cualquier combinación de los anteriores restos.

55 Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

En otra realización, la presente invención proporciona el péptido aislado de SEQ ID NO:41 para su uso para inducir una respuesta inmunológica antimesotelioma en un sujeto, que comprende la etapa de poner en contacto el sujeto con una composición inmunogénica que comprende dicho péptido.

5 En otra realización, la presente invención proporciona el péptido aislado de SEQ ID NO:41 para su uso para tratar un sujeto con un mesotelioma, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición inmunogénica que comprende dicho péptido.

10 En otra realización, la presente invención proporciona el péptido aislado de SEQ ID NO:41 para su uso para reducir la incidencia de un mesotelioma, o su recaída, en un sujeto, que comprende la etapa de administrar al sujeto una composición inmunogénica que comprende dicho péptido, reduciendo con ello la incidencia de un mesotelioma, o su recaída, en un sujeto.

15 Tal como se proporciona en la presente, las células de mesotelioma expresan la proteína de WT1 (ejemplo 10). Además, las células de mesotelioma procesan y presentan los péptidos de la presente invención o los correspondientes péptidos nativos (ejemplo 6). Además, la presentación es lo suficientemente robusta como para suscitar una respuesta inmunológica anti-WT1 específica (ejemplo 6). Por tanto, las células de mesotelioma pueden ser tratadas mediante una terapia inmunológica anti-WT1.

20 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, al porcentaje de restos AA en la secuencia candidata que son idénticos a los restos de un correspondiente polipéptido nativo, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los métodos y los programas informáticos para el alineamiento son muy conocidos en la técnica.

25 En otra realización, el término "homología," cuando hace referencia a cualquier secuencia de ácido nucleico, indica, de modo similar, el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos de una correspondiente secuencia de ácido nucleico nativa.

30 La homología, en otra realización, se determina mediante un algoritmo informático para el alineamiento de secuencias, por medio de métodos bien descritos en la técnica. En otras realizaciones, el análisis con algoritmos informáticos de la homología de secuencia de ácidos nucleicos incluye la utilización de cualquiera de los paquetes de software disponibles, tales como, por ejemplo, los paquetes BLAST, DOMAIN, BEAUTY (BLAST Enhanced Alignment Utility), GENPEPT y TREMBL.

En otra realización, la "homología" se refiere a la identidad con una secuencia peptídica adicional seleccionada de SEQ ID NO:1-4, 6, 39, 41, y 42 mayor que 70%, 72%, 75%, 78%, 80%, 82%, 83%, 85%, 87%, 88%, 90%, 92%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%.

35 En otro aspecto, 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 otros aspectos, los métodos de hibridación se realizan bajo condiciones de moderadas a rigurosas, con el complemento de un ADN que codifica un péptido de caspasa nativo. Las condiciones de hibridación son, por ejemplo, una incubación durante la noche a 42 °C en una disolución que comprende: formamida al 10-20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado 20 µg/ml.

Cada uno de los anteriores homólogos y variantes de los péptidos enumerados en los ejemplos representa un aspecto separado de las composiciones de la presente descripción.

45 En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido de SEQ ID NO:41. 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 de SEQ ID NO:41 y al menos otro péptido descrito en la presente. En otra realización, la composición comprende además cualquiera de los aditivos, compuestos o excipientes indicados a continuación. En otra
50 realización, el adyuvante es 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 la presente. En otras realizaciones, el adyuvante es cualquier adyuvante enumerado en la presente. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

55 En otra realización, esta invención proporciona una vacuna que comprende el 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 combinación de un vehículo y un adyuvante. En otra realización, la vacuna comprende además una APC. En otra realización, la vacuna comprende además una

combinación de una APC y un vehículo o un adyuvante. En otra realización, la vacuna es una composición basada en células. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

5 En otra realización, esta invención proporciona una composición inmunogénica que comprende el péptido de SEQ ID NO:41. En otra realización, la composición inmunogénica comprende además un vehículo. En otra realización, la composición inmunogénica comprende además un adyuvante. En otra realización, la composición inmunogénica comprende además una combinación de un vehículo y un adyuvante. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

10 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 a una enfermedad concreta, trastorno o síntoma de estos. En otra realización, esta invención comprende vacunas basadas en péptidos, en las que el péptido comprende cualquier realización listada en la presente, y opcionalmente incluye además compuestos inmunomoduladores, tales como citoquinas, adyuvantes, etc.

15 En otras realizaciones, una composición o 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 emulgente refinado. En otra realización, el adyuvante es GM-CSF. En otra realización, el adyuvante es KLH. El GM-CSF recombinante es una proteína del crecimiento humano, en otra realización, en un vector de levadura (*S. cerevisiae*). El GM-CSF estimula la expansión clonal y la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas, APC, y células dendríticas y células T.

20 En otra realización, el adyuvante es una citoquina. En otra realización, el adyuvante es un factor del crecimiento. En otra realización, el adyuvante es una población celular. 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 interleuquina. En otra realización, el adyuvante es una quimioquina. En otra realización, el adyuvante es cualquier otro tipo de adyuvante conocido en la técnica. En otra realización, la vacuna de WT1 comprende dos de los anteriores adyuvantes. En otra realización, la vacuna de WT1 comprende más de dos de los anteriores adyuvantes. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

30 En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende el péptido de SEQ ID NO:41. En otra realización, la célula es una célula presentadora de antígenos. En otra realización, la presente invención proporciona una composición o una vacuna que comprende una célula presentadora de antígenos de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido de SEQ ID NO:41. En otra realización, la presente invención proporciona una composición o una vacuna que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención.

35 En otra realización, la presente invención proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una composición o una vacuna que comprende un vector de la presente invención.

40 En otras realizaciones, una composición o una vacuna de la presente invención puede comprender un péptido de SEQ ID NO:41 en combinación con cualquiera de los péptidos de WT1 descritos en la presente. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona una composición o una vacuna que comprende un péptido de SEQ ID NO:41 y otro péptido de WT. En otra realización, la composición o la vacuna comprende un péptido de SEQ ID NO:41 y otros dos péptidos de WT. En otra realización, la composición comprende un péptido de SEQ ID NO: 41 y más otros dos péptidos de WT.

45 Tal como se describe en la presente, una composición comprende dos péptidos que se derivan del mismo fragmento de WT1, y cada uno contiene un péptido heteroclítico de HLA de clase I diferente. Tal como se describe también en la presente, los dos péptidos heteroclíticos de HLA de clase I contienen mutaciones en diferentes restos de anclaje de la molécula de HLA de clase I. Tal como se describe también en la presente, los dos péptidos heteroclíticos de HLA de clase I contienen mutaciones diferentes en el mismo o los mismos restos de anclaje.

50 En otro aspecto, los péptidos en una composición de la presente invención se unen a dos moléculas de HLA de clase II distintas. En otro aspecto, los péptidos se unen a tres moléculas de HLA de clase II distintas. En otro aspecto, los péptidos se unen a cuatro moléculas de HLA de clase II distintas. En otro aspecto, los péptidos se unen a cinco moléculas de HLA de clase II distintas. En otro aspecto, los péptidos se unen a más de cinco moléculas de HLA de clase II distintas. En otro aspecto, los péptidos en la composición se unen a las mismas moléculas de HLA de clase II.

55

- 5 En otro aspecto, cada uno de los péptidos en una composición de la presente invención se une a un conjunto de moléculas de HLA de clase II. En otro aspecto, cada uno de los péptidos se une a un conjunto diferente de moléculas de HLA de clase II. En otro aspecto, los péptidos en la composición se unen al mismo conjunto de moléculas de HLA de clase II. En otro aspecto, dos de los péptidos se unen a un conjunto diferente, pero solapante, de moléculas de HLA de clase II. En otro aspecto, dos o más de los péptidos se unen al mismo conjunto de moléculas de HLA de clase II, mientras que otro de los péptidos se une a un conjunto distinto. En otro aspecto, dos o más de los péptidos se unen a un conjunto solapante de moléculas de HLA de clase II, mientras que otro de los péptidos se une a un conjunto distinto.
- 10 En otro aspecto, los péptidos en una composición de la presente invención se unen a dos moléculas de HLA de clase I distintas. En otro aspecto, los péptidos se unen a tres moléculas de HLA de clase I distintas. En otro aspecto, los péptidos se unen a cuatro moléculas de HLA de clase I distintas. En otro aspecto, los péptidos se unen a cinco moléculas de HLA de clase I distintas. En otro aspecto, los péptidos se unen a más de cinco moléculas de HLA de clase I distintas. En otro aspecto, los péptidos en la composición se unen a las mismas moléculas de HLA de clase I.
- 15 En otro aspecto, cada uno de los péptidos en una composición de la presente invención se une a un conjunto de moléculas de HLA de clase I. En otro aspecto, cada uno de los péptidos se une a un conjunto diferente de moléculas de HLA de clase I. En otro aspecto, los péptidos en la composición se unen al mismo conjunto de moléculas de HLA de clase I. En otro aspecto, dos de los péptidos se unen a un conjunto diferente, pero solapante, de moléculas de HLA de clase I. En otro aspecto, dos o más de los péptidos se unen al mismo conjunto de moléculas de HLA de clase I, mientras que otro de los péptidos se une a un conjunto distinto. En otro aspecto, dos o más de los péptidos se unen a un conjunto solapante de moléculas de HLA de clase I, mientras que otro de los péptidos se une a un conjunto distinto.
- 20 En otro aspecto, un "conjunto de moléculas de HLA de clase II" o "conjunto de moléculas de HLA de clase I" se refiere a las moléculas de HLA codificadas por diferentes alelos en un locus particular. En otro aspecto, la expresión se refiere a moléculas de HLA con una especificidad de unión concreta. En otro aspecto, la expresión se refiere a moléculas de HLA con una secuencia consenso peptídica concreta. En otro aspecto, la expresión se refiere a una superfamilia de moléculas de HLA de clase II. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.
- 25 Cada una de las anteriores composiciones y tipos de composiciones representa un aspecto separado de la presente descripción.
- 30 Cualquiera de las realizaciones descritas en la presente relacionadas con los péptidos, las composiciones y las vacunas de esta descripción puede emplearse en cualquiera de los usos de esta descripción. Cada combinación de péptido, composición o vacuna con un uso representa un aspecto separado de esta.
- 35 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido de SEQ ID NO:41, una composición de la presente invención, o una composición inmunogénica, tal como una vacuna de la presente invención, para su uso para tratar un sujeto con un cáncer que expresa WT1, que comprende administrar al sujeto el péptido de la presente invención, tratando con ello al sujeto con un cáncer que expresa WT1.
- 40 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido de SEQ ID NO:41, una composición de la presente invención, o una composición inmunogénica, tal como una vacuna de la presente invención, para su uso para suprimir o detener el avance de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el péptido de la presente invención, suprimiendo o deteniendo con ello el avance de un cáncer que expresa WT1.
- 45 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido de SEQ ID NO:41, una composición de la presente invención, o una composición inmunogénica, tal como una vacuna de la presente invención, para su uso para reducir la incidencia de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el péptido de la presente invención, reduciendo con ello la incidencia de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto.
- 50 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido de SEQ ID NO:41, una composición de la presente invención, o una composición inmunogénica, tal como una vacuna de la presente invención, para su uso para reducir la incidencia de recaída de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el péptido de la presente invención, reduciendo con ello la incidencia de recaída de un cáncer que expresa WT1 en un sujeto.
- 55 En otra realización, la presente invención proporciona un péptido de SEQ ID NO:41, una composición de la presente invención, o una composición inmunogénica, tal como una vacuna de la presente invención, para su uso para superar la tolerancia de las células T de un sujeto frente a un cáncer que expresa WT1, que comprende administrar al sujeto el péptido de la presente invención, superando con ello la tolerancia de las células T frente a un cancer que expresa WT1.
- En la presente se describe un método para tratar a un sujeto que tiene un cáncer que expresa WT1, que comprende (a) inducir en un donante la formación y proliferación de linfocitos T citotóxicos (CTL) humanos que reconocen una célula maligna del cáncer, y (b) infundar los CTL humanos en el sujeto, tratando con ello a un sujeto que tiene un cáncer.

En la presente se describe un método para tratar a 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, en el que las células inmunológicas humanas se obtienen de un donante; y (b) infundir los CTL humanos en el sujeto, tratando con ello a un sujeto que tiene un cáncer.

5 Los métodos para la inmunoterapia *ex vivo* son muy 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.*, sept.-oct. 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.*, julio 2006, 28).

10 En otra realización, la presente invención proporciona un uso para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de un CTL específico de la proteína de WT1, y el uso comprende poner en contacto una población de linfocitos con una composición inmunogénica, tal como una vacuna de la presente invención, induciendo con ello la formación y proliferación de un CTL específico de la proteína de WT1. En otra realización, la composición inmunogénica comprende una célula presentadora de antígenos (APC) asociada con el péptido de la presente invención. En otra
 15 realización, la presente invención proporciona un uso para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de un CTL específico de la proteína de WT1, que comprende poner en contacto una población de linfocitos con el péptido o con una composición de la presente invención, induciendo con ello la formación y proliferación de un CTL específico de la proteína de WT1. En otra realización, la presente invención proporciona un uso para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de un CTL específico de la proteína de WT1, que comprende poner en contacto una población
 20 de linfocitos con una vacuna de la presente invención, induciendo con ello la formación y proliferación de un CTL específico de la proteína de WT1. En otra realización, el CTL es específico para una célula que expresa WT1. En otra realización, la célula diana es una célula de un cáncer que expresa WT1. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

25 En la presente se describe un método para inducir en un sujeto la formación y proliferación de un CTL específico de una proteína de WT1, y el método comprende poner en contacto el sujeto con una composición inmunogénica, tal como una vacuna, induciendo con ello en un sujeto la formación y proliferación de un CTL específico de una proteína de WT1. La composición inmunogénica puede comprender una APC asociada con una mezcla de péptidos.

30 En la presente también se describe un método para inducir en un sujeto la formación y proliferación de un CTL específico de una proteína de WT1, y el método comprende poner en contacto el sujeto con un péptido o una composición, induciendo con ello en un sujeto la formación y proliferación de un CTL específico de una proteína de WT1. En la presente también se describe un método para inducir en un sujeto la formación y proliferación de un CTL específico de una proteína de WT1, y el método comprende poner en contacto el sujeto con una vacuna, induciendo
 35 con ello en un sujeto la formación y proliferación de un CTL específico de una proteína de WT1. La célula diana puede ser una célula de un cáncer que expresa WT1. El sujeto puede tener un cáncer que expresa WT1. El CTL puede ser específico para una célula que expresa WT1. El sujeto puede ser un donante de linfocitos.

40 En otra realización, la presente invención proporciona un uso para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de ambos (a) un linfocito CD8⁺ específico de una proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico de la proteína de WT1, que comprende poner en contacto una población de linfocitos con una composición inmunogénica, tal como una vacuna de la presente invención, induciendo con ello la formación y la proliferación de ambos (a) un linfocito
 45 CD8⁺ específico de la proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico para la proteína de WT1. En otra realización, la composición inmunogénica comprende una APC asociada con un péptido de SEQ ID NO:41 y al menos otro péptido descrito en la presente. En otra realización, la presente invención proporciona un uso para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de ambos (a) un linfocito CD8⁺ específico de una proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico de la proteína de WT1, que comprende poner en contacto una población de linfocitos
 50 con un péptido o composición de la presente invención, induciendo con ello la formación y la proliferación de ambos (a) un linfocito CD8⁺ específico de la proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico para la proteína de WT1. En otra realización, el CTL es específico para una célula que expresa WT1. En otra realización, la célula diana es una célula de un cáncer que expresa WT1.

55 En la presente se describe un método para inducir en un sujeto la formación y proliferación de ambos (a) un linfocito CD8⁺ específico de una proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico de la proteína de WT1, y el método comprende poner en contacto el sujeto con una composición inmunogénica, tal como una vacuna, induciendo con ello en un sujeto la formación y la proliferación de ambos (a) un linfocito CD8⁺ específico de la proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico para la proteína de WT1. La composición inmunogénica puede comprender una APC asociada con una mezcla de péptidos. En la presente también se describe un método para inducir en un sujeto la
 60 formación y proliferación de ambos (a) un linfocito CD8⁺ específico de una proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico de la proteína de WT1, y dicho método comprende poner en contacto al sujeto con un péptido o composición, induciendo con ello en un sujeto la formación y la proliferación de ambos (a) un linfocito CD8⁺

específico de la proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico para la proteína de WT1. En la presente también se describe un método para inducir en un sujeto la formación y proliferación de ambos (a) un linfocito CD8⁺ específico de una proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico de la proteína de WT1, y dicho método comprende poner en contacto al sujeto con una vacuna, induciendo con ello en un sujeto la formación y la proliferación de ambos (a) un linfocito CD8⁺ específico de la proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4⁺ específico para la proteína de WT1. La célula diana puede ser una célula de un cáncer que expresa WT1. El sujeto puede tener un cáncer que expresa WT1. El CTL puede ser específico para una célula que expresa WT1. El sujeto puede ser un donante de linfocitos.

En la presente también se describe un método para generar una respuesta inmunológica heteroclítica en un sujeto, en el que la respuesta inmunológica heteroclítica se dirige contra un cáncer que expresa WT1, y el método comprende administrar al sujeto un péptido o una composición, generando con ello una respuesta inmunológica heteroclítica. En la presente también se describe un método para generar una respuesta inmunológica heteroclítica en un sujeto, en el que la respuesta inmunológica heteroclítica se dirige contra un cáncer que expresa WT1, y el método comprende administrar al sujeto una composición inmunogénica, tal como una vacuna, generando con ello una respuesta inmunológica heteroclítica. En la presente también se describe un método para generar una respuesta inmunológica heteroclítica en un sujeto, en el que la respuesta inmunológica heteroclítica se dirige contra un cáncer que expresa WT1, y el método comprende administrar al sujeto una vacuna, generando con ello una respuesta inmunológica heteroclítica.

En otro aspecto, una célula diana de una respuesta inmunológica suscitada por un método de la presente invención presenta el péptido de la presente invención, o un correspondiente fragmento de WT1, sobre una molécula de HLA de clase I. En otra realización, la molécula de HLA es una molécula de HLA de clase I. En otro aspecto, la molécula de HLA es una molécula de HLA de clase II. En otro aspecto, el péptido, o su fragmento, se presenta sobre una molécula de HLA de clase I y una molécula de HLA de clase II. En otros aspectos, la molécula de HLA de clase I es cualquier subtipo de HLA de clase I o molécula de HLA de clase I conocida en la técnica. En otros aspectos, la molécula de HLA de clase I es cualquier subtipo de HLA de clase I o molécula de HLA de clase I enumerada en la presente. En otros aspectos, la molécula de HLA de clase II es cualquier subtipo de HLA de clase II o molécula de HLA de clase II conocida en la técnica. En otros aspectos, la molécula de HLA de clase II es cualquier subtipo de HLA de clase II o molécula de HLA de clase II enumerada en la presente. En otro aspecto, la respuesta inmunológica contra el péptido o el fragmento es una respuesta inmunológica heteroclítica. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente invención.

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 no microcítico (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 de células redondas pequeñas desmoplásico. 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 uterino. 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 no microcítico (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 de 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 pancreático. 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.

En otra realización, un cáncer o un tumor tratado por el péptido de SEQ ID NO:41 o la composición de la presente invención es sospechoso de expresar WT1. En otra realización, la expresión de WT1 no ha sido verificada mediante

el ensayo de una muestra de tumor real. En otra realización, el cáncer o el tumor es de un tipo conocido porque expresa WT1 en muchos casos. En otra realización, el tipo expresa WT1 en la mayoría de los casos.

Cada tipo de cáncer o tumor que expresa WT1, y el cáncer o tumor sospechoso de expresar WT1, representa una realización separada de la presente invención.

- 5 En otra realización, un péptido de SEQ ID NO:41 y al menos otro péptido descrito en la presente se emplean para estimular una respuesta inmunológica.

Tal como se proporciona en la presente, los péptidos heterocliticos que suscitan respuestas de células T CD8⁺ específicas de antígeno pueden crearse utilizando los métodos de la presente invención (ejemplos 1-2). Tal como se proporciona en los ejemplos 3-4, pueden identificarse los péptidos de WT1 que suscitan respuestas de células T CD4⁺ a múltiples moléculas de HLA de clase II. Las células T CD4⁺ reconocen los péptidos unidos a la molécula de HLA de clase II sobre una APC. En otra realización, las respuestas de células T CD4⁺ específicas de antígeno ayudan a la inducción y el mantenimiento de respuestas de células T citotóxicas (CTL) CD8⁺.

En otra realización, los péptidos de la presente invención muestran una capacidad potenciada para suscitar respuestas de CTL, debido a su capacidad para unirse a moléculas de HLA de clase I y de HLA de clase II. En otra realización, las vacunas de la presente invención tienen la ventaja de activar o suscitar células T CD4⁺ y CD8⁺ que reconocen antígenos de WT1. En otra realización, la activación o la suscitación de células T CD4⁺ y CD8⁺ proporciona una respuesta inmunológica anti-WT1 sinérgica, con relación a la activación de cualquiera de las poblaciones por sí solas. En otra realización, la inmunogenicidad potenciada de los péptidos de la presente invención se muestra en individuos de múltiples subtipos de HLA de clase II, debido a la capacidad de los péptidos de la presente invención a unirse a múltiples subtipos de HLA de clase II. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, las células CD4⁺ activadas potencian la inmunidad autorizando células dendríticas, sustentando con ello la activación y la supervivencia de las células T citotóxicas. En otra realización, las células T CD4⁺ activadas inducen la muerte de las células tumorales mediante el contacto directo con la célula tumoral o mediante la activación de la vía de la apoptosis. Las células tumorales de mesotelioma, por ejemplo, son capaces de procesar y presentar antígenos en el contexto de las moléculas de HLA de clase I y de clase II.

Los métodos descritos en la presente serán entendidos por los expertos en la técnica para permitir diseñar otros péptidos derivados de WT1 que sean capaces de unirse a moléculas de HLA de clase I y de HLA de clase II. Los métodos permiten diseñar además composiciones inmunogénicas y vacunas que combinen péptidos derivados de WT1 descritos en la presente.

En otra realización, los péptidos, las vacunas y/o las composiciones inmunogénicas de la presente invención tienen la ventaja de activar o suscitar células T CD4⁺ específicas de WT1 que contienen múltiples alelos diferentes de HLA de clase II. En otra realización, las vacunas tienen la ventaja de activar o suscitar células T CD4⁺ específicas de WT1 en una proporción sustancial de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 10% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 15% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 20% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 25% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 30% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 35% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 40% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 45% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 50% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 55% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 60% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 70% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 75% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 80% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 85% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 90% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en 95% de la población. En otro aspecto, los péptidos activan las células T CD4⁺ específicas de WT1 en más del 95% de la población. En otro aspecto, las vacunas activan o suscitan células T CD4⁺ específicas de WT1 en una proporción sustancial de una población concreta (por ejemplo, caucásicos estadounidenses). Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

En otra realización, los péptidos, las vacunas y/o las composiciones inmunogénicas de la presente invención suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en individuos que portan la molécula de HLA de clase I y la molécula de HLA de clase II cuyos motivos de unión están presentes en el péptido. En otra realización, debido a la unión de múltiples moléculas de HLA de clase I y/o múltiples moléculas de HLA de clase II, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en una proporción sustancial de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 10% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 15%

de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 20% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 25% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 30% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 35% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 40% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 45% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 50% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 55% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 60% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 70% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 75% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 80% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 85% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 90% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en 95% de la población. En otro aspecto, los péptidos suscitan unas respuestas potenciadas de CTL específicos de WT1 en más del 95% de la población. En otro aspecto, las vacunas activan o suscitan células T CD4⁺ específicas de WT1 en una proporción sustancial de una población concreta (por ejemplo, caucásicos estadounidenses). Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

En otra realización, el péptido de la presente invención proporciona una mejora en una respuesta inmunológica que ya ha sido organizada por un sujeto. En otra realización, los usos de la presente invención comprenden administrar el péptido, la composición o la vacuna dos o más veces. En otra realización, los péptidos son variados con respecto a su composición, su concentración o una combinación de ambas. En otra realización, los péptidos proporcionan el inicio de una respuesta inmunológica contra un antígeno de interés en un sujeto en el que aún no se ha iniciado una respuesta inmunológica contra el antígeno de interés. En otra realización, los CTL que son inducidos proliferan en respuesta a la presentación del péptido sobre la APC o la célula del cáncer. En otras realizaciones, la referencia a la modulación de la respuesta inmunológica implica el brazo humoral o el brazo mediado por células, o ambos, del sistema inmunológico, a lo cual acompaña la presencia de células T auxiliares Th2 y Th1, respectivamente, o, en otra realización, cada brazo individualmente.

En otras realizaciones, los usos que afectan al crecimiento de un tumor producen (1) la inhibición directa de la división de las células tumorales, o (2) la lisis de células tumorales mediada por células inmunológicas, o ambas, que conduce a la supresión en la expansión neta de las células tumorales. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

La inhibición del crecimiento tumoral por cualquiera de estos dos mecanismos puede ser determinada con facilidad por los expertos en la técnica basándose en una serie de métodos muy conocidos. En otra realización, la inhibición del tumor se determina midiendo el tamaño real del tumor a lo largo de un periodo de tiempo. En otra realización, la inhibición del tumor puede ser determinada calculando el tamaño de un tumor (a lo largo del tiempo) empleando métodos conocidos por los expertos en la técnica. De modo más específico, puede utilizarse una diversidad de métodos de formación de imágenes radiológicas (por ejemplo, tomografía computerizada de fotones individuales y de emisión de positrones; véase, en general, "Nuclear Medicine in Clinical Oncology," Winkler, C. (ed.) Springer-Verlag, Nueva York, 1986), para calcular el tamaño del tumor. Estos métodos también pueden utilizar una diversidad de agentes de formación de imágenes, que incluyen, por ejemplo, agentes de formación de imágenes convencionales (por ejemplo, citrato de galio-67), así como reactivos especializados para la formación de imágenes de metabolitos, la formación de imágenes de receptores o la formación de imágenes inmunológicas (por ejemplo, marcadores tumorales específicos de anticuerpos monoclonales radiomarcados). Además, también pueden utilizarse métodos no radiactivos, tales como ultrasonido (véase, "Ultrasonic Differential Diagnosis of Tumors", Kossoff y Fukuda, (eds.), Igaku-Shoin, Nueva York, 1984), para calcular el tamaño de un tumor.

Además de los métodos *in vivo* para determinar la inhibición tumoral analizados anteriormente, puede utilizarse una diversidad de métodos *in vitro* para determinar 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), proliferación de linfocitos dependiente de tumor (Ioannides, *et al.*, J. Immunol., 146(5):1700-1707, 1991), generación *in vitro* de anticuerpos específicos de tumor (Herlyn, *et al.*, J. Immunol. Meth., 73:157-167, 1984), inhibición mediada por células (por ejemplo, CTL, célula T auxiliar) o humoral (por ejemplo, anticuerpos) 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 (Vose, Int. J. Cancer, 30:135-142 (1982), y otros.

En otra realización, los usos relacionados con la supresión del crecimiento tumoral indican un estado del crecimiento que está restringido, comparado con el crecimiento sin contacto, o la exposición al péptido de la invención. El crecimiento de las células tumorales puede evaluarse por cualquier medio conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a medir el tamaño tumoral, determinar cuáles son las células tumorales que están proliferando empleando un ensayo de incorporación de ³H-timidina, o contando las células tumorales. "Suprimir" el crecimiento

de células tumorales se refiere, en otras realizaciones, a frenar, retrasar o detener el crecimiento del tumor, o a un encogimiento del tumor. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

5 En otra realización de los usos y las composiciones de la presente invención se mide la expresión de WT1. En otra realización se mide la expresión del transcrito de WT1. En otra realización se miden los niveles de la proteína de WT1 en el tumor. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

10 Los métodos para determinar la presencia y la magnitud de una respuesta inmunológica son muy conocidos en la técnica. En otra realización, se realizan ensayos de proliferación de linfocitos, en los que se mide la captación por las células T de una sustancia radiactiva, por ejemplo, ³H-timidina, como función de la proliferación celular. En otras realizaciones, la detección de la proliferación de las células T se logra midiendo los aumentos en la producción de interleuquina-2 (IL-2), el flujo de Ca²⁺, o la captación de un tinte, tal como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

15 En otro aspecto, la estimulación de los CTL se determina por medios conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen la detección de la proliferación celular, la producción de citoquinas y otros. El análisis de los tipos y las cantidades de las citoquinas segregadas por las células T tras el contacto con dianas pulsadas con ligando puede ser una medición de la actividad funcional. Las citoquinas pueden medirse mediante ELISA, ensayos ELISPOT o clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) para determinar la tasa y la cantidad total de producción de citoquinas (Fujihashi K. *et al.* (1993), *J. Immunol. Meth.*, 160:181; Tanguay S. y Killion J. J. (1994), *Lymphokine Cytokine Res.*, 13:259).

20 En otro aspecto se determina la actividad de los CTL mediante un ensayo de lisis de liberación de ⁵¹Cr. La lisis de las dianas marcadas con ⁵¹Cr pulsadas con péptido por células T específicas de antígeno puede compararse para las células diana pulsadas con el péptido control. En otro aspecto, las células T son estimuladas con un péptido de esta invención, y puede determinarse la lisis de las células diana que expresan el péptido nativo en el contexto de MHC. Se emplea la cinética de la lisis, así como la lisis global de la diana en un momento fijado (por ejemplo, 4 horas), en otro aspecto, para evaluar la actuación del ligando (Ware C. F. *et al.* (1983), *J. Immunol.*, 131: 1312).

25 Los métodos para determinar la afinidad de un péptido por una molécula de HLA son muy conocidos en la técnica. En otra realización, la afinidad se determina mediante ensayos de estabilización de TAP (ejemplos).

30 En otro aspecto, la afinidad se determina mediante un radioinmunoensayo de competición. En otro aspecto se emplea el siguiente protocolo: Las células diana se lavan dos veces en PBS con albúmina de suero bovina al 1% (BSA; Fisher Chemicals, Fairlawn, NJ). Las células se resuspenden a 10⁷/ml en hielo, y los péptidos unidos a la superficie de la célula nativa se extraen durante 2 minutos a 0 °C empleando tampón citrato-fosfato en presencia de beta₂-microglobulina 3 mg/ml. El sedimento se resuspende a 5 x 10⁶ células/ml en PBS/BSA al 1% en presencia de beta₂-microglobulina 3 mg/ml y desoxirribonucleasa 30 mg/ml y se incuban partes alícuotas de 200 ml en presencia o ausencia de péptidos específicos de HLA durante 10 min a 20 °C, y después con péptido marcado con ¹²⁵I durante 30 min a 20 °C. El ¹²⁵I total unido se determina después de dos lavados con PBS/BSA al 2% y un lavado con PBS. Se determinan las afinidades relativas mediante comparación con concentraciones crecientes del péptido de ensayo frente a un péptido de unión conocido.

40 En otro aspecto, se realiza un análisis de especificidad de la unión del péptido a HLA sobre la superficie de células vivas (por ejemplo, células SKLY-16) para confirmar que la unión se realiza con la molécula de HLA apropiada y para caracterizar su restricción. Esto incluye, en otro aspecto, la competición con un exceso de péptidos no marcados que se sabe que se unen a la misma o a otra molécula de HLA y el uso de células diana que expresan el mismo o distinto tipo de HLA. Este ensayo se realiza, en otro aspecto, en PBMC humanas vivas frescas o fijadas en paraformaldehído al 0,25%, líneas celulares de leucemia y líneas de células T transformadas con EBV de tipos de HLA específicos. La avidez relativa de los péptidos que se unen a las moléculas de MHC sobre las células específicas se ensaya mediante ensayos de competición, tal como se describió anteriormente, frente a péptidos marcados con ¹²⁵I de alta afinidad conocida por la molécula de HLA pertinente, por ejemplo, tirosinasa o la secuencia del péptido de HBV.

50 En otro aspecto, otros péptidos de los usos y las composiciones de la presente invención comprenden uno o más aminoácidos no clásicos, tales como: 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato (Kazmierski *et al.* (1991), *J. Am Chem. Soc.*, 113:2275-2283); (2S,3S)-metilfenilalanina, (2S,3R)-metilfenilalanina, (2R,3S)-metilfenilalanina y (2R,3R)-metilfenilalanina (Kazmierski y Hruby (1991), *Tetrahedron Lett.*, 32(41): 5769-5772); ácido 2-aminotetrahidronaftalen-2-carboxílico (Landis (1989), tesis doctoral, University of Arizona); hidroxí-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilato (Miyake *et al.* (1984), *J. Takeda Res. Labs.*, 43:53-76), ácido histidin-isoquinolin-carboxílico (Zechel *et al.* (1991), *Int. J. Pep. Protein Res.*, 38(2):131-138); y HIC (histidina ciclo urea, Dharanipragada *et al.* (1993), *Int. J. Pep. Protein Res.*, 42(1):68-77, y (1992), *Acta. Crst., Crystal Struc. Comm.*, 48(IV):1239-124).

55 En otro aspecto, un péptido adicional de los métodos y las composiciones de la presente invención comprende uno o más análogos de AA o es un péptidomimético, que, en otro aspecto, induce o favorece estructuras secundarias específicas. Estos péptidos comprenden, en otros aspectos, los siguientes: LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidon-6-carboxílico), un análogo dipeptídico que induce vueltas β (Kemp *et al.* (1985), *J. Org. Chem.*, 50:5834-5838);

análogos inductores de lámina β (Kemp *et al.* (1988), *Tetrahedron Lett.*, 29:5081-5082); análogos inductores de vueltas β (Kemp *et al.* (1988), *Tetrahedron Lett.*, 29:5057-5060); análogos inductores de alfa-hélice (Kemp *et al.* (1988), *Tetrahedron Lett.*, 29:4935-4938); análogos inductores de vueltas gamma (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.*, p. 1687, un análogo de vuelta de Gly-Ala (Kahn *et al.* (1989), *Tetrahedron Lett.*, 30:2317); un isómero de enlace amida (Jones *et al.* (1988), *Tetrahedron Lett.*, 29(31):3853-3856); tretazol (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 los análogos indicados en Olson *et al.* (1990), *J. Am. Chem. Sci.*, 112:323-333 y Garvey *et al.* (1990), *J. Org. Chem.*, 55(3):936-940. Se describen miméticos de conformación restringida de vueltas beta y bultos beta y los péptidos que los contienen en la patente de EEUU n.º 5.440.013, expedida el 8 de agosto, 1995, de Kahn.

En otros aspectos, el péptido adicional se conjuga con una de diversas otras moléculas, según se describe a continuación, a través de un enlace covalente o no covalente (se compleja), cuya naturaleza varía, en otra realización, dependiendo del objetivo concreto. En otro aspecto, el péptido se compleja, de modo covalente o no covalente, con un vehículo macromolecular (por ejemplo, un vehículo inmunogénico) que incluye, pero no se limita a polímeros naturales y sintéticos, proteínas, polisacáridos, polipéptidos (aminoácidos), poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y lípidos. En otro aspecto, el péptido adicional se une a un sustrato. En otro aspecto, el péptido se conjuga con un ácido graso, para la introducción en un liposoma (patente de EEUU n.º 5.837.249). En otro aspecto, el péptido adicional se compleja, de forma covalente o no covalente, con un soporte sólido, y en la técnica se conoce una diversidad de estos. En otro aspecto, la unión del péptido al vehículo, sustrato, ácido graso o soporte sólido sirve para aumentar una respuesta inmunológica suscitada.

En otros aspectos, el vehículo es tiroglobulina, una albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humana), toxoide del tétanos, poliaminoácidos, tales como poli(lisina:ácido glutámico), una proteína de la gripe, la proteína nuclear del virus de la hepatitis B, hemocianina de lapa, una albúmina u otra proteína vehículo o péptido vehículo; una vacuna recombinante del virus de la hepatitis B, o una APC. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.

El término "aminoácido" puede indicar un AA natural o no natural o sintético, y puede incluir glicina, D- o L-isómeros ópticos, análogos de AA, peptidomiméticos, o sus combinaciones.

En otra realización, los términos "cáncer," "neoplasma," "neoplásico" o "tumor" se emplean de modo intercambiable e indican células que han sufrido una transformación maligna que hace que sean patológicas para el organismo hospedante. Las células de cáncer primarias (es decir, células obtenidas de un sitio cercano al sitio de la transformación maligna) pueden distinguirse con facilidad de las células no cancerosas por medio de técnicas bien establecidas, en particular, un examen histológico. La definición de una célula del cáncer, tal como se emplea en la presente, incluye no solo una célula de cáncer primaria, sino también cualquier célula derivada de un antecesor de célula del cáncer. Esto incluye células del cáncer metastatizadas, y cultivos *in vitro* y líneas celulares derivadas de las células del cáncer. En otra realización, un tumor es detectable basándose en la masa tumoral; se identifica, por ejemplo, mediante procedimientos tales como barrido CAT, formación de imágenes de resonancia magnética (MRI), rayos X, ultrasonido o palpación y, en otra realización, mediante descubrimientos bioquímicos o inmunológicos, empleándose estos últimos para identificar también células cancerosas en otras realizaciones.

Los métodos para sintetizar péptidos son muy conocidos en la técnica. En otra realización, el péptido de esta invención se sintetiza empleando 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, empleando los ensayos descritos en la presente.

En otra realización, el péptido de esta invención se purifica mediante métodos convencionales, que incluyen cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y de columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. En otra realización se emplea una cromatografía de inmutafinidad, por la cual un epitopo se aísla mediante su unión a una columna de afinidad que comprende anticuerpos que han sido generados contra ese péptido, o un péptido relacionado de la invención, que han sido fijados a un soporte estacionario.

En otro aspecto, se unen marcadores de afinidad, tales como hexa-His (Invitrogen), dominio de unión a maltosa (New England Biolabs), secuencia de la envuelta de la gripe (Kolodziej *et al.* (1991), *Meth. Enzymol.*, 194:508-509), glutatión-S-transferasa, u otros, a los péptidos de esta invención para permitir una purificación sencilla por medio de su paso a través de una columna de afinidad apropiada. Los péptidos aislados también pueden caracterizarse físicamente, en otras realizaciones, empleando técnicas tales como la proteólisis, la resonancia magnética nuclear, y la cristalografía de rayos X.

En otro aspecto, el péptido de esta invención se produce por medio de la traducción *in vitro*, mediante técnicas conocidas tal como será evidente para los expertos en la técnica. En otro aspecto, los péptidos se modifican de modo diferencial durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante fosforilación, glicosilación, reticulación,

acilación, ruptura proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo, una molécula de membrana u otro ligando (Ferguson *et al.* (1988), Ann. Rev. Biochem., 57:285-320).

En otro aspecto, el péptido de esta invención comprende además un marcador detectable que, en otro aspecto, es fluorescente o, en otro aspecto, es luminiscente o, en otro aspecto, es radiactivo o, en otro aspecto, es denso a los electrones. En otros aspectos, el marcador detectable comprende, por ejemplo, la proteína fluorescente verde (GFP), DS-rojo (proteína fluorescente roja), fosfatasa alcalina segregada (SEAP), beta-galactosidasa, luciferasa, ³²P, ¹²⁵I, ³H y ¹⁴C, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo y umbeliferona, luciferina o cualquiera de otros marcadores de este tipo conocidos por los expertos en la técnica. El marcador concreto empleado dependerá del tipo de inmunoensayo utilizado.

En otro aspecto, el péptido de esta invención está unido a un sustrato que, en otro aspecto, actúa como vehículo. En otro aspecto, la unión del péptido a un sustrato actúa para aumentar una respuesta inmunológica suscitada.

En otro aspecto, el péptido de la invención se une a otras moléculas, tal como se describe en la presente, empleando agentes reticulantes convencionales, tales como carbodimidas. Los ejemplos de carbodimidas 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 otros aspectos, los agentes reticulantes comprenden bromuro de cianógeno, glutaraldehído y anhídrido succínico. En general, puede utilizarse cualquiera de los agentes homobifuncionales, que incluye 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 homobifuncional. También se contemplan los compuestos heterobifuncionales, por ejemplo, los compuestos que tienen un grupo reactivo a amina y un grupo reactivo a sulfhidrilo, compuestos con un grupo reactivo a amina y un grupo fotorreactivo, y compuestos con un grupo reactivo a carbonilo y un grupo reactivo a sulfhidrilo.

En otros aspectos, los agentes reticulantes homobifuncionales incluyen los ésteres de N-hidroxisuccinimida bifuncionales ditiobis(succinimidilpropionato), suberato de disuccinimidilo, y tartrato de disuccinimidilo; los imidoésteres bifuncionales adipimidato de dimetilo, pimelimidato de dimetilo, y suberimidato de dimetilo; los reticulantes reactivos a 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-dinitrobenzoceno y 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrofenilsulfona; los agentes fotorreactivos bifuncionales, tales como bis-[b-(4-azidosalicilamido)etil]disulfuro; los aldehídos bifuncionales formaldehído, malondialdehído, succinaldehído, glutaraldehído, y adipaldehído; un epóxido bifuncional, tal como 1,4-butaneodiol diglicidil éter; las hidrazidas bifuncionales dihidrazida del ácido adípico, carbohidrazida, y dihidrazida del ácido succínico; los diazonios bifuncionales o-tolidina, benzidina 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 halo-mostazas, tales como ácido ala'-diyodo-p-xilensulfónico y tri-(2-cloroetil)amina, respectivamente.

En otros aspectos, los agentes reticulantes heterobifuncionales empleados para unir los péptidos a otras moléculas, tal como se describe en la presente, incluyen, pero no se limitan a SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato), MBS (m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster), SIAB (N-succinimidil-(4-yodoacetil)aminobenzoato), SMPB (succinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato), GMBS (N-(gamma-maleimidobutiriloxi)succinimida éster), MPBH (hidrazida del ácido 4-(4-N-maleimidofenil)butírico), M2C2H (4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilhidrazida), SMPT (succinimidiloxicarbonil-a-metil-a-(2-piridilditio)tolueno), y SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo).

En otro aspecto, el péptido de la invención se formula como una unión no covalente de monómeros a través de interacciones iónicas, de adsorción o bioespecíficas. Pueden lograrse complejos de péptidos con moléculas cargadas muy positiva o negativamente, en otra realización, a través de la formación de puentes salinos en entornos de baja fuerza iónica, tales como agua desionizada. Pueden crearse grandes complejos, en otra realización, empleando 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 se adsorben sobre superficies, tales como esferas de micropartículas de látex o a otros polímeros hidrófobos, formando complejos de péptido-superantígeno asociados de modo no covalente que imitan con eficacia una proteína reticulada o químicamente polimerizada, en otras realizaciones. En otra realización, los péptidos se unen de modo 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 puede emplearse para formar complejos de péptidos. Los péptidos, según este aspecto, y en otra realización, pueden modificarse para que posean grupos biotina empleando reactivos de biotilación habituales, tales como N-hidroxisuccinimidil éster de D-biotina (NHS-biotina), que reacciona con grupos amina disponibles.

En otra realización, el péptido de la presente invención está unido a un vehículo. En otra realización, el vehículo es KLH. En otras realizaciones, el vehículo es cualquier otro vehículo conocido en la técnica, que incluye, por ejemplo,

tiroglobulina, albúminas, tales como albúmina de suero humana, toxoide del tétanos, poliaminoácidos, tales como poli(lisina:ácido glutámico), gripe, proteína nuclear del virus de la hepatitis B, vacuna recombinantes del virus de la hepatitis B y similares. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

5 En otra realización, los péptidos de esta invención se conjugan con un lípido, tal como P3 CSS. En otra realización, los péptidos de esta invención se conjugan con una esfera.

10 En otra realización, las composiciones de esta invención comprenden además compuestos inmunomoduladores. En otras realizaciones, el compuesto inmunomodulador es una citoquina, una quimioquina, o un componente del complemento que potencia la expresión de moléculas de adhesión o accesorias del sistema inmunológico, sus receptores o sus combinaciones. En algunas realizaciones, el compuesto inmunomodulador incluye interleuquinas, por ejemplo, interleuquina 1 a 15, interferones alfa, beta o gamma, factor de necrosis tumoral, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), quimioquinas, tales como la proteína activadora de neutrófilos (NAP), factor activador y quimioatractivo de macrófagos (MCAF), RANTES, los 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 potenciada de OX40, OX40L (gp34), linfotactina, CD40, CD40L, B7.1, B7.2, TRAP, ICAM-1, 2 o 3, receptores de citoquinas o sus combinaciones.

15 En otra realización, el compuesto inmunomodulador induce o potencia la expresión de moléculas coestimuladoras que participan en la respuesta inmunológica que incluyen, en algunas realizaciones, CD40 o su ligando, CD28, CTLA-4 o una molécula de B7. En otra realización, el compuesto inmunomodulador induce o potencia la expresión de un antígeno termoestable (HSA) (Liu Y. *et al.* (1992), *J. Exp. Med.*, 175:437-445), la cadena invariable de MHC modificada con sulfato de condroitina (li-CS) (Naujokas M. F. *et al.* (1993), *Cell*, 74:257-268), o una molécula de adhesión intracelular 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 cognados sobre las células T.

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

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

30 En otra realización, la vacuna que comprende el péptido de esta invención comprende además una población celular que, en otra realización, comprende linfocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, células pluripotenciales o sus combinaciones que, en otra realización, son autólogas, singeneicas o alogeneicas, entre sí. En otra realización, la población celular comprende el péptido de la presente invención. En otra realización, la población celular capta el péptido. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

35 En otra realización, las poblaciones celulares de esta invención se obtienen a partir de fuentes *in vivo*, tales como, por ejemplo, sangre periférica, productos de la sangre de leucoféresis, productos de la sangre de aféresis, nódulos linfáticos periféricos, tejido linfoide asociado al intestino, bazo, timo, sangre del cordón umbilical, nódulos linfáticos mesentéricos, hígado, sitios de lesiones inmunológicas, por ejemplo, fluido sinovial, páncreas, fluido cerebroespinal, muestras de tumor, tejido granulomatoso, o cualquier otra fuente de la cual pueden obtenerse células. En otra realización, las poblaciones celulares se obtienen a partir de fuentes humanas que son, en otras realizaciones, fuentes de feto humano, neonatales, de infante o de adulto. En otra realización, las poblaciones celulares de esta invención se obtienen a partir de fuentes animales, tales como, por ejemplo, de fuentes porcinas o de simio, o cualquier otro animal de interés. En otra realización, las poblaciones celulares de esta invención se obtienen a partir de sujetos que son normales o, en otra realización, que están enfermos o, en otra realización, que son susceptibles a una enfermedad de interés.

40 En otra realización, las poblaciones celulares de esta invención se separan por medio de métodos de separación basados en la afinidad. Las técnicas para la separación por afinidad incluyen, en otras realizaciones, separación magnética empleando esferas magnéticas revestidas con anticuerpos, cromatografía de afinidad, agentes citotóxicos unidos a un anticuerpo monoclonal o empleados junto con un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, el complemento y citotoxinas, e inmunoadsorción ("panning") con un anticuerpo unido a una matriz sólida, tal como una placa, o cualquier otra técnica convencional. En otras realizaciones, las técnicas de separación incluyen el uso de clasificadores de células activados por fluorescencia, que pueden tener diversos grados de sofisticación, tales como múltiples canales de colores, canales detectores de la dispersión de la luz obtusos y de ángulo bajo, canales de impedancia, etc. En otras realizaciones, puede emplearse cualquier técnica que permita la separación de las poblaciones celulares de esta invención, y esto debe considerarse parte de esta invención.

- 5 En otra realización, las células dendríticas proceden de la diversa población de tipos de células morfológicamente similares que se encuentran en una diversidad de tejidos linfoides y no linfoides, calificadas como tales (Steinman (1991), Ann. Rev. Immunol., 9:271-296). En otra realización, las células dendríticas empleadas en esta invención se aíslan de la médula ósea, o en otra realización, se derivan de células progenitoras de la médula ósea, o en otra realización, se aíslan/se derivan de sangre periférica, o en otra realización, se derivan o son una línea celular.
- 10 En otra realización, las poblaciones celulares descritas en la presente se aíslan de la fracción de leucocitos de un mamífero, tal como un mamífero murino, simio o un ser humano (véase, por ejemplo, el documento WO 96/23060). La fracción de leucocitos, en otra realización, puede ser aislada de la sangre periférica del mamífero.
- 15 Los métodos para aislar células dendríticas son muy conocidos en la técnica. En otra realización, las DC se aíslan mediante un método que incluye las siguientes etapas: (a) proporcionar una fracción de leucocitos obtenidos a partir de una fuente de mamífero mediante métodos conocidos en la técnica, tales como leucoforesis; (b) separar la fracción de leucocitos 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), preferiblemente a aproximadamente 4 °C.
- 20 En otra realización, la fracción enriquecida en células dendríticas se identifica mediante clasificación de células activada por fluorescencia, que identifica, en otra realización, 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.
- 25 En otra realización, la población celular comprende linfocitos, que son, en otra realización, células T o, en otra realización, células B. Las células T, en otras realizaciones, se caracterizan como células NK, células T auxiliares, linfocitos T citotóxicos (CTL), TIL, células T sin exponer, o sus combinaciones. Debe entenderse que las células T que son primarias, o las líneas celulares, los clones, etc., han de ser consideradas parte de esta invención. En otra realización, las células T son CTL, o líneas de CTL, clones de CTL, o CTL aislados a partir de un tumor, inflamatorias u otros infiltrados.
- 30 En otra realización, las células pluripotenciales hematopoyéticas o progenitoras tempranas comprenden las poblaciones celulares empleadas en esta invención. En otra realización, estas poblaciones se aíslan o se derivan por medio de leucaféresis. En otra realización, la leucaféresis se produce después la administración de citoquinas, procedentes de la médula ósea, sangre periférica (PB) o sangre de cordón umbilical neonatal. En otra realización, las células pluripotenciales o progenitoras se caracterizan por la expresión sobre su superficie del marcador del antígeno de superficie conocido como CD34⁺, y la exclusión de la expresión de los marcadores de antígeno del linaje de superficie Lin⁻.
- 35 En otra realización, al sujeto se le administra un péptido, una composición o una vacuna de esta invención, junto con células de la médula ósea. En otra realización, la administración junto con células de la médula ósea se produce después de una irradiación previa del sujeto, como parte del desarrollo de la terapia, para suprimir, inhibir o tratar un cáncer en el sujeto.
- 40 En otra realización, la expresión "poner en contacto la célula" o "poner en contacto una población" se refiere a un método de exposición que puede ser, en otras realizaciones, directo o indirecto. En otra realización, dicho contacto comprende la inyección directa de la célula a través de cualquier medio conocido en la técnica, tal como microinyección. También se contempla, en otra realización, que el suministro de la célula sea indirecto, tal como a través de la provisión en un medio de cultivo que rodea a la célula, o la administración a un sujeto por medio de cualquier vía conocida en la técnica, y tal como se describe en la presente.
- 45 En otra realización, la generación de CTL de los usos de la presente invención se realiza *in vivo*, y se realiza introduciendo en un sujeto una célula presentadora de antígenos que se ha puesto en contacto *in vitro* con un péptido de esta invención (véase, por ejemplo, Paglia *et al.* (1996), J. Exp. Med., 183:317-322).
- En otra realización, los péptidos de los usos y las composiciones de la presente invención se administran a células presentadoras de antígenos (APC).
- 50 En otra realización, los péptidos se administran a APC en forma de un ADNc que codifica los péptidos. En otra realización, la expresión "células presentadoras de antígenos" se refiere a células dendríticas (DC), monocitos/macrófagos, linfocitos B u otro tipo celular que exprese las moléculas de MHC/coestimuladoras necesarias, que permitan el reconocimiento eficaz por la célula T del péptido presentado. En otra realización, la APC es una célula de cáncer. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 55 En otra realización, el CTL se pone en contacto con dos o más poblaciones de células presentadoras de antígenos. En otra realización, las dos o más poblaciones de células presentadoras de antígenos presentan diferentes péptidos. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

- En otro aspecto, las técnicas que conducen a la expresión del antígeno en el citosol de la APC (por ejemplo, DC) se emplean para administrar los péptidos a la APC. Los métodos para expresar antígenos sobre APC son muy conocidos en la técnica. En otro aspecto, las técnicas incluyen (1) la introducción en la APC de ADN desnudo que codifica un péptido de esta invención, (2) la infección de la APC con vectores recombinantes que expresan un péptido de esta invención, y (3) la introducción de un péptido de esta invención en el citosol de una APC empleando 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 otro aspecto, se emplean células presentadoras de antígenos de acogida, tales como las derivadas de la línea celular humana 174xCEM.T2, denominadas T2, que contienen una mutación en su vía de procesamiento del antígeno que restringe la asociación de péptidos endógenos con las moléculas de MHC de clase I de la superficie celular (Zweierink *et al.* (1993), *J. Immunol.*, 150:1763-1771), tal como se ejemplifica en la presente.
- Cualquiera de los métodos descritos en la presente puede utilizarse para suscitar CTL, que son suscitados *in vitro* o *ex vivo*. El CTL resultante puede administrarse al sujeto, tratando con ello el trastorno asociado con el péptido, un producto de expresión que comprende el péptido, o uno de sus homólogos.
- El método descrito en la presente puede suponer la introducción de la secuencia genética que codifica los péptidos. El método puede comprender administrar al sujeto un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido descrito en la presente (Tindle, R. W. *et al.*, *Virology* (1994), 200:54). El método puede comprender administrar al sujeto un ADN desnudo que codifica un péptido o, en otra realización, dos o más péptidos descritos en la presente (Nabel, *et al.*, *PNAS-USA* (1990), 90:11307). Pueden utilizarse vacunas del cáncer de múltiples epitopos basadas en análogos (Fikes *et al.*, *ibid.*).
- Los ácidos nucleicos pueden ser administrados a un sujeto por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye la administración parenteral o intravenosa, o por medio de una pistola de genes o en una composición.
- Los vectores para su uso según dichos métodos pueden comprender cualquier vector que facilita o permite la expresión de un péptido. Los "vectores" pueden incluir virus atenuados, tales como vaccinia o viruela de las aves de corral, tal como se describe, por ejemplo, en la patente de EEUU n.º 4.722.848. El vector puede ser BCG (bacilo de Calmette-Guerin), tal como se describe en Stover *et al.* (*Nature*, 351:456-460 (1991)). Otros vectores útiles para la inmunización o la administración terapéutica de los péptidos descritos en la presente, por ejemplo, vectores de *Salmonella typhi* y similares, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción en la presente.
- El vector puede codificar también un compuesto inmunomodulador, tal como se describe en la presente. Al sujeto se le puede administrar un vector adicional que lo codifique, al mismo tiempo, antes o después de la administración del vector que codifica un péptido descrito en la presente al sujeto.
- En otro aspecto, los péptidos, las composiciones y las vacunas de esta invención se administran a un sujeto, o se utilizan en los usos de esta invención, en combinación con otros compuestos anticáncer y quimioterapéuticos, que incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos del cáncer alternativos o, en otro aspecto, epitopos que consisten en una secuencia de AA que se corresponde o se corresponde en parte a la secuencia de la cual se derivan los péptidos de esta invención.
- En otra realización, la presente invención proporciona un péptido, una vacuna o una composición inmunogénica de la presente invención para su uso para detectar una respuesta de células T CD4⁺ específicas de WT1 en un sujeto. En otro aspecto, se emplea un ensayo de hipersensibilidad de tipo retrasado para detectar la respuesta de células T CD4⁺ específicas de WT1. En otra realización, un péptido de la presente invención es mejor que su homólogo no mutado para inducir una respuesta de células T CD4⁺ en un sujeto. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.
- Una composición inmunogénica de los usos y composiciones de la presente invención comprende, en otra realización, una APC asociada con un péptido de la presente invención. En otra realización, la composición inmunogénica comprende una APC asociada con una mezcla de péptidos de la presente invención. En otro aspecto, la composición inmunogénica consiste en una APC asociada con una mezcla de péptidos de la presente invención. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción.
- Una composición de los usos y composiciones de la presente invención es, en otra realización, una composición inmunogénica. En otra realización, la composición es una composición farmacéutica. En otra realización, la composición es cualquier otro tipo de composición conocida en la técnica. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- Varios aspectos de intervalos de dosificación son contemplados por esta invención. En otro aspecto, la dosificación es de 20 µg por péptido diarios. En otro aspecto, la dosificación es de 10 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 30 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 40 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 60 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 80 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 100 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de

200 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 300 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 400 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 600 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 800 µg/péptido/día. En otro aspecto, la dosificación es de 1000 µg/péptido/día.

5 En otro aspecto, la dosificación es de 10 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 30 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 40 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 60 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 80 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 100 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 150 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 200 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 300 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 400 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 600 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 800 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 1000 µg/péptido/dosis.

10 En otro aspecto, la dosificación es de 10-20 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 20-30 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 30-40 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 40-60 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 60-100 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 100-150 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 150-200 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 200-300 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 300-400 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 400-600 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 600-800 µg/péptido/dosis. En otro aspecto, la dosificación es de 800-1000 µg/péptido/dosis.

15 En otro aspecto, la cantidad total de péptido por dosis o por día es una de las anteriores cantidades. En otro aspecto, la dosis total de péptido por dosis es una de las anteriores cantidades.

Cada una de las dosis anteriores representa un aspecto separado de la presente descripción.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende un péptido, una composición o una vacuna de la presente invención. En otro aspecto, el kit comprende además una etiqueta o un inserto en el envase. En otro aspecto, se emplea el kit para detectar una respuesta de CD4 específica de WT1 mediante el uso de un ensayo de hipersensibilidad de tipo retrasado. En otro aspecto, el kit se emplea para cualquier otro método enumerado en la presente. En otro aspecto, el kit se emplea para cualquier otro método conocido en la técnica. Cada posibilidad representa un aspecto separado de la presente descripción de la invención.

Sección de detalles experimentales

Ejemplo 1: Unión de HLA-A0201 y -A0301 por análogos de péptido sintéticos derivados de WT1

30 Materiales y métodos experimentales

Péptidos

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

Análisis de la secuencia del péptido

40 El análisis de la secuencia del péptido se realizó empleando dos bases de datos. La primera fue el software de the Bioinformatics & Molecular Analysis Section (National Institutes of Health, 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 clasifica péptidos 9-meros o 10-meros sobre el semitiempo de un coeficiente de disociación predicho de moléculas de HLA de clase I. La segunda base de datos, el software de predicción SYFPEITHI, se describe en Rammensee H.G. *et al.* (SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs, Immunogenetics, 50:213-219, 1999). Los péptidos control irrelevantes empleados en los experimentos *in vitro* fueron: RAS (TEYKLVVVGAPGVGKSALTIQ; SEQ ID NO:49) o CML b2a2 (VHSIPLTINKEALQRPVASFDFE; SEQ ID NO:50) para la clase II, y HIV pol (ILKEPVHGV; SEQ ID NO:51) o CML F (YLKALQRPY; SEQ ID NO:52) para la clase I.

50 **Líneas celulares**

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 5%, penicilina, estreptomina, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol a 37 °C en aire humidificado que contenía 5% de CO₂. T2 es una línea celular humana que carece de TAP1 y TAP2 y, por tanto, es incapaz de presentar péptidos derivados de proteínas

citosólicas. Las células Raji son células de linfoma de Burkitt humanas que muestran un alto nivel de expresión de TAP.

5 Las líneas celulares de mesotelioma humanas estudiadas incluyeron: sarcomatoide (VAMT, H2373, H28), epitelioides (H2452) y bifásica (JMN, MSTO y H-Meso1A). Las líneas celulares se obtuvieron en 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, Karmanos Cancer Institute, Wayne State University, Detroit, MI; H28 y MSTO: American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las líneas celulares se mantuvieron en los medios recomendados por los suministradores y se incubaron en un incubador humidificado con 5% de CO₂.

10 Las líneas celulares de mesotelioma Meso 11, Meso 34, Meso 37, Meso 47 y Meso 56 se obtuvieron del Dr. M Gregoire (Institute of Biology, Nantes, Francia) y se cultivaron en RPMI 1640 (Life Technologies) + suero de ternera fetal al 10% (FCS), penicilina-estreptomina al 1%, y L-glutamina al 1%. Todas las células fueron tipificadas para HLA por the Department of Cellular Immunology en MSKCC. La línea celular de melanoma Mewo (WT1⁻ A201⁺) se obtuvo del ATCC. El carcinoma de células renales SKRC-52 se obtuvo de L. Old de the Ludwig Institute. Las líneas celulares de leucemia se cultivaron en RPMI 1640 + FCS al 10%, penicilina-estreptomina al 1%, glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol a 37 °C/5% de CO₂. LAMA81, BV173 y 697, leucemias Ph⁺ que son WT1⁺ y A0201⁺, fueron suministradas por Dr. H.J. Stauss (University College London). SKLY-16 es un linfoma de células B humano (WT1⁻, A0201⁺); K562, RwLeu4 y HLA60, todas leucemias WT1⁺, se obtuvieron del ATCC.

Ensayo de T2 para la unión de péptidos y la estabilización de moléculas de HLA A0201

20 Células T2 (TAP⁻, HLA-A0201⁺) se incubaron durante la noche a 27 °C a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml en medio RPMI sin FCS suplementado con β_2m humana 5 μ g/ml (Sigma, St Louis, MO) en ausencia (control negativo) o en presencia de un péptido de referencia de tirosinasa positivo o los péptidos de ensayo a diversas concentraciones finales (50, 10, 1, y 0,1 microgramos (μ g)/ml). Después de una incubación durante 4 horas con brefeldina A 5 μ g/ml (Sigma), las células T2 se marcaron durante 30 minutos a 4 °C con una concentración saturante de mAb anti-HLA-A2.1 (BB7.2) y después se lavaron dos veces. Las células después se incubaron durante 30 minutos, a 4 °C, con una concentración saturante de Ig anti-ratón de F(ab')₂ de IgG de cabra conjugado con FITC (Caltag, San Francisco, CA), se lavaron dos veces, se fijaron en PBS/paraformaldehído al 1% y se analizaron empleando un citofluorómetro FACS Calibur® (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA).

30 Se empleó el promedio de la intensidad de fluorescencia (MIF) observada para cada concentración de péptido (después de dividir entre el MIF en ausencia de péptido) como una indicación de la unión del péptido, y se expresa como un "índice de fluorescencia." Los ensayos de estabilización se realizaron de modo similar. Después de la evaluación inicial de la unión del péptido en el momento 0, las células se lavaron en medio completo RPMI para eliminar los péptidos libres y se incubaron en presencia continua de brefeldina-A 0,5 μ g/ml durante 2, 4, 6 o 8 horas.

35 El número de complejos de péptido-HLA-A2.1 estables se calculó como se describió anteriormente para la inmunofluorescencia. El semitiempo de los complejos es una estimación del tiempo requerido para una reducción del 50% del valor MIF en el momento = 0.

Resultados

40 Se identificaron los péptidos que tenían una afinidad prevista por moléculas de HLA-A0201 y HLA-A0301 a partir de la secuencia de WT1. Estos péptidos nativos de WT1 se modificaron para generar péptidos heterocliticos con una mayor unión prevista a moléculas de HLA-A0201 y HLA-A0301, tal como se muestra en las tablas 1-2. Varios de los péptidos heterocliticos estabilizaron significativamente a las moléculas de HLA-A0201 y HLA-A0301 en ensayos de termoestabilización empleando una línea celular negativa TAP 1/2 (T2) y células Raji HLA-A0301. De modo específico, WT1-A1, B1, y C1 muestran una unión similar o mayor comparado con los correspondientes péptidos nativos WT1-A, B, y C. WT1-DL muestra una unión similar o mayor comparado con el correspondiente péptido nativo WT1-D (figura 1 A). Una comparación de la unión de HLA A0301 de A3 WT1-A, -B, -C, y -D con cada uno de sus respectivos tres análogos mostró una unión similar (figuras 1B-5E).

Así, los péptidos heterocliticos de WT1 de la presente invención muestran una unión potenciada a moléculas de HLA de clase I.

Tabla 1

Péptidos nativos de unión a HLA 0201 procedentes de WT1 y análogos sintéticos			
Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:	Puntuación BIMAS
WT1 A (nativo)	RMFPNAPYL	5	313

ES 2 591 029 T3

Péptidos nativos de unión a HLA 0201 procedentes de WT1 y análogos sintéticos			
Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:	Puntuación BIMAS
WT1 A1 (análogo)	YMFNPAPYL	6	1444
WT1 B (nativo)	SLGEQQYS V	7	285
WT1 B1 (análogo)	YLGEQQYSV	8	1311
WT1 C (nativo)	ALLPAVPS L	9	181
WT1 C1 (análogo)	YLLPAVPSL	10	836
WT1 D (nativo)	NLGATLKGV	11	159
WT1 D1 (análogo)	YLGATLKGV	12	735
WT1 E (nativo)	DLNALLPAV	13	11
WT1 E1 (análogo)	YLNALLPAV	14	735
WT1 F (nativo)	GVFRGIQDV	15	51
WT1 F1 (análogo)	GLRRGIQDV	16	12
WT1 G (nativo)	KRYFKLSHL	17	1
WT1 G1 (análogo)	KLYFKLSHL	18	550
WT1 H (nativo)	ALLRTPY S	19	1
WT1 H1 (análogo)	ALLRTPYV	20	1415
WT1 J (nativo)	CMTWNQMNL	21	15
WT1 J1 (análogo)	YMTWNQMNL	22	70

Tabla 2

Péptidos nativos de unión a HLA 0201 procedentes de WT1 y análogos sintéticos			
Nombre	Secuencia	SEQ ID	Puntuación BIMAS
A3WT1 A (nativo)	NMHQRNMTK	23	40
A3WT1 A1 (análogo)	NMYQRNMTK	24	200
A3WT1 A2 (análogo)	NMHQRVMTK	25	120

Péptidos nativos de unión a HLA 0201 procedentes de WT1 y análogos sintéticos			
Nombre	Secuencia	SEQ ID	Puntuación BIMAS
A3WT1 A3 (análogo)	NMYQRVMTK	26	600
A3WT1 B (nativo)	QMNLGATLK	27	20
A3WT1 B1 (análogo)	QMYLGATLK	28	100
A3WT1 B2 (análogo)	QMYLGVTLK	29	60
A3WT1 B3 (análogo)	QMYLGVTLK	30	300
A3WT1 C (nativo)	FMCAYPGCNK	31	30
A3WT1 C1 (análogo)	FMYAYPGCNK	32	150
A3 WT1 C2 (análogo)	FMCAYPFCNK	33	90
A3WF1 C3 (análogo)	FMYAYPGCNK	34	450
A3WT1 D (nativo)	KLSHLQMHSR	35	18
A3WT1 D1 (análogo)	KLYHLQMHSR	36	90
A3 WT1 D2 (análogo)	KLSHLQMHSK	37	90
A3 WT1 D3 (análogo)	KLYHLQMHSK	38	450

Ejemplo 2: Inducción de respuestas inmunológicas contra análogos de péptidos sintéticos derivados de WT1

Materiales y métodos experimentales

5 Estimulaciones de péptidos

Las PBMC se purificaron a partir de donantes sanos positivos a HLA-A0201 y de pacientes CML mediante centrifugación en un medio de centrifugación Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). Las células dendríticas de sangre periférica (DC) se generaron como sigue: Se aislaron fracciones de PBMC enriquecidas en monocitos empleando una técnica de adherencia al plástico, a partir de las PBMC totales. Las células adherentes al plástico se volvieron a cultivar en medio RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía plasma autólogo al 1-5%, interleuquina humana recombinante (IL)-4 a 1000 unidades por mililitro (U/ml) (Schering-Plough, N.J.), y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos humano recombinante (GM-CSF) 1000 U/ml (Immunex, Seattle).

En los días 2 y 4 de la incubación se añadió medio de cultivo fresco suplementado con IL-4 y GM-CSF. En el día 6, la mitad del medio se intercambió por medio de cultivo que contenía IL-4, GM-CSF, factor de necrosis tumoral(TNF)-alfa humano recombinante 10 ng/ml (R&D system) y CD40L soluble trimérico 500 ng/ml (Immunex, Seattle). En el día 9 las células se recolectaron y se emplearon como APC para la estimulación de antígenos. Las células expresan antígenos asociados a DC, tales como CD80, CD83, CD86, y HLA de clase I y de clase II sobre su superficie celular.

Se aislaron linfocitos T de los mismos donantes empleando una selección negativa mediante disminución de la cantidad con un anticuerpo monoclonal anti-CD11b, anti-CD56 y CD19 (Miltenyi, CA). Se cultivaron 1×10^6 linfocitos T con 1×10^5 DC autólogas en RPMI 1640 que contenía plasma autólogo humano termoinactivado al 5% con péptido 10 μ g/ml y β_2 microglobulina 2 μ g/ml, IL-7 humana recombinante 5 ng/ml (Genzyme), e IL-2 0,1 ng/ml en placas de 24 pocillos.

Después de cultivar durante 3 días se añadieron 20 U/ml de IL-2 recombinante (Sandoz Pharmaceutical). Después de 10 días se estimularon 1×10^6 células de nuevo añadiendo 2×10^5 monocitos CD14⁺ magnéticamente aislados autólogos, junto con IL-7 10 ng/ml, IL-2 20 U/ml y péptido 10 μ g/ml. En algunos casos, después de cultivar durante 7

más, las células se estimularon por tercera vez de la misma manera. Después de la última estimulación, las células T CD8⁺ fueron aisladas magnéticamente y se determinó la toxicidad y la secreción de gamma-IFN de estas células.

Resultados

5 Para determinar la capacidad de los péptidos de WT1 heteroclínicos para generar respuestas inmunológicas contra péptidos de WT nativos y heteroclínicos, la subpoblación de PBMC CD3⁺ de un donante sano se aisló y se estimuló con DC pulsadas con péptidos, derivadas de monocitos autólogos, y después se volvieron a estimular con monocitos CD14⁺ pulsados con péptidos. Después se determinó la presencia de células T específicas de antígeno activadas empleando líneas celulares leucémicas con HLA concordante. Varios péptidos análogos generaron respuestas inmunológicas más grandes (es decir, mayor frecuencia de precursores de células T en comparación con los péptidos nativos) mediante ELISPOT de gamma-IFN (figura 2A) y ensayo de liberación de cromo (figura 2B). Se observaron resultados similares empleando subpoblaciones de CD3⁺ (figuras 3B-D) y CD8⁺ (figura 3A) de donantes. Además, las células T CD8⁺ estimuladas con los péptidos de WT1 heteroclínicos presentan reactividad cruzada con los péptidos de WT1 nativos y fueron capaces de matar a los blastos de CML con HLA concordante (figuras 4A-B).

15 Así, los péptidos de WT1 heteroclínicos de la presente invención son capaces de generar células T que (a) segregan citoquinas inflamatorias, y (b) realizan la citólisis en respuesta a células que presentan los péptidos de WT1. Además, las células T generadas por los péptidos de WT1 heteroclínicos reconocen a los péptidos de WT1 nativos y heteroclínicos.

Ejemplo 3: Selección de péptidos de WT1 sintéticos que se unen a moléculas de HLA de clase II

20 Para identificar los péptidos de WT1 que se unen a muchas moléculas diferentes de HLA de clase II con afinidades relativamente altas, se determinaron las frecuencias alélicas de HLA-DRB en la población caucásica estadounidense empleando la información disponible en la base de datos de MHC de NCBI (Wheeler D.L. *et al.*, Database resources of the National Center for Biotechnology Information, Nucleic Acids Res., enero 2005, 1;33:D39-45; Wheeler D.L. *et al.*, Database resources of the National Center for Biotechnology Information, Nucleic Acids Res., enero 2006, 1;34:D173-80). Empleando el algoritmo de predicción de epitopos SYFPEITHI, se identificaron dos péptidos que se predijo que se unirían a las moléculas de HLA-DRB con afinidades relativamente altas, a partir de la secuencia de WT1 (tabla 3).

25 Tabla 3: Unión prevista de péptidos de WT1 nativos a alelos de HLA-DR basándose en el algoritmo SYFPEITHI (0 (baja)- 28 (alta)).

Identificador del péptido	SEQ ID NO:	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	7	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

30 Las secuencias de AA de los péptidos en la tabla 3 fueron LVRHHNMHQRNMTKL (427); RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (423); NKRYFKLSHLQMHRSR (331); y PGCNKRYFKLSHLQMHRSRKHTG (328).

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

Ejemplo 4: Los péptidos de WT1 de unión a moléculas de HLA de clase II estimulan células T CD4⁺

35 Materiales y métodos experimentales (en este y en posteriores ejemplos)

Preparación de células efectoras DC y CD4⁺

40 Se purificaron PBMC con Ficoll y se resuspendieron a 5 x 10⁶/ml en medio Ex-Vivo-15® (BioWhittaker, Walkersville, MD) que contenía plasma autólogo al 1%. Después de una incubación de 2 horas a 37 °C, la fracción no adherente se recolectó y se lavó repetidamente con PBS, después se resuspendió en medio que contenía 1 x 10³ IU/ml de GM-CSF y 0,0032 IU/ml de IL-4. En los días 2 y 4 se añadió el mismo medio como realimentación (es decir,

se añadió ½ del volumen de medio que contenía las suficientes citoquinas para una placa completa). En el día 5 se añadieron 10 µg/ml del péptido.

En el día 6 se añadió un cóctel de maduración de citoquinas, y las células se cultivaron durante 48 horas más. El cóctel de maduración consistía en: 4 x 10² IU/ml de IL-1-beta, 0,0032 IU/ml de IL-4, 1 x 10³ IU/ml de IL-6, 1 x 10³ IU/ml de GM-CSF, 10 µg/ml de TNF-alfa, y 1 µg/ml de PGE2.

En el día 7 las DC se recolectaron y se lavaron dos veces con RPMI, se contaron, se dividieron en partes alícuotas y se resuspendieron a 1 x 10⁶/ml en medio X-vivo 15® (sin suero). Los péptidos se añadieron hasta una concentración final de 10 µg/ml, y se incubaron durante 2 h, 37 °C y 5% de CO₂, se resuspendieron cuidadosamente cada 15 minutos, después se lavaron dos veces en HBSS y se resuspendieron en RPMI + plasma autólogo al 5% a una concentración apropiada dependiendo del número de efectores aislados en la siguiente etapa.

Además, en el día 7 se emplearon más PBMC para generar más células DC y CD3⁺. Las DC se aislaron a partir de la fracción adherente y se prepararon como se describió anteriormente para la segunda estimulación de las células efectoras en el día 14. Las células CD3⁺ se aislaron a partir de la fracción no adherente mediante selección negativa y se estimularon con las DC previamente preparadas mediante la resuspensión de las células CD3⁺ a una concentración de 2 x 10⁶ células/ml en RPMI + plasma autólogo al 5% y añadiendo DC a una proporción de efector:DC de 20:1 y 10 ng/ml de IL-15. Las células después se cultivaron en placa en 2 ml y se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante una semana.

En el día 14, las células CD3⁺ fueron estimuladas por segunda vez con el segundo lote de DC de la misma manera, excepto que se mezclaron 1 x 10⁶ células/ml con DC a una proporción de efector:DC de 50:1. En el día 18 se añadió el mismo medio como realimentación. En el día 20, las DC de la generación previa se descongelaron y se incubaron en citoquinas de maduración en medio X-vivo 15®. En el día 21 se realizó el ensayo ELISPOT.

Ensayo ELISPOT

Las placas se prehumedecieron con 30 µl/pocillo de alcohol al 70%, agitando las placas para asegurar la cobertura de toda la superficie específica, se lavaron tres veces con 150 µl/pocillo de PBS estéril, y después se incubó durante la noche a 4 °C con anticuerpo de revestimiento 10 µg/ml (clon anti-INF) en PBS, 100 µl/pocillo, envolviendo en papel de aluminio. Las placas después se lavaron dos veces con 150 µl/pocillo de PBS y una vez con RPMI/plasma autólogo al 10% (AP), y después se bloquearon con 150 µl/pocillo de RPMI/AP al 5% durante 2 horas a 37 °C. Las PBMC se suspendieron en RPMI/AP al 5% a 1 x 10⁶/ml. Se añadieron 1 x 10⁵ 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 disolución madre de PHA 2,5 mg/ml a los pocillos control. Las placas se envolvieron en papel de aluminio y se incubaron durante 20 horas a 37 °C.

Para el revelado, las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,05% dos y tres veces con PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de anti-gamma-INF-biotina (clon 7-B6-1), diluido 1:500 en PBS/BSA al 0,5%, y las placas se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Después de 1 hora y 30 minutos se preparó un complejo de avidina-peroxidasa (ABC) (Vectastain Elite Kit, Vector) añadiendo 1 gota del reactivo A y 1 gota del reactivo B a 10 ml de PBS/Tween 20 al 0,1%, y se conservó a temperatura ambiente (ta) envuelto en papel de aluminio. Las placas se lavaron tres veces con PBS/Tween al 0,05% y tres veces con PBS, después se añadieron 100 µl/pocillo de complejo de avidina-peroxidasa y las placas se incubaron durante una hora a ta envueltas en papel de aluminio, después se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0,05%, seguido de tres veces con PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato, las placas se incubaron durante 4 a ta en la oscuridad y la reacción se detuvo con agua. Los pocillos se secaron y las placas se conservaron durante la noche en la oscuridad a ta. El número de manchas se determinó de modo automático con el uso de un analizador de imágenes de vídeo asistido por ordenador con el software KS ELISPOT 4.0 (Carl Zeiss Vision, Alemania).

Preparación del sustrato

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

Experimentos de cebado cruzado

Se realizó una estimulación de CD3⁺ *in vitro* como se describió anteriormente. Se incubaron 2 x 10⁶ DC inmaduras con el lisado celular total procedentes de 2 x 10⁶ células tumorales que previamente se habían preparado mediante 3 ciclos de congelación/descongelación. Después de 18 horas de incubación se añadieron citoquinas de maduración a las DC como se describió anteriormente. Las células CD3⁺ se estimularon tres veces con estas DC maduras autólogas, tras lo cual las células T se ensayaron con un ensayo ELISPOT de gamma-IFN para la reactividad contra las DC maduras autólogas que habían sido pulsadas con péptidos de CD4⁺ individuales cuando estaban en el

estado inmaduro. Estas DC fueron expuestas al péptido de nuevo durante el ensayo ELISPOT, según se describió anteriormente.

Ensayo de citotoxicidad de cromo 51

5 La presencia de CTL específicos se midieron en el ensayo de liberación de cromo de 4 h convencional. Las células diana se pulsaron con 10 microgramos (mcg)/ml de péptidos sintéticos durante la noche a 37 °C y se marcaron con 300 µCi de Na₂⁵¹CrO₄ (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA). Después de un lavado a fondo, las células diana se incubaron con células T en una proporción E:T que varía de 100:1 a 10:1. Todas las condiciones se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C en 5% de CO₂. Los fluidos sobrenadantes se recolectaron y se midió la radiactividad en un contador gamma. Se determinó el porcentaje de lisis específica a partir de la siguiente fórmula: 100 x [(liberación experimental menos liberación espontánea)/(liberación máxima menos liberación espontánea)]. La liberación máxima se determinó mediante la lisis de las dianas radiomarcadas en Triton X-10 al 2,5%.

Estadísticas

15 Los análisis estadísticos se realizaron con el software Statview (SAS Institute, Cary, NC) empleando un ensayo de la t desapareado de dos colas, ajustándose el nivel de significancia estadística a 0,05.

Resultados

20 Para determinar la capacidad de los péptidos de WT1 de unión a HLA de clase II de la presente invención para estimular células T CD4⁺, se aislaron subpoblaciones de PBMC CD4⁺ de donantes sanos y se estimularon con DC pulsadas con péptidos derivadas de monocitos autólogas, y después se reestimularon con monocitos CD14⁺ pulsados con péptidos. El péptido 328 y, en un grado ligeramente inferior, el péptido 423, estimularon una significativa respuesta de CD4 específica de péptido en una diversidad de donantes con diferentes tipos de HLA-DRB1, tal como lo muestra un ELISPOT de γ-IFN (figura 5). Tal como se esperaba, las células estimuladas con RAS (péptido control irrelevante) o con APC solo no produjeron γ-IFN por encima de los niveles de fondo.

25 Así, los péptidos de WT1 de unión a HLA de clase II de la presente invención son capaces de estimular células T que reconocen células que presentan péptidos de WT1.

Ejemplo 5: Identificación de otros péptidos de WT1 de unión a moléculas de HLA de clase II; mutación de estos para que contengan epitopos de moléculas de clase I heteroclíticos

30 Se generó un péptido de WT1 que abarca los restos 122-140, que tiene la secuencia SGQARMFPNAPYLPSCL (SEQ ID NO:39) y se denominó "WT1 122." Se predijo la afinidad de unión de WT1 122 por moléculas de HLA DRB habituales empleando el algoritmo de predicción de epitopos SYFPEITHI (Rammensee H. *et al.*, SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs, Immunogenetics, noviembre 1999, 50(3-4):213-219). Cuatro de los seis tipos de HLA-DR mostraron una mejor unión prevista con relación a un péptido más corto, WT1 124, que tiene la secuencia QARMFPNAPYLPSCL (SEQ ID NO:40) (tabla 4). Además, se generó un péptido denominado "WT1 122A1", que comprende el péptido WT1A1 de CD8⁺ heteroclítico YMFPNAPYL (ejemplo 1; SEQ ID NO:6) anidado dentro del epitopo de péptido de CD4⁺ alargado y que tiene la secuencia SGQAYMFPNAPYLPSCL (SEQ ID NO:41). WT1 122A1 también muestra una mejor unión predicha frente a WT1 124 con una amplia gama de tipos de HLA-DR (tabla 4). El promedio de puntuación de WT1 122A1 fue de 19, con una puntuación de unión mayor que 14 (la marca de la mitad) para los seis tipos de HLA-DR, comparado con una puntuación de unión 12 con solo un tipo de HLA-DR sobre 14. La unión de WT1 122A1 predicha a los tipos de HLA-DR también fue mayor que para un péptido más corto que contenía el péptido WT1A1, "124A1," que tiene la secuencia QAYMFPNAPYLPSCL (SEQ ID NO:42).

45 Además, se generó un péptido de WT1 que abarca los restos 247-261, que tiene la secuencia GATLKGVAAGSSSSVKWT (SEQ ID NO:44) y se denominó "WT1 244." Se predijo la afinidad de unión de WT1 244 por moléculas de HLA DRB habituales tal como se describió anteriormente para WT 122. Varios tipos de HLA-DR mostraron una mejor unión prevista con relación a un péptido más corto, WT1 247, que tiene la secuencia LKGVAAGSSSSVKWT (SEQ ID NO:45) (tabla 4).

Tabla 4. Identificación de unión predicha de los péptidos de WT1 a tipos de HLA-DR de clase II

Secuencia del péptido	Nombre	Puntuación SYFPEITHI (alta 28 - baja 0)					
		DRB-101	DRB-301	DRB-401	DRB-701	DRB-1101	DRB-1501
QARMFPNAPYLPSCL	124	12	12	8	8	14	18

Secuencia del péptido	Nombre	Puntuación SYFPEITHI (alta 28 - baja 0)					
SGQARMFPNAPYLPSCLE S	122	22	18	22	16	16	18
QAYMFPNAPYLPSCL	124A1	22	12	8	8	14	18
SGQAYMFPNAPYLPSCLE S	122A	27	17	22	18	16	18
GATLKGVAAGSSSSVKW T	244	31	11	20	24	18	18
LKGVAAGSSSSVKWT	247	22	11	20	24	6	18
Frecuencia de HLA en la población caucásica estadounidense		17,9%	18,6%	13,8%	25,5%	10,4%	15,9%

Ejemplo 6: Células que expresan WT1 procesan y presentan péptidos de la presente invención

Se realizaron estudios de cebado cruzado para determinar si las células que expresan WT1 procesan y presentan los péptidos de la presente invención y/o los correspondientes péptidos nativos. Se prepararon lisados totales tumorales a partir de tres líneas celulares diferentes: 697 (WT1⁺, HLA A0201⁺), una línea celular de leucemia e1a2; JMN, (WT1⁺, HLA A0201⁺) una línea celular de mesotelioma bifásica y, como control, MeWo (WT1⁻, HLA A0201⁺), una línea celular de melanoma maligno. Las DC de donantes A0201⁺ sanos se incubaron durante 18 horas con los lisados tumorales y se emplearon para estimular células T CD3⁺ autólogas. Después de tres estimulaciones, las células T se ensayaron para su reactividad contra DC autólogas pulsadas con los péptidos de WT1. Las células T que habían sido estimuladas con los lisados tumorales positivos a WT1 reconocieron los péptidos de HLA de clase II individuales (figura 6A-B), mientras que las células T estimuladas por DC pulsadas con lisado de MeWo no estimularon células T específicas de WT1. Además, las células T estimuladas con DC pulsadas con el lisado tumoral de 697 reconocieron el péptido de clase I corto nativo WT1A (126-134) y el péptido WT1A1 análogo. Estos experimentos se repitieron en 5 donantes distintos. Las células T estimuladas reconocieron el péptido de WT1DR 328 y el péptido de WT1DR 122A1 en 3/5 experimentos, y reconocieron a WT1DR 427 en todos los experimentos. Por tanto, a pesar de la baja expresión del transcrito de WT1 en las líneas celulares de mesotelioma (véase a continuación), los epitopos de WT1 CD4 de la presente invención fueron procesados y presentados por las moléculas de HLA de clase II de las células de mesotelioma.

Estos descubrimientos demuestran que los péptidos de la presente invención (a) son captados y presentados por las APC en una forma antigénica; y (b) son presentados por APC expuestas a células tumorales que expresan WT1; y (c) las APC expuestas a los péptidos WT1 122 y 122A1 suscitan la formación de células T que reconocen células tumorales que expresan WT1. Así, las células que expresan WT1, incluyendo células de mesotelioma y de leucemia, procesan y presentan los péptidos de la presente invención.

Ejemplo 7: La estimulación con WT1 122 o 122A1 estimula la producción de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de antígeno; las células T CD8⁺ suscitadas por WT1 122A1 también reconocen el antígeno nativo

Materiales y métodos experimentales

Se aislaron células CD3⁺ de donantes sanos y se estimularon dos veces con péptido, y después se determinó el reconocimiento de las células JMN WT1⁺ o las células Mewo WT1⁻, solas o con el péptido indicado, mediante ELISPOT de gamma-IFN empleando los métodos descritos en el ejemplo 4.

Resultados

Las células T fueron estimuladas con DC derivadas de monocitos autólogas pulsadas con WT1 122, 122A1, o un péptido control negativo, se reestimularon con monocitos CD14⁺ pulsados con el mismo péptido, y después se ensayaron para la formación de células T específicas de antígeno mediante ELISPOT de γ -IFN. La estimulación con WT1 122 o 122A1, pero no con el péptido de control negativo, generó células T CD4⁺ que reconocen dianas pulsadas con péptidos que contienen los respectivos epitopos de CD4⁺, pero no las dianas pulsadas con el péptido de control negativo (figura 7A-B).

Además, ambos WT1 DR 122 y WT1DR 122A1 fueron capaces de activar células T CD8⁺ contra el epitopo corto nativo WT1A (aminoácidos 126-134 (figura 7C)); WT1DR 122A1 fue un estimulador más potente.

Estos experimentos de estimulación se reprodujeron en 7 donantes sanos diferentes, cada uno con un tipo diferente de HLA-DRB1. Se realizaron hasta 15 experimentos distintos con cada péptido WT1 DR. El WT1DR 328 estimuló respuestas de células T específicas de péptido en 11/15 experimentos; el WT1 DR 423 en 3/14 experimentos; el WT1DR 122 en 2/5 experimentos; y el WT1DR 122A1 estimuló células T que reconocen al péptido WT1DR 122A1 y WT1DR 122 en 6/9 experimentos.

Así, la estimulación con WT1 122 o 122A1 genera células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de antígeno. Además, la estimulación con WT1 122A1 genera células T CD8⁺ que reconocen al péptido de CD8⁺ heteroclíptico y su homólogo nativo, tanto si está enterrado en un péptido más largo (WT1 122 o WT1 122A1, respectivamente) como si está solo.

Ejemplo 8: Las células T CD4⁺ específicas de antígeno generadas por los péptidos de la presente invención reconocen células tumorales que expresan WT1

Para ensayar si las células T CD4⁺ específicas de antígeno generadas por los péptidos de la presente invención reconocen las células tumorales que expresan WT1, células T estimuladas con péptido fueron expuestas en un ELISPOT de gamma-IFN a células tumorales WT-1* y negativas a WT-1*. Se presentó una cantidad suficiente de péptido de WT1 sobre la superficie de células tumorales de mesotelioma WT1⁺ para las células T estimuladas con los péptidos WT1DR individuales para que reconozcan las células tumorales de mesotelioma, comparado con células de melanoma negativas a WT1 control (figura 8, panel izquierdo). En otro experimento, las células T fueron estimuladas por el WT1DR 122A1 mutado y expuestas a dianas pulsadas y no pulsadas. Cuando las células diana negativas a WT1 control fueron pulsadas con péptido WT1DR 122A1 adicional, aumentó la producción de gamma-IFN. Cuando las células diana positivas a WT1 fueron pulsadas con péptido WT1DR 122A1 adicional, la producción no aumentó, lo cual demuestra que se logra una respuesta máxima con los péptidos procesados nativos (figura 8, panel derecho). Así, la vacunación con péptidos de la presente invención produce como resultado la generación de células T específicas de antígeno con actividad contra tumores que expresan WT1.

Ejemplo 9: Las células T CD8⁺ específicas de antígeno generadas por los péptidos de la presente invención reconocen células tumorales que expresan WT1

Para determinar si las células T CD8⁺ específicas de antígeno generadas por los péptidos de la presente invención reconocen células tumorales que expresan WT1, células CD3⁺ procedentes de donantes sanos fueron aisladas y estimuladas con DC derivadas de monocitos autólogos pulsadas con WT1DR 122A1, WT1DR 122, o un péptido de control negativo, se reestimularon con monocitos CD14⁺ pulsados con el mismo péptido, y después se ensayaron mediante ELISPOT γ-IFN para la formación de células T específicas de antígeno que reconocen células JMN WT1⁺.

El WT1DR 122A1, pero no el WT1DR 122, estimuló un número suficiente de células CD8⁺ como para ser citotóxico para 697, una línea celular de leucemia WT1⁺. Las células T de CD8⁺ no reconocen a SKLY16, un linfoma de células B negativo a WT1, a menos que haya sido pulsado con WT1A (figura 9, panel izquierdo), lo cual demuestra especificidad de antígeno de la respuesta inmunológica. Se observaron resultados similares en 3/4 donantes A0201⁺ diferentes, cada uno con un tipo diferenciado de HLA-DRB1. Tal como se esperaba, los péptidos de control negativo no generaron células T CD8⁺ específicas de antígeno. En otros experimentos, las células T CD3⁺ generadas mediante estimulación con WT1 122A1 o WT1A1 reconocen a las células JMN, pero no a las células de control negativo MeWo, tanto solas como pulsadas con el péptido WT1 122A1 (figura 9, panel derecho). Por contraste, las células CD4⁺ estimuladas con WT1DR 122A1 no muestran citotoxicidad con las células de mesotelioma WT1⁺ o con las células de melanoma WT1⁻. Las células T humanas estimuladas dos veces con el péptido WT1A nativo o el análogo WT1A1 fueron capaces de lisar líneas celulares de mesotelioma WT1⁺ humanas, comparado con las líneas celulares control WT1⁻ (9,2% de lisis de MeWo frente a 19% de lisis de JMN para células T estimuladas con WT1A; 22,2% de lisis de MeWo frente a 44,8% de lisis de JMN para células T estimuladas con WT1A1).

Estos descubrimientos demuestran que la vacunación con WT1 122A1 o WT1A1 da como resultado la generación de células T específicas de antígeno con actividad contra tumores que expresan WT1. Estos descubrimientos también demuestran que los péptidos que comprenden un péptido de MHC de clase I heteroclíptico que está asociado con un péptido de MHC de clase II estimulan células T CD4⁺ y CD8⁺, incluyendo respuestas de células T específicas de antígeno contra el péptido nativo.

Ejemplo 10: Expresión de WT1 en líneas celulares de mesotelioma humano

Materiales y métodos experimentales

RT-PCR cuantitativa para los transcritos de WT-1

El ARN total fue aislado de líneas celulares mediante extracción con fenol/cloroforno. La pureza del ARN se confirmó mediante la absorbancia a 260 nm. La reacción de RT se adaptó de los protocolos suministrados por Applied Biosystems (Foster City, CA). Comenzando con 1 mcg de ARN total, se emplearon la transcriptasa inversa y hexámeros aleatorios para aislar el ADNc. Para la reacción de PCR, el ADNc se mezcló con los siguientes

5 cebadores y sondas de WT1: cebador directo (localizado en el exón 7): 5' CAGGCTGCAATAAGAGATATTTTAAGCT-3' (SEQ ID NO:53) y cebador inverso (localizado en el exón 8): 5'-GAAGTCACACTGGTATGGTTTCTCA-3' (SEQ ID NO:54); sonda Taqman (localizada en el exón 7) 5'-CTTACAGATGCACAGCAGGAAGCACACTG-3' (SEQ ID NO:55). La sonda de WT1 fluorescente 5'-56-FAM/CTTACAGATGCACAGCAGGAAGCACACTG/3BHQ_1/-3 (SEQ ID NO:56) se marcó con 6-carboxifluoresceína fosforamida (FAM) como tinte indicador en el extremo 5', y con el tinte extintor 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 s 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 de Q-RT-PCR y las mediciones de fluorescencia se realizaron en el sistema de PCR Applied Biosystems 7500 Real Time®. Los cebadores y sondas de ABL control fueron: directo 5'-TGGAGATAAAGCTCTAAGCATAACTAAAGGT-3 (SEQ ID NO:57, localizado en EnF-10030); inverso 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3' (SEQ ID NO:58, localizado en ENR-1063); sonda fluorescente 5'-/56 FAM/ CCATTTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT /3BHQ_1/-3' (SEQ ID NO:59, localizada en ENPr-1043).

15 **Resultados**

Para determinar los niveles de expresión de WT1 en un mesotelioma, se cuantificaron los niveles del transcrito de WT1 en una serie de líneas celulares de mesotelioma humano (sarcomatoide, epitelioide y bifásica) mediante RT-PCR y se compararon con diversas líneas celulares de leucemia con expresión de WT1 conocida. El mensaje de WT1 fue expresado en 12/12 líneas celulares de mesotelioma y, en la mayoría de los casos, a un nivel más bajo que las líneas celulares leucémicas (figura 10). Por contraste, las líneas celulares de melanoma (MeWo) y linfoma (SKLY16) fueron negativas a WT1. SK-RC-52, una línea celular de carcinoma de células renales, no expresó WT1, a pesar de la baja expresión de WT1 en podocitos renales humanos. Los análisis de citometría de flujo confirmaron que todas las líneas celulares de mesotelioma expresaban moléculas de clase II, y algunas (JMN y H-2452) expresaban moléculas de clase I.

25

Lista De Secuencias

- <110> Memorial Sloan Kettering cancer Center
- <120> Péptidos WT-1 inmunogénicos y métodos para su uso
- 5 <130> P-862S-PC
- <160> 59
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- Leu Val Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu**
1 5 10 15
- 20 <210> 2
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 25 <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**
- 30 <210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 3
- Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg**
1 5 10 15
- 40 <210> 4
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- 45 <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
- 50 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
- <400> 5
- 55 **Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu**
1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 6
Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5
 10
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 7
Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5
 20
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 8
Tyr Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
1 5
 30
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 9
Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
1 5
 40
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 10
Tyr Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
1 5
 50
 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 11
Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val
1 5
 60
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

Tyr Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val
1 5

5 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
1 5

10 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

Tyr Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
1 5

20 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <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*

35 <400> 16

Gly Leu Arg Arg Gly Ile Gln Asp Val
1 5

40 <210> 17
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 17

Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu
1 5

50 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

Lys Leu Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu
1 5

55 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser
1 5

5 <210> 20
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 20

Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Val
1 5

15 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 21

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

25 <210> 22
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22

30 **Tyr Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu**
1 5

35 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys
1 5

40 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 24

Asn Met Tyr Gln Arg Asn Met Thr Lys
1 5

50 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 25

Asn Met His Gln Arg Val Met Thr Lys
1 5

60 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

5 **Asn Met Tyr Gln Arg Val Met Thr Lys**
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

15 **Gln Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys**
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

25 **Gln Met Tyr Leu Gly Ala Thr Leu Lys**
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

35 **Gln Met Asn Leu Gly Val Thr Leu Lys**
1 5

<210> 30

35 <211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

40 **Gln Met Tyr Leu Gly Val Thr Leu Lys**
1 5

<210> 31

45 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 31

50 **Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys**
1 5 10

<210> 32

55 <211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

60 **Phe Met Tyr Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys**
1 5 10

<210> 33

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 33
Phe Met Cys Ala Tyr Pro Phe Cys Asn Lys
1 5 10
 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 34
 15 **Phe Met Tyr Ala Tyr Pro Phe Cys Asn Lys**
1 5 10
 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35
 20 **Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg**
1 5 10
 <210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 36
 25 **Lys Leu Tyr His Leu Gln Met His Ser Arg**
1 5 10
 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 37
 30 **Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Lys**
1 5 10
 <210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 38
 35 **Lys Leu Tyr His Leu Gln Met His Ser Lys**
1 5 10
 <210> 39
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 39
 40

Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys
1 5 10 15

Leu Glu Ser

<210> 40
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 40

Gln Ala Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu
1 5 10 15

<210> 41
 <211> 19
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 41

Ser Gly Gln Ala Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys
1 5 10 15

Leu Glu ser

20 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 42

Gln Ala Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu
1 5 10 15

30 <210> 43
 <211> 168
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 43

ES 2 591 029 T3

Met Gly 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
 Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala Leu
 165

5 <210> 44
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

10 Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Trp Thr

15 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 45

20 Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys Trp Thr
 1 5 10 15

25 <210> 46
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 46

ES 2 591 029 T3

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 Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30
 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45
 Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235
 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
 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

<210> 47

<211> 453

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

ES 2 591 029 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
210 215 220

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

ES 2 591 029 T3

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> 48
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 48

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

5

10

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
 Thr Pro Ser Tyr Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro
 225 230 235
 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 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

<212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humano

 <400> 51
 5 **Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val**
 1 5

<210> 52
 <211> 9
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 52

15 **Tyr Leu Lys Ala Leu Gln Arg Pro Tyr**
 1 5

<210> 53
 <211> 28
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> sintetizado químicamente

25 <400> 53

 caggctgcaa taagagatat ttaagct 28

30 <210> 54
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 <400> 54

40 gaagtcacac tggtatggtt tctca 25

 <210> 55
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 <400> 55

50 cttacagatg cacagcagga agcacactg 29

 <210> 56
 <211> 29
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> sintetizado químicamente

 <400> 56

 cttacagatg cacagcagga agcacactg 29

<210> 57
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <400> 57
 10 tggagataac actctaagca taactaaagg t 31
 <210> 58
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 20 <400> 58
 gatgtagttg cttgggaccc a 21
 25 <210> 59
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> sintetizado químicamente
 <400> 59
 35 ccatttttg tttgggcttc acaccatt 28

REIVINDICACIONES

- 1.- Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos SGQAYMFPNAPYLPSCLLES (SEQ ID NO:41).
- 2.- Una composición que comprende el péptido aislado de la reivindicación 1, y un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 5 3.- Una vacuna que comprende el péptido aislado de la reivindicación 1, y que comprende además un adyuvante o un vehículo, o una célula presentadora de antígenos.
- 4.- La composición de la reivindicación 2 o la vacuna de la reivindicación 3, que comprende además un péptido de WT1 adicional distinto de dicho péptido aislado.
- 10 5.- La composición o la vacuna de la reivindicación 4, en la que dicho péptido de WT1 adicional se selecciona del grupo que consiste en: LVRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO:1), RSDLVRRHHNMHQRNMTKL (SEQ ID NO:2), NKRYFKLSHLQMHSR (SEQ ID NO:3), y PGCNKRYFKLSHLQMHSRKHTG (SEQ ID NO:4).
- 6.- El uso de un péptido según la reivindicación 1, para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de un linfocito T citotóxico específico de la proteína de WT1 (CTL).
- 15 7.- El uso de un péptido según la reivindicación 1, para inducir la formación y proliferación *ex vivo* de (a) un linfocito CD8+ específico de la proteína de WT1; y (b) un linfocito CD4+ específico para dicha proteína de WT1.
- 8.- La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o la vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, para su uso para tratar un cáncer que expresa WT1 o para reducir la incidencia de un cáncer que expresa WT1 o su recaída en un sujeto.
- 20 9.- La composición o la vacuna según la reivindicación 8, en la que dicho cáncer que expresa WT1 es una leucemia mielógena aguda (AML), un mesotelioma maligno, un síndrome mielodisplásico (MDS), un cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), o un linfoma.
- 10.- El uso del péptido de la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para tratar un cáncer que expresa WT1 o para reducir la incidencia de un cáncer que expresa WT1 o su recaída en un sujeto.
- 11.- Una célula presentadora de antígenos que comprende el péptido aislado de la reivindicación 1.
- 25 12.- Una vacuna que comprende la célula presentadora de antígenos de la reivindicación 11.
- 13.- Una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido aislado de la reivindicación 1.
- 14.- Una vacuna o un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.
- 15.- Un linfocito T citotóxico humano que reconoce una célula de cáncer que expresa WT1 maligna para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa WT1, en el que el linfocito T citotóxico humano se induce *ex vivo* para que se forme y prolifere poniendo en contacto una población de linfocitos *ex vivo* con el péptido de la reivindicación 1.
- 30

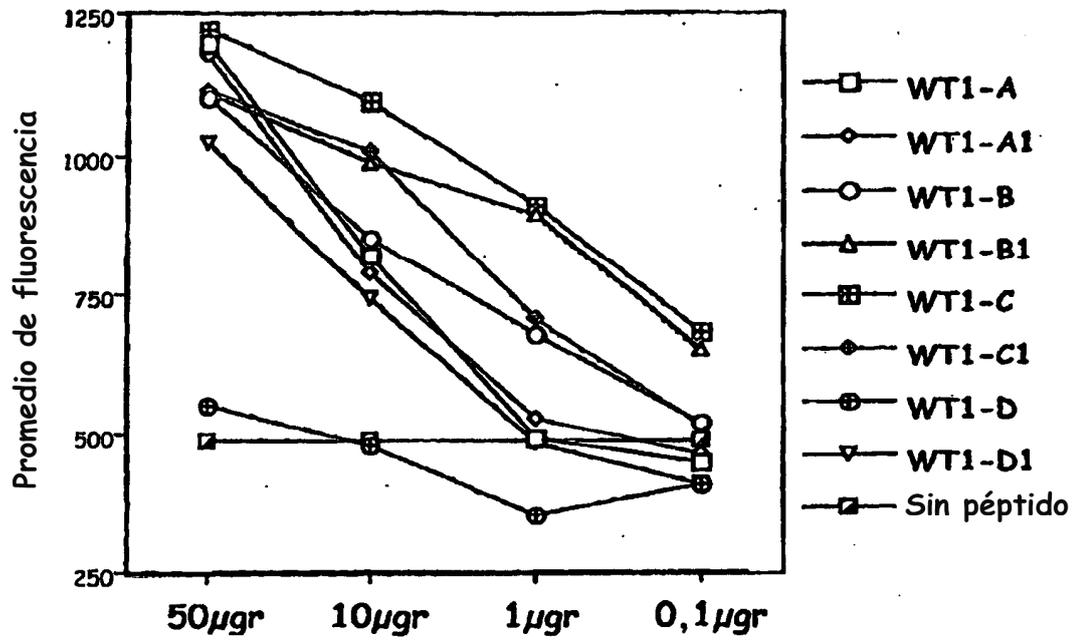


Figura 1A

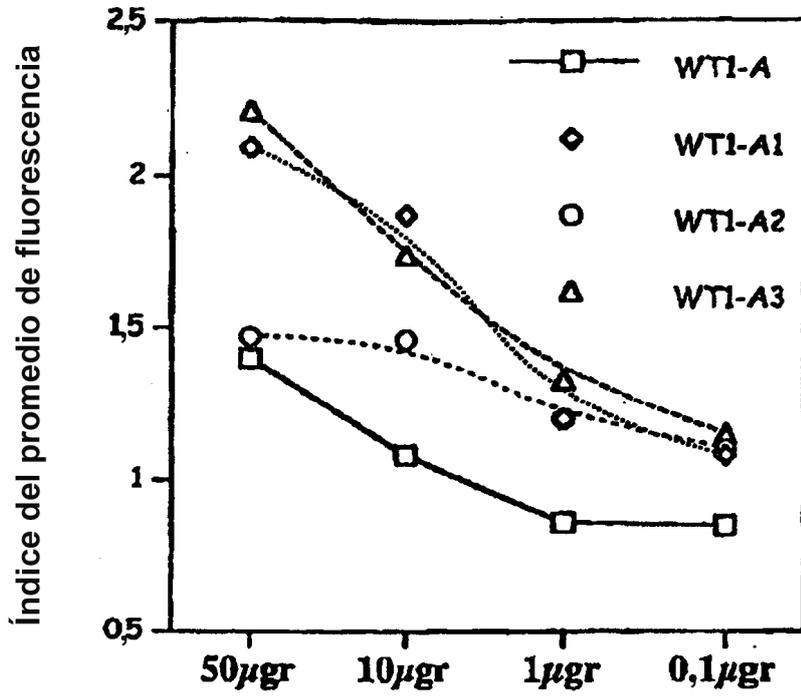


Figura 1B

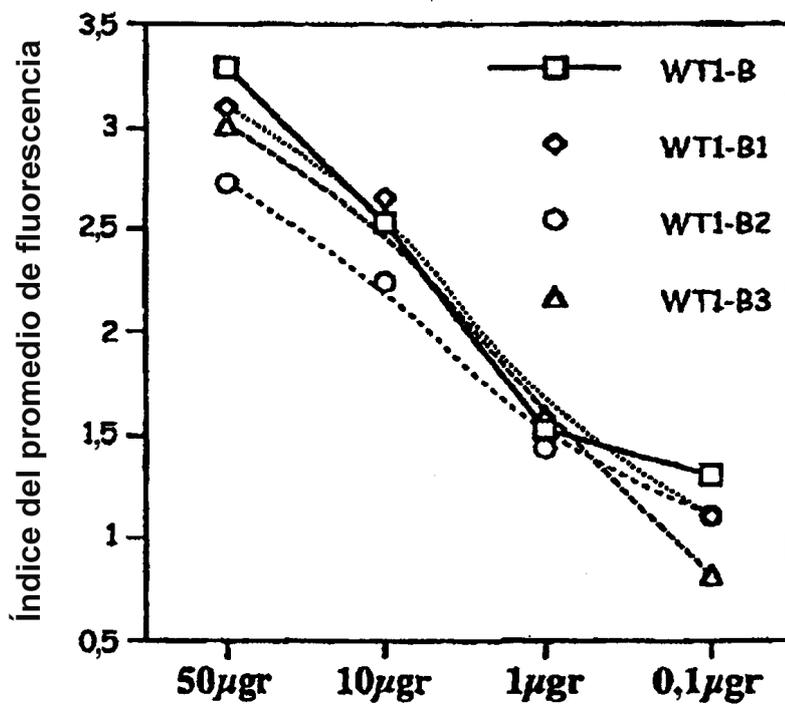


Figura 1C

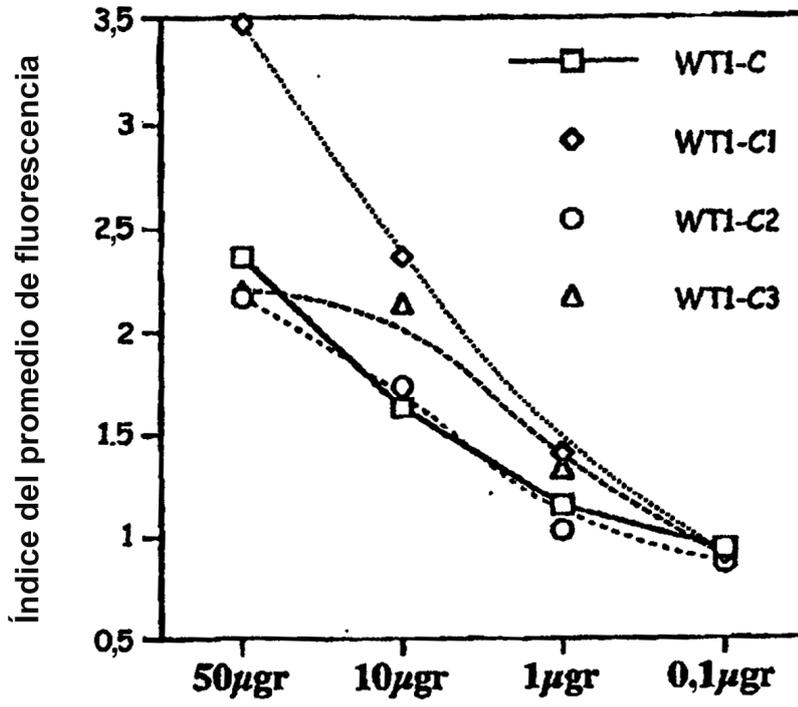


Figura 1D

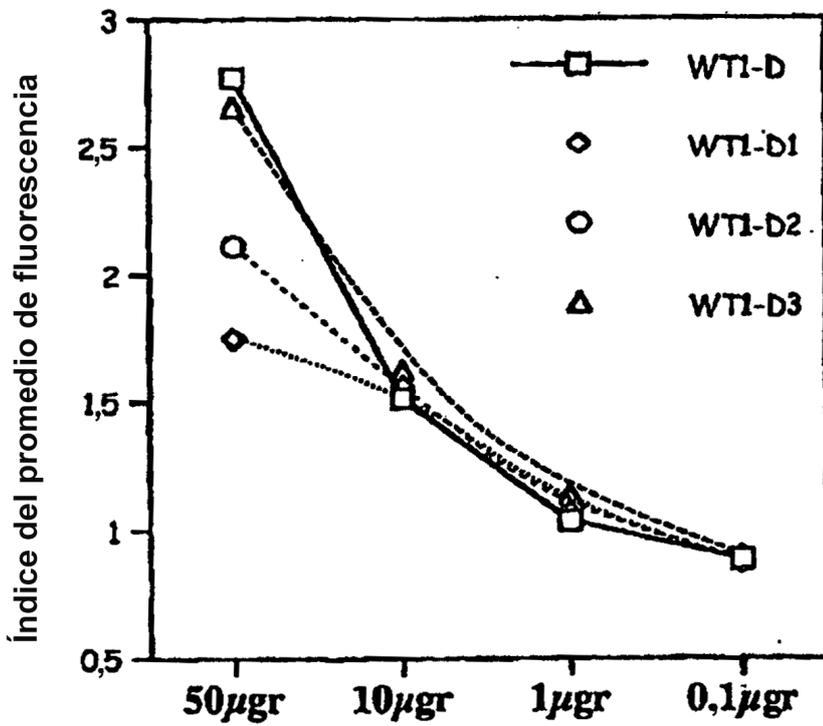


Figura 1E

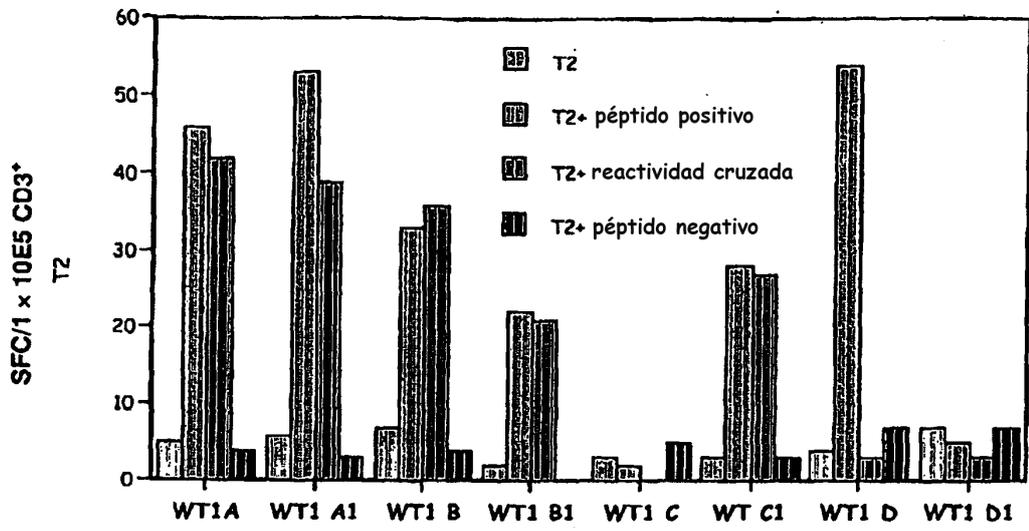


FIGURA 2A

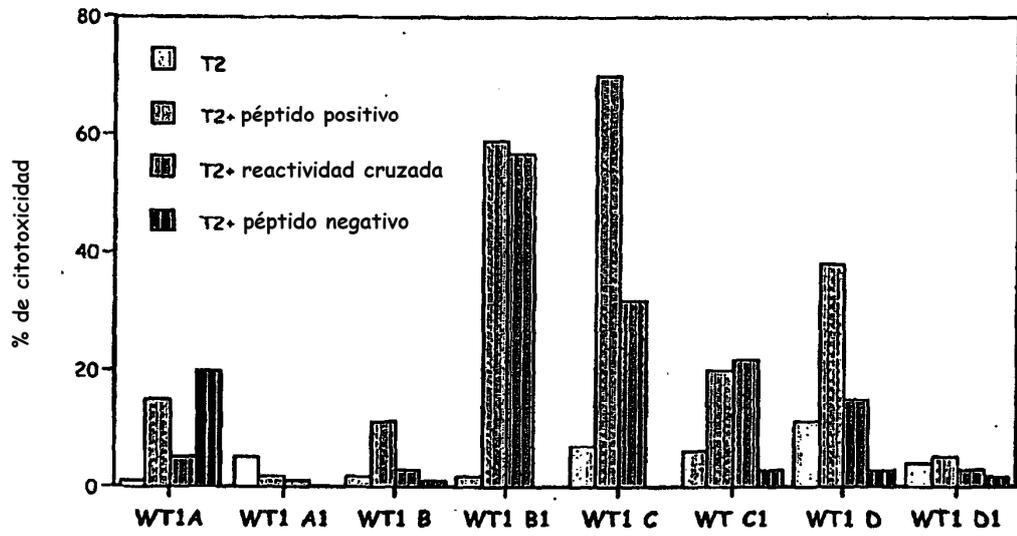


FIGURA 2B

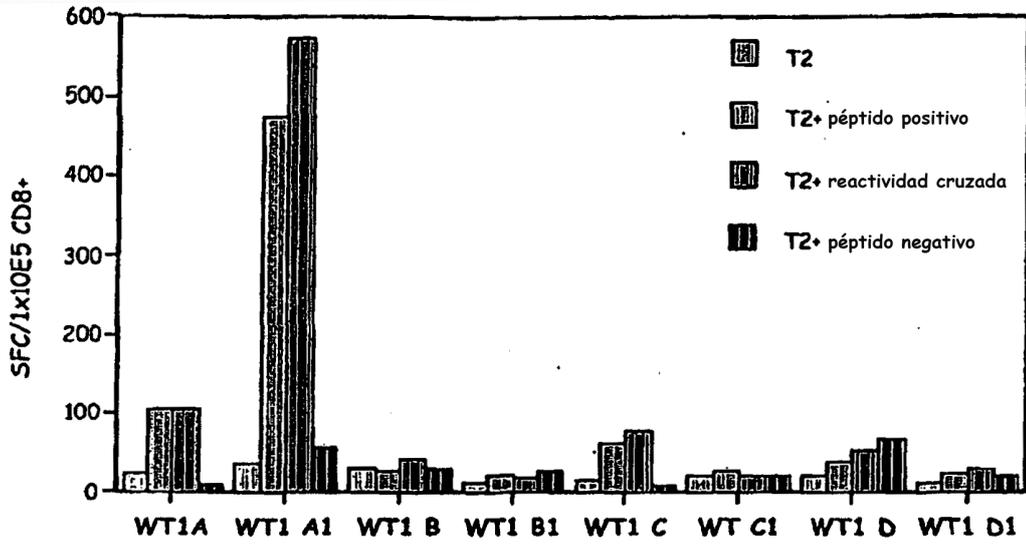


FIGURA 3A

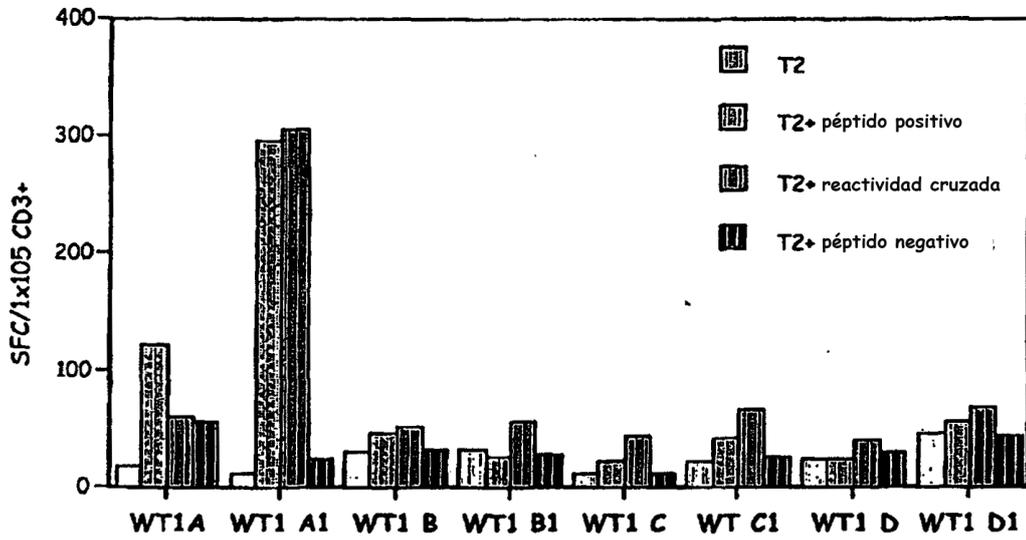


FIGURA 3B

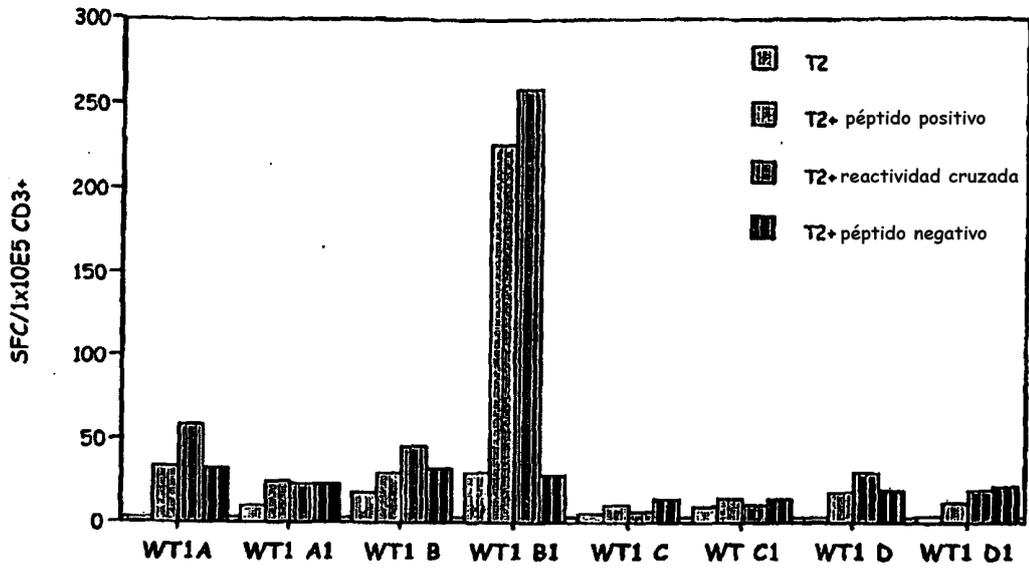


FIGURA 3C

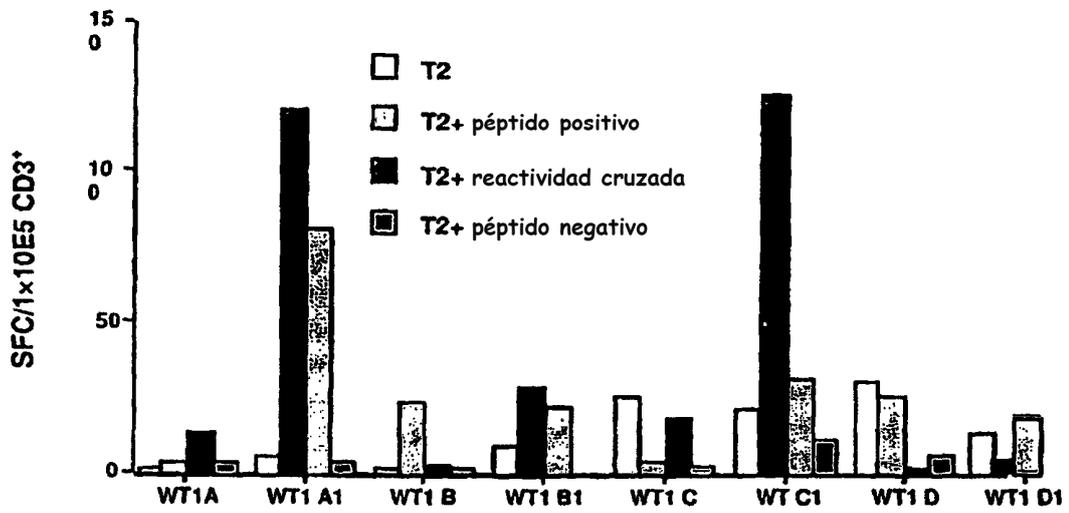


FIGURA 3D

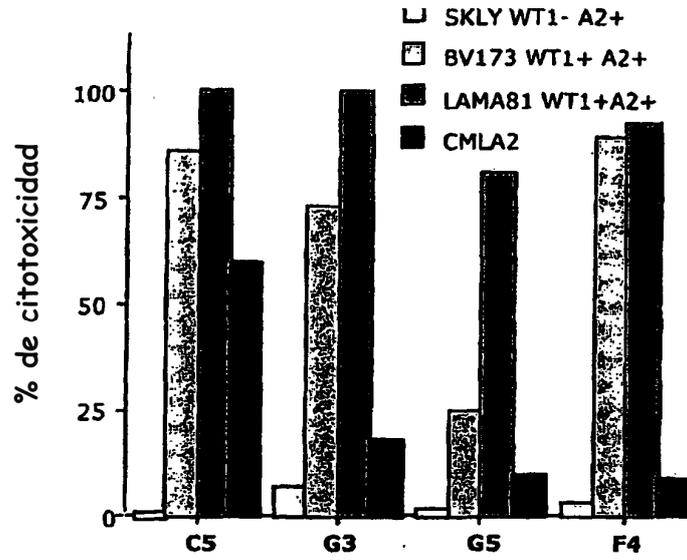


FIGURA 4A

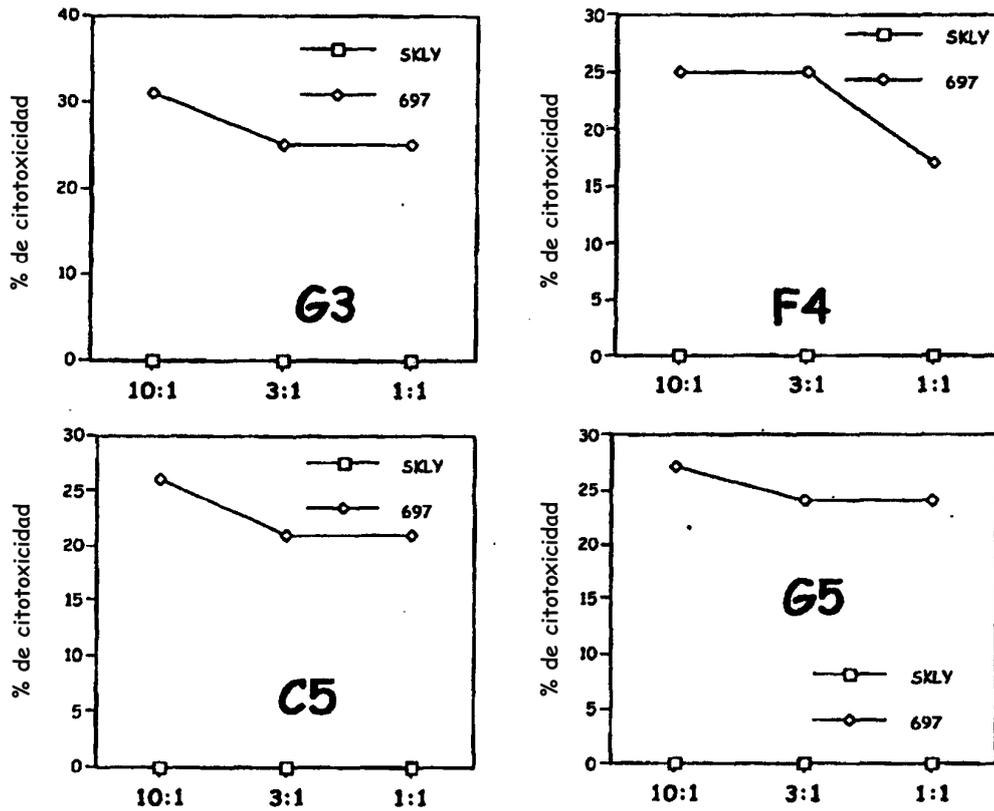


FIGURA 4B

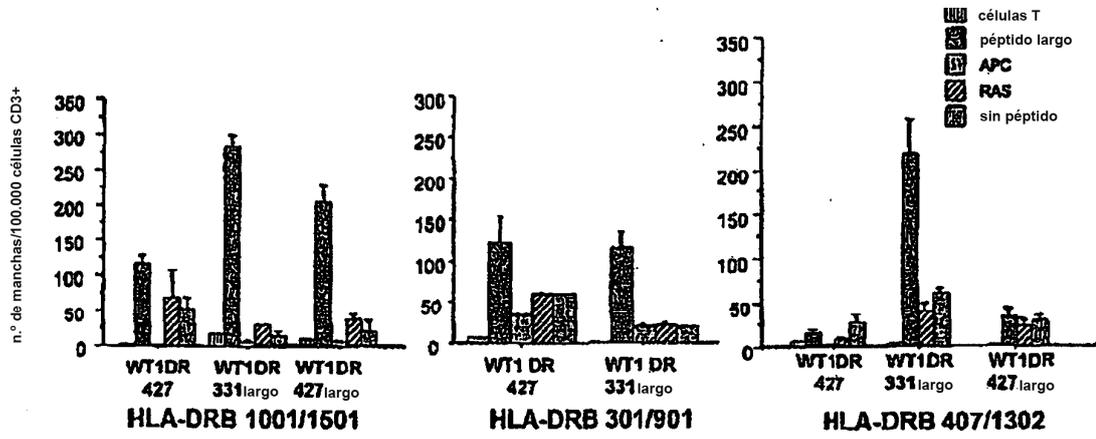


FIGURA 5, parte 1

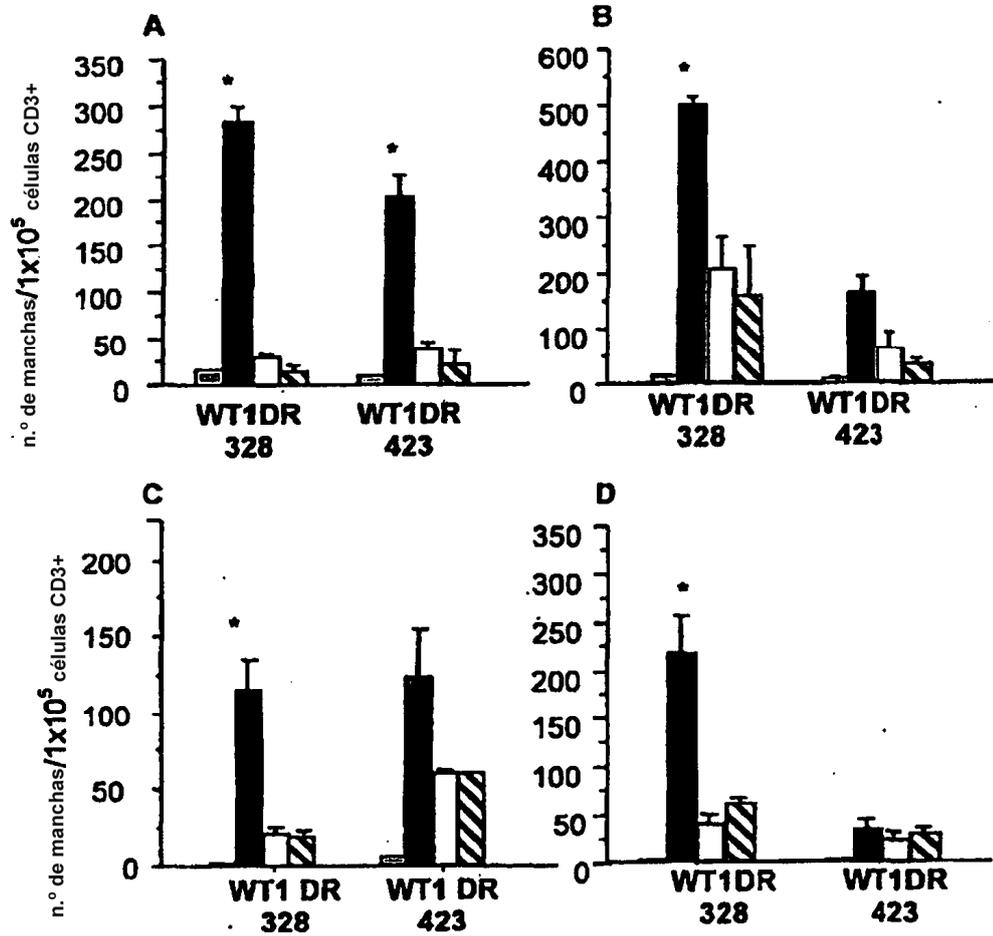


FIGURA 5, parte 2



FIGURA 6A

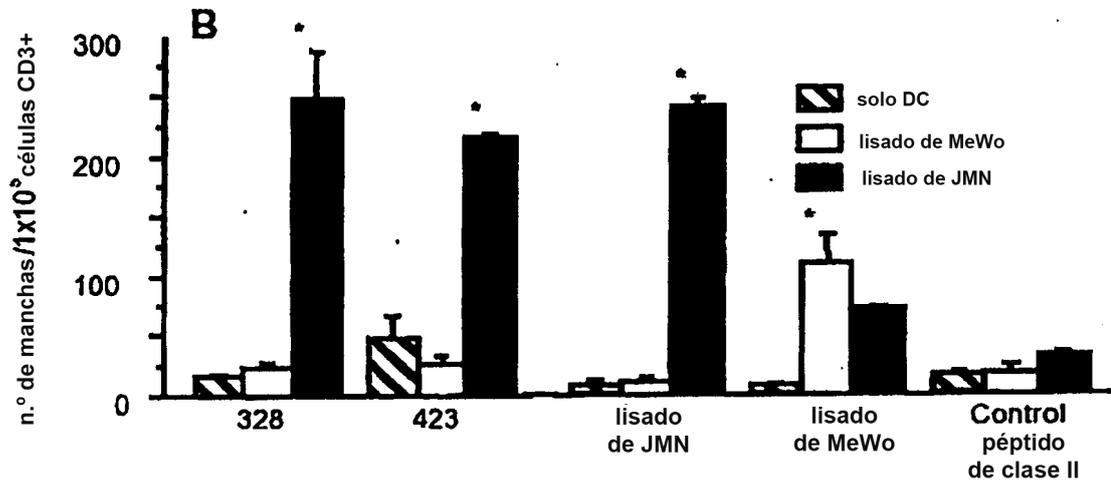


FIGURA 6B

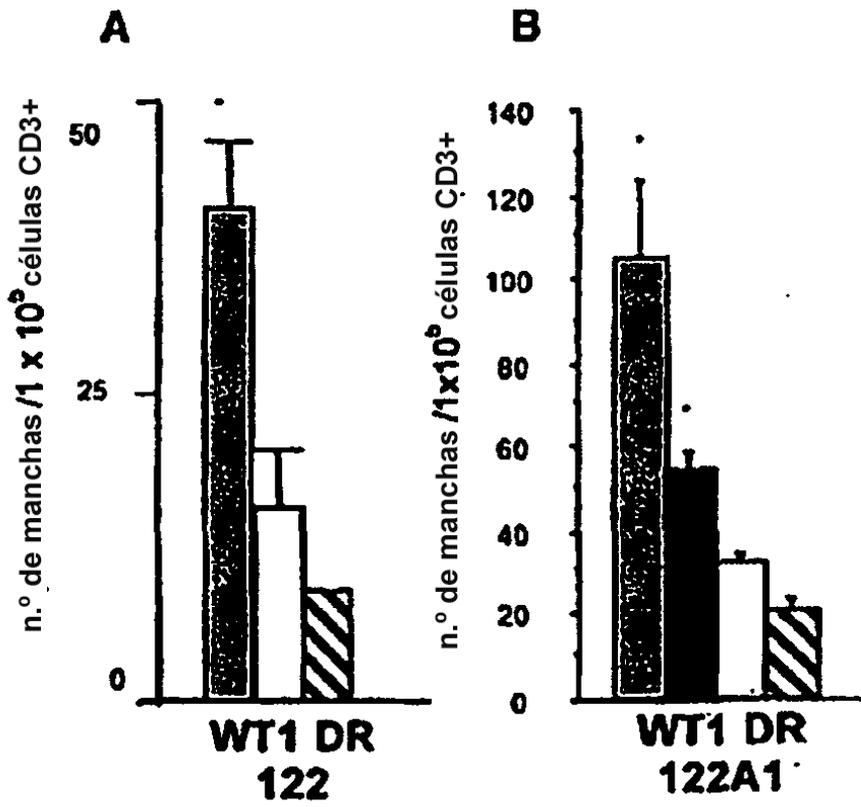


FIGURA 7A-B

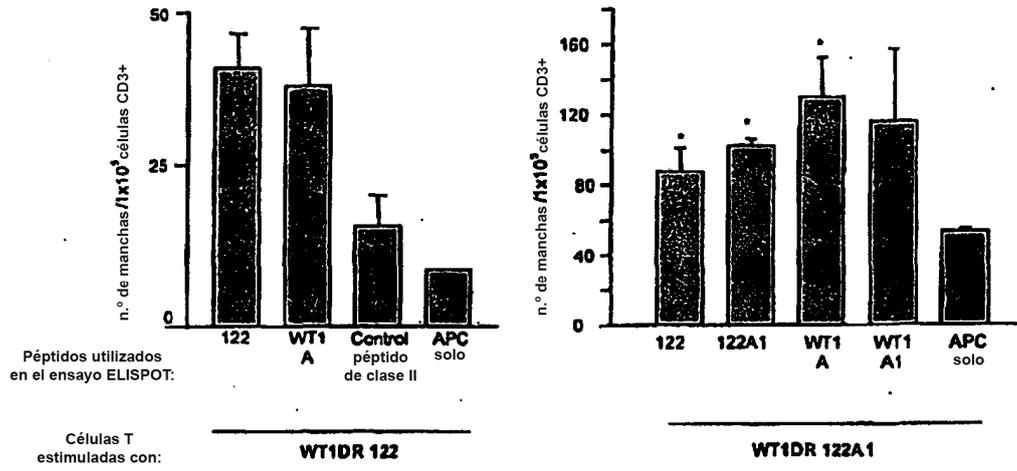


FIGURA 7C

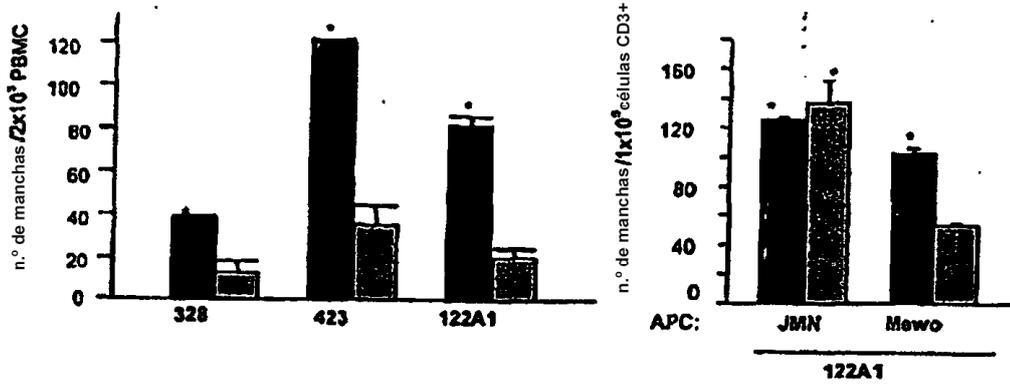


FIGURA 8

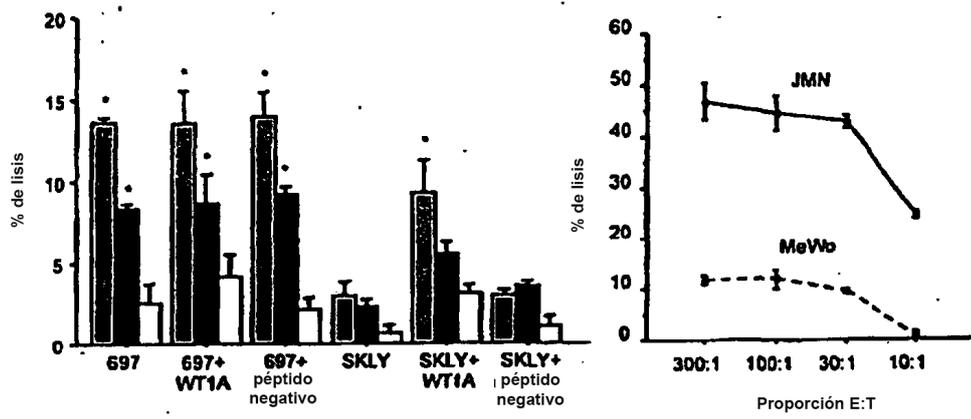


FIGURA 9

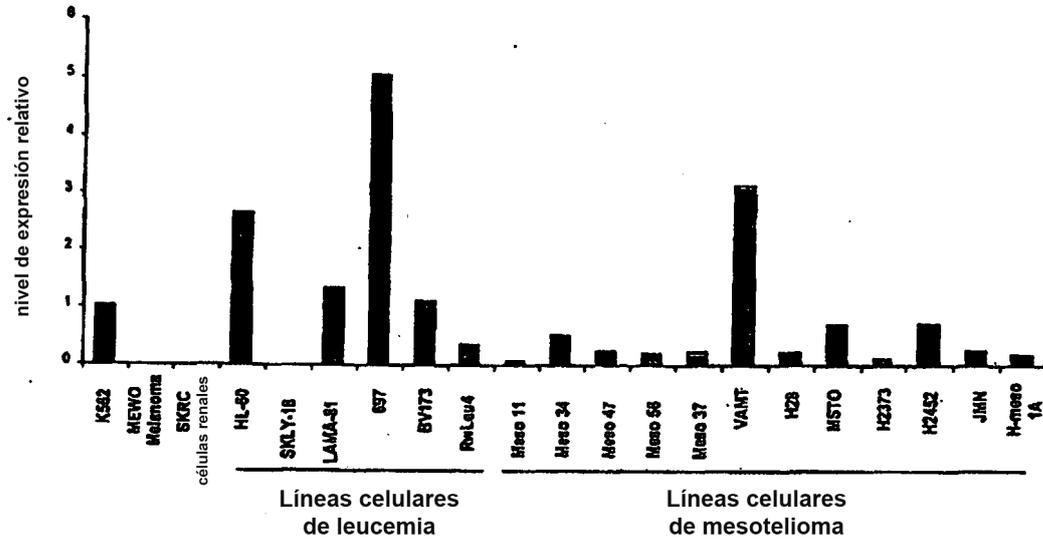


FIGURA 10