



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 679 127

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01) **A61K 39/39** (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 35/15 (2015.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/0784 (2010.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: 05.12.2008 PCT/JP2008/072160

(87) Fecha y número de publicación internacional: 11.06.2009 WO09072610

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 05.12.2008 E 08857437 (1)

97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 13.06.2018 EP 2228072

54 Título: Composición vacunal contra el cáncer

(30) Prioridad:

05.12.2007 JP 2007314552

Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 22.08.2018

(73) Titular/es:

INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC. (100.0%) 13-9, ENOKI-CHO SUITA-SHI, OSAKA 564-0053, JP

(72) Inventor/es:

SUGIYAMA, HARUO

74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

DESCRIPCIÓN

Composición vacunal contra el cáncer

5 Campo de la técnica

10

15

25

35

La presente invención se refiere a una composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al antígeno leucocitario humano (HLA)-A*0206, que comprende un producto proteico del gen supresor tumoral del tumor 1 de Wilms (WT1) (de aquí en adelante abreviado a veces como WT1 proteico) o un péptido parcial del mismo (de aquí en adelante abreviado a veces como WT1 peptídico). La presente invención también se refiere a una composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0206, que comprende un ADN o ARN que codifica el WT1 proteico o WT1 peptídico mencionado anteriormente, un método para inducir CTL específicos de WT1, un método para la inducción de células dendríticas que presentan un antígeno del cáncer, y un método para el diagnóstico de personas positivas al HLA-A*0206, y un método de tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206.

La presente invención se refiere adicionalmente a una composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0201, que comprende un péptido modificado del WT1 peptídico.

20 Técnica antecedente

El gen WT1 del tumor de Wilm se aisló como un gen asociado con tumorigénesis en el tumor de Wilms, que es un tumor renal pediátrico (véase la bibliografía no patente 1). Este gen codifica un factor de transcripción en dedos de zinc asociado con el mecanismo regulador del crecimiento y diferenciación celular, y la apoptosis y el desarrollo tisular.

El gen WT1 se clasificó originalmente como un gen supresor tumoral. Sin embargo, basándose en pruebas recientes que se muestran en (i) a (iii) siguientes:

- 30 (i) alta expresión del gen WT1 de tipo silvestre en distintos tumores malignos y cánceres sólidos humanos incluyendo tumores hematopoyéticos malignos tales como la leucemia y síndromes mielodisplásicos (MDS),
 - (ii) inhibición del crecimiento de las células de leucemia human y células de un cáncer sólido tratadas con oligonucleótidos WT1 antisentido, y
 - (iii) promoción del crecimiento e inhibición de diferenciación en células mieloides precursoras de ratón por la expresión constitutiva del gen WT1 de tipo silvestre,

se ha sugerido que el gen WT1 de tipo silvestre presenta un efecto oncogénico más que un efecto supresor tumoral en distintas enfermedades malignas (véase la bibliografía de patente 1).

- 40 También se sabe de la alta expresión del gen WT1 en cánceres sólidos, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de cuello de útero y cáncer ovárico (véase la bibliografía de patente 2).
- En general, el sistema inmunitario para eliminar sustancias ajenas comprende la inmunidad humoral, en la cual están implicados los macrófagos, que reconocen un antígeno y sirven como células presentadoras de antígeno, células T auxiliares, que reconocen el antígeno presentado por los macrófagos y producen distintas linfocinas para activar otras células T, y linfocito B, que se diferencian en células productoras de anticuerpo mediante acciones de las linfocinas; e inmunidad mediada por células, en la que los linfocitos T citotóxicos (CTL), que se producen mediante diferenciación en respuesta a la presentación de antígenos, atacan y destruyen las células diana.
- Actualmente, se ha considerado que la inmunidad del cáncer se basa principalmente en inmunidad mediada por células en la que están implicados los CTL. En la inmunidad del cáncer basada en CTL, los precursores de células T reconocen un antígeno del cáncer presentado en forma de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y el antígeno del cáncer, y por esto se diferencian y crecen como CTL, que atacan y destruyen las células del cáncer. En este caso, la célula del cáncer presenta, en su superficie celular, un antígeno del MHC clase I y el antígeno del cáncer, que es el objetivo de los CTL (véase las bibliografías no patentes 2 a 5). El MHC se denomina como antígeno leucocitario humano (HLA) en los seres humanos.
- Se considera que el antígeno del cáncer mencionado anteriormente, que se presenta por un antígeno del MHC de clase I en las superficies de las células del cáncer, es decir, las células diana, es un péptido de aproximadamente 8 a 12 aminoácidos producido mediante un procesamiento mediado por proteasa intracelular de un antígeno proteico sintetizado en las células cancerosas (véase las bibliografías no patentes 2 a 5). Actualmente, la búsqueda de antígenos proteicos de distintos cánceres está en proceso, pero solo se han identificado unas pocas proteínas como antígenos específicos del cáncer.

El presente inventor sintetizó polipéptidos que consistía cada uno en 7 a 30 aminoácidos contiguos basándose en la secuencia de aminoácidos del producto de expresión del gen WT1 y cada uno contenía al menos un aminoácido que presumiblemente sirve como un aminoácido de anclaje para la unión con el HLA-A*2402 o HLA-A*0201 confirmó que estos péptidos se unían con el HLA-A*2402 o HLA-A*0201 (estos péptidos estaban restringidos a HLA-A*2402 o HLA-A*0201), y descubrió que la unión de los péptidos con HLA-A*2402 o HLA-A*0201 inducía los CTL, dando como resultado una respuesta citotóxica contra las células diana (de aquí en adelante abreviada como respuesta de CTL). A partir de este hecho, estos péptidos se identificaron como epítopos de CTL a partir del producto de expresión del gen WT1 (proteína WT1).

- En este punto, se identificaron los epítopos de CTL específicos de WT1 solo para HLA-A*2402 o HLA-A*0201 (véase la bibliografía de patente 3), HLA-A*3303 (véase la bibliografía de patente 4) o HLA-A*1101 (véase la bibliografía de patente 5). Se confirmó que las respuestas de CTL inducidas por los polipéptidos desvelados por las bibliografías anteriores están restringidos por HLA-A*2402, HLA-A*0201, HLA-A*3303 y HLA-A*1101.
- Esto indica la posibilidad de que el producto proteico del gen supresor tumoral WT1 es un antígeno de rechazo tumoral prometedor, también llamado como antígeno asociado a un tumor (TAA). De hecho, no se observaban altos niveles de CTL específicos de WT1 o un alto título de anticuerpos anti-WT1 en sangre periférica de donantes de sangre sanos, pero sí en los pacientes de cáncer.
- Sin embargo, los tipos de HLA son suficientemente diversos para servir como marcadores para la identificación de individuos. En los HLA, los antígenos del MHC de clase I se clasifican en HLA-A, HLA-B, HLA-C, y los antígenos del MHC de clase II se clasifican en HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Cada clase tiene varios tipos de antígeno. El sitio de unión de cada HLA tiene un polimorfismo genético. Por ejemplo, se sabe que HLA-A, HLA-B y HLA-C tiene 27 o más, 59 o más, y 10 o más tipos de polimorfismos (alelos), respectivamente.
 - Por lo tanto, habiendo el deseo de identificar un antígeno del cáncer que se una a otros tipos de HLA distintos de HLA-A*2402, HLA-A*0201, HLA-A*3303 y HLA-A*1101 e inducir una respuesta de CTL, y para de esta manera aplicar una inmunoterapia a un intervalo más amplio de sujetos.
- 30 Entre tanto, se informó de los siguientes tres WT1 peptídicos modificados en dos documentos: el péptido WT1₁₈₇P1Y (YLGEQQYSV; SEQ ID NO: 12), el péptido WT1₁₂₆P1Y (YMFPNAPYL; SEQ ID NO: 35) (véase la bibliografía de patente 6 para los dos péptidos anteriores), y el péptido WT1₁₂₆P9M (RMFPNAPYM; SEQ ID NO: 52) (véase la bibliografía de patente 7).
- Además, se informó de los siguientes dos péptidos en la exposición escrita para el examen de la patente europea N.º 1127068:
 - el péptido WT1₁₂₆P2L (RLFPNAPYL; SEQ ID NO: 39) y el péptido WT1₁₂₆P2L&P9V (RLFPNAPYV; SEQ ID NO: 75) (véase la bibliografía no patente 7).
- Sin embargo, no se ha informado nunca de si estos WT1 peptídicos modificados sirven como un antígeno del cáncer que se una a otros tipos de HLA distintos de HLA-A*2402, HLA-A*0201, HLA-A*3303 y HLA-A*1101 y que induzca una respuesta de CTL.
 - Bibliografía de patente 1: JP-A 9-104629
- 45 Bibliografía de patente 2: JP-A 11-035484
 - Bibliografía de patente 3: WO 00/06602 Folleto
 - Bibliografía de patente 4: Solicitud de patente japonesa N.º 2006-045287
 - Bibliografía de patente 5: Solicitud de patente japonesa N.º 2006-355356
 - Bibliografía de patente 6: Folleto WO 2005/053618
- 50 Bibliografía de patente 7: Folleto WO 2007/016466
 - Bibliografía no patente 1: Gessler, M. et al., Nature, vol. 343, pp. 774-778, 1990
 - Bibliografía no patente 2: Cur. Opin. Immunol., vol. 5, p. 709, 1993
 - Bibliografía no patente 3: Cur. Opin. Immunol., vol. 5, p. 719, 1993
 - Bibliografía no patente 4: Cell, vol. 82, p. 13, 1995
- Bibliografía no patente 5: Immunol. Rev., vol. 146, p. 167, 1995
 - Bibliografía no patente 6: Mol. Cell. Biol., vol. 11, p. 1707, 1991
 - Bibliografía no patente 7: La exposición escrita para el examen de la patente europea N.º 1127068

Sumario de la invención

60

Problema que resolver por la invención

Un objetivo de la presente invención es aplicar, adicionalmente para personas positivas a HLA-A*0206, un método de tratamiento y/o prevención del cáncer para pacientes con tumores malignos incluyendo la leucemia, estando basado el método en un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 (WT1 proteico) o un péptido parcial del mismo (WT1 peptídico).

Medio para resolver el problema

10

El presente inventor llevó a cabo estudios intensivos para conseguir el objetivo mencionado anteriormente. Como resultado, descubrió que el péptido WT1₁₈₇ (SLGEQQYSV) y el péptido WT1₁₂₆ (RMFPNAPYL) que derivaban del WT1 proteico humano, que se sabía que inducía solo los CTL restringidos a HLA-A*0201, sorprendentemente también inducía los CTL restringidos al HLA-A*0206. En circunstancias en las que solo los péptidos descritos en el folleto WO 00/06602 se conocían como los WT1 peptídicos que inducían CTL restringidos a HLA-A*0201, el presente inventor descubrió que un péptido modificado del WT1₁₈₇ peptídico (al que también se hace referencia como WT1₁₂₆ peptídico modificado) y un péptido modificado del WT1₁₂₆ peptídico (al que también se hace referencia como WT1₁₂₆ peptídico modificado) también se unen a una molécula del HLA-A*0201. Basándose en estos hallazgos, el presente inventor llevó a cabo estudios intensivos adicionales y completó la presente invención. A saber, la presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Por lo tanto, se refiere a los siguientes artículos:

15 1. Un péptido parcial, una composición que contiene dicho péptido parcial, o una vacuna contra el cáncer que comprende un ADN o ARN que codifican un péptido parcial, para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es

```
el péptido WT1<sub>187</sub>: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2),
el péptido WT1<sub>126</sub>: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3),
el péptido WT1<sub>187</sub>P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11),
el péptido WT1<sub>187</sub>P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16),
el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20),
el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34),
el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39),
el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46), o
el péptido WT1<sub>126</sub>P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).
```

2. El péptido parcial o la composición de acuerdo con el artículo 1 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en una persona positiva al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es

```
el péptido WT1<sub>187</sub>: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2),
el péptido WT1<sub>126</sub>: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3),
el péptido WT1<sub>187</sub>P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11),
35 el péptido WT1<sub>187</sub>P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16),
el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20),
el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34),
el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39),
el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46), o
el péptido WT1<sub>126</sub>P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).
```

- 3. El péptido parcial o composición de acuerdo con el artículo 2 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es
- 45 el WT1₁₂₆ péptido: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3)
 - 4. Las composiciones de acuerdo con uno cualquiera de los artículos 1 a 3 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, que comprende adicionalmente un adyuvante.
- 50 5. El uso de un péptido parcial, una composición que contiene dicho péptido parcial, o una vacuna contra el cáncer que comprende un ADN o ARN que codifica un péptido parcial, donde dicho péptido parcial es un péptido como se define en el artículo 1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206.
- 6. El uso de un péptido parcial o composición de acuerdo con el artículo 5 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es

```
el péptido WT1<sub>187</sub>: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2),
el péptido WT1<sub>126</sub>: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3),
el péptido WT1<sub>187</sub>P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11),
el péptido WT1<sub>187</sub>P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16),
el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20),
el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34),
el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39),
el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46), o
```

ES 2 679 127 T3

el péptido WT1₁₂₆P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).

- 7. El uso de un péptido parcial o composición de acuerdo con el artículo 6 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es
- el péptido WT1₁₂₆: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3).

5

10

15

20

25

30

45

50

60

65

- 8. El uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de los artículos 5 a 7 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, que comprende adicionalmente un adyuvante.
 - 9. Un método *ex vivo* para la inducción de CTL específicos de WT1, que comprende el cultivo, en presencia de un péptido parcial de acuerdo con el artículo 1, de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de la persona positiva a HLA-A*0206, para obtener los CTL específicos de WT1 inducidos a partir de ellas.
- 10. Un método ex vivo para la inducción de células dendríticas que presenten el péptido parcial de acuerdo con el artículo 1, que comprende el cultivo, en presencia del péptido parcial del mismo, células dendríticas inmaduras derivadas de una persona positiva a HLA-A*0206, para obtener células dendríticas inducidas a partir de las mismas que presenten al péptido parcial del mismo.
- 11. Un método in vitro de diagnóstico del cáncer para personas positivas al HLA-A*0206, que comprende
- i) una etapa de detección o cuantificación de un péptido parcial de acuerdo con el artículo 1, un anticuerpo contra este o CTL específicos de WT1 inducidos por un método de acuerdo con el artículo 9 en una muestra de una persona positiva al HLA-A*0206, y una etapa de comparación de la cantidad de dicho péptido parcial del mismo, dicho anticuerpo contra este o dichos CTL específicos de WT1, con el caso en el que el cáncer no se ha desarrollado, o
 - ii) una etapa de la determinación de la posición o región de CTL específicos de WT1 o células dendríticas en el sujeto positivo al HLA-A*0206 al que se habían administrado dichos CTL específicos de WT1 inducidos por el método de acuerdo con el artículo 9 o dichas células dendríticas inducidas por el método de acuerdo con el artículo 10.
- 12. Una composición vacunal para personas positivas al HLA-A*0201, que comprende el siguiente péptido:

```
el péptido WT1<sub>187</sub>P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11), el péptido WT1<sub>187</sub>P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16), el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20), el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34), el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39), el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46), o el péptido WT1<sub>126</sub>P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).
```

- 13. El uso de una composición de acuerdo con el artículo 12 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0201.
- 14. la composición de acuerdo con el artículo 12 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0201.

Además, en el contexto de la presente invención, se desvelan los siguientes (1) a (17).

- (1) Una composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al antígeno leucocitario humano (HLA)-A*0206 que comprende un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo.
- (2) La composición de acuerdo con el (1) anterior, donde el producto proteico del gen supresor tumoral WT1 es la proteína de los siguientes (a) o (b):
 - (a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o
 - (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de (a), cualquiera de las cuales es inmunogénica para las personas positivas al HLA-A*0206.
 - (3) La composición de acuerdo con el (1) anterior, donde el péptido parcial es el péptido WT1₁₈₇: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2), el péptido WT1₁₂₆: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3), el péptido WT1₁₈₇P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11), el péptido WT1₁₈₇P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16),

ES 2 679 127 T3

```
el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20), el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34), el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39), el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46), o el péptido WT1<sub>126</sub>P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).
```

- (4) La composición de acuerdo con el (1) a (3) anteriores, que comprende adicionalmente un adyuvante.
- (5) Una composición vacunal contra el cáncer para personas positivas la HLA-A*0206, que comprende un ADN que codifica un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo.
- (6) Una composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0206, que comprende un ARN que codifica un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo.
- (7) Un método para inducir CTL específicos de WT1, que comprende el cultivo, en presencia de un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de una persona positiva al HLA-A*0206, para obtener CTL específicos, para obtener CTL específicos de WT1 inducidos a partir de ellas.
- (8) Un método para la inducción de células dendríticas que presenten un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo, que comprende el cultivo, en presencia del producto proteico o un péptido parcial del mismo, células dendríticas inmaduras derivadas de una persona positiva al HLA-A*0206, para obtener células dendríticas inducidas a partir de ellas que presenten el producto proteico o un péptido parcial del mismo.
- 20 (9) Un método de diagnóstico del cáncer para personas positivas al HLA-A*0206, que comprende
 - i) una etapa de detección o cuantificación de un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial, un anticuerpo contra este o CTL específicos de WT1 en una muestra de una persona positiva al HLA-A*0206, y una etapa de comparación de la cantidad de la proteína o un péptido parcial del mismo, un anticuerpo contra este o los CTL específicos de WT1, con el caso en el que el cáncer no se ha desarrollado, o
 - ii) una etapa de administración a un sujeto positivo al HLA-A*0206 de CTL específicos de WT1 inducidos por el método mencionado en el (7) anterior o células dendríticas que inducidas por el método mencionado en el (8) anterior, y una etapa de determinación de la posición o región de los CTL específicos de WT1 o células dendríticas en el sujeto positivo al HLA-A*0206.
 - (10) Una composición vacunal para personas positivas al HLA-A*0201, que comprende el siguiente péptido: un péptido modificado del péptido WT1₁₈₇: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2) o el péptido WT1₁₂₆: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3), cualquiera de los cuales es un péptido parcial de un producto proteico del gen supresor tumoral WT1, siendo el péptido modificado inmunogénico para personas positivas al HLA-A*0201.
 - (11) La composición de acuerdo con el (10) anterior, donde el péptido modificado es

```
el péptido WT1<sub>187</sub>P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11),
40 el péptido WT1<sub>187</sub>P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16),
el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20),
el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34),
el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39),
el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46), o
45 el péptido WT1<sub>126</sub>P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).
```

- (12) Un método de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende la administración a una persona positiva al HLA-A*0206 de una composición que contiene un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo.
- 50 (13) Un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206.
 - (14) Un método de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende la administración a una persona positiva al HLA-A*0201 de una composición que contienen el siguiente péptido:
- un péptido modificado del péptido WT1₁₈₇: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2) o el péptido WT1₁₂₆: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3), cualquiera de los cuales es un péptido parcial de un producto proteico del gen supresor tumoral WT1, siendo el péptido modificado inmunogénico para personas positivas al HLA-A*0201.
 - (15) El siguiente péptido:

5

10

25

30

35

- un péptido modificado del péptido WT1₁₈₇: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2) o el péptido WT1₁₂₆: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3), cualquiera de los cuales es un péptido parcial de un producto proteico del gen supresor tumoral WT1, siendo el péptido modificado inmunogénico para personas positivas al HLA-A*0201, para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0201.
 - (16) Un método de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende la introducción de un ARN que codifica

un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo en células dendríticas de una persona positiva al HLA-A*0206.

(17) Un ARN que codifica un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206.

5

15

20

También se desglosa el uso de un producto proteico del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo para la producción de una composición vacunal utilizada para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas el HLA-A*0206.

10 La presente invención también se refiere al uso del siguiente péptido:

un péptido modificado del péptido WT1₁₈₇: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2) o el péptido WT1₁₂₆: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3), cualquiera de los cuales es un péptido parcial de un producto proteico del gen supresor tumoral WT1, siendo el péptido modificado inmunogénico para personas positivas al HLA-A*0201, para la producción de una composición vacunal utilizada para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0201.

La "composición vacunal contra el cáncer" como se utiliza en el presente documento se refiere a un medicamento utilizado para la prevención o tratamiento del cáncer mediante su inoculación o administración a un animal incluyendo un ser humano. El "tratamiento" se refiere a, además de curar completamente el estado de enfermedad, parar la progresión del estado de enfermedad inhibiendo la progresión y/o agravamiento de los síntomas hasta cierto grado incluso aunque falle a corto plazo en la cura completa; o mejorar todo o parte del estado de enfermedad en una dirección hacia la cura. La "prevención" se refiere a evitar, inhibir o retrasar el desarrollo de la enfermedad.

Las siguientes expresiones: células mononucleares de sangre periférica, células dendríticas inmaduras, CTL específicos de WT1, muestras, etc. derivadas de personas positivas a HLA-A*0206 o positivas a HLA-A*0201 se refieren a células mononucleares de sangre periférica, células dendríticas inmaduras, CTL específicos de WT1, especímenes biológicos, etc., tal como sangre, que se aísla o recolecta de personas positivas a HLA-A*0206 o positivas a HLA-A*0201, respectivamente. Los CTL específicos de WT1 derivados de personas positivas a HLA-A*0201 también incluyen los CTL inducidos a partir de células mononucleares de sangre periférica, células dendríticas inmaduras o especímenes biológicos tales como la sangre, que se aíslan o recolectan de personas positivas a HLA-A*0206 o positivas a HLA-A*0201.

Efectos de la invención

35

40

45

50

55

65

La presente invención hace posible la inducción in vivo e in vitro de CTL específicos de WT1 en sujetos positivos al HLA-A*0206. Aunque los sujetos de inmunoterapia utilizan una vacuna que comprende el WT1 proteico o el WT1 peptídico se habían limitado convencionalmente a los pacientes positivos a HLA-A*0201 y pacientes positivos al HLA-A*2402, la presente invención puede ampliar el intervalo de sujetos a los pacientes positivos al HLA-A*0206. El HLA-A2, que es un serotipo de los antígenos del HLA clase I, es el más frecuente en la raza blanca (aproximadamente un 50 %), y la gran mayoría tiene el HLA-A*0201, mientras que aproximadamente el 4 % de individuos de raza blanca tienen el HLA-A*0206. Por otra parte, el HLA-A24 es el serotipo más frecuente en la población japonesa (aproximadamente el 58 %), y la Gram mayoría tiene el HLA-A*2402. Aproximadamente el 42 % de la población japonesa tiene el HLA-A2. Entre ellos, solo aproximadamente el 43 % tiene el HLA-A*0201, y los otros tienen el HLA-A*0206 o HLA-A*0207. En otras palabras, aproximadamente el 18 % de la población japonesa tiene el HLA-A*0201, y aproximadamente el 17 % de la población japonesa tiene el HLA-A*0206. Por lo tanto, el hecho de que se identificó al menos un epítopo de CTL restringido a HLA-A*0206 en la población japonesa, así como un epítopo de CTL restringido al HLA-A*0201 es significativamente útil para aumentar los sujetos de inmunoterapia contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0206. Como el 14 % de la población china y el 9 % de la población surcoreana tienen este alelo, es posible aplicar la composición vacunal contra el cáncer de la presente invención a un intervalo más amplio de sujetos.

La composición vacunal contra el cáncer de la presente invención es útil para el tratamiento de cánceres que expresan el WT1 tales como tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos en personas positivas al HLA-A*0206. La composición vacunal contra el cáncer de la presente invención también es útil para la prevención del desarrollo del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la actividad citotóxica de CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ inducidos a partir de PBMC de un donante de sangre sano positivo a HLA-A*0206. La Fig. 1a muestra la actividad citotóxica contra B-LCL marcados con ⁵¹Cr. La Fig. 1b muestra que la actividad citotóxica contra B-LCL autólogos marcados con ⁵¹Cr aumenta en paralelo con la concentración del péptido WT1₁₈₇ utilizado para pulsar las PBMC.

La Fig. 2 muestra la actividad citotóxica de CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ inducidos a partir de PBMC de un donante de sangre sano positivo al HLA-A*0206. Las Fig. 2a y 2b muestran las actividades citotóxicas respectivas, contra B-LCL marcados con ⁵¹Cr, de CTL obtenidos por separado de dos donantes de sangre sanos

distintos del donante de sangre de la Fig. 1a.

- La Fig. 3a muestra la actividad citotóxica de CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ contra B-LCL transformadas con el gen WT1, o B-LCL transformadas con un vector falso. La Fig. 3b muestra la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ contra las células 0206K562, células K562, KH562, células KH88 o células JY.
- 5 La Fig. 4 muestra la inhibición de la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ por anticuerpos contra el HLA clase I y/o clase II.
 - La Fig. 5 muestra la actividad citotóxica contra B-LCL marcadas con ⁵¹Cr de los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆ inducidas a partir de PBMC de un donante de sangre sano positivo al HLA-A*0206.
- Las Fig. 6a y 6b muestran las actividades citotóxicas respectivas de los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆ inducidas por separado a partir de dos donantes diferentes, contra las células 0206K562, células K562, KH562, células KH88 o células JY.
 - la Fig. 7 muestra los resultados de los análisis de citometría de flujo de los CTL teñidos con el tetrámero HLA unido al péptido WT1₁₂₆ y el anticuerpo anti-CD8. Los CTL se habían inducido por estimulación de las PBMC del donante 1 positivo al HLA-A*0201 con los péptidos modificados.
- La Fig. 8 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 1 positivo al HLA-A*0201 con el péptido WT1₁₂₆P1F.
 - La Fig. 9 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 1 positivo al HLA-A*0201 con el péptido WT1₁₂₆P2L.
- La Fig. 10 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo de los CTL teñidos con el tetrámero HLA unido al péptido WT1₁₂₆ y el anticuerpo anti-CD8. Los CTL se habían inducido por estimulación de las PBMC del donante 2 positivo al HLA-A*0201 con el péptido WT1₁₂₆P2L.
 - La Fig. 11 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 2 con el péptido WT1₁₂₆P2L.
- La Fig. 12 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 3 positivo al HLA-A*0206 con péptidos WT1₁₂₆ modificados.
 - La Fig. 13 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 3 positivo al HLA-A*0206 con el péptido WT1₁₂₆P9V.
 - La Fig. 14 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 4 positivo al HLA-A*0206 con péptidos WT1₁₂₆ modificados.
- La Fig. 15 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 3 positivo al HLA-A*0206 con péptidos WT1₁₂₆ modificados.
 - La Fig. 16 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante positivo al HLA-A*0201 con péptidos WT1₁₈₇ modificados.
- La Fig. 17 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante positivo al HLA-A*0206 con el péptido WT1₁₈₇P1F.
 - La Fig. 18 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 3 positivo al HLA-A*0206 con el péptido WT1₁₈₇P2M.
 - La Fig. 19 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₈₇ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
- 40 La Fig. 20 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₈₇ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
 - La Fig. 21 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₈₇ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
- La Fig. 22 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₈₇ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
 - La Fig. 23 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₂₆ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
 - La Fig. 24 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₂₆ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
- La Fig. 25 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₂₆ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
 - La Fig. 26 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₂₆ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
 - La Fig. 27 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₂₆ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
 - La Fig. 28 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₈₇ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
 - La Fig. 29 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₈₇ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
- 60 La Fig. 30 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₂₆ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
 - La Fig. 31 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₂₆ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.
- La Fig. 32 muestra los resultados de la evaluación de péptidos WT1₁₂₆ modificados sobre la actividad de inducción de inmunidad mediada por células específica.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

De aquí en adelante, la presente invención se ilustrará.

5 Se utilizan los siguientes códigos cuando se abrevian los restos de aminoácidos en la presente descripción y los dibujos.

Ala o A: resto de Alanina

Arg o R: resto de Arginina

Asn o N: resto de Asparagina

10 Asp o D: resto de ácido Aspártico

Cys o C: resto de Cisteína

GIn o Q: resto de Glutamina

Glu o E: resto de ácido Glutámico

Gly o G: resto de Glicina

15 His o H: resto de Histidina

lle o l: resto de Isoleucina

Leu o L: resto de Leucina

Lys o K: resto de Lisina

Met o M: resto Metionina de

20 Phe o F: resto de Fenilalanina

Pro o P: resto de Prolina

Ser o S: resto de Serina

Thr o T: resto de Treonina

Trp o W: resto de Triptófano

25 Tyr o Y: resto de Tirosina

40

Val o V: resto de Valina

El WT1 proteico como se desvela en el presente documento puede ser un producto genético de un factor de transcripción tipo dedos de zinc aislado como gen causante del tumor de Wilms, siendo el producto genético capaz de unirse a una molécula del HLA-A*0206 y de esta manera sirviendo de antígeno diana de tumores malignos. Más específicamente el WT1 proteico desvelado en el presente documento es preferentemente el WT1 proteico humano que consiste en 449 aminoácidos (Listado de secuencia: SEQ ID NO: 1) o una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos que comprende la eliminación, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos (preferentemente aproximadamente 2 a 6 aminoácidos) en la secuencia de aminoácidos del WT1 proteico humano, y que es inmunogénico en personas positivas al HLA-A*0206. El aminoácido utilizado para la adición o sustitución puede eser un aminoácido no natural además de los 20 aminoácidos codificados genéticamente.

El péptido parcial del WT1 proteico (WT1 peptídico) se refiere a un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos que constituye el WT1 proteico. El WT1 peptídico puede ser un péptido que consiste en 8 a 12 aminoácidos, preferentemente 8 a 9 aminoácidos derivados del WT1 proteico y que se une a una molécula del HLA-A*0206 y de esta manera induce células T citotóxica. Es particularmente preferido el péptido WT1₁₈₇ (Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val; SEQ ID NO: 2) o el péptido WT1₁₂₆ (Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu; SEQ ID NO: 3), ambos descritos en el folleto WO 00/06602.

- También se puede utilizar un péptido modificado que comprende una eliminación, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos del WT1 peptídico como WT1 peptídico como se desvela en el presente documento a condición de que sea inmunogénico para personas positivas al HLA-A*0206. Ejemplos de dicho péptido modificado incluye un péptido WT1₁₈₇ modificado y un péptido WT1₁₂₆ modificado.
- El péptido WT1₁₈₇ modificado es preferentemente un péptido que comprende los mismos restos de aminoácidos (EQQYS) en las posiciones 4 a 8 desde el extremo N que el péptido WT1₁₈₇ en las posiciones correspondientes, y más preferentemente un péptido que comprende los mismos restos de aminoácidos (EQQYSV) en las posiciones 4 a 9 del extremo N que el péptido WT1₁₈₇ en las posiciones correspondientes. Dicho péptido WT1₁₈₇ modificado es preferentemente un péptido que consiste en cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4 a 26 y 54 a 62.

```
péptido WT1<sub>187</sub>P1G (GLGEQQYSV; SEQ ID NO: 4)
péptido WT1<sub>187</sub>P1A (ALGEQQYSV; SEQ ID NO: 5)
péptido WT1<sub>187</sub>P1V (VLGEQQYSV; SEQ ID NO: 6)
60 péptido WT1<sub>187</sub>P1L (LLGEQQYSV; SEQ ID NO: 7)
péptido WT1<sub>187</sub>P1I (ILGEQQYSV; SEQ ID NO: 8)
péptido WT1<sub>187</sub>P1M (MLGEQQYSV; SEQ ID NO: 9)
péptido WT1<sub>187</sub>P1W (WLGEQQYSV; SEQ ID NO: 10)
péptido WT1<sub>187</sub>P1F (FLGEQQYSV; SEQ ID NO: 11)
```

péptido WT1₁₈₇P1Y (YLGEQQYSV; SEQ ID NO: 12)

péptido WT1₁₈₇P2V (SVGEQQYSV; SEQ ID NO: 13)

```
péptido WT1<sub>187</sub>P2Q (SQGEQQYSV; SEQ ID NO: 14)
          péptido WT1<sub>187</sub>P2I (SIGEQQYSV; SEQ ID NO: 15)
          péptido WT1<sub>187</sub>P2M (SMGEQQYSV; SEQ ID NO: 16)
          péptido WT1<sub>187</sub>P3L (SLLEQQYSV; SEQ ID NO: 17)
 5
          péptido WT1<sub>187</sub>P3A (SLAEQQYSV; SEQ ID NO: 18)
          péptido WT1<sub>187</sub>P3V (SLVEQQYSV; SEQ ID NO: 19)
          péptido WT1<sub>187</sub>P3M (SLMEQQYSV; SEQ ID NO: 20)
          péptido WT1<sub>187</sub>P3P (SLPEQQYSV; SEQ ID NO: 21)
          péptido WT1<sub>187</sub>P3W (SLWEQQYSV; SEQ ID NO: 22)
10
          péptido WT1<sub>187</sub>P3F (SLFEQQYSV; SEQ ID NO: 23)
          péptido WT1<sub>187</sub>P3Y (SLYEQQYSV; SEQ ID NO: 24)
          péptido WT1<sub>187</sub>P3S (SLSEQQYSV; SEQ ID NO: 25)
          péptido WT1<sub>187</sub>P3I (SLIEQQYSV; SEQ ID NO: 26)
          péptido WT1<sub>187</sub>P9L (SLGEQQYSL; SEQ ID NO: 53)
          péptido WT1<sub>187</sub>P1D (DLGEQQYSV; SEQ ID NO: 54)
15
          péptido WT1<sub>187</sub>P1E (ELGEQQYSV; SEQ ID NO: 55)
          péptido WT1<sub>187</sub>P1H (HLGEQQYSV; SEQ ID NO: 56)
          péptido WT1<sub>187</sub>P1K (KLGEQQYSV; SEQ ID NO: 57)
          péptido WT1<sub>187</sub>P1N (NLGEQQYSV; SEQ ID NO: 58)
          péptido WT1<sub>187</sub>P1P (PLGEQQYSV; SEQ ID NO: 59)
20
          péptido WT1<sub>187</sub>P1Q (QLGEQQYSV; SEQ ID NO: 60)
          péptido WT1<sub>187</sub>P1R (RLGEQQYSV; SEQ ID NO: 61)
          péptido WT1<sub>187</sub>P1T (TLGEQQYSV; SEQ ID NO: 62)
```

El péptido WT1₁₂₆ modificado es preferentemente un péptido que comprende los mismos restos de aminoácidos (PNAPY) en las posiciones 4 a 8 desde el extremo N que el péptido WT1₁₂₆ en las posiciones correspondientes. Dicho péptido WT1₁₂₆ modificado es preferentemente un péptido que consiste de cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácido de las SEQ ID NO: 27 a 52 y 63 a 75.

```
30
          péptido WT1<sub>126</sub>P1G (GMFPNAPYL: SEQ ID NO: 27)
          péptido WT1<sub>126</sub>P1A (AMFPNAPYL; SEQ ID NO: 28)
          péptido WT1<sub>126</sub>P1V (VMFPNAPYL; SEQ ID NO: 29)
          péptido WT1<sub>126</sub>P1L (LMFPNAPYL; SEQ ID NO: 30)
          péptido WT1<sub>126</sub>P1I (IMFPNAPYL; SEQ ID NO: 31)
35
          péptido WT1<sub>126</sub>P1M (MMFPNAPYL; SEQ ID NO: 32)
          péptido WT1<sub>126</sub>P1W (WMFPNAPYL; SEQ ID NO: 33)
          péptido WT1<sub>126</sub>P1F (FMFPNAPYL; SEQ ID NO: 34)
          péptido WT1<sub>126</sub>P1Y (YMFPNAPYL; SEQ ID NO: 35)
          péptido WT1<sub>126</sub>P2V (RVFPNAPYL; SEQ ID NO: 36)
40
          péptido WT1<sub>126</sub>P2Q (RQFPNAPYL; SEQ ID NO: 37)
          péptido WT1<sub>126</sub>P2A (RAFPNAPYL; SEQ ID NO: 38)
          péptido WT1<sub>126</sub>P2L (RLFPNAPYL; SEQ ID NO: 39)
          péptido WT1<sub>126</sub>P2I (RIFPNAPYL; SEQ ID NO: 40)
          péptido WT1<sub>126</sub>P3I (RMIPNAPYL; SEQ ID NO: 41)
          péptido WT1<sub>126</sub>P3L (RMLPNAPYL; SEQ ID NO: 42)
45
          péptido WT1<sub>126</sub>P3G (RMGPNAPYL; SEQ ID NO: 43)
          péptido WT1<sub>126</sub>P3A (RMAPNAPYL; SEQ ID NO: 44)
          péptido WT1<sub>126</sub>P3V (RMVPNAPYL; SEQ ID NO: 45)
          péptido WT1<sub>126</sub>P3M (RMMPNAPYL; SEQ ID NO: 46)
          péptido WT1<sub>126</sub>P3P (RMPPNAPYL; SEQ ID NO: 47)
50
          péptido WT1<sub>126</sub>P3W (RMWPNAPYL; SEQ ID NO: 48)
          péptido WT1<sub>126</sub>P9V (RMFPNAPYV; SEQ ID NO: 49)
          péptido WT1<sub>126</sub>P9A (RMFPNAPYA; SEQ ID NO: 50)
          péptido WT1<sub>126</sub>P9I (RMFPNAPYI; SEQ ID NO: 51)
55
          péptido WT1<sub>126</sub>P9M (RMFPNAPYM: SEQ ID NO: 52)
          péptido WT1<sub>126</sub>P1D (DMFPNAPYL; SEQ ID NO: 63)
          péptido WT1<sub>126</sub>P1E (EMFPNAPYL; SEQ ID NO: 64)
```

65

Inter alia, el péptido WT1₁₈₇ modificado es preferentemente el péptido WT1₁₈₇P1F (SEQ ID NO: 11), el péptido WT1₁₈₇P2M (SEQ ID NO: 16) o el péptido WT1₁₈₇P3M (SEQ ID NO: 20), más preferentemente el péptido WT1₁₈₇P1F o el péptido WT1₁₈₇P2M, y más preferentemente el péptido WT1₁₈₇P2M. El péptido WT1₁₂₆ modificado es preferentemente el péptido WT1₁₂₆P1F (SEQ ID NO: 34), el péptido WT1₁₂₆P2L (SEQ ID NO: 39), el péptido WT1₁₂₆P3M (SEQ ID NO: 46) o el péptido WT1₁₂₆P9V (SEQ ID NO: 49), más preferentemente el péptido WT1₁₂₆P9V. el péptido WT1₁₂₆P3M o el péptido WT1₁₂₆P9V, y más preferentemente el péptido WT1₁₂₆P9V.

El WT1 peptídico en la composición vacunal contra el cáncer de la presente invención es preferentemente el péptido

WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆, el péptido WT1₁₈₇P1F, el péptido WT1₁₈₇P2M, el péptido WT1₁₂₆P9F, el péptido WT1₁₂₆P9L, el péptido WT1₁₂₆P9W. Más preferentemente el péptido WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆P9, el péptido WT1₁₈₇P1F, el péptido WT1₁₈₇P2M, el péptido WT1₁₂₆P9L, el péptido WT1₁₂₆P9W. Incluso se prefiere el péptido WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆, el péptido WT1₁₂₆P9W. Particularmente se prefiere el péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆P9W. Particularmente se prefiere el péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆.

También se puede utilizar un derivado del WT1 peptídico como WT1 peptídico. Por ejemplo, el derivado del péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆ puede estar formado por una secuencia de aminoácidos de los 9 aminoácidos contiguos anteriores y distintas sustancias unidas al extremo N y/o C del mismo. Las distintas sustancias pueden ser, por ejemplo, aminoácidos, péptidos, análogos de los mismos, etc. Dicha sustancia unida al péptido WT1₁₈₇, al péptido WT1₁₂₆ o un péptido modificado de los mismos se somete, por ejemplo, a un tratamiento enzimático *in vivo* mediante un procesamiento intracelular, etc., y finalmente se produce un péptido que consiste en los 9 aminoácidos mencionados anteriormente y se presenta como un complejo con una molécula del HLA-A*0206 sobre la superficie molecular. Por lo tanto, se puede inducir una respuesta de CTL específico del WT1 en pacientes con HLA-A*0206.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

El WT1 peptídico se puede preparar por un método utilizado habitualmente en el campo de la técnica, tal como un método de síntesis de péptidos descrito en Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1975; Basis and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd. 1985; the Sequel to Development of Pharmaceuticals, Vol. 14 (peptide synthesis), Hirokawa Publishing Company, 1991; etc.

Como un método para la exploración del WT1 peptídico y un péptido modificado del mismo, por ejemplo, se prefiere un método que lleva a cabo el ensayo de IFNy con una única estimulación de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) con un péptido, de algunos pacientes que tienen el HLA-A*0206, y entonces se selecciona un péptido que presenta una buena respuesta, debido a su simplicidad.

En la presente invención, también se pueden utilizar polinucleótidos, tales como ADN que codifican el WT1 proteico o el WT1 inmunogénico mencionado anteriormente, inmunogénico en personas positivas al HLA-A*0206, como ingrediente activo de la composición vacunal contra el cáncer. A saber, insertando un polinucleótido que codifica el WT1 proteico o WT1 peptídico en un vector adecuado, preferentemente un vector de expresión, y entonces se administra el vector en animales incluyendo seres humanos, se puede producir una inmunidad contra el cáncer en el cuerpo vivo. Ejemplos de polinucleótidos incluyen el ADN, ARN y similares, y se prefieren el ADN o el ARN. La secuencia de bases del polinucleótido se puede determinar basándose en la secuencia de aminoácidos del WT1 proteico o el WT1 peptídico inmunogénico en personas positivas al HLA-A*0206. El polinucleótido se puede preparar por un método de síntesis de ADN o ARN conocido, el método PCR, etc. Dicha composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0206, que comprende un ADN que codifica el WT1 proteico o WT1 peptídico también es un aspecto de la presente invención. El WT1 proteico o WT1 peptídico es preferentemente un WT1 peptídico, más preferentemente el péptido WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆, el vector de expresión que se utiliza para insertar el ADN mencionado anteriormente no está limitado particularmente. El ARN no se tiene que insertar en un vector y se puede utilizar como tal como principio activo de la composición.

La composición vacunal contra el cáncer de la presente invención puede comprender un adyuvante. El adyuvante no está limitado a condición de que, después de administrarse junto con o separadamente del WT1 proteico o WT1 peptídico utilizados como antígeno, aumente inespecíficamente las respuestas inmunitarias al antígeno. Ejemplos del adyuvante incluyen hidróxido sódico, hidróxido de aluminio, fosfato cálcico, fosfato de aluminio, alúmina, PEPES y polímeros de carboxivinilo. Un adyuvante oleosos preferible es uno que pueda firmar micelas de manera que el aceite encierra la solución acuosa del antígeno. Ejemplos específicos del mismo incluye parafina líquida, lanolina, de Freund, Montanide ISA-763AVG, Montanide ISA-51, adyuvante incompleto de Freund y adyuvante completo de Freund. Estos adyuvantes se pueden utilizar como una mezcla de dos o más tipos de los mismos. Se prefiere un adyuvante oleoso.

La cantidad del adyuvante en la composición vacunal contra el cáncer de la presente invención no está particularmente limitada a condición de que las respuestas inmunológicas a los antígenos se pueden aumentar inespecíficamente. La cantidad del mismo puede seleccionarse adecuadamente dependiendo del tipo de adyuvante, etc.

La composición vacunal contra el cáncer de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral (por ejemplo, intraperitoneal, subcutánea, intercutánea, intramuscular, intravenosa, intranasal, etc.). En el caso de la administración parenteral, el principio activo, es decir el WT1 proteico o el WT1 peptídico, también se puede absorber por vía percutánea aplicando la composición vacunal en la piel, o pegando a la piel un parche que contiene la composición vacunal. La composición vacunal de la presente invención se puede administrar también mediante inhalación, etc. La composición vacunal de la presente invención se administra preferentemente por vía parenteral, y más preferentemente intracutánea o subcutánea. La parte del cuerpo para la administración intracutánea o subcutánea es preferentemente, por ejemplo, la parte superior del brazo, etc.

La composición vacunal contra el cáncer de la presente invención puede estar en distintas formas de dosificación dependiendo de su vía de administración, y las formas de dosificación ejemplares de las mismas incluyen una preparación sólida y una preparación líquida. La composición vacunal contra el cáncer puede estar, por ejemplo, en forma de una preparación sólida o líquida para utilizarse internamente para la administración oral, una inyección para la administración parenteral, o similares.

Ejemplos de la preparación sólida que se va a utilizar internamente por administración parenteral incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y gránulos.

10 Para la preparación de la preparación sólida que se va a utilizar internamente, el WT1 proteico o el WT1 peptídico sin tratar, se mezcla con un aditivo o granulado (de acuerdo con, por ejemplo, la granulación por agitado, granulación en lecho fluidificado, granulación seca, granulación en lecho fluidificado con agitado rodante, etc.) y entonces se somete a un método habitual. Por ejemplo, las cápsulas se pueden preparar por encapsulación et. y los comprimidos se puede preparar por compresión, etc. Un tipo o dos o más de aditivos se puede incorporar apropiadamente a la preparación sólida. Ejemplos de los aditivos incluye excipientes tales como la lactosa, manitol, 15 glucosa, celulosa microcristalina y almidón de maíz; aglutinantes tales como hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, y aluminometasilicato de magnesio; agentes dispersantes tales como el almidón de maíz; desintegrantes tale como la carboximetil celulosa cálcica; lubricantes tales como el estearato de magnesio; agentes solubilizantes tales como el ácido glutámico y el ácido aspártico; estabilizantes; polímeros hidrosolubles que incluyen celulosas tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa, y polímeros sintéticos tales como polietilenglicol, 20 polivinilpirrolidona y alcohol polivinílico; y edulcorantes tales como el azúcar blanco, azúcar en polvo, sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, jarabe azucarado de malta reducida (jarabe de maltitol), polvo de jarabe azucarado de malta reducida (polvo de jarabe de maltitol), jarabe de maíz alto en glucosa, jarabe de maíz alto en fructosa, miel, sorbitol, maltitol, manitol, xilitol, eritritol, aspartamo, sacarina y sacarina sódica.

25

30

35

40

45

55

60

65

Los gránulos o tabletas se pueden cubrir con un agente de revestimiento, etc., si fuera necesario, y se pueden cubrir con dos o más capas del mismo. Ejemplos de un agente de revestimiento incluyen el azúcar blanco, gelatina, hidroxipropilcelulosa y ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. Las cápsulas se pueden preparar mezclando el principio activo con hidrato de pranlikast y un excipiente seleccionado apropiadamente de entre los excipientes anteriores, granulando opcionalmente la mezcla, y opcionalmente cubriendo los gránulos resultantes con un agente de revestimiento, seguido por el llenado de la cápsula. De manera alternativa, las cápsulas se pueden preparar añadiendo glicerol, sorbitol, etc. a una base de cápsula apropiada (gelatina, etc.) para aumentar su plasticidad, y se encapsula el principio activo con la base resultante. Se puede añadir a la base de la cápsula un colorante o conservante (dióxido de azufre; y parabenos tales como parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo y parahidroxibenzoato de propilo) si fuera necesario. Las cápsulas incluyen las cápsulas duras y las cápsulas blandas.

Ejemplos de la preparación líquida que se va a utilizar internamente mediante administración oral incluye, agua, suspensiones/emulsiones, jarabes, preparación para que se disuelvan antes de su uso como jarabes secos, y elixires. Para la preparación de la preparación líquida que se va a utilizar internamente, el WT1 proteico o el WT1 peptídico se disuelve, suspende o emulsiona en un diluyente utilizado en general para las preparaciones liquidas que se van a utilizar internamente. Ejemplos del diluyente incluyen agua purificada, etanol y una mezcla de los mismos. La preparación líquida puede contener adicionalmente un agente humectante, un agente de suspensión, un emulsionante, un edulcorante, un saborizante, un aroma, un conservante o un agente tapón. Los jarabes secos se pueden preparar, por ejemplo, mezclando el principio activo con hidrato de pranlikast y un ingrediente adicional tal como azúcar blanco, azúcar en polvo, sacarosa, fructosa, glucosa y lactosa. Los jarabes secos también se pueden utilizar en gránulos de manera habitual.

Ejemplos de la forma de dosificación para la administración parenteral incluye inyecciones, ungüentos, geles, cremas, parches, aerosoles y pulverizadores. Se prefieren las inyecciones. Por ejemplo, la inyección contiene preferentemente un vehículo convencional con el WT1 proteico o el WT1 peptídico.

La inyección para la administración parenteral puede ser una inyección acuosa o una inyección oleosa. La inyección acuosa se puede preparar de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, añadiendo apropiadamente un aditivo farmacéuticamente adecuado a un disolvente acuoso (agua para inyección, agua purificada, etc.) para hacer una solución, mezclando el WT1 proteico o WT1 peptídico con la solución, esterilizando por filtración la mezcla resultante con un filtro, etc., y después llenando un envase aséptico con el filtrado resultante. Ejemplos del aditivo farmacéuticamente aceptable incluye los adyuvantes mencionados anteriormente; agentes de isotonicidad tal como cloruro sódico, cloruro potásico, glicerol, manitol, sorbitol, ácido bórico, bórax, glucosa y propilenglicol; agentes tampón tales como solución tampón de fosfato, solución tampón de acetato, solución tampón de borato, solución tampón de carbonato, solución tampón de ctirato, solución de tampón Tris, solución tampón de glutamato y solución épsilon-aminocaproato; conservantes tales como parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo, para hidroxibenzoato de propilo, parahidroxibenzoato de butilo, clorobutanol, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, dihidroacetato sódico, edetato sódico, ácido bórico y bórax; espesantes tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, alcohol polivinílico y polietilenglicol; estabilizantes tales como sulfito hidrógeno sódico, tiosulfato sódico, edetato sódico, citrato sódico, ácido ascórbico y dibutil hidroxitolueno; y ajustadores del pH tales

como ácido clorhídrico, hidróxido sódico, ácido fosfórico y ácido acético. La inyección puede contener adicionalmente un agente solubilizante apropiado, y ejemplos de los mismos incluyen alcoholes tales como etanol, polialcoholes tales como el propilenglicol y polietilenglicol; y tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 80, aceite de ricino hidrogenado polioxetileno 50, lisolecitina y polioles plurónicos. También pueden estar contenidos en la inyección proteínas tales como albúmina sérica bovina y hemocianina de lapa californiana; polisacáridos tales como el aminodextrano; etc. Para la preparación de la inyección oleosa, por ejemplo, se utiliza aceite de sésamo o aceite de soja como disolvente oleoso, y se puede mezclar con benzoato de bencilo o alcohol bencílico como agente solubilizante. Las preparaciones liofilizadas se vuelven listas para su uso re-disolviéndolos en agua destilada para inyección, etc. que se añade antes de su uso.

10

25

30

60

Otra forma de dosificación de la composición vacunal contra el cáncer de la presente invención puede ser un liposoma que contiene el WT1 proteico o WT1 peptídico y, si es necesario, se pueden mezclar con polisacáridos y/u otros ingredientes en la composición vacunal contra el cáncer.

La dosis de la composición vacunal de la presente invención varía con el tipo de WT1 proteico, WT1 peptídico o ADN que se va a utilizar, la edad y peso corporal del paciente, la enfermedad que se va a tratar, etc. Por ejemplo, en el caso de la composición vacunal que comprende el WT1 peptídico, por ejemplo, el péptido WT1₁₂₆, la dosis diaria es preferentemente aproximadamente 0,1 μg/kg pc a 1 mg/kg pc como cantidad del WT1 peptídico. La dosis del WT1 peptídico es habitualmente de 0,001 mg a 1000 mg, preferentemente 0,01 mg a 1000 mg, y más preferentemente 0,1 mg a 10 mg. Esta cantidad se administra preferentemente una vez en varios días a varios meses.

La composición vacunal contra el cáncer de la presente invención es una composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0206. El tipo HLA, que es una medida de selección de personas positivas al HLA-A*0206, se puede determinar, por ejemplo, de la sangre periférica de donantes. Ejemplos del método de determinación del tipo HLA incluye métodos conocidos tales como el método de tipaje de ADN, por ejemplo, el método SBT (Tipaje basado en secuenciación) o el método SSP, y el método de tipaje de HLA. En el método SBT, la secuencia de bases de un ADN amplificado por PCR se compara con los datos de secuencia de bases de alelos conocidos para identificar con precisión el tipo de gen HLA. En el método SSP, después de la amplificación por PCR utilizando una variedad de cebadores específicos para los alelos de HLA respectivos, se lleva a cabo la electroforesis posterior para comprobar una banda positiva. De esta manera, se puede identificar el tipo de gen HLA.

Cuando la composición vacunal contra el cáncer de la presente invención se administra a una persona positiva a HLA-A*0206, el WT1 proteico o el WT1 peptídico restringido al HLA-A*0206 de la composición vacunal, o el WT1 35 proteico o WT1 peptídico expresado a partir del ADN o ARN de la composición vacunal se une a una molécula de HLA-A*0206 en la superficie de una célula presentadora de antígenos (célula dendrítica) de la persona positiva al HLA-A*0206. Esto induce una inmunidad antitumoral específica, es decir, los CTL específicos de WT1, que destruye las células cancerosas en el sujeto (persona positiva al HLA-A*0206). Dicha inmunidad antitumoral se puede comprobar, por ejemplo, mediante la respuesta de CTL específicos de WT1, el ensayo citotóxico contra las células cancerosas (por ejemplo, ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr), etc. Por ejemplo, el péptido WT1₁₈₇ y el 40 péptido WT1₁₂₆ restringidos a HLA-A*0201 que consiste cada uno en 9 aminoácidos derivados del WT1 proteico, que se ha informado que es capaz de inducir una respuesta de CTL específico de WT1, puede inducir una respuesta restringida a HLA-A*0206. Aproximadamente un 17 % de la población japonesa es positiva a HLA-A*0206, mientras que casi la misma proporción es positiva a HLA-A*0201. En los siguientes ejemplos 1 a 5, se prepararon CTL 45 específicos de WT1₁₈₇ a partir de PBMC de tres donantes de sangre positivos a HLA-A*0206. Los CTL inducidos presentaban el efecto citotóxico en células de leucemia positivas a HLA-A*0206 que expresaban WT1. Como la actividad de CTL específico para el péptido WT1₁₈₇ y el péptido WT1₁₂₆ se puede inhibir por un anticuerpo anti-HLA Clase I, se descubrió que la actividad la van a presentar los CTL restringidos al HLA de clase I. El WT1 proteico o WT1 peptídico incluyendo el péptido WT1₁₈₇ y/o el péptido WT1₁₂₆, o un péptido modificado del mismo puede ser 50 una vacuna para pacientes de cáncer positivos al HLA-A*0206 así como para pacientes positivos al HLA-A*0201. Por lo tanto, la inmunoterapia basada en el WT1 proteico o el WT1 peptídico para pacientes con tumores malignos, tales como tumores hematopoyéticos o cánceres sólidos, se pueden aplicar adicionalmente a pacientes de cáncer positivos al HLA-A*0206. También se desvela el método de tratamiento y/o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206 que comprende la administración de la composición vacunal de la presente invención en 55 una persona positiva al HLA-A*0206.

En personas positivas al HLA-A*0206, la composición vacunal contra el cáncer de la presente invención se puede utilizar para el tratamiento y/o prevención de cánceres acompañados por el aumento de la expresión del gen WT1: por ejemplo, tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno; y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de cuello de útero y cáncer ovárico.

Un método de administración ejemplar de la composición vacunal contra el cáncer como se desvela en el presente documento es un método que comprende la recolección de PBMC de la sangre periférica de un paciente positivo al HLA-A*0206, la extracción de células dendríticas de las PBMC, el pulsado de las células dendríticas con un péptido,

ES 2 679 127 T3

por ejemplo, el péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆, o un polinucleótido, por ejemplo, ADN o ARN, contenidos como principio activo en la composición vacunal contra el cáncer de la presente invención, y devolviendo las células dendríticas al paciente mediante la administración subcutánea, etc. Las condiciones del pulsado de células dendríticas con el WT1 peptídico, etc. no están limitadas particularmente a condición de que se consiga el efecto de la presente invención, y pueden ser condiciones habituales.

En el caso en el que el ARN que codifica el WT1 proteico o el WT1 peptídico se utiliza en la composición vacunal contra el cáncer, es preferible que la composición se administra de manera que ese introduce el ARN en las células dendríticas de una persona positiva al HLA-A*0206. Un método ejemplar para la introducción del ARN en células dendríticas de una persona positiva al HLA-A*0206 es un método que comprende la recolección de células dendríticas de una persona positiva al HLA-A*0206 de la misma manera que se ha mencionado anteriormente, y la introducción del ARN en las células dendríticas con un pulso eléctrico. El WT1 proteico o WT1 peptídico que se expresa a partir del ARN introducido en las células dendríticas se permite que se presente en la superficie de las mismas. Devolviendo las células dendríticas pulsadas con el ARN en la persona positiva al HLA-A*0206, se puede producir rápidamente la inmunidad contra el cáncer en el cuerpo vivo. También se desvela dicho método de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende la introducción de ARN que codifica un WT1 proteico o WT1 peptídico en células dendríticas de una persona positiva al HLA-A*0206.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Otra realización de la presente invención se refiere a un método ex vivo para la inducción de CTL específicos de WT1, cultivando, en presencia del WT1 proteico o WT1 peptídico, las PBMC derivadas de una persona positiva al HLA-A*0206, para obtener CTL específicos de WT1 inducidos a partir de ellas. El sujeto del cual se derivan los PBMC no se limita particularmente a condición de que el sujeto es positivo al HLA-A*0206. Ejemplos del WT1 proteico o WT1 peptídico incluye el péptido WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆ y un péptido modificado del mismo, y preferentemente el péptido WT1₁₈₇ y el péptido WT1₁₂₆. Por ejemplo, se pueden inducir los CTL específicos del WT1 a partir de células precursoras de CTL entre las PBMC cultivando las PBMC derivadas de una persona positiva al HLA-A*0206 en presencia del péptido WT1₁₈₇ (o el péptido WT1₁₂₆). Las condiciones de cultivo para las PBMC derivadas de una persona positiva al HLA-A*0206 no están limitadas particularmente, y pueden ser condiciones habituales. Los CTL obtenidos de esta manera reconocen un complejo del péptido WT1₁₈₇ (o el péptido WT1₁₂₆) y una molécula HLA-A*0206. Por lo tanto, mediante el uso de CTL específicos de WT1 inducidos de acuerdo con la presente invención, se pueden destruir específicamente las células tumorales que expresan altamente WT1 en una persona positiva al HLA-A*0206, y de esta manera se pueden tratar y/o prevenir los tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos del sujeto, es decir, la persona positiva al HLA-A*0206. El método de administración de dichos CTL específicos de WT1 en un sujeto positivo al HLA-A*0206 no está limitado particularmente, y, por ejemplo, puede ser el mismo que el método de administración de la composición vacunal contra el cáncer mencionado anteriormente. También se desvela un kit para inducir CTL específicos de WT1, que comprende el WT1 proteico o WT1 peptídico restringido a HLA-A*0206 como constituyente esencial. Preferentemente, el kit se utiliza para el método mencionado anteriormente para inducir CTL específicos de WT1 derivados de una persona positiva al HLA-A*0206, Dicho kit puede comprender, por ejemplo, un medio de recolección las PBMC, un adyuvante y un recipiente de reacción además del WT1 proteico o WT1 peptídico restringido al HLA-A*0206. Por el uso del kit, se pueden inducir los CTL específicos de WT1 que reconocen un complejo de un antígeno del cáncer, tal como el péptido WT1₁₈₇ y el péptido WT1₁₂₆, y una molécula del HLA-A*0206.

Otra realización de la presente invención se refiere a un método ex vivo para inducir células dendríticas que presentan el WT1 proteico o WT1 peptídico, cúltivando, en presencia del WT1 proteico o WT1 peptídico, células dendríticas inmaduras derivadas de una persona positiva al HLA-A*0206, para obtener células dendríticas inducidas a partir de ellas que presenten el WT1 proteico o WT1 peptídico. Ejemplos del WT1 proteico o WT1 peptídico incluye el péptido WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆ y un péptido modificado del mismo, y preferentemente el péptido WT1₁₈₇ y el péptido WT1₁₂₆. El sujeto del que se derivan las células dendríticas inmaduras no se limita particularmente a condición de que el sujeto sea positivo al HLA-A*0206. Como las células dendríticas inmaduras se presentan entre las PBMC, etc., también se pueden cultivar PBMC en presencia del péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆, por ejemplo. Por la administración de las células dendríticas así obtenidas a una persona positiva al HLA-A*0206, se inducen eficazmente los CTL específicos de WT1 mencionados anteriormente, y de esta manera se pueden tratar y/o prevenir tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos en el sujeto. El método para la administración de dichas células dendríticas en un sujeto positivo al HLA-A*0206 no se limita particularmente, y, por ejemplo, puede ser el mismo que el método de administración de la composición vacunal contra el cáncer.

También se desvela un kit para inducir células dendríticas que presentan el WT1 proteico o WT1 peptídico, que comprenden el WT1 proteico o WT1 peptídico restringidos al HLA-A*0206 como constituyente esencial. Preferentemente, se utiliza el kit para el método mencionado anteriormente para inducir células dendríticas. Dicho kit puede comprender, por ejemplo, un medio para recolectar células dendríticas inmaduras y PBMC, un adyuvante y un recipiente de reacción además del WT1 proteico o WT1 peptídico restringidos al HLA-A*0206. Por el uso del kit, se pueden inducir eficazmente células dendríticas que presentan el WT1 proteico o el WT1 peptídico mediante una molécula del HLA-A*0206.

Los cánceres de personas positivas al HLA-A*0206 se pueden diagnosticar por el uso de

- (1) el WT1 proteico o WT1 peptídico, los CTL específicos de WT1 inducidos por el método mencionado anteriormente, o las células dendríticas inducidas por el método mencionado anteriormente, o
 - (2) un anticuerpo contra lo siguiente: el WT1 proteico o WT1 peptídico, los CTL específicos de WT1 inducidos por

ES 2 679 127 T3

el método mencionado anteriormente, o las células dendríticas inducidas por el método mencionado anteriormente.

Dicho método *in vitro* del diagnóstico del cáncer es también un aspecto de la presente invención. En el (1) anterior, el diagnóstico del cáncer se lleva preferentemente utilizando CTL específicos del WT1 inducidos por el método mencionado anteriormente. Ejemplos del WT1 proteico o WT1 peptídico incluye el péptido WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆, y un péptido modificado de los mismos, y preferentemente el péptido WT1₁₈₇ y el péptido WT1₁₂₆. De acuerdo con la presente invención, un método ejemplar *in vitro* de diagnóstico del cáncer para personas positivas

al HLA-A*0206 comprende una etapa de detección o cuantificación del WT1 proteico o WT1 peptídico, un anticuerpo contra ellos o CTL específicos del WT1 en una muestra de una persona positiva al HLA-A*0206, y una etapa de comparación de la cantidad de la proteína o un péptido parcial de la misma y un anticuerpo contra ellos o los CTL específicos del WT1, con la del caso en el que no se desarrolló el cáncer.

10

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En una muestra del paciente de cáncer (por ejemplo, sangre), está presente el WT1 peptídico y/o WT1 proteico liberado por las células cancerosas, y la respuesta inmunológica contra un antígeno del cáncer está aumentada. Es decir, la muestra del paciente de cáncer tiene una mayor cantidad de un anticuerpo contra el WT1 peptídico o WT1 proteico, CTL específicos del WT1, etc. Por esta razón, cuando aumenta la cantidad del WT1 peptídico o WT1 proteico, un anticuerpo contra ellos o los CTL específicos de WT1 en comparación con la del caso en el que no se desarrolló el cáncer, se puede haber desarrollado el cáncer. La cantidad del anticuerpo puede medirse por el método ELISA, por ejemplo. Los CTL específicos del WT1 se pueden detectar por un método que utiliza multímeros del WT1 tales como los tetrámeros del MHC descritos posteriormente.

De manera alternativa, el diagnóstico del cáncer también se puede llevar a cabo incubando los CTL mencionados anteriormente, células dendríticas o anticuerpos junto con una muestra de un sujeto positivo al HLA-A*0206, o administrando los CTL, células dendríticas o anticuerpo mencionado anteriormente a un sujeto positivo al HLA-A*0206; y después determinar la posición, región, cantidad, etc. de los CTL, células dendríticas o anticuerpo. Como los CTL y células dendríticas tienen una propiedad de unirse alrededor de las células cancerosas, se puede llevar a cabo el diagnóstico del cáncer administrando los CTL o células dendríticas al sujeto, y examinando la posición o región de los mismos. También se desvela en el presente documento un método de diagnóstico del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206 comprende una etapa de administración de CTL específicos de WT1 o células dendríticas inducidas por el método mencionado anteriormente en un sujeto positivo al HLA-A*0206, y una etapa de determinar la posición o región de los CTL o células dendríticas en el sujeto positivo al HLA-A*0206.

El diagnóstico del cáncer se puede llevar a cabo también incubando los CTL o las células dendríticas junto con una muestra de un sujeto positivo al HLA-A*0206 que les permita reaccionar, añadiendo un anticuerpo contra los CTL o las células dendríticas, continuar la incubación, y detectar o cuantificar un complejo de unión del anticuerpo a las células cancerosas y los CTL, la unión de anticuerpo a las células dendríticas, etc. mediante un marcador, etc. unido al anticuerpo. Cuando la cantidad del complejo de unión del anticuerpo a la célula cancerosa y los CTL o la unión del anticuerpo a células dendríticas está aumentada en comparación con el caso en el que no se desarrolló el cáncer, puede que se haya desarrollado el cáncer. Los CTL, células dendríticas o anticuerpos mencionados anteriormente pueden estar marcados. el marcado hace posible que se lleve a cabo eficazmente el diagnóstico. Ejemplos de la muestra del sujeto positivo a HLA-A*0206 incluye los especímenes biológicos obtenidos de las personas positivas al HLA-A*0206, tal como orina, sangre, fluido de extractos tisulares, saliva, lágrimas, y otros fluidos, y es preferible la sangre.

Ejemplos del método de diagnóstico del cáncer para personas positivas al HLA-A*0206 que utilizan el WT1 proteico o WT1 peptídico mencionado anteriormente incluye el ensayo de MHC tetramérico, el ensayo de MHC pentamérico y el ensayo del MHC dextramérico, cada uno de los cuales utilizan el WT1 peptídico como antígeno. Por ejemplo, en el ensayo del MHC tetramérico o el ensayo del MHC pentamérico utilizando el péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆ como antigénico peptídico, los CTL específicos de WT1 de personas positivas al HLA-A*0206 se pueden detectar utilizando un complejo MHC/péptido WT1₁₈₇ o un complejo del MHC/péptido WT1₁₂₆ como sonda. Como los pacientes de cáncer presentan una alta expresión de CTL específicos de WT1, se puede diagnosticar el cáncer

pacientes de cáncer presentan una alta expresión de CTL específicos de WT1, se puede diagnosticar el cáncer midiendo la expresión de CTL específicos de WT1 en personas positivas al HLA-A*0206. Como los pacientes de cáncer manifiestan una repuesta inmunológica aumentada contra los antígenos del cáncer, también se puede diagnosticar el cáncer examinando la respuesta inmunológica contra el WT1 proteico o WT1 peptídico en personas positivas al HLA-A*0206. Ejemplos del método de examen de la respuesta inmunológica incluye un método que implica la medición de un anticuerpo contra el WT1 proteico o WT1 peptídico mediante ELISA. Dicho método de diagnóstico del cáncer para personas positivas al HLA-A*0206 utilizando un producto del gen supresor tumoral WT1 o un péptido parcial del mismo es también un aspecto de la presente invención. El ensayo del MHC tetramérico y el ensayo del MHC pentamérico se puede llevar a cabo por un método conocido utilizando un kit disponible en el mercado, por ejemplo, "WT1 tetramer" (Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.).

El diagnóstico del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206 también se puede llevar a cabo por un método que comprende una etapa de hacer reaccionar una muestra de un sujeto positivo al HLA-A*0206 con un anticuerpo contra los siguientes: el WT1 proteico o el WT1 péptido, CTL específicos de WT1 inducidos por el método mencionado anteriormente o las células dendríticas inducidas por el método descrito anteriormente, y una etapa de

detección o cuantificación de un complejo del anticuerpo con el WT1 proteico o el WT1 peptídico, o un complejo del anticuerpo con los CTL específicos de WT1 o células dendríticas. Cuando la cantidad del complejo del anticuerpo con el WT1 proteico o el WT1 peptídico, o el complejo del anticuerpo con los CTL específicos de WT1 o células dendríticas está aumentada en comparación con la del caso en el que no se desarrolló el cáncer, puede haberse desarrollado un cáncer.

Ejemplos del anticuerpo contra las células dendríticas incluyen un anticuerpo que reconoce un complejo péptido WT1/HLA-A*0206. Como dicho anticuerpo puede reconocer el péptido WT1 y una molécula del HLA-A*0206, el anticuerpo puede reconocer las células dendríticas que tiene el WT1 péptido presente mediante el HLA de clase I.

10

25

60

65

Un anticuerpo que reconoce un complejo del WT1 peptídico/HLA-A*0206/TCR (receptor antigénico de célula T) de los CTL también se puede utilizar como anticuerpo contra células dendríticas. Dicho anticuerpo puede reconocer un complejo de una célula dendrítica y un CTL, y un complejo de una célula cancerosa y un CTL.

El diagnóstico del cáncer se puede llevar a cabo incubando dicho anticuerpo junto con una muestra de un sujeto positivo al HLA-A*0206 para permitirle que forme un complejo, y detectar o cuantificar un complejo de unión al anticuerpo de la célula cancerosa y los CTL, el anticuerpo unido a las células dendríticas que presentan el WT1 peptídico o similares, mediante la fluorescencia emitida por el anticuerpo. Cuando la cantidad del complejo de unión del anticuerpo a la célula cancerosa y CTL, el anticuerpo unido a las células que presentan el WT1 peptídico, o similares está aumentado en comparación con el del caso en el que no se desarrolló el cáncer, se puede haber desarrollado un cáncer.

También se desvela en el presente documento un método de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende la administración de una composición que contiene el WT1 proteico o el WT1 péptido en una persona positiva al HLA-A*0206. La composición que comprende el WT1 proteico o el WT1 peptídico y las realizaciones preferidas del mismo son las mismas que se han descrito con respecto a la composición vacunal contra el cáncer mencionada anteriormente.

- El uso del WT1 proteico o WT1 peptídico para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-30 A*0206, y el uso de los mismos para la producción de una composición vacunal contra el cáncer que se utiliza para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206 también es un aspecto de la presente invención. El WT1 proteico o WT1 peptídico y las realizaciones preferidas del mismo son las mismas que se han descrito con respecto a la composición vacunal contra el cáncer mencionada anteriormente.
- También se desvela en el presente documento una composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0201, que comprende un péptido modificado del péptido WT1₁₈₇ (SEQ ID NO: 2) o el péptido WT1₁₂₆ (SEQ ID NO: 3), cualquiera de los cuales es un péptido parcial de un producto proteico del gen supresor tumoral WT1, siendo el péptido modificado inmunogénico en personas positivas al HLA-A*0201.
- Ejemplos de un péptido WT1₁₈₇ modificado o un péptido WT1₁₂₆ modificado incluye péptidos que comprenden una eliminación, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos del péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆ mencionados anteriormente. El péptido WT1₁₈₇ modificado es preferentemente un péptido que comprende los mismos restos de aminoácidos en las posiciones 4 a 8 desde el extremo N que tiene el péptido WT1₁₈₇ en las posiciones correspondientes. Como dicho péptido modificado, se prefieren los péptidos mencionados anteriormente de las SEQ
 ID NO: 4 a 12, 15 y 16, 18 a 20 y 22 a 25. También se prefiere el péptido WT1₁₈₇P9L (SLGEQQYSL; SEQ ID NO: 53). El péptido WT1₁₂₆ modificado es preferentemente un péptido que comprende los mismos restos de aminoácidos en las posiciones 4 a 8 desde el extremo N que tiene el péptido WT1₁₂₆ en las posiciones correspondientes. Por

ejemplo, se prefieren los péptidos mencionados anteriormente de SEQ ID NO: 27 a 37 y 39 a 52.

También se desvela que los péptidos mencionados anteriormente de SEQ ID NO: 4 a 26 y 53 a 62 se pueden utilizar como un péptido WT1₁₈₇ modificado, y los péptidos mencionados anteriormente de las SEQ ID NO: 27 a 52 y 63 a 75 se pueden utilizar como péptido WT1₁₂₆ modificado. Entre los péptidos modificados de SEQ ID NO: 4 a 75, se prefieren los péptidos excepto el péptido WT1₁₈₇P1D, el péptido WT1₁₈₇P1E, el péptido WT1₁₈₇P1H, el péptido WT1₁₈₇P1P y el péptido WT1₁₈₇P2Q; y el péptido WT1₁₂₆P1D, el péptido WT1₁₂₆P1E, el péptido WT1₁₂₆P1P, el péptido WT1₁₂₆P2A y el péptido WT1₁₂₆P2Q.

Inter alia, el péptido WT1₁₈₇P3M, y más preferentemente el péptido WT1₁₈₇P1F, el péptido WT1₁₈₇P2M o el péptido WT1₁₈₇P3M, y más preferentemente el péptido WT1₁₈₇P1F o el péptido WT1₁₈₇P2M. El péptido WT1₁₂₆P0H, el péptido WT1₁₂₆P2L, el péptido WT1₁₂₆P3M o el péptido WT1₁₂₆P9V, y más preferentemente el péptido WT1₁₂₆P1F o el péptido WT1₁₂₆P2L.

La cantidad para el uso del péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆ modificados que son inmunogénicos en personas positivas al HLA-A*0201 es la misma que la del WT1 peptídico en la composición vacunal contra el cáncer mencionada anteriormente para personas positivas al HLA-A*0206. Los demás ingredientes de la composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0201 y las realizaciones preferidas de la misma son los mismos que los de la composición vacunal mencionada anteriormente para personas positivas al HLA-A*0206.

El ADN y ARN que codifica el péptido WT1₁₈₇ o péptido WT1₁₂₆ modificados que se mencionan anteriormente que son inmunogénicos en personas positivas al HLA-A*0201 también se pueden utilizar como un principio activo de la composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0201. Dicha composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0201 también se desvela en el presente documento.

Los demás ingredientes distintos del ADN y ARN en la composición vacunal contra el cáncer para las personas positivas al HLA-A*0201 y realizaciones preferidas de los mismos son los mismos que los de la composición vacunal contra el cáncer mencionada anteriormente para personas positivas al HLA-A*0206.

- Los CTL específicos de WT1 se pueden inducir a partir de PBMC derivadas de una persona positiva al HLA-A*0201 cultivando las PBMC en presencia de un péptido WT1₁₈₇ o un péptido WT1₁₂₆ modificado que sea inmunogénica para la persona positiva al HLA-A*0201 mencionada anteriormente. Dicho método de inducción de CTL específicos del WT1 también se desvela en el presente documento.
- Ejemplos preferidos del péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆ modificados que sean inmunogénicos en personas positivas al HLA-A*0201 son los mismos que se utilizan para la composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0201.
- Las células dendríticas que presentan el péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆ modificados pueden inducirse a partir de células dendríticas inmaduras derivadas de una persona positiva al HLA-A*0201 cultivando las células dendríticas inmaduras en presencia del péptido modificado que es inmunogénica en la persona positiva al HLA-A*0201 mencionada anteriormente. Dicho método para la inducción de células dendríticas que presentan el péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆ modificados también se desvela en el presente documento. Los ejemplos preferidos del péptido modificado son los mismo que se utilizan para la composición vacunal contra el cáncer mencionada anteriormente para las personas positivas al HLA-A*0201.
 - Los cánceres en las personas positivas al HLA-A*0201 se pueden diagnosticar mediante el uso del péptido WT1₁₈₇ modificado o el péptido WT1₁₂₆ modificado mencionados anteriormente inmunogénicos para personas positivas al HLA-A*0201, un anticuerpo contra ellos, CTL específicos de WT1 inducidos por el péptido modificado o las células dendríticas inducidas por el péptido modificado. Dicho método de diagnóstico del cáncer para personas positivas al HLA-A*0201 también se desvela en el presente documento.

30

35

40

- El método de diagnóstico del cáncer para personas positivas al HLA-A*0201 y las realizaciones preferidas del mismo son los mismos que el método mencionado anteriormente para el diagnóstico del cáncer para personas positivas al HLA-A*0206 y las realizaciones preferidas del mismo.
- Ejemplos del método de diagnóstico para personas positivas al HLA-A*0201 incluyen el ensayo del MHC tetramérico, el ensayo del MHC pentamérico y el ensayo del MHC dextramérico, cada uno de los cuales utilizan el péptido WT1₁₈₇ modificado o el péptido WT1₁₂₆ modificado inmunogénicos en personas positivas al HLA-A*0201 como antígeno. Ejemplos preferidos del péptido modificado son los mismos que se utilizaron para la composición vacunal contra el cáncer mencionada anteriormente para personas positivas al HLA-A*0201.
- Los cánceres en las personas positivas al HLA-A*0201 se pueden diagnosticar mediante el uso de un anticuerpo contra los siguientes: el péptido WT1₁₈₇ modificado o el péptido WT1₁₂₆ modificado mencionados anteriormente inmunogénicos en personas positivas al HLA-A*0201, los CTL específicos de WT1 inducidos por el péptido modificado o las células dendríticas inducidas por el péptido modificado. Dicho método de diagnóstico del cáncer en personas positivas al HLA-A*0201 también se desvela en el presente documento.
- Ejemplos preferidos del péptido modificado son los mismos que se han utilizado en la composición vacunal contra el cáncer mencionada anteriormente para las personas positivas al HLA-A*0201. El método de diagnóstico del cáncer para personas positivas al HLA-A*0201 y las realizaciones preferidas del mismo son las mismas que el método mencionado anteriormente de diagnóstico del cáncer para personas positivas al HLA-A*0206 y las realizaciones preferidas del mismo.
- También se desvela en el presente documento un método para el tratamiento o prevención del cáncer, que comprende la administración a una persona positiva al HLA-A*0201 de una composición vacunal que contiene el siguiente péptido:
- un péptido modificado del péptido WT1₁₈₇ (SEQ ID NO: 2) o el péptido WT1₁₂₆ (SEQ ID NO: 3), que cualquiera de ellos es un péptido parcial de un producto proteico del gen supresor tumoral WT1, siendo el péptido modificado inmunogénico en personas positivas al HLA-A*0201.
 - Ejemplos preferidos del péptido modificado son los mismos que se han utilizado para la composición vacunal contra el cáncer mencionada anteriormente para personas positivas al HLA-A*0201. La composición vacunal contra el cáncer y las realizaciones preferidas del mismo como se describen con respecto a la composición vacunal mencionada anteriormente para las personas positivas al HLA-A*0201.

Se desvela también el uso del siguiente péptido:

un péptido modificado del péptido WT1₁₈₇ (SEQ ID NO: 2) o el péptido WT1₁₂₆ (SEQ ID NO: 3), que cualquiera de los cuales es un péptido parcial del producto proteico del gen supresor tumoral WT1, siendo el péptido modificado inmunogénica en una persona positiva al HLA-A * 0201,

para el tratamiento o prevención en personas positivas al HLA-A*0201, y el uso de los mismos para la producción de una composición vacunal contra el cáncer utilizada para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0201.

10 Ejemplos preferidos del péptido modificado son los mismos que se utilizan en la composición vacunal contra el cáncer mencionada anteriormente para las personas positivas al HLA-A*0201. La composición vacunal contra el cáncer y las realizaciones preferidas de la misma son los mismos que se han descrito respecto a la composición vacunal mencionada anteriormente para las personas positivas al HLA-A*0201.

15 Ejemplos

5

De aquí en adelante, la presente invención se ilustrará con más detalle por medio de ejemplos, pero no se limita a estos. Las abreviaturas de los Ejemplos indican los siguientes significados. Los péptidos sintéticos se adquirieron en SIGMA GENOSYS JAPAN.

20 DCs: Células dendríticas

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

CD: Agrupamiento de diferenciación (antígeno de diferenciación de leucocitos)

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de monocitos granulocitos

IL: Interleucina

25 TNFα: Factor de necrosis tumoral-α

PGE: Prostaglandina

Gy: Gray

B-LCL: Línea celular linfoblastoide-B EB virus: virus de Epstein-Barr

30 tBu: t-butilo Trt: Trifenilmetilo

35

45

50

55

65

Fmoc: 9-fluorenilmetiloxicarbonilo

Ejemplo 1 (predicción de moléculas del HLA capaces de unirse con el WT1 peptídico)

Las moléculas de HLA capaces de unirse con el péptido WT1₁₈₇ (SEQ ID NO: 2) se predijeron utilizando el programa de predicción NetMHC2.0 Server.

Como resultado, el péptido WT1₁₈₇ restringido al HLA-A*0201 capaz de inducir CTL específicos del WT1 se clasificó como alto en términos de afinidad de unión a una molécula del HLA-A*0206 con el programa de predicción NetMHC2.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC-2.0/).

Ejemplo 2 (preparación de CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ a partir de PBMC de donantes de sangre sanos positivos al HLA-A*0206, y ensayo de citotoxicidad de los CTL)

(1) Separación de las PBMC de donantes de sangre sanos positivos al HLA-A*0206, y preparación de las CD

Primero, se aislaron las PBMC a partir de la sangre periférica de cada uno de los donantes de sangre sanos positivos al HLA-A*0206 (tres personas) por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Después, se seleccionaron las células positivas al CD14 de entre las PBMC utilizando partículas-DM magnéticas anti-CD14 humano (fabricadas por Becton, Dickinson y compañía (BD)). En este caso, se consideró que estaba presente un gran número de células positivas a CD14 en la población de monocitos. Las células positivas a CD14 seleccionadas se cultivaron en un medio X-VIVO 15 (fabricado por BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con un 1 % v/v de suero AB humano, 800 UI/ml de GM-CSF (fabricado por Pepro Tech INC, Rocky Hill, NJ) y 1000 UI/ml de IL-4 (fabricada por Pepro Tech INC) para preparar las CD.

(2) Inducción de CD maduras autólogas

Las CD preparadas en el (1) anterior se cultivaron a 37 °C durante 1 día, y después se añadió un coctel de maduración de citocinas que contenía 10 ng/ml de TNFα (factor de necrosis tumoral-α; Pepro Tech INC, Rocky Hill, NJ), 10 ng/ml de IL-β, 100 UI/ml de IL-6 y 1 μg/ml de PGE2 a los pocillos de cultivo que contenían las CD. Después del cultivo de 24 h a 37 °C, se obtuvieron las CD maduras autólogas.

(3) Inducción de CTL específicos del péptido WT1₁₈₇

Las CD maduras autólogas se pulsaron con el péptido WT1₁₈₇, se irradiaron con 30 Gy de radiación, y se co-

cultivaron con PBMC enriquecidas en células T positivas a CD8 obtenidas del donante de sangre sano positivo al HLA-A*0206. La pulsión de las CD con el péptido WT1₁₈₇ se llevó a cabo cultivando las CD en presencia de 10 µg/ml del péptido WT1₁₈₇ a 37 °C durante 30 minutos. Las células T positivas a CD8 se enriquecieron a partir de las PBMC del donante de sangre sano positivo al HLA-A*0206 utilizando las microperlas CD8 y columna MS (fabricadas por Miltenyi Biotec GmbH).

A partir de la segunda estimulación, se utilizaron las PBMC autólogas que se habían pulsado con el péptido y después irradiado con radiación como células estimulantes selectivas. Dos días después de la segunda estimulación, se añadieron una IL-2 recombínate (proporcionada por Shionogi & Co., Ltd.) y una IL-7 (fabricada por Pepro Tech INC) al medio de cultivo a concentraciones de 10 UI/ml y 10 ng/ml, respectivamente. Después de la 4ª estimulación, se cultivaron las células durante 10 días a 37 °C y después se recolectaron las células resultantes (CTL) por centrifugación utilizando una centrífuga. La actividad citotóxica de estas células (CTL) contra las células diana se examinó por un ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr.

15 (4) Ensayo de citotoxicidad

10

20

25

35

40

El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo por un ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr. El ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr se llevó a cabo de la siguiente manera. Primero, las células diana (1 x 10⁷ células/ml) se incubaron en presencia de 100 μl de ⁵¹Cr (actividad específica: 1 mCi/ml) en RPMI1640 (fabricado por NIHON PHARMACEUTICAL CO., LTD.) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino a 37 °C durante 1,5 horas para marcar las células diana con ⁵¹Cr. Después, las células diana marcadas con ⁵¹Cr se añadieron a los pocillos de placas de 96 pocillos de fondo redondeado que contenían distinto número de CTL obtenidos en el (3) anterior (suspendidos en 100 μl de medio de ensayo), se mezclaron con los CTL y después se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Estas células se mezclaron de manera que la relación E/T (relación de número de células) era 1.1, 5:1, 20:1 o 25:1, con la condición de que los CTL y las células diana marcadas con ⁵¹Cr se expresan como "E" y "T", respectivamente. Después de terminar la incubación, se recolectaron 100 μl del sobrenadante de cada pocillo. Se determinó la cantidad de ⁵¹Cr liberado de las células marcadas, y se calculó la lisis específica (%) basada en la liberación de ⁵¹Cr. La lisis específica (%) se calculó de la siguiente manera.

30 Lisis específica (%) = (liberación de la muestra de ensayo - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea) x 100

En la fórmula, la cantidad de liberación espontánea se refiere a la cantidad de fluorescencia del sobrenadante del cultivo en los pocillos que contienen solo las células diana, y la liberación máxima se refiere a la cantidad de fluorescencia del medio de cultivo en el que las células diana se han lisado completamente por tratamiento con un 1 % en peso de Triton X-100.

Las células diana que se utilizaron eran B-LCL, células K562, célula JY, y células KH88, que se describirán con detalle posteriormente. Las células KH88 eran las mismas que las células KH88OF8 utilizadas en el Ejemplo 9 posterior.

Las células B-LCL, que se establecieron por transformación mediada por virus EB de linfocitos B de sangre periférica obtenidos de un donante de sangre positivo al HLA-A*0206, no expresaban el WT1.

Las células K562, que se establecieron a partir de un paciente con leucemia mielógena crónica en crisis blástica, son una línea celular que expresa WT1, que no se expresa en un HLA clase I. El presente inventor no fue capaz de obtener una línea celular de leucemia de tipo silvestre positiva a HLA-A*0206 que expresara un WT1. Por esta razón, se utilizaron también células 0206K562, que se prepararon por transformación de células K562 con genes HLA-A*0206. El análisis FACS utilizando un anticuerpo anti-HLA-A2 (clon BB7.2; fabricado por BD Biosciences Pharmingen) demostraba que las células 0206K562 transformadas con genes HLA-A*0206 expresan moléculas de HLA-A*0206 en su superficie celular.

El análisis de transferencia de western demostraba que las células B-LCL transformadas con el gen WT1 expresaba WT1. Las células B-LCL transformadas con un falso vector se utilizaron como control.

Las células JY no expresan WT1 La línea celular B negativa a HLA-A*0206 se estableció por transformación mediada por virus EB.

Las células KH88 es una línea celular de leucemia negativa al HLA-A*0206 que expresa WT1.

Cada línea celular se cultivó en un medio de cultivo RPMI1640 suplementado con un 10 % v/v de suero fetal bovino inactivado por calor, 50 UI/ml de penicilina y 50 mg/ml de estreptomicina.

(5) Análisis de anticuerpo y citometría de flujo

Se adquirieron los mAb anti-CD14, CD86, CD80, CD83 y HLA-DR humanos en BD. La concentración y maduración

19

55

60

de las CD se confirmaron por análisis de antígenos de superficie celular utilizando los anticuerpos monoclonales (mAb) enumerados anteriormente. Las muestras se analizaron con un citómetro de flujo (FACS Calibur; fabricado por BD) utilizando el software CellQest.

(6) Resultados

10

15

20

25

45

50

55

60

65

Se examinó si se podían preparar los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ a partir de las PBMC de donantes de sangre positivos a HLA-A*0206. Se examinó la actividad citotóxica específica del péptido WT1₁₈₇ utilizando los CTL obtenidos por estimulación repetida de PBMC enriquecidas en células T positivas a CD8 a partir de un donante de sangre sano positivo al HLA-A*0206 con CD o PBMC autólogas pulsadas con el péptido WT1₁₈₇. Los CTL presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células B-LCL autólogas pulsadas con el péptido WT1₁₈₇ que contra las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1₁₈₇ (Fig. 1a). En la Fig. 1a, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de TL obtenidos por la estimulación del péptido (efector:E) con respecto a las células diana (diana:T) (relación E/T). El triángulo cerrado representa las células pulsadas con 10 μg/ml del péptido WT1₁₈₇, y el cuadrado cerrado representa las células no pulsadas con el péptido WT1₁₈₇. La misma actividad citotóxica anterior se demostró también por los CTL preparados de manera similar a partir de las PBMC aisladas de los dos sonantes de sangre sanos positivos a HLA-A*0206 diferentes (Fig. 2a y 2b). En la Fig. 2, el triángulo cerrado representa las células pulsadas con 10 μg/ml del péptido WT1₁₈₇, y el cuadrado cerrado representa las células no pulsadas con el péptido WT1₁₈₇. Estos resultados muestran que cada actividad citotóxica es específica para el péptido WT1₁₈₇.

La actividad citotóxica de los CTL aumentaba en paralelo con la concentración del péptido WT1₁₈₇ utilizado para pulsar las CD o PBMC, y alcanzaban la meseta con la concentración de péptido de 0,1 μg/ml (Fig. 1b). La concentración media máxima del péptido WT1₁₈₇ para la lisis específica (valor de lisis medio máximo) era aproximadamente 5 x 10⁻⁵ μg/ml. Esto demuestra que la afinidad de los TCR (receptores antigénicos de células T) de los CTL contra un complejo péptido WT1₁₈₇/ HLA-A*0206 era relativamente alto. Este resultado sugiere fuertemente que los CTL inducidos con el péptido WT1₁₈₇ pueden reconocer el péptido WT1₁₈₇.

De la misma manera que anteriormente, se examinó la actividad citotóxica contra distintas células diana que expresaban endógenamente WT1 utilizando los CTL obtenidos estimulando las PBMC enriquecidas en células T positivas al CD8 del donante de sangre positivo a HLA-A*0206 con CD o PBMC pulsadas con el péptido WT1₁₈₇. los resultados se muestran en las Fig. 3a y 3b. Las actividades citotóxicas respectivas para las células diana que se muestran en las Fig. 3a y 3b se determinaron al mismo tiempo. La Fig. 3a muestra la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ contra las B-LCL transformadas con el gen WT1 (positivas al HLA-A*0206, que expresan WT1; triángulo cerrado), o las B-LCL transformadas con el vector falso (positivas a HLA-A*0206, que no expresan WT1; cuadrado cerrado). La Fig. 3b muestra que la actividad específica de los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ contra las células 0206K625 (positivas al HLA-A*0206, que expresan el WT1, cuadrado cerrado), células K562 (negativas al HLA-A*0206, que expresan WT1; cuadrado abierto), células KH88 (negativas al HLA-A*0206, que expresan WT1; triángulo cerrado).

Los CTL presentaban una citotoxicidad más fuerte contra las B-LCL transformadas con WT1 (positivas al HLA-A*0206, que expresan WT1) que contra las B-LCL transformadas con el vector falso (positivas al HLA-A*0206, que no expresan WT1) (Fig. 3a). Además, como se muestra en la Fig. 3b, los CTL presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células 0206K625 transformadas con el HLA-A*0206 (positivas al HLA-A*0206, que expresan WT1) que contra las células K562 (negativas al HLA-A*0206, que expresan WT1), las células KH88 (negativas al HLA-A*0206, que expresan WT1), o las células JY (negativas al HLA-A*0206, que no expresan WT1). En otras palabras, los CTL presentaban una actividad citotóxica significativa contra las células de leucemia diana positivas al HLA-A*0206 que expresan WT1, pero no actividad citotóxica contra las células negativas al HLA-A*0206 y/o que no expresan WT1. Este resultado demuestra que los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ preparados *in vitro* muestran una actividad citotóxica contra las células tumorales que expresan WT1 como las células de leucemia y que son positivas al HLA-A*0206. El resultado en la Fig. 3b sugiere fuertemente que la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ estaban restringidos a la HLA-A de clase I. Esto se basa en el hecho de que se observaba una actividad citotóxica más fuerte contra las células 0206K625 que contra las células K562.

Los resultados anteriores demuestran que los CTL cultivados mencionados anteriormente son CTL específicos del péptido WT1₁₈₇.

Los resultados de cada figura son los datos típicos, y básicamente reproducibles con algunas variaciones.

Ejemplo 3 (confirmación de la clase de HLA por la que los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ están restringidos)

Se examinó si la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ obtenidos en el Ejemplo 2 estaban restringidos por el HLA de clase I. Se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr en presencia o ausencia de mAb contra HLA de clase I o HLA de clase II. Se utilizaron células B-LCL autólogas como células diana.

En este experimento la relación E/T era de 5:1.

Los resultados se muestran en la Fig. 4. La Fig. 4a muestra los resultados del ensayo que se llevó a cabo utilizando B-LCL (positivas al HLA-A*0206, que no expresan WT1₁₈₇) como célula diana en ausencia de los mAb contra HLA clase I (mAb anti-HLA clase II). La Fig. 4b muestra los resultados del ensayo que se llevó a cabo utilizando B-LCL pulsadas con el péptido WT1₁₈₇ (positivas al HLA-A*0206, que expresan WT1₁₈₇) como célula diana en ausencia de mAb anti-HLA clase I y en presencia de mAb anti-HLA clase II. La fig. 4c muestra los resultados del ensayo que se llevó a cabo utilizando B-LCL pulsadas con el péptido WT1₁₈₇ (positivas la HLA-A*0206, que expresan WT1₁₈₇) como célula diana en presencia de mAb anti-HLA clase I y ausencia de mAb anti-HLA clase II. La Fig. 4d muestra los resultados del ensayo que se llevó a cabo utilizando B-LCL pulsadas con el péptido WT1₁₈₇ (positivas a HLA-A*0206, que expresan WT1₁₈₇) como célula diana en ausencia de mAb anti-HLA clase I y mAb anti-HLA clase II.

Como se muestra en la Fig. 4, la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ se inhibía completamente por la acción de un anticuerpo anti-HLA clase I, no con un anticuerpo anti-HLA clase II. Los resultados demuestran que la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ estaba restringida por el HLA clase I como se esperaba.

Ejemplo 4 (ensayo de toxicidad contra células tumorales)

El ensayo de toxicidad contra las células tumorales positivas al HLA-A*0206 que expresan WT1 se llevó a cabo *in vitro* utilizando CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ obtenidos en el Ejemplo 2. El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo de acuerdo con el ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr descrito en el Ejemplo 2. Como resultado, los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇ presentaban la actividad de citotoxicidad contra las células tumorales que expresaban WT1 (datos no mostrados).

Ejemplo 5 (preparación de los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆, y ensayo de toxicidad de los CTL)

Los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆ se prepararon de la misma manera que en el Ejemplo 2 (3) excepto que se utilizó el péptido WT1₁₂₆ (SEQ ID NO: 3) en vez del péptido WT1₁₈₇. El ensayo de citotoxicidad se llevó a cabo utilizando estos CTL de la misma manera que en el Ejemplo 2, para determinar la actividad citotóxica específica contra el péptido WT1₁₂₆. La Fig. 5 muestra la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆ inducidos a partir de las PBMC del mismo donante de sangre sano positivas al HLA-A*0206 que en la Fig. 2b. En la Fig. 5, el triángulo cerrado representa las células pulsadas con 10 µg/ml del péptido WT1₁₂₆, y el cuadrado cerrado representa las células no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆. Los CTL presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células B-LCL autólogas pulsadas con el péptido WT1₁₂₆ que contra las células B-LCL no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆. Este resultado demuestra que la actividad citotóxica de los CTL es específica del péptido WT1₁₂₆.

De la misma manera que en el Ejemplo 2, se examinó la actividad citotóxica contra distintas células diana que expresaban WT1 endógenamente utilizando los CTL preparados estimulando las PBMC enriquecidas en células T positivas al CD8 de donantes de sangre positivos al HLA-A*0206 con CD o PBMC pulsadas con el péptido WT1₁₂₆. La actividad citotóxica contra cada célula dina se muestra en las Fig. 6a y 6b. Las células diana de las Fig. 6a y 6b son las células 0206K625 (positivas al HLA-A*0206, que expresan WT1; cuadrado cerrado), K562 (negativas al HLA-A*0206, que expresan WT1; circulo cerrado), y células JY (negativas al HLA-A*0206, que no expresan WT1; triángulo cerrado). La Fig. 6a muestra la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆ inducidos a partir de PBMC del mismo donante de sangre sano positivo al HLA-A*0206 que en la Fig. 2a. La Fig. 6b muestra la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆ inducidos a partir de PBMC de mismo donante de sangre sano positivo al HLA-A*0206 que en la Fig. 2b.

Como los CTL específicos del péptido WT1₁₈₇, los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆ presentaban una actividad citotóxica significativa contra las células de leucemia diana positivas al HLA-A*0206, que expresaban WT1, pero no una actividad citotóxica contra células negativas al HLA-A*0206 y/o que no expresaban WT1. Este resultado demuestra que los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆ preparados *in vitro* presentan actividad citotóxica contra células tumorales que expresan WT1 endógenamente como las células de leucemia y que sean positivas al HLA-A*0206. Los resultados de las Fig. 6a y 6b sugiere fuertemente que la actividad citotóxica de los CTL específicos del péptido WT1₁₂₆ estaba restringida por el HLA-A de clase I. Esto se basa en el hecho de que se observaba una actividad citotóxica más fuerte contra las células 0206K625 que contra las células K562.

Los resultados anteriores demuestran que los CTL obtenidos son CTL específicos del péptido WT1₁₂₆.

Los resultados de cada figura son datos típicos, y básicamente reproducibles con algunas variaciones.

Ejemplo 6 (preparación de composiciones vacunales)

65

55

60

20

Se prepararon las siguientes composiciones vacunales 1 a 8. Estas son solo ejemplos de la composición vacunal contra el cáncer de la presente invención.

Composición vacunal contra el cáncer 1

Péptido WT11873 mgMontanide ISA-51400 mg5 % glucosa en agua400 mg

5 Los ingredientes mencionados anteriormente se mezclaron y la vacuna se llamó composición vacunal contra el cáncer 1.

Composición vacunal contra el cáncer 2

Péptido WT11871 mgMontanide ISA-51400 mg5 % glucosa en agua400 mg

Los ingredientes mencionados anteriormente se mezclaron y la vacuna se llamó composición vacunal contra el 10 cáncer 2.

Composición vacunal contra el cáncer 3

Péptido WT1₁₈₇ 0,001 mg Montanide ISA-51 400 mg 5 % glucosa en agua 400 mg

Los ingredientes mencionados anteriormente se mezclaron y la vacuna se llamó composición vacunal contra el cáncer 3.

Composición vacunal contra el cáncer 4

Péptido WT1₁₈₇ 10 mg Montanide ISA-51 400 mg 5 % glucosa en agua 400 mg

Los ingredientes mencionados anteriormente se mezclaron y la vacuna se llamó composición vacunal contra el cáncer 4.

20 Composiciones vacunales contra el cáncer 5 a 8

Las composiciones vacunales contra el cáncer 5 a 8 se prepararon de la misma manera que en las composiciones vacunales contra el cáncer 1 a 4 mencionadas anteriormente excepto en que se utilizó el péptido WT1₁₂₆ en vez del péptido WT1₁₈₇.

Ejemplo 7 (afinidad de péptidos modificados a las moléculas de HLA-A*0206)

Como con el péptido WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆ y los péptidos modificados que comprende la sustitución de un resto de aminoácido en la posición 1, 2, 3 o 9 desde el extremo N del péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆, se analizó la afinidad para las moléculas del HLA-A*0206 mediante el uso del programa de predicción NetMHC2.0 Server. Los resultados del análisis de los péptidos WT1₁₈₇ modificados y los péptidos WT1₁₂₆ modificados se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. El valor menor (el péptido tiene capacidad de unión a una concentración menor) indica una alta afinidad.

35 Tabla 1

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración prevista | Afinidad (nM) | Fuerza de unión |
|------------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|---------------|-------------------|
| WT1 ₁₈₇ | SLGEQQYSV | 2 | 0,776 | 11 | Unión fuerte (SB) |
| WT1 ₁₈₇ P1G | GLGEQQYSV | 4 | 0,756 | 13 | SB |
| WT1 ₁₆₇ P1A | ALGEQQYSV | 5 | 0,812 | 7 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1V | VLGEQQYSV | 6 | 0,755 | 14 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1L | LLGEQQYSV | 7 | 0,810 | 7 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1I | ILGEQQYSV | 8 | 0,782 | 10 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1M | MLGEQQYSV | 9 | 0,877 | 3 | SB |

15

25

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración prevista | Afinidad (nM) | Fuerza de unión |
|------------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|---------------|-----------------|
| WT1 ₁₈₇ P1W | WLGEQQYSV | 10 | 0,876 | 3 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1F | FLGEQQYSV | 11 | 0,926 | 2 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1Y | YLGEQQYSV | 12 | 0,896 | 3 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P2V | SVGEQQYSV | 13 | 0,722 | 20 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P2Q | SQGEQQYSV | 14 | 0,824 | 6 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P2I | SIGEQQYSV | 15 | 0,734 | 17 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P2M | SMGEQQYSV | 16 | 0,798 | 8 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3L | SLLEQQYSV | 17 | 0,865 | 4 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3A | SLAEQQYSV | 18 | 0,844 | 5 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3V | SLVEQQYSV | 19 | 0,869 | 4 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3M | SLMEQQYSV | 20 | 0,896 | 3 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3P | SLPEQQYSV | 21 | 0,791 | 9 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3W | SLWEQQYSV | 22 | 0,883 | 3 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3F | SLFEQQYSV | 23 | 0,864 | 4 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3Y | SLYEQQYSV | 24 | 0,857 | 4 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3S | SLSEQQYSV | 25 | 0,801 | 8 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3I | SLIEQQYSV | 26 | 0,880 | 3 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P9L | SLGEQQYSL | 53 | 0,586 | 88 | Unión débil |

Tabla 2

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración prevista | Afinidad (nM) | Fuerza de unión |
|------------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|---------------|-----------------|
| WT1 ₁₂₆ | RMFPNAPYL | 3 | 0,83 | 6 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1G | GMFPNAPYL | 27 | 0,76 | 14 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1A | AMFPNAPYL | 28 | 0,80 | 8 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1V | VMFPNAPYL | 29 | 0,75 | 15 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1L | LMFPNAPYL | 30 | 0,80 | 8 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1I | IMFPNAPYL | 31 | 0,77 | 11 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1M | MMFPNAPYL | 32 | 0,86 | 4 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1W | WMFPNAPYL | 33 | 0,88 | 3 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1F | FMFPNAPYL | 34 | 0,91 | 2 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1Y | YMFPNAPYL | 35 | 0,88 | 3 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P2V | RVFPNAPYL | 36 | 0,78 | 11 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P2Q | RQFPNAPYL | 37 | 0,85 | 4 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P2A | RAFPNAPYL | 38 | 0,67 | 35 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P2L | RLFPNAPYL | 39 | 0,80 | 8 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P2I | RIFPNAPYL | 40 | 0,78 | 10 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3I | RMIPNAPYL | 41 | 0,84 | 5 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3L | RMLPNAPYL | 42 | 0,83 | 6 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3G | RMGPNAPYL | 43 | 0,71 | 23 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3A | RMAPNAPYL | 44 | 0,79 | 9 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3V | RMVPNAPYL | 45 | 0,82 | 6 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3M | RMMPNAPYL | 46 | 0,86 | 4 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3P | RMPPNAPYL | 47 | 0,72 | 21 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3W | RMWPNAPYL | 48 | 0,85 | 5 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P9V | RMFPNAPYV | 49 | 0,91 | 2 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P9A | RMFPNAPYA | 50 | 0,77 | 12 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P9I | RMFPNAPYI | 51 | 0,81 | 7 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P9M | RMFPNAPYM | 52 | 0,65 | 42 | SB |

5 Ejemplo 8 (afinidad de péptidos modificados a moléculas del HLA-A*0201)

Como para el péptido WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆, y los péptidos modificados comprenden la sustitución de un resto de aminoácido en la posición 1, 2, 3 o 9 desde el extremo N del péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆. se analizó la afinidad por las moléculas del HLA-A*0201 mediante el uso del programa de predicción NetMHC2.0 Server. Los resultados de los análisis de los péptidos WT1₁₈₇ modificados y los péptidos WT1₁₂₆ modificados se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. El valor menor indica la mayor afinidad.

Tabla 3

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración prevista | Afinidad (nM) | Fuerza de unión |
|------------------------|-----------------------------|-----------|------------------------|---------------|-----------------|
| WT1 ₁₈₇ | SLGEQQYSV | 2 | 0,721 | 20 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1G | GLGEQQYSV | 4 | 0,672 | 34 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1A | ALGEQQYSV | 5 | 0,648 | 44 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1V | VLGEQQYSV | 6 | 0,705 | 24 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1L | LLGEQQYSV | 7 | 0,658 | 40 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1I | ILGEQQYSV | 8 | 0,698 | 26 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1M | MLGEQQYSV | 9 | 0,717 | 21 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1W | WLGEQQYSV | 10 | 0,628 | 55 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P1F | FLGEQQYSV | 11 | 0,824 | 6 | SB |
| WT1 ₁₆₇ P1Y | YLGEQQYSV | 12 | 0,809 | 7 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P2I | SIGEQQYSV | 15 | 0,556 | 121 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P2M | SMGEQQYSV | 16 | 0,740 | 16 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3A | SLAEQQYSV | 18 | 0,811 | 7 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3V | SLVEQQYSV | 19 | 0,766 | 12 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3M | SLMEQQYSV | 20 | 0,876 | 3 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3W | SLWEQQYSV | 22 | 0,863 | 4 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3F | SLFEQQYSV | 23 | 0,852 | 4 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3Y | SLYEQQYSV | 24 | 0,854 | 4 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P3S | SLSEQQYSV | 25 | 0,793 | 9 | SB |
| WT1 ₁₈₇ P9L | SLGEQQYSL | 53 | 0,640 | 49 | SB |

Tabla 4

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración prevista | Afinidad (nM) | Fuerza de unión |
|------------------------|--------------------------------|-----------|------------------------|---------------|-----------------|
| WT1 ₁₂₆ P1G | GMFPNAPYL | 27 | 0,80 | 9 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1A | AMFPNAPYL | 28 | 0,81 | 7 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1V | VMFPNAPYL | 29 | 0,81 | 8 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1L | LMFPNAPYL | 30 | 0,82 | 7 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1I | IMFPNAPYL | 31 | 0,81 | 8 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1M | MMFPNAPYL | 32 | 0,85 | 4 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1W | WMFPNAPYL | 33 | 0,80 | 8 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1F | FMFPNAPYL | 34 | 0,91 | 2 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P1Y | YMFPNAPYL | 35 | 0,90 | 2 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P2V | RVFPNAPYL | 36 | 0,55 | 127 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P2Q | 1 ₁₂₆ P2Q RQFPNAPYL | | 0,49 | 262 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P2L | RLFPNAPYL | 39 | 0,78 | 10 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P2I | RIFPNAPYL | 40 | 0,64 | 48 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3I | RMIPNAPYL | 41 | 0,74 | 16 | SB |

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración prevista | Afinidad (nM) | Fuerza de unión |
|------------------------|-----------------------------|-----------|------------------------|---------------|-----------------|
| WT1 ₁₂₆ P3L | RMLPNAPYL | 42 | 0,78 | 10 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3G | RMGPNAPYL | 43 | 0,60 | 73 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3A | RMAPNAPYL | 44 | 0,73 | 17 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3V | RMVPNAPYL | 45 | 0,68 | 31 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3M | RMMPNAPYL | 46 | 0,83 | 6 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3P | RMPPNAPYL | 47 | 0,61 | 66 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P3W | RMWPNAPYL | 48 | 0,83 | 6 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P9V | RMFPNAPYV | 49 | 0,84 | 5 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P9A | RMFPNAPYA | 50 | 0,73 | 18 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P9I | RMFPNAPYI | 51 | 0,79 | 9 | SB |
| WT1 ₁₂₆ P9M | RMFPNAPYM | 52 | 0,69 | 29 | SB |

Ejemplo 9 (comparación de CTL restringidos al HLA-A*0201 inducidos por distintos péptidos WT1₁₂₆ modificados)

5 (1) Propósito

20

25

30

35

45

En vista de los resultados del Ejemplo 8, se seleccionaron el péptido WT1₁₂₆P1F (SEQ ID NO: 34), el péptido WT1₁₂₆P2L (SEQ ID NO: 39), el péptido WT1₁₂₆P3M (SEQ ID NO: 46) y el péptido WT1₁₂₆P9V (SEQ ID NO: 49) como péptidos WT1₁₂₆ modificados a ensayar, y se llevaron a cabo los siguientes experimentos para explorar os péptidos WT1₁₂₆ modificados capaces de inducir CTL que tengan una alta actividad citotóxica. Los reactivos, medios, métodos experimentales, etc. utilizados en los Ejemplos 9 a 12 eran los mismos que en el Ejemplo 1, a menos de que se especifique otra cosa. En los Ejemplos 9 a 12, se llevó el cultivo a 37 °C, a menos de que es especifique otra cosa.

15 (2) Materiales y métodos

A partir de un donante humano sano que mostraba la expresión de moléculas del HLA-A*0201 (donantes de sangre sanos positivos al HLA-A*0201), se aislaron PBMC, y se separaron de las PBMC las células positivas a CD14 mediante el uso de partículas magnéticas DM anti-CD14 humano. Se preparó un medio de cultivo añadiendo 800 Ul/ml de GM-CSF y 1000 Ul/ml de IL-4 a un medio X-VIVO 15 suplementado con un 1 % v/v de suero AB humano, y se cultivaron las células positivas a CD14 en el medio de cultivo durante 1 día.

Al cultivo anterior, se añadió un coctel de maduración de citocinas que contenía 10 ng/ml de TNFα, 10 ng/ml de IL-β, 1000 UI/ml de IL-6 y 1 μg/ml de PGE2. Después de un día de cultivo adicional, se obtuvieron las CD maduras autólogas.

Las CD maduras autólogas se pulsaron con $10 \mu g/ml$ de un péptido WT1₁₂₆ modificado obtenido en el Ejemplo 13 (el péptido WT1₁₂₆P1F, el péptido WT1₁₂₆P2L, el péptido WT1₁₂₆P3M o el péptido WT1₁₂₆P9V), cultivado durante 4 horas, e irradiadas con 35 Gy de radiación. Las células obtenidas de esta manera se utilizaron como células estimulantes para la inducción de CTL.

Las PBMC (2 x 10⁶ células/pocillo) servían como células de respuesta y las CD mencionadas anteriormente (2 x 10⁵ células/pocillo) se co-cultivaron en una placa de 24 pocillos. Una semana más tarde, se dio la re-estimulación por adición de células T2 que se habían pulsado con el péptido y se irradiaron con 75 Gy de radiación. Tres días después de la re-estimulación, se añadieron 20 Ul/ml de IL-2. La misma re-estimulación se repitió otras 3 veces por adición del péptido pulsado, células T2 irradiadas, y después se enriquecieron las células positivas a CD8 en las células de respuesta.

Como para las células T positivas al CD8, la reactividad de un HLA-A*0201 tetramérico unido al péptido WT1₁₂₆ se analizó por citometría de flujo, y se examinó la actividad de citotoxicidad contra distintas células diana.

Las células diana que se utilizaron eran células K562, células 0206K625, células JY, células KH88OF8, células TF-1, y células THP-1, que se muestran en la Tabla 5. Las características de estas células se muestran en la Tabla 5. La línea celular linfoblastoide B (B-LCL) establecida por infección vírica con el EB de la sangre de un donante positivo al HLA-A*0201 también se utilizó como célula diana.

Tabla 5

| Célula diana | HLA-A*0201 | HLA-A*0206 | WT1 |
|--------------|------------|------------|--------------|
| K562 | negativo | negativo | expresado |
| 0206K562 | negativo | positivo | expresado |
| JY | positivo | negativo | no expresado |
| KH88OF8 | negativo | negativo | expresado |
| TF-1 | positivo | negativo | expresado |
| THP-1 | positivo | negativo | expresado |

(3) Resultados

5

15

20

25

40

45

50

La Fig. 7 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo de las PBMC del donante 1 positivo a HLA-A*0201 que se estimularon con diferentes péptidos WT1₁₂₆ modificados y después se tiñeron con un HLA-A*0201 tetramérico marcado con PE (ficoeritrina) unido al péptido WT1₁₂₆: (Medical & Biological Laboratories, Co., Ltd.), y un anticuerpo anti-CD8 marcado con Cy7-APC (APC-Cy7: Aloficocianina-Cianina-7). Cuando las PBMC se teñían con el tetrámero y el anticuerpo anti-CD8 mencionados anteriormente, los CTL inducidos por estimulación con el péptido modificado se unían al tetrámero y al anticuerpo anti-CD8, y de esta manera, la fluorescencia emitida por el tetrámero y la fluorescencia emitida por el anticuerpo anti-CD8 se podía detectar, respectivamente. En las Fig. 7a a 7e, el eje vertical representa la intensidad de fluorescencia emitida por el HLA-A*0201 tetramérico, y el eje horizontal representa la intensidad de fluoresceína emitida por el anticuerpo anti-CD8. Cada cuadro de las Fig. 7a a 7e muestra la frecuencia (%) de CTL restringidos al HLA-A*0201 capaces de reconocer el péptido WT1₁₂₆. La Fig. 7a muestra el resultado del análisis de las PBMC que no se estimularon con ningún péptido WT1₁₂₆ modificado y teñidas con el tetrámero mencionado anteriormente y anticuerpo anti-CD8 (fondo). La Fig. 7b muestra el resultado del análisis de PBMC que se estimularon con el péptido WT1₁₂₆P1F y se tiñeron. La Fig. 7c muestra el análisis de las PBMC muestra el resultado del análisis de las PBMC se estimularon con el péptido WT1₁₂₆P2L y se tiñeron. La Fig. 7d muestra el resultado del análisis de las PBMC que se estimularon con el péptido WT1₁₂₆P3M y se tiñeron. La Fig. 7e muestra el resultado del análisis de las PBMC que se estimularon con el péptido WT1₁₂₆P9V y se tiñeron.

La frecuencia de los CTL mencionados anteriormente inducidos por estimulación de PBMC con el péptido WT1₁₂₆P1F era del 0,14 % (Fig. 7b). La frecuencia de los CTL mencionados anteriormente inducidos por estimulación de PBMC con el péptido WT1₁₂₆P2L era del 0,37 % (Fig. 7c). Los CTL inducidos por separado con estos péptidos eran positivos al HLA tetramérico, positivos a CDS y capaces de unirse al HLA-A*0201 tetramérico unido al péptido WT1₁₂₆. Estos resultados demuestran que la estimulación de PBMC con el péptido WT1₁₂₆ modificado inducía CTL que pueden reconocer el péptido de tipo silvestre (péptido WT1₁₂₆).

La Fig. 8 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de PBMC del donante 1 con el péptido WT1₁₂₆P1F. En la Fig. 8, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de células T positivas a CDS obtenidas por estimulación peptídica (efector:E) con respecto a las células diana (diana: T) (relación E/T). El rombo cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células JY como célula diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P1F se utilizaron como una célula diana.

Las células JY son positivas al HLA-A*0201 y negativas a WT1. Los CTL que presentan una actividad citotóxica más fuerte contra las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P1F que contra células JY no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P1F. Este resultado muestra que se inducían CTL que eran específicos para el péptido utilizado por la estimulación mencionada anteriormente y estaban restringidos por el HLA-A*0201.

La Fig. 9 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por la estimulación de las PBMC del donante 1 con el péptido WT1₁₂₆P2L. En la Fig. 9 el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de células T positivas a CD8 obtenidas por estimulación peptídica (efector: E) con respecto a las células diana (diana: T) (relación E/T). En la Fig. 9a, el rombo cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células JY como una célula diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P2L se utilizaron como células diana. En la Fig. 9b, el rombo cerrado representa el grupo en el que las células TF-1 se utilizaron como una célula diana, el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células THP-1 se utilizaron como una célula diana, el triángulo cerrado representa el grupo en el que las células KH88OF8 se utilizaron como células diana, y la cruz representa el grupo en el que las células B-LCL se utilizaron como células diana.

Los CTL inducidos presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P2L que contra las células JY pulsadas no con el péptido WT1₁₂₆P2L (Fig. 9a). Los CTL inducidos

presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células TF-1 y células THP-1, las cuales son positivas a HLA-A*0201 y positivas a WT1, que contra las células KH880F8, que son negativas a HLA-A*0201 y positivas a WT1, y las células B-LCL que son positivas al HLA-A*0201 y negativos a WT1 (Fig. 9b). Como está claro por los resultados, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P2L están restringidos por HLA-A*0201, y capaces de destruir células cancerosas que expresan WT1 endógenamente.

La Fig. 10 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo de las PBMC del donante 2 positivo al HLA-A*0201 que se estimularon con el péptido WT1₁₂₆P2L y después teñidas con el HLA-A*0201 tetramérico marcado con PE unido al péptido WT1₁₂₆, y el anticuerpo anti-CD8 marcado con APC-Cy7. A saber, la Fig. 10 muestra los resultados de la citometría de flujo de los CTL inducidos que se tiñeron con el HLA tetramérico unido al péptido WT1₁₂₆, y el anticuerpo anti-CD8. El ejem vertical representa la intensidad de fluorescencia emitida por el HLA-A*0201 tetramérico, y el eje horizontal representa la intensidad de fluorescencia emitida por el anticuerpo anti-CD8.

Las células del área derecha superior de la Fig. 10 son CTL inducidos que están restringidos al HLA-A*0201 y pueden reconocer el péptido WT1₁₂₆. El 5,43 % de los linfocitos de las PBMC estimuladas con el péptido WT1₁₂₆P2L eran CTL positivos al CD8, positivos al HLA tetramérico, que eran capaces de unirse al HLA-A*0201 tetramérico unido al péptido WT1₁₂₆. Este resultado demuestra que la estimulación de las PBMC con el péptido modificado inducía CTL positivos a CD8 que pueden reconocer el péptido de tipo silvestre.

La Fig. 11 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 2 con el péptido WT1₁₂₆P2L. En las Fig. 11a y 11b, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de células T positivas al CD8 obtenidas mediante la estimulación peptídica (efector:E) con respecto a las células diana (diana:T) (relación E/T). En la Fig. 11a, el rombo cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células JY como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₂₆ se utilizaron como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células JY se utilizaron como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P2L se utilizaron como células diana.

Los CTL inducidos presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₂₆ que contra las células JY no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆ (Fig. 11a). Los CTL inducidos también presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P2L que contra las células JY no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P2L (Fig. 11b). Como está claro por los resultados, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P2L pueden reconocer tanto el péptido WT1₁₂₆P2L como el péptido WT1₁₂₆. de tipo silvestre.

Ejemplo 10 (comparación de CTL restringidos al HLA-A*0206 inducidos por distintos péptidos WT1₁₂₆. modificados

(1) Propósito

40

45

50

60

10

En vista de los resultados del Ejemplo 7, el péptido WT1₁₂₆P1F, el péptido WT1₁₂₆P2L, el péptido WT1₁₂₆P3M y el péptido WT1₁₂₆P9V se seleccionaron como los péptidos WT1₁₂₆ modificados a ensayar, y se llevaron a cabo los siguientes experimentos para explorar los péptidos WT1₁₂₆ modificados capaces de inducir los CTL que tienen una alta actividad citotóxica.

(2) Materiales y métodos

Se aislaron las PBMC de un donante humano sano que presentaba la expresión de moléculas HLA-A*0206 (donante de sangre sano positivo al HLA-A*0206) y se separaron las células positivas al CD14 de las PBMC por el uso de Partículas Magnéticas DM anti-CD14 humano. Se preparó un medio de cultivo añadiendo 800 Ul/ml de GM-CSF y 1000 Ul/ml de IL-4 a un medio X-VIVO 15 suplementado con un 1 % v/v de suero AB humano, y se cultivaron las células positivas al CD14 en el medio de cultivo durante 1 día.

Al cultivo anterior, se añadió un coctel de maduración de citocinas que contenía 10 ng/ml de TNFα, 10 ng/ml de IL-β, 1000 UI/ml de IL-6 y 1 μg/ml de PGE2. Después de un día adicional de cultivo, se obtuvieron las CD autólogas maduras.

Las CD autólogas maduras se pulsaron con 10 μg/ml de un péptido WT1₁₂₆ modificado obtenido en el Ejemplo 13 (el péptido WT1₁₂₆P1F, el péptido WT1₁₂₆P2L, el péptido WT1₁₂₆P3M o el péptido WT1₁₂₆P9V), se cultivaron durante 4 horas, y se irradiaron con 35 Gy de radiación. Las células obtenidas de esta manera se utilizaron como células estimuladoras para la inducción de CTL.

Las PBMC enriquecidas en células T positivas a CD8 (2 x 10⁶ células/pocillo) y las CD mencionadas anteriormente (1 x 10⁵ células/pocillo) se co-cultivaron en una placa de 24 pocillos. Diez días más tarde se dio una re-estimulación por la adición de PBMC que se habían pulsado con el péptido e irradiado con 35 Gy de radiación. Dos días después de la re-estimulación, se añadieron 10 UI/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-7. Después de la repetición de la misma re-

ES 2 679 127 T3

estimulación otras 4 veces, se enriquecieron las células T positivas a CD8. Las células T positivas al CD8 se examinaron en cuanto a su actividad citotóxica contra distintas células diana.

Las células diana que se utilizaron eran las B-LCL establecidas por infección vírica con EB de la sangre de un donante positivo al HLA-A*0206, células K562 y células 0206K562.

(3) Resultados

- La Fig. 12 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 3 positivo al HLA-A*0206 con diferentes péptidos. La Fig. 12a muestra la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P2L. La Fig. 12b muestra la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P3M. La Fig. 12c muestra la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P9V. En las Fig. 12a a 12c, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de células T positivas a CD8 obtenidas por estimulación peptídica (efector: E) con respecto a las células diana (diana:T) (relación E/T). El rombo cerrado representa el grupo en el que las células B-LCL autólogas se utilizaron como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células B-LCL autólogas se pulsaron con el mismo péptido WT1₁₂₆ modificado que se utilizó en la estimulación mencionada anteriormente, se utilizaron como células diana.
- Los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P2L presentaban una actividad citotóxica contra las células B-LCL autólogas pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P2L, que son positivas al HLA-A*0206 y negativas al WT1, que contra las células B-LCL autólogas no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P2L (Fig. 12a). Los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P3M presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células B-LCL autólogas pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P3M, que son positivas a HLA-A*0206 y negativas al WT1, que contra las células B-LCL autólogas no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P3M (Fig. 12b). Los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P9V presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células B-LCL autólogas pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P9V, que son positivas la HLA-A*0206 y negativas al WT1, que contra las células B-LCL autólogas no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P9V (Fig. 12c).
- 30 Estos resultados demuestran que los CTL que se inducían son específicos del péptido utilizado para la estimulación mencionada anteriormente y están restringidos por el HLA-A*0206.
- La Fig. 13 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 3 positivo al HLA-A*0206 con el péptido WT1₁₂₆P9V. En la Fig. 13, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de células T positivas a CD8 obtenidas por estimulación peptídica (efector: E) con respecto a las células diana (diana:T) (relación E/T). El rombo cerrado representa el grupo en el que las células B-LCL autólogas se utilizaron como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células B-LCL autólogas transfectadas con el gen WT1, se utilizaron como células diana.
- En la Fig. 13, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P9V presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células B-LCL autólogas producidas para ser positivas al WT1 por transfección del gen WT1 en las células B-LCL, que eran originalmente positivas al HLA-A*0206 y negativas a WT1, que contra las células B-LCL autólogas no transfectadas con el gen WT1 (Fig. 12c). Como está claro por el resultado, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P9V están restringidos por el HLA-A*0206, y presentan la actividad citotóxica reconociendo el péptido WT1₁₂₆ de tipo silvestre presentado endógenamente.
- La Fig. 14 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 4 positivo al HLA-A*0206 con diferentes péptidos. La Fig. 14a muestra la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P2L. La Fig. 14b muestra la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P3M. La Fig. 14c muestra la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P9V. En las Fig. 14a a 14c, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de células T positivas a CD8 obtenidas por estimulación peptídica (efector: E) con respecto a las células diana (diana:T) (relación E/T). El rombo cerrado representa el grupo en el que las células B-LCL autólogas se utilizaron como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células B-LCL autólogas se pulsaron con el mismo péptido WT1₁₂₆ modificado que se utilizó en la estimulación mencionada anteriormente, se utilizaron como células diana.
- Los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P2L presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células B-LCL autólogas pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P2L, que son positivas al HLA-A*0206 y negativas al WT1, que contra las células B-LCL autólogas no pulsadas con el WT1₁₂₆P2L (Fig. 14a). Los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P3M presentaba una actividad citotóxica más fuerte contra las células B-LCL autólogas pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P3M, que son positivas al HLA-A*0206 y negativas al WT1 que contra las células B-LCL autólogas no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P3M (Fig. 14b). Los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P9V presentaba una actividad citotóxica más fuerte contra las células B-LCL autólogas pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P9V, que son positivas la HLA-A*0206 y negativas al WT1, que contra las células B-LCL autólogas no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆P9V (Fig. 14c). Estos resultados muestran que los CTL

que se inducían, son específicos para el péptido utilizado para la estimulación mencionada anteriormente y están restringidos al HLA-A*0206.

La Fig. 15 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante 4 positivo a HLA-A*0206 con diferentes péptidos. La Fig. 14a muestra la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P2L. La Fig. 14b muestra la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P3M. La Fig. 14c muestra la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P9V. En las Fig. 14a a 14c, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de células T positivas a CDS obtenidas por estimulación peptídica (efector: E) con respecto a las células diana (diana:T) (relación E/T). El rombo cerrado representa el grupo en el que las células K562 se utilizaron como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células 0206K562, es decir las células K562 producidas para presentar endógenamente el antígeno WT1 peptídico por transfección del gen HLA-A*0206 en ellas, se utilizaron como células diana.

15 En las Fig. 15a a 15c, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆P2L, el péptido WT1₁₂₆P3M o el péptido WT1₁₂₆P9V presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células 0206K562 que contra las células K562, encada caso. Como está claro por los resultados, los CTL inducidos por estimulación con cualquiera de estos péptidos modificados están restringidos por el HLA-A*0206, y presentan la actividad citotóxica reconociendo el péptido WT1₁₂₆ de tipo silvestre presentado endógenamente.

Ejemplo 11 (comparación de los CTL restringidos al HLA-A*0201 inducidos por distintos péptidos WT1₁₈₇ modificados)

(1) Propósito

10

20

25

30

35

45

50

55

60

65

En vista de los resultados del Ejemplo 8, se seleccionaron el péptido WT1₁₈₇P1F (SEQ ID NO: 11), el péptido WT1₁₈₇P2M (SEQ ID NO: 16) y el péptido WT1₁₈₇P3M (SEQ ID NO: 20) como péptidos WT1₁₈₇ modificados a ensayar, y se llevaron a cabo los siguientes experimentos para explorar los péptidos WT1₁₈₇ modificados capaces de inducir CTL que tengan una alta actividad de citotoxicidad.

(2) Materiales y métodos

Se aislaron las PBMC de un donante humano sano que presentaba expresión de moléculas del HLA-A*0201 (donante de sangre sano positivo al HLA-A*0201), y se separaron las células positivas al CD14 de las PBMC utilizando partículas magnéticas DM anti-CD14 humano. Se preparó un medio de cultivo añadiendo 800 Ul/ml de GM-CSF y 1000 Ul/ml de IL-4 a un medio X-VIVO 15 suplementado con un 1 % v/v de suero AB humano, y se cultivaron las células positivas al CD14 en el medio de cultivo durante 1 día.

Al cultivo anterior, se añadió un coctel de maduración de citocinas que contenía 10 ng/ml de TNFα, 10 ng/ml de IL-β, 1000 Ul/ml de IL-6 y 1 μg/ml de PGE2. Después de un día adicional de cultivo, se obtuvieron las CD autólogas maduras.

Las CD autólogas maduras se pulsaron con 10 μg/ml de un péptido WT1₁₈₇ modificado obtenido en el Ejemplo 13 (el péptido WT1₁₈₇P1F, el péptido WT1₁₈₇P2M o el péptido WT1₁₈₇P3M), se cultivaron durante 4 horas, y se irradiaron con 35 Gy de radiación. Las células obtenidas de esta manera se utilizaron como células estimuladoras para la inducción de los CTL.

Las PBMC (2 x 10⁶ células/pocillo) servían como células respondedoras y las CD mencionadas anteriormente (2 x 10⁵ células/pocillo) se co-cultivaron en una placa de 24 pocillos. Una semana más tarde, se dio una re-estimulación por adición de células T2 que se habían pulsado con el péptido e irradiado con 75 Gy de radiación. Tres días después de la re-estimulación se añadieron 20 Ul/ml de IL-2. Se repitió la misma re-estimulación otras 3 veces por adición de las células T2 pulsadas con el péptido e irradiadas, y después se enriquecieron las células positivas a CD8 en las células respondedoras. Las células T positivas a CD8 se examinaron en cuanto a la actividad citotóxica contra las células diana, es decir, aquí las células JY.

(3) Resultados

La Fig. 16 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante positivo al HLA-A*0201 con el péptido WT1₁₈₇P1F (Fig. 16a) o el péptido WT1₁₈₇P2M (Fig. 16b). En las Fig. 16a y 16b, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de célula T positivas a CD8 obtenidas por estimulación peptídica (efector: E) con respecto a las células diana (diana: T) (relación E:T). El rombo cerrado representa el grupo en el que las células JY se utilizaron como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que se pulsaron las células JY con el péptido WT1₁₈₇ modificado (péptido WT1₁₈₇P1F) que se utilizó para la estimulación mencionada anteriormente se utilizaron como células diana. Las células JY son positivas al HLA-A*0201 y negativas al WT1.

Los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₈₇P1F presentaban una actividad citotóxica igual contra las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₈₇P1F, y la actividad era más fuerte que contra las células JY no pulsadas con un péptido (Fig. 16a). Los CTL inducidos por la estimulación con el péptido WT1₁₈₇P2M presentaban una actividad citotóxica igual contra las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₈₇ que contra las células JY pulsadas con el péptido WT1₁₈₇P2M, y la actividad era más fuerte que contra las células JY no pulsadas con un péptido (Fig. 16b). Como está claro por los resultados, los CTL inducidos por estimulación con el péptido modificado pueden reconocer tanto el péptido modificado como el péptido WT1₁₈₇ de tipo silvestre.

Ejemplo 12 (comparación de los CTL restringidos por HLA-A*0206 inducidos por distintos péptidos WT1₁₈₇ modificados)

(1) Propósito

20

25

30

35

40

45

50

55

- 15 En vista de los resultados del Ejemplo 7, se seleccionaron el péptido WT1₁₈₇P1F, el péptido WT1₁₈₇P2M y el péptido WT1₁₈₇P3M como péptidos WT1₁₈₇ modificados a ensayar, y se llevaron a cabo los siguientes experimentos para seleccionar los péptidos WT1₁₈₇ modificado capaces de inducir CTL que tienen una alta actividad citotóxica.
 - (2) Materiales y métodos

Se aislaron las PBMC de un donante humano sano que presentaba la expresión de moléculas del HLA-A*0206 (donante de sangre sano positivo al HLA-A*0206), y se separaron células positivas al CD14 de las PBMC utilizando partículas magnéticas DM anti-CD14 humano. Se preparó un medio de cultivo añadiendo 800 Ul/ml de GM-CSF y 1000 Ul/ml de IL-4 a un medio X-VIVO 15 suplementado con un 1 % v/v de suero AB humano, y se cultivaron las células positivas al CD14 en el medio de cultivo durante 1 día.

Al cultivo anterior, se añadió un coctel de maduración de citocinas que contenía 10 ng/ml de TNF α , 10 ng/ml de IL- β , 1000 UI/ml de IL- δ y 1 µg/ml de PGE2. Después de un día adicional de cultivo, se obtuvieron las CD autólogas maduras.

Las CD autólogas maduras se pulsaron con un péptido WT1₁₈₇ modificado obtenido en el Ejemplo 13 (el péptido WT1₁₈₇P1F, el péptido WT1₁₈₇P2M o el péptido WT1₁₈₇P3M), se cultivaron durante 4 horas, y se irradiaron con 35 Gy de radiación. Las células obtenidas de esta manera se utilizaron como células estimuladoras para la inducción de los CTL.

Las PBMC enriquecidas en células T positivas a CD8 (2 x 10⁶ células/pocillo) y las CD mencionadas anteriormente (1 x 10⁵ células/pocillo) se co-cultivaron en una placa de 24 pocillos. Diez días más tarde, se hizo la re-estimulación por adición de PBMC que se habían pulsado con el péptido e irradiado con 35 Gy de radiación. Dos días después de la re-estimulación, se añadieron 10 Ul/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-7. Después de que se repitiera la misma re-estimulación otras 4 veces, se enriquecieron las células T positivas al CD8. Las células T positivas al CD8 se examinaron en cuanto a la actividad citotóxica contra distintas células diana.

Las células diana que se utilizaron eran B-LCL establecidas por infección vírica con el EB a partir de la sangre de un donante positivo al HLA-A*0206, células K562 y células 0206K562.

(3) Resultados

La Fig. 17 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC de un donante positivo al HLA-A*0206 con el péptido WT1₁₈₇P1F. En la fig. 17, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el ejem horizontal representa la relación de células T positivas al CD8 obtenidas por estimulación peptídica (efector: E) con respecto a las células diana (diana: T) (relación E/T). En la Fig. 17a, el rombo cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células B-LCL como células diana, el cuadrado cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1₁₈₇ como células diana, y el triángulo cerrado representa el grupo en el que las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1₁₈₇P1F se utilizaron como células diana. En la Fig. 17b, el rombo cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células K562 como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que las células 0206K562, es decir, las células K562 producidas para presentar los antígenos WT1 peptídicos endógenamente por transfección del gen HLA-A*0206 en ellas, se utilizaron como células diana.

Los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₈₇P1F presentaba una actividad citotóxica igual contra las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1₁₈₇P1F, y la actividad era más fuerte que contra las células B-LCL no pulsadas con un péptido (Fig. 17a). Cuando las células K562 negativas a HLA-A*0206, positivas a WT1, y las células K562 producidas para que presenten péptidos antígenos WT1 peptídicos por transfección con el gen HLA-A*0206 en ellas (células 0206K562) se utilizaron como células diana, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₈₇P1F presentaba una actividad citotóxica más fuerte contra las células 0206K562 que contra las células K562 (Fig. 17b). Como está claro por los resultados, los CTL

inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₈₇P1F pueden reconocer tanto el péptido WT1₁₈₇P1F y el péptido WT1₁₈₇ de tipo silvestre. De manera similar, se descubrió que los CTL están restringidos por el HLA-A*0206, y presentan la actividad citotóxica reconociendo el péptido WT1₁₈₇ de tipo silvestre presentado endógenamente.

La Fig. 18 muestra los resultados de la medición de la actividad citotóxica de los CTL inducidos por estimulación de las PBMC del donante positivo al HLA-A*0206 con el péptido WT1₁₈₇P2M. En la Fig. 18, el eje vertical representa la actividad citotóxica, y el eje horizontal representa la relación de células T positivas a CD8 obtenidos por la estimulación peptídica (efector: E) con respecto a las células diana (diana: T) (relación E/T). En la Fig. 18a, el rombo cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células B-LCL como células diana, el cuadrado cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1₁₈₇P2M como células diana. En la Fig. 18b, el rombo cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células K562 como células diana, y el cuadrado cerrado representa el grupo en el que se utilizaron las células 0206K562, es decir, las células K562 producidas para presentar endógenamente los péptidos WT1 antigénicos por transfección del gen HLA-A*0206 en ellas, como células diana.

Los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₈₇P2M presentaban una actividad citotóxica igual contra las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1₁₈₇P2M, y la actividad era más fuerte que contra las células B-LCL no pulsadas con un péptido (Fig. 18a). Cuando las células K562 negativas a HLA-A*0206 positivas a WT1, y las células K562 producidas para presentar endógenamente los péptidos WT1 antigénicos por transfección del gen HLA-A*0206 en ellas (células 0206K562) se utilizaron como células diana, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₈₇P2M presentaban una actividad citotóxica más fuerte contra las células 0206K562 que contra las células K562 (Fig. 18b). Como está claro por los resultados, los TL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₈₇P2M pueden reconocer tanto el péptido WT1₁₈₇P2M como el péptido WT1₁₈₇ de tipo silvestre. De manera similar, se descubrió que los CTL están restringidos por el HLA-A*0206,

Como está claro por los resultados de los Ejemplos 9 a 12, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆ modificado, es decir, el péptido WT1₁₂₆P1F, el péptido WT1₁₂₆P2L, el péptido WT1₁₂₆P3M o el péptido WT1₁₂₆P9V, están restringidos por el HLA-A*0206, y presentan actividad citotóxica reconociendo el péptido WT1₁₂₆ de tipo silvestre presentado endógenamente. *Inter alia* el péptido WT1₁₂₆P9V, el péptido WT1₁₂₆P2L y el péptido WT1₁₂₆P3M eran altamente eficaces.

y presentan actividad citotóxica reconociendo el péptido WT1₁₈₇ de tipo silvestre presentado endógenamente.

Como está claro por los resultados anteriores, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₈₇ modificado, es decir el péptido WT1₁₈₇P1F, el péptido WT1₁₈₇P2M, o el péptido WT1₁₈₇P3M, están restringidos por el HLA-A*0206, y presentan la actividad citotóxica reconociendo el péptido WT1₁₈₇ de tipo silvestre presentado endógenamente. *Inter alia*, el péptido WT1₁₈₇P2M y el péptido WT1₁₈₇P1F eran altamente eficaces.

Por lo tanto, se demostró que estos péptidos modificados son eficaces en el tratamiento y prevención de cánceres acompañados por el aumento de la expresión del gen WT1 en personas positivas al HLA-A*0206.

Como está claro por los resultados anteriores, los CTL inducidos por estimulación con el péptido WT1₁₂₆ modificado, es decir, el péptido WT1₁₂₆P1F, el péptido WT1₁₂₆P2L, el péptido WT1₁₂₆P3M o el péptido WT1₁₂₆P9V, están restringidos por el HLA-A*0201, y presentan actividad citotóxica reconociendo el péptido WT1₁₂₆ de tipo silvestre presentado endógenamente. *Inter alia*, el péptido WT1₁₂₆P1F y el péptido WT1₁₂₆P2L eran altamente eficaces.

Como está claro por los resultados anteriores, los CTL inducidos por la estimulación con el péptido WT1₁₈₇Pomodificado, es decir, el péptido WT1₁₈₇P1F, el péptido WT1₁₈₇P2M, o el péptido WT1₁₈₇P3M, están restringidos por el HLA-A*0201, y presentan actividad citotóxica reconociendo el péptido WT1₁₈₇ de tipo silvestre presentado endógenamente. *Inter alia*, el péptido WT1₁₈₇P2M y el péptido WT1₁₈₇P1F eran altamente eficaces. Por lo tanto, se demostró que estos péptidos modificados son eficaces en el tratamiento y prevención de cánceres acompañados por el aumento de expresión del gen WT1 en personas positivas al HLA-A*0201.

Ejemplo 13

15

20

25

30

35

40

45

- 55 Síntesis del péptido WT1₁₈₇P2V (SVGEQQYSV; SEQ ID NO: 13; H-Ser-Val-Gly-Glu-Gln-Gln-Tyr-Ser-Val-OH)
 - 1. Síntesis de la resina de péptido protegida (resina H-Ser(tBu)-Val-Gly-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Se r(tBu)-Val-Alko)
- Se colocaron 0,4 g de una resina Fmoc-Val-Alko (Alko es alcohol p-alcoxibencílico) (fabricado por WATANABE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD; 0,80 mmol/g) en el recipiente de reacción del sintetizador en fase sólida ACT496 fabricado por Advanced ChemTech, lavado con DMF (N,N'-dimetilformamida) (Etapa 1), tratado con un 25 % de solución de piperidina en DMF (5 minutos x 1 vez, y 30 minutos x 1 vez) para retirar el grupo Fmoc (Etapa 2), y se lavó de nuevo con DMF (Etapa 3) para dar lugar a una resina H-Val-Alko. A este recipiente de reacción se añadieron 0,7 ml de NMP (N-metilpirrolidona) y una solución de 121 mg (0,96 mmol) de DIPCI (N,N'-diisopropilcarbodiimida) en 0,9 ml de NMP, y después una solución de 368 mg (0,96 mmol) de Fmoc-Ser(tBu)-OH y 147 mg (0,96 mmol) de

HOBT (1-hidroxibenzotriazol) monohidrato en 1,8 ml de NMP. Se llevó a cabo la reacción de acoplamiento a temperatura ambiente durante 60 minutos (Etapa 4). Se llevó a cabo una reacción de acoplamiento adicional utilizando las mismas cantidades de Fmoc-Ser(tBu)-OH, HOBT monohidrato y DIPCI que anteriormente (Etapa 5). La resina resultante se lavó con DMF (Etapa 6), se desprotegió (Etapa 7) y se lavó de nuevo (Etapa 8) para dar una resina H-Ser(tBu)-Val-Alko. Después se llevaron a cabo sucesivamente los a acoplamientos repitiendo las Etapas 4 a 8 utilizando Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Val-OH y Fmoc-Ser(tBu)-OH. La resina peptídica resultante se recolectó del recipiente de reacción, se lavó con éter y luego se secó al vacío para dar 980 mg de una resina H-Ser(tBu)-Val-Gly-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Ser (tBu)-Val-Alko. El resumen del procedimiento de síntesis mencionado anteriormente se muestra en la Tabla 6.

<Procedimiento de síntesis>

Tabla 6

| Etapa | Reactivo | Repetición (tiempo) | Duración (min) |
|------------------|---|---------------------|----------------|
| 1) lavado | DMF 3 ml | 5 | 0,3 |
| 2) desprotección | rotección 25 % piperidina DMF 3 ml | | 5 30 |
| 3) lavado | DMF 3 ml | 5 | 0,3 |
| 4) acoplamiento | Cada Fmoc-aminoácidos (3 Eq), HOBT(3 Eq), DIPCI(3 Eq) /NMP 3,4 ml | 1 | 60 |
| 5) acoplamiento | Cada Fmoc-aminoácidos (3 Eq), HOBT(3 Eq), DIPCI(3 Eq) /NMP 3,4 ml | 1 | 60 |
| 6) lavado | DMF 3 ml | 5 | 0,3 |
| 7) desprotección | 25 % piperidina/DMF 3 ml | 1 | 5 30 |
| 8) lavado | DMF 3 ml | 5 | 0,3 |

2. Desprotección de la resina peptídica protegida

A 980 mg de resina (H-Ser(tBu)-Val-Gly-Glu(OtBu)-Gln(Trt)-Gln(Trt)-Tyr(tBu)-Se r(tBu)-Val-Alko se añadieron 5 ml de una solución mixta de ácido trifluoroacético/agua/triisopropilsilano (95/2,5/2,5 (relación de volumen)). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 horas. La resina se filtró y el filtrado resultante se añadió a éter dietílico enfriado en hielo. El precipitado resultante se recolectó con un filtro de cristal. El residuo se lavó con éter dietílico y se secó al vacío para dar 268 mg de péptido en bruto.

3. Purificación del péptido en bruto

25

15

20

10

Se disolvieron los 268 mg del péptido en bruto obtenido en una solución acuosa de ácido acético al 20 %, y se purificó por cromatografía líquida de fase inversa.

Bomba: : Shimadzu LC-8A

Columna: YMC-Pack Pro C18 AS12S11-2530WT 3 cmΦ x 25 cm

30 Eluyente 1: H2O/0,1 % TFA

Eluyente 2 (el segundo eluyente): CH₃CNf0,1 % TFA

Caudal: 10 ml/min Detección: UV220 nm

Después de equilibrarla con el segundo eluyente a una concentración del 1 %, la columna se cargó con la solución del péptido en bruto. Después de esto, se permitió que la concentración del segundo eluyente aumentara al 8 % durante 30 minutos y posteriormente al 14 % durante 120 minutos. Las fracciones que contenían el compuesto objetivo se recolectaron, se evaporó el acetonitrilo al vacío y entonces se secó el residuo por congelación. Así, se obtuvieron 105 mg del péptido objetivo WT1₁₈₇P2V (SVGEQQYSV; SEQ ID NO: 13; H-Ser-Val-Gly-Glu-Gln-Tyr-Ser-Val-OH).

Las condiciones utilizadas para la HPLC y la espectrometría de masas del péptido purificado son las siguientes: Análisis HPLC (Shimadzu LC-10Avp)

Columna: YMC-Pack Pro C18 AS-302 4,6 mmΦ x 150 mm

45 Eluyente 1: H₂O/0,1 % TFA Eluyente 2: CH₃CN/0,1 % TFA

ES 2 679 127 T3

Gradiente: Se permitió que la concentración de eluyente 2 aumentas del 10 % al 40 % durante 30 minutos.

Caudal: 1 ml/min Detección: UV 220 nm

Pureza: 97,4 %, tiempo de Retención: 11,22 minutos

5 Análisis de aminoácidos (Analizador de aminoácidos Hitachi L-8500) Hidrolisis: 1 % fenol/solución acuosa de ácido

clorhídrico 6 N, 110 °C, 24 horas

Método de análisis: Método de Ninhidrina

paréntesis es un valor teórico.

Espectrometría de masas (espectrómetro de masas API 150EX de Applied Biosystems)

 $m/z = 996.9 [M + 1]^{+}$ (valor teórico = 996.5)

15 Análisis de secuencia de aminoácidos (secuenciador proteico 491 de Applied Biosystems)

La secuencia de aminoácidos se comprobó secuencialmente para la Ser del extremo N a la Val del extremo C.

Los péptidos que se muestran en las Tabla 7 y 8 se sintetizaron de la misma manera que anteriormente.

20

10

Tabla 7

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Cantidad de péptido en bruto obtenido (mg) | Cantidad de péptido purificado obtenido (mg) | HPLC pureza (%) | HPLC tiempo de retención (min) | Espectrometría de masas (m/z) |
|------------------------|-----------------------------|-----------------|--|--|-----------------------|---|-------------------------------------|
| WT1 ₁₈₇ P2Q | SQGEQQYSV | 14 | 251 | 88 | 98,2 | 9,21 | 1026,0 |
| WT1 ₁₈₇ P2I | SIGEQQYSV | 15 | 244 | 91 | 97,6 | 12,98 | 1010,7 |
| WT1 ₁₈₇ P2M | SMGEQQYSV | 16 | 260 | 22 | 96,9 | 11,91 | 1029,1 |
| WT1 ₁₈₇ P3L | SLLEQQYSV | 17 | 238 | 176 | 96,8 | 18,24 | 1066,9 |
| WT1 ₁₈₇ P3A | SLAEQQYSV | 18 | 268 | 172 | 99,1 | 13,67 | 1024,8 |
| WT1 ₁₈₇ P3V | SLVEQQYSV | 19 | 267 | 182 | 98,7 | 15,26 | 1052,8 |
| WT1 ₁₈₇ P3M | SLMEQQYSV | 20 | 280 | 63 | 94,8 | 16,12 | 1084,8 |
| WT1 ₁₈₇ P3P | SLPEQQYSV | 21 | 227 | 132 | 98,1 | 14,02 | 1050,8 |
| WT1 ₁₈₇ P3W | SLWEQQYSV | 22 | 248 | 40 (de péptido en bruto 100 mg) | 99,4 | 20,00 | 1139,5 |
| WT1 ₁₈₇ P3F | SLFEQQYSV | 23 | 224 | 110 | 98,3 | 19,44 | 1100,8 |
| WT1 ₁₈₇ P3Y | SLYEQQYSV | 24 | 236 | 114 | 98,5 | 15,76 | 1116,7 |
| WT1 ₁₈₇ P3S | SLSEQQYSV | 25 | 261 | 130 | 99,1 | 13,33 | 1040,8 |
| WT1 ₁₈₇ P3I | SLIEQQYSV | 26 | 270 | 162 | 97,3 | 17,51 | 1066,9 |

Tabla 8

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Cantidad de péptido en bruto obtenido (mg) | Cantidad de péptido purificado obtenido (mg) | HPLC pureza (%) | HPLC tiempo de retención (min) | Espectrometría de masas (m/z) |
|---------------------------|-----------------------------|-----------------|---|--|-----------------------|---|-------------------------------------|
| WT1 ₁₂₆ P2V | RVFPNAPYL | 36 | 253 | 130 | 96,5 | 20,65 | 1077,1 |
| WT1 ₁₂₆ P2Q | RQFPNAPYL | 37 | 274 | 87 | 98,7 | 18,43 | 1106,1 |
| WT1 ₁₂₆ P2A | RAFPNAPYL | 38 | 240 | 63 | 99,0 | 19,03 | 1049,1 |
| WT1 ₁₂₆ P9A | RMFPNAPYA | 50 | 262 | 139 | 94,3 | 16,59 | 1066,8 |
| WT1 ₁₂₆ P9M | RMFPNAPYM | 52 | 295 | 167 | 95,7 | 19,75 | 1126,8 |

Los péptidos que se muestran en las Tablas 9 a 12 se sintetizaron de manera similar, pero las condiciones utilizadas para el análisis HPLC y espectrometría de masas son las siguientes.

5 Análisis HPLC (Agilent HP1100 o Thermo Fisher Scientific Surveyor)

Columna: Thermo Fischer Scientific BioBasic-18 3 mmΦ x 250 mm

Eluyente 1: H₂O/0,1 % TFA Eluyente 2: CH₃CN/0,1 % TFA

10 Gradiente: Se permitió que la concentración del eluyente 2 cambiara a la concentración mostrada en la tabla durante

20 minutos. Caudal: 0,4 ml/min

Detección: 215 nm Espectrometría de masas

15 Espectrómetro de masas Thermo Bioanalysis Dynamo (MALDI-TOF)

Tabla 9

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | HPLC (%) | Pureza de HPLC tiempo de retención (mm) | HPLC gradiente | Espectrometría de masas (m/z) |
|------------------------|--------------------------|--------------|-------------|---|-------------------|-------------------------------|
| WT1 ₁₈₇ P1G | GLGEQQYSV | 4 | 100 | 12,72 | 5-60 % | 980,7 |
| WT1 ₁₈₇ P1A | ALGEQQYSV | 5 | 98,9 | 12,00 | 10-50 % | 993,0 |
| WT1 ₁₈₇ P1V | VLGEQQYSV | 6 | 98,9 | 14,98 | 5-50 % | 1022,3 |
| WT1 ₁₈₇ P1L | LLGEQQYSV | 7 | 97,6 | 12,75 | 10-65 % | 1037,6 |
| WT1 ₁₈₇ P1I | ILGEQQYSV | 8 | 98,8 | 13,46 | 5-60 % | 1037,2 |
| WT1 ₁₈₇ P1M | MLGEQQYSV | 9 | 95,5 | 14,15 | 5-60 % | 1054,0 |
| WT1 ₁₈₇ P1W | WLGEQQYSV | 10 | 98,9 | 15,60 | 5-60 % | 1109,9 |
| WT1 ₁₈₇ P1F | FLGEQQYSV | 11 | 95,8 | 13,14 | 10-65 % | 1070,8 |
| WTI ₁₈₇ P9L | SLGEQQYSL | 53 | 95,4 | 12,49 | 10-55 % | 1024,6 |

20 Tabla 10

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | HPLC (%) | Pureza de HPLC tiempo de retención (mm) | HPLC gradiente | Espectrometría de masas (m/z) |
|------------------------|--------------------------|--------------|-------------|---|-------------------|-------------------------------|
| WT1 ₁₂₆ P1G | GMFPNAPYL | 27 | 99,6 | 15,39 | 10-70 % | 1009,5 |
| WT1 ₁₂₆ P1A | AMFPNAPYL | 28 | 98,8 | 13,79 | 10-85 % | 1023,3 |
| WT1 ₁₂₆ P1V | VMFPNAPYL | 29 | 98,4 | 14,00 | 10-85 % | 1052,2 |
| WT1 ₁₂₆ P1L | LMFPNAPYL | 30 | 98,9 | 14,91 | 10-80 % | 1066,3 |
| WT1 ₁₂₆ P1I | IMFPNAPYL | 31 | 99,2 | 13,93 | 10-80 % | 1065,4 |
| WT1 ₁₂₅ P1M | MMFPNAPYL | 32 | 100 | 13,77 | 10-80 % | 1083,5 |
| WT1 ₁₂₆ P1W | WMFPNAPYL | 33 | 97,5 | 15,64 | 10-80 % | 1139,3 |
| WT1 ₁₂₆ P1F | FMFPNAPYL | 34 | 98,8 | 14,78 | 10-85 % | 1099,7 |
| WT1 ₁₂₆ P2L | RLFPNAPYL | 39 | 98,6 | 13,11 | 10-80 % | 1090,9 |
| WT1 ₁₂₆ P2I | RIFPNAPYL | 40 | 100 | 13,74 | 10-70 % | 1090,1 |
| WT1 ₁₂₆ P3I | RMIPNAPYL | 41 | 97,4 | 14,17 | 10-70 % | 1076,7 |
| WT1 ₁₂₆ P3L | RMLPNAPYL | 42 | 100 | 13,88 | 10-65 % | 1076,4 |
| WT1 ₁₂₆ P3G | RMGPNAPYL | 43 | 96,7 | 12,63 | 10-65 % | 1020,9 |
| WT1 ₁₂₆ P3A | RMAPNAPYL | 44 | 95,2 | 13,95 | 10-60 % | 1034,9 |
| WT1 ₁₄₆ P3V | RMVPNAPYL | 45 | 92,9 | 14,67 | 10-60 % | 1062,7 |
| WT1 ₁₂₆ P3M | RMMPNAPYL | 46 | 91,8 | 14,87 | 10-60 % | 1094,8 |
| WT1 ₁₂₆ P3P | RMPPNAPYL | 47 | 95,8 | 13,56 | 10-65 % | 1058,8 |
| WT1 ₁₂₆ P3W | RMWPNAPYL | 48 | 99,6 | 15,21 | 10-70 % | 1149,7 |
| WT1 ₁₂₆ P9V | RMFPNAPYV | 49 | 99,2 | 13,86 | 10-60 % | 1096,5 |
| WT1 ₁₂₆ P9I | RMFPNAPYI | 51 | 99,4 | 14,00 | 10-65 % | 1110,7 |

Tabla 11

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | HPLC (%) | Pureza de HPLC tiempo de retención (mm) | HPLC gradiente | Espectrometría de masas (m/z) |
|------------------------|--------------------------|--------------|----------|---|-------------------|-------------------------------|
| WT1 ₁₈₇ P1D | DLGEQQYSV | 54 | 96,6 | 13,43 | 5-60 % | 1038,2 |

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | HPLC (%) | Pureza de HPLC tiempo de retención (mm) | HPLC gradiente | Espectrometría de masas (m/z) |
|------------------------|--------------------------|--------------|----------|---|-------------------|----------------------------------|
| WT1 ₁₈₇ P1E | ELGEQQYSV | 55 | 96,4 | 11,83 | 10-60 % | 1052,2 |
| WT1 ₁₈₇ P1H | HLGEQQYSV | 56 | 98,0 | 15,79 | 5-40 % | 1060,2 |
| WT1 ₁₈₇ P1K | KLGEQQYSV | 57 | 99,0 | 13,77 | 5-45 % | 1052,2 |
| WT1 ₁₈₇ P1N | NLGEQQYSV | 58 | 95,8 | 14,34 | 5-50 % | 1037,0 |
| WT1 ₁₈₇ P1P | PLGEQQYSV | 59 | 95,9 | 14,68 | 5-50 % | 1020,0 |
| WT1 ₁₈₇ P1Q | QLGEQQYSV | 60 | 96,8 | 13,28 | 5-60 % | 1051,3 |
| WT1 ₁₈₇ P1R | RLGEQQYSV | 61 | 100 | 13,27 | 5-60 % | 1079,6 |
| WT1 ₁₈₇ P1T | TLGEQQYSV | 62 | 96,7 | 14,40 | 5-50 % | 1025,0 |

Tabla 12

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | HPLC (%) | Pureza de HPLC tiempo de retención (mm) | HPLC gradiente | Espectrometría de masas (m/z) |
|----------------------------|--------------------------|--------------|-------------|---|-------------------|-------------------------------|
| WT1 ₁₂₆ P1D | DMFPNAPYL | 63 | 99,2 | 14,72 | 10-75 % | 1067,3 |
| WT1 ₁₂₆ P1E | EMFPNAPYL | 64 | 99,1 | 15,20 | 5-70 % | 1082,1 |
| WT1 ₁₂₆ P1H | HMFPNAPYL | 65 | 96,7 | 14,52 | 10-70 % | 1089,9 |
| WT1 ₁₂₆ P1K | KMFPNAPYL | 66 | 95,9 | 13,96 | 10-75 % | 1080,0 |
| WT1 ₁₂₆ P1N | NMFPNAPYL | 67 | 99,8 | 14,69 | 10-75 % | 1066,3 |
| WT1 ₁₂₆ P1P | PMFPNAPYL | 68 | 96,9 | 14,26 | 10-80 % | 1049,3 |
| WT1 ₁₂₆ P1Q | QMFPNAPYL | 69 | 95,1 | 14,94 | 10-70 % | 1080,3 |
| WT1 ₁₂₆ P1S | SMFPNAPYL | 70 | 99,8 | 14,28 | 10-80 % | 1040,8 |
| WT1 ₁₂₆ P1T | TMFPNAPYL | 71 | 98,8 | 13,72 | 10-85 % | 1053,5 |
| WT1 ₁₂₆ P2I&P9I | RIFPNAPYI | 72 | 97,0 | 14,23 | 10-65 % | 1089,5 |
| WT1 ₁₂₆ P2I&P9V | RIFPNAPYV | 73 | 100 | 12,23 | 10-80 % | 1077,0 |
| WT1 ₁₂₆ P2L&P9I | RLFPNAPYI | 74 | 97,7 | 13,43 | 10-75 % | 1090,8 |
| WT1 ₁₂₆ P2L&P9V | RLFPNAPYV | 75 | 97,0 | 12,83 | 10-75 % | 1076,9 |

5 Ejemplo 14

(Evaluación de los péptidos modificados respecto a la actividad de inducción de células inmunitarias específicas utilizando ratones transgénicos que expresan HLA-A*0201, y confirmación de la reacción cruzada de células inmunitarias específicas inducidas con el péptido de tipo silvestre)

<Métodos>

(1) Péptidos modificados candidatos

Como para el péptido WT1₁₈₇, el péptido WT1₁₂₆, y los péptidos modificados de los mismos (péptidos que comprende una sustitución de uno o dos restos de aminoácidos en la posición 1, 2, 3 y/o 9 desde el extremo N del péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆), se analizó la afinidad contra las moléculas de HLA-A*0201 utilizando el método conocido en el campo de la técnica, es decir, el método mediado por las siguientes cuatro bases de datos de computadora: BIMAS (http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/binding.html), SYFPEITHI (http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/binding.html), RANLPEP (http://immunax.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html), y NetMHC3.0 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/). Los resultados de los análisis del péptido WT1₁₈₇ y sus péptidos modificados se muestran en las Tablas 13 a 16 y 21. Los resultados de los análisis del péptido WT1₁₂₆ y sus péptidos modificados se muestran en las Tablas 17 a 20 y 22 a 23. La afinidad prevista se muestra en las valoraciones.

25

Tabla 13

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | |
|--------------------------|--------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|--|
| | | | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | |
| WT1 ₁₈₇ | SLGEQQYSV | 2 | 285 | 27 | 96/64,43 % | 0,721 | |
| WT1 ₁₈₇ P1A | ALGEQQYSV | 5 | 285 | 27 | 95/63,76 % | 0,720 | |
| -WT11 ₁₈₇ P1F | FLGEQQYSV | 11 | 1312 | 26 | 82/55,03 % | 0,862 | |
| WT1 ₁₈₇ P1G | GLGEQQYSV | 4 | 285 | 26 | 86/57,72 % | 0,672 | |
| WT11 ₁₈₇ P1I | ILGEQQYSV | 8 | 485 | 27 | 90/60,40 % | 0,698 | |
| WT1 ₁₈₇ P1L | LLGEQQYSV | 7 | 485 | 27 | 89/59,73 % | 0,719 | |

ES 2 679 127 T3

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | |
|------------------------|-----------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|--|
| | | | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | |
| WT1 ₁₈₇ P1M | MLGEQQYSV | 9 | 485 | 25 | 92/61,74 % | 0,770 | |
| WT1 ₁₈₇ P1V | VLGEQQYSV | 6 | 485 | 26 | 92/61,74 % | 0,705 | |
| WT1 ₁₈₇ P1W | WLGEQQYSV | 10 | 1312 | 25 | 71/47,65 % | 0,693 | |

Tabla 14

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | | |
|------------------------|--------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|--|--|
| | | | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | | |
| WT1 ₁₈₇ | SLGEQQYSV | 2 | 285 | 27 | 96/64,43 % | 0,721 | | |
| WT1 ₁₈₇ P2I | SIGEQQYSV | 15 | 39 | 25 | 85/57,05 % | 0,556 | | |
| WT1 ₁₈₇ P2M | SMGEQQYSV | 16 | 206 | 25 | 84/56,38 % | 0,740 | | |
| WT1 ₁₈₇ P2Q | SQGEQQYSV | 14 | 29 | 17 | 52/34,90 % | 0,455 | | |
| WT1 ₁₈₇ P2V | SVGEQQYSV | 13 | 25 | 21 | 78/52,35 % | 0,461 | | |

5 Tabla 15

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | |
|------------------------|-----------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|-------------|-----------|--|
| | | | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | |
| WT1 ₁₈₇ | SLGEQQYSV | 2 | 285 | 27 | 96/64,43 % | 0,721 | |
| WT1 ₁₈₇ P3A | SLAEQQYSV | 18 | 285 | 29 | 110/73,83 % | 0,811 | |
| WT1 ₁₈₇ P3F | SLFEQQYSV | 23 | 1055 | 28 | 114/76,51 % | 0,852 | |
| WT1 ₁₈₇ P3I | SLIEQQYSV | 26 | 285 | 29 | 115/77,18 % | 0,817 | |
| WT1 ₁₈₇ P3L | SLLEQQYSV | 17 | 1055 | 29 | 116/77,85 % | 0,839 | |
| WT1 ₁₈₇ P3M | SLMEQQYSV | 20 | 1055 | 28 | 114/76,51 % | 0,876 | |
| WT1 ₁₈₇ P3P | SLPEQQYSV | 21 | 285 | 27 | 95/63,76 % | 0,748 | |
| WT1 ₁₈₇ P3S | SLSEQQYSV | 25 | 285 | 27 | 110/73,83 % | 0,793 | |
| WT1 ₁₈₇ P3V | SLVEQQYSV | 19 | 285 | 27 | 113/75,84 % | 0,766 | |
| WT1 ₁₈₇ P3W | SLWEQQYSV | 22 | 2367 | 28 | 98/65,77 % | 0,863 | |
| WT1 ₁₈₇ P3Y | SLYEQQYSV | 24 | 913 | 28 | 111/74,50 % | 0,854 | |

Tabla 16

| Péptido | Secuencia de | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | |
|------------------------|--------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|
| Pepildo | aminoácidos | | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 |
| WT1 ₁₈₇ | SLGEQQYSV | 2 | 285 | 27 | 96/64,43 % | 0,721 |
| WT1 ₁₈₇ P9L | SLGEQQYSL | 53 | 88 | 27 | 89/59,73 % | 0,640 |

Tabla 17

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | |
|------------------------|--------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|--|
| | | | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | |
| WT1 ₁₂₆ | RMFPNAPYL | 3 | 314 | 22 | 70/46,98 % | 0,802 | |
| WT1 ₁₂₆ P1A | AMFPNAPYL | 28 | 314 | 24 | 77/51,68 % | 0,808 | |
| WT1 ₁₂₆ P1F | FMFPNAPYL | 34 | 1444 | 23 | 64/42,95 % | 0,909 | |
| WT1 ₁₂₆ P1G | GMFPNAPYL | 27 | 314 | 23 | 68/45,64 % | 0,795 | |
| WT1 ₁₂₆ P1I | IMFPNAPYL | 31 | 534 | 24 | 72/48,32 % | 0,802 | |
| WT1 ₁₂₆ P1L | LMFPNAPYL | 30 | 534 | 24 | 71/47,65 % | 0,819 | |
| WT1 ₁₂₆ P1M | MMFPNAPYL | 32 | 534 | 22 | 74/49,66 % | 0,852 | |
| WT1 ₁₂₆ P1V | VMFPNAPYL | 29 | 534 | 23 | 74/49,66 % | 0,804 | |
| WT1 ₁₂₆ P1W | WMFPNAPYL | 33 | 1444 | 22 | 53/35,57 % | 0,799 | |

Tabla 18

15

| Péptido | Secuencia de | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | |
|--------------------|--------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|
| amino | aminoácidos | SEQ ID NO | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 |
| WT1 ₁₂₆ | RMFPNAPYL | 3 | 314 | 22 | 70/46,98 % | 0,802 |

| WT1 ₁₂₆ P2A | RAFPNAPYL | 38 | 6 | 18 | 47/31,54 % | 0,376 |
|-------------------------|-----------|----|-----|----|------------|-------|
| WT1 ₁₂₆ P2I | RIFPNAPYL | 40 | 60 | 22 | 71/47,65 % | 0,640 |
| WT1 ₁₂₆ P2L | RLFPNAPYL | 39 | 435 | 24 | 82/55,03 % | 0,784 |
| WT11 ₁₂₆ P2Q | RQFPNAPYL | 37 | 44 | 14 | 38/25,50 % | 0,485 |
| WT1 ₁₂₆ P2V | RVFPNAPYL | 36 | 38 | 18 | 64/42,95 % | 0,552 |

Tabla 19

| Péptido | Secuencia de | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | | | |
|------------------------|--------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|--|--|--|
| Peptido | aminoácidos | SEQ ID NO | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | | | |
| WT1 ₁₂₆ | RMFPNAPYL | 3 | 314 | 22 | 70/46,98 % | 0,802 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P3A | RMAPNAPYL | 44 | 85 | 23 | 66/44,30 % | 0,734 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P3G | RMGPNAPYL | 43 | 85 | 21 | 52/34,90 % | 0,602 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P3I | RMIPNAPYL | 41 | 85 | 23 | 71/47,65 % | 0,741 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P3L | RMLPNAPYL | 42 | 314 | 23 | 72/48,32 % | 0,781 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P3M | RMMPNAPYL | 46 | 314 | 22 | 70/46,98 % | 0,834 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P3P | RMPPNAPYL | 47 | 85 | 21 | 51/34,23 % | 0,613 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P3V | RMVPNAPYL | 45 | 85 | 21 | 69/46,31 % | 0,680 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P3W | RMWPNAPYL | 48 | 2293 | 22 | 61/40,94 % | 0,867 | | | |

5 Tabla 20

| Dántido | Secuencia de | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | | | |
|------------------------|--------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|--|--|--|
| Péptido | aminoácidos | SEQ ID NO | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | | | |
| WT1 ₁₂₆ | RMFPNAPYL | 3 | 314 | 22 | 70/46,98 % | 0,802 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P9A | RMFPNAPYA | 50 | 73 | 16 | 53/35,57 % | 0,731 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P9I | RMFPNAPYI | 51 | 153 | 20 | 74/49,66 % | 0,790 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P9M | RMFPNAPYM | 52 | 73 | 16 | 65/43,62 % | 0,686 | | | |
| WT1 ₁₂₆ P9V | RMFPNAPYV | 49 | 1022 | 22 | 77/51,68 % | 0,838 | | | |

Tabla 21

| Péptido | Secuencia de | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | | | |
|------------------------|--------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|--|--|--|
| Pepildo | aminoácidos | SEQ ID NO | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | | | |
| WT1 ₁₈₇ | SLGEQQYSV | 2 | 285 | 27 | 96/64,43 % | 0,721 | | | |
| WT1 ₁₈₇ P1D | DLGEQQYSV | 54 | 21 | 24 | 81/54,36 % | 0,252 | | | |
| WT1 ₁₈₇ P1E | ELGEQQYSV | 55 | 21 | 22 | 85/57,05 % | 0,366 | | | |
| WT1 ₁₈₇ P1H | HLGEQQYSV | 56 | 10 | 25 | 83/55,70 % | 0,610 | | | |
| WT1 ₁₈₇ P1K | KLGEQQYSV | 57 | 998 | 26 | 89/59,73 % | 0,745 | | | |
| WT1 ₁₈₇ P1N | NLGEQQYSV | 58 | 285 | 25 | 90/60,40 % | 0,613 | | | |
| WT1 ₁₈₇ P1P | PLGEQQYSV | 59 | 6 | 22 | 78/52,35 % | 0,287 | | | |
| WT1 ₁₈₇ P1Q | QLGEQQYSV | 60 | 285 | 25 | 87/58,39 % | 0,630 | | | |
| WT1 ₁₈₇ P1R | RLGEQQYSV | 61 | 285 | 25 | 88/59,06 % | 0,690 | | | |
| WT1 ₁₈₇ P1T | TLGEQQYSV | 62 | 285 | 25 | 93/62,42 % | 0,669 | | | |

10

Tabla 22

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoració | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | | | |
|------------------------|--------------------------|-----------|-----------|----------------------------------|------------|-----------|--|--|--|--|
| | | | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ | RMFPNAPYL | 3 | 314 | 22 | 70/46,98 % | 0,802 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ P1D | DMFPNAPYL | 63 | 24 | 21 | 63/42,28 % | 0,353 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ P1E | EMFPNAPYL | 64 | 24 | 19 | 67/44,97 % | 0,501 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ P1H | HMFPNAPYL | 65 | 11 | 22 | 65/43,62 % | 0,747 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ P1K | KMFPNAPYL | 66 | 1099 | 23 | 71/47,65 % | 0,841 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ P1N | NMFPNAPYL | 67 | 314 | 22 | 72/48,32 % | 0,734 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ P1P | PMFPNAPYL | 68 | 7 | 19 | 60/40,27 % | 0,802 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ P1Q | QMFPNAPYL | 69 | 314 | 22 | 69/46,31 % | 0,757 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ P1S | SMFPNAPYL | 70 | 314 | 24 | 78/52,35 % | 0,819 | | | | |
| WT1 ₁₂₆ P1T | TMFPNAPYL | 71 | 314 | 22 | 75/50,34 % | 0,779 | | | | |

Tabla 23

5

10

15

20

25

30

35

40

| Péptido | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID NO | Valoración de unión a HLA-A*0201 | | | | | |
|----------------------------|--------------------------|-----------|----------------------------------|-----------|------------|-----------|--|--|
| | | | BIMAS | SYFPEITHI | RANKPEP | NetMHC3.0 | | |
| WT1 ₁₂₆ | RMFPNAPYL | 3 | 314 | 22 | 70/46,98 % | 0,802 | | |
| WT1 ₁₂₆ P2I&P9I | RIFPNAPYI | 72 | 29 | 20 | 75/50,34 % | 0,617 | | |
| WT1 ₁₂₆ P2I&P9V | RIFPNAPYV | 73 | 195 | 22 | 78/52,35 % | 0,722 | | |
| WT1 ₁₂₆ P2L&P9I | RLFPNAPYI | 74 | 212 | 22 | 86/57,72 % | 0,780 | | |
| WT1 ₁₂₆ P2L&P9V | RLFPNAPYV | 75 | 1415 | 24 | 89/59,73 % | 0,818 | | |

Se seleccionó un péptido modificado que se predijo que tenía una afinidad igual o mayor en comparación con el péptido tipo silvestre (el péptido WT1₁₈₇ o el péptido WT1₁₂₆) en al menos una de las bases de datos como muestra para ensayar en los siguientes (2) a (4), además de los péptidos de tipo silvestre.

(2) Preparación y administración de preparaciones peptídicas

Se preparó un péptido sintetizado y secado por congelación en el Ejemplo 13 a la concentración de 50 mg/ml en DMSO (fabricado por Nacalai Tesque, Inc.). Después de eso, se mezclaron 32,5 μl de la solución del péptido en DMSO con 540 μl de agua destilada para inyección (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.). A continuación, se mezclaron 550 μl de la mezcla con 700 μl de adyuvante incompleto de Freund (Montanide ISA-51) utilizando una jeringa de cristal para preparar una emulsión de agua en aceite. Se inmunizó un ratón transgénico que expresa HLA-A*0201 (nombre de estirpe: HLA-A2+HLA-DR1+/laβ° P2m, EMMA número de ID EM: 01783) por administración subcutánea de 300 μl de la preparación (emulsión de agua en aceite) en la base de la cola. La evaluación de cada péptido se llevó a cabo utilizando 2 o 3 ratones.

(3) Preparación de las células esplénicas

El bazo se aisló 7 días después de la inmunización. Se machacó el bazo frotando contra la parte esmerilada de un portaobjetos de cristal y entonces se sometió a un tratamiento de hemólisis con el Tampón de Lisis ACK (fabricado por Lonza Co.) para preparar las células esplénicas. En este experimento, se utilizó medio CTM (medio completo de células T : RPMI-1640 (fabricado por Invitrogen Corporation) suplementado con un 10 % de FBS, 10 mM de HEPES, 20 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 1 mM de MEM aminoácidos no esenciales, un 1 % de MEM vitaminas y 55 µM de 2-mercaptoetanol con la condición de que estas concentraciones eran concentraciones finales) como medio para las células esplénicas, y se preparó la suspensión celular a la concentración de 5 x 10⁶ células/ml.

(4) Método ELISPOT

Se examinó si el péptido administrado tenía la actividad de inducción de células inmunitarias específicas de WT1 por el método ELISPOT utilizando IFNγ como índice. El método se llevó a cabo de acuerdo con el manual adjunto. Después de añadir el CTM en un volumen de 50 μl/pocillo en placas para ELISPOT (fabricadas por BD Japan, N.º de catálogo 551083), se colocó en las placas la suspensión celular esplénica en un volumen de 100 μl (5 x 10⁵ células/pocillo). Adicionalmente, se añadió el péptido administrado o el péptido de tipo silvestre a la misma en un volumen de 50 μl/pocillo (concentración final de péptido: 2 μg/ml). Este método de ensayo se conoce como uno de los métodos sustitutos que hacen posible la predicción de la actividad citotóxica (J. Immunological Methods, 1995, 181, 45-54).

<Resultados>

10

40

45

Los resultados de la evaluación de la actividad de inducción de inmunidad específica basada en células se muestran en las Fig. 19 a 22 y 28 a 29 para los péptidos WT1₁₈₇ modificados, y en las Fig. 23 a 27 y 30 a 32 para los péptidos WT1₁₂₆ modificados. En cada una de las Fig. 19 a 32, el eje vertical representa el número de células de respuesta específicas del péptido antigénico en 5 x 10⁵ células esplénicas (manchas/5 x 10⁵ células), y el eje horizontal representa el ratón individual (2 o 3 ratones) utilizado en la evaluación. La barra blanca representa el número de células inmunitarias específicas que responden bajo no estimulación con péptidos antigénicos. La barra gris representa el número de células inmunitarias específicas que responden a la estimulación con el péptido de tipo silvestre. La barra negra representa el número de células inmunitarias específicas que responden a la estimulación con el péptido administrado (modificado).

- Las fig. 19 a 32 muestra las actividades respectivas de inducción de inmunidad específica mediada por células con respecto a los siguientes péptidos.
- La Fig. 19 a: péptido WT1₁₈₇P1A, b: péptido WT1₁₈₇P1F, c: péptido WT1₁₈₇P1G, d: péptido WT1₁₈₇P1I, e: péptido WT1₁₈₇P1L, f: péptido WT1₁₈₇P1M.
 - La Fig. 20 a: péptido WT1₁₈₇P1V, b: péptido WT1₁₈₇P1W, c: péptido WT1₁₈₇P2I, d: péptido WT1₁₈₇P2M, e: péptido WT1₁₈₇P2V.
- La Fig. 21 a: péptido WT1₁₈₇P3A, b: péptido WT₁₈₇P3F, c: péptido WT1₁₈₇P3I, d: péptido WT1₁₈₇P3L, e: péptido 20 WT1₁₈₇P3M, f: péptido WT1₁₈₇P3P.
 - La Fig. 22 a: péptido WT1₁₈₇P3S, b: péptido WT1₁₈₇P3V, c: péptido WT1₁₈₇P3W, d: péptido WT1₁₈₇P3Y, e: péptido WT1₁₈₇P9L.
 - La Fig. 23 a: péptido WT1₁₂₆P1A, b: péptido WT1₁₂₆P1F, c: péptido WT1₁₂₆P1G, d: péptido WT1₁₂₆P1I, e: péptido WT1₁₂₆P1L, f: péptido WT1₁₂₆P1M.
- La Fig. 24 a: péptido WT1₁₂₆P1V, b: péptido WT1₁₂₆P1W, c: péptido WT1₁₂₆P2A, d: péptido WT1₁₂₆P2I, e: péptido WT1₁₂₆P2L, f: péptido WT1₁₂₆P2Q.
 - La Fig. 25 a: péptido WT1₁₂₆P2V, b: péptido WT1₁₂₆P3A, c: péptido WT1₁₂₆P3G, d: péptido WT1₁₂₆P3I, e: péptido WT1₁₂₆P3L, f: péptido WT1₁₂₆P3M.
- La Fig. 26 a: péptido WT1₁₂₆P3P, b: péptido WT1₁₂₆P3V, c: péptido WT1₁₂₆P3W, d: péptido WT1₁₂₆P9A, e: péptido WT1₁₂₆P9I, f: péptido WT1₁₂₆P9M.
 - La Fig. 27: péptido WT1₁₂₆P9V.
 - La Fig. 28 a: péptido WT1137P1D, b: péptido WT1₁₈₇P1E, c: péptido WT1₁₈₇P1H, d: péptido WT1₁₈₇PIK.
 - La Fig. 29 a. péptido WT1₁₈₇P1N, b. péptido WT1₁₈₇P1P, c. péptido WT1₁₈₇P1Q, d. péptido WT1₁₈₇P1R, e. péptido WT1₁₈₇P1T.
- La Fig. 30 a: péptido WT1₁₂₆P1D, b: péptido WT1₁₂₆P1E, c: péptido WT1₁₂₆P1H, d: péptido WTI₁₂₆P1K, e: péptido WT1₁₂₆P1N. f: péptido WT1₁₂₆P1P.
 - La Fig. 31 a: péptido WT1₁₂₆P1Q, b: péptido WT1₁₂₆P1S, c: péptido WT1₁₂₆P1T, d: péptido WT1₁₂₆P2I&P9I, e: péptido WT1₁₂₆P2I&P9V, f: péptido WT1₁₂₆P2L&P9I. La Fig. 32: péptido WT1₁₂₆P2L&P9V.

Como se muestra en estos resultados, cuando se administraron los péptidos modificados excepto el péptido WT1₁₈₇P1D, el péptido WT1₁₈₇P1E, el péptido WT1₁₈₇P1H, el péptido WT1₁₈₇P1P y el péptido WT1₁₂₆P2Q; el péptido WT1₁₂₆P1D, el péptido WT1₁₂₆P2D, el péptido WT1₁₂₆P2Q en los ratones, se inducían notablemente células inmunitarias específicas de una manera eficaz.

A continuación, se analizaron las células inmunitarias específicas inducidas por estimulación con el péptido modificado en cuanto a la reactividad cruzada con el péptido de tipo silvestre (Tablas 24 a 25). Los resultados muestran que particularmente el péptido WT1₁₈₇P1A, el péptido WT1₁₈₇P1I, el péptido WT1₁₈₇P1L, el péptido WT1₁₈₇P1V, el péptido WT1₁₈₇P

WT1₁₈₇P2V, el péptido WT1₁₈₇P2M, el péptido WT1₁₈₇P2I, el péptido WT1₁₈₇P3A, el péptido WT1₁₈₇P3F, el péptido WT1₁₈₇P3S, el péptido WT1₁₈₇P3V y el péptido WT1₁₈₇P9L entre los péptidos WT1₁₈₇ modificados; y el péptido WT1₁₂₆P1S, el péptido WT1₁₂₆P2I, el péptido WT1₁₂₆P2L, el péptido WT1₁₂₆P2V, el péptido WT1₁₂₆P3W, el péptido WT1₁₂₆P9I, el péptido WT1₁₂₆P9M y el péptido WT1₁₂₆P9V entre los péptidos WT1₁₂₆ modificados, pueden inducir células inmunitarias específicas que pueden reconocer eficazmente tanto el péptido

55 modificado como el péptido de tipo silvestre.

Tabla 24

| Reactividad | Péptido WT1 ₁₈₇ modifi | icado | | |
|-------------|--|--|--|-----------------------------|
| cruzada (%) | Modificado en la posición 1 | Modificado en la posición 2 | Modificado en la posición 3 | Modificado en la posición 9 |
| 80-100 | WT1 ₁₈₇ P1A WT1 ₁₈₇ P1N WT1 ₁₈₇ P1Q WT1 ₁₈₇ P1T WT1 ₁₈₇ P1V | WT1 ₁₈₇ P2V WT1 ₁₈₇ P2M WT1 ₁₈₇ P2I | WT1 ₁₈₇ P3A WT1 ₁₈₇ P3P WT1 ₁₈₇ P3S | WT1 ₁₈₇ P9L |
| 60-80 | WT1 ₁₈₇ P1I WT1 ₁₈₇ P1L WT1 ₁₈₇ P1M | | WT1 ₁₈₇ P3F WT1 ₁₈₇ P3V | |
| 40-60 | WT1 ₁₈₇ P1R | | WT1 ₁₈₇ P3Y | |
| 20-40 | WT1 ₁₈₇ P1F WT1 ₁₈₇ P1W | | WT1 ₁₈₇ P3L | |
| 0-20 | WT1 ₁₈₇ P1G WT1 ₁₈₇ P1K | | WT1 ₁₈₇ P3I WT1 ₁₈₇ P3M WT1 ₁₈₇ P3W | |
| ND* | WT1 ₁₈₇ P1D WT1 ₁₈₇ P1E WT1 ₁₈₇ P1H WT1 ₁₈₇ P1P | WT1 ₁₈₇ P2Q | | |

Tabla 25

5

| Reactividad cruzada (%) | Péptido WT1 ₁₂₁ | Péptido WT1 ₁₂₁₆ modificado | | | | | | | | | |
|-------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| | Modificado en la posición 1 | Modificado en la posición 2 | Modificado en la posición 3 | Modificado en la posición 9 | Modificado en las posiciones 2 y 9 | | | | | | |
| 80-100 | | WT1 ₁₂₆ P2L WT1 ₁₂₆ P2V | WT1 ₁₂₆ P3W | WT1 ₁₂₆ P9M WT1 ₁₂₆ P9I | | | | | | | |
| 60-80 | WT1 ₁₂₆ P1S | WT1 ₁₂₆ P2I | | WT1 ₁₂₆ P9V | | | | | | | |
| 40-60 | WT1 ₁₂₆ P1A WT1 ₁₂₆ P1H WT1 ₁₂₆ P1K WT1 ₁₂₆ P1M WT1 ₁₂₆ P1N | | | | | | | | | | |
| 20-40 | WT1 ₁₂₆ P1G WT1 ₁₂₆ P1I WT1 ₁₂₆ P1Q WT1 ₁₂₆ P1W | | | WT1 ₁₂₆ P9A | | | | | | | |
| 0-20 | WT1 ₁₂₆ P1F WT1 ₁₂₆ P1L WT1 ₁₂₆ P1T WT1 ₁₂₆ P1V | | WT1 ₁₂₆ P3A WT1 ₁₂₆ P3G WT1 ₁₂₆ P3I WT1 ₁₂₆ P3L WT1 ₁₂₆ P3M WT1 ₁₂₆ P3P WT1 ₁₂₆ P3V | | WT1 ₁₂₆ P2I&P9I WT1 ₁₂₆ P2I&P9V WT1 ₁₂₆ P2L&P9I WT1 ₁₂₆ P2L&P9V | | | | | | |
| ND* | WT1 ₁₂₆ P1D WT1 ₁₂₆ P1E WT1 ₁₂₆ P1P | WT1 ₁₂₆ P2Q WT1 ₁₂₆ P2A | | | | | | | | | |
| ND*: no med | ible debido a que | no presenta activi | dad | - | | | | | | | |

Aplicabilidad industrial

La composición vacunal contra el cáncer de la presente invención es útil como medicamento utilizado para el tratamiento y prevención de cánceres que expresan WT1 en personas positivas al HLA-A*0206. La composición vacunal contra el cáncer de la presente invención también es útil como un medicamento utilizado para el tratamiento y prevención de cánceres que expresan WT1 en personas positivas al HLA-A*0201.

LISTADO DE SECUENCIAS

145

<110> International Institute of Cancer Immunology, Inc. <120> Composición vacunal contra el cáncer para positivos al HLA-A*0206 5 <130> G06F2975 <150> JP2007-314552 <151> 05-12-2007 10 <160>75 <170> PatentIn versión 3.1 <210> 1 <211> 449 15 <212> PRT <213> Humana <400> 1 20 Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala 2.0 25 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr 40 Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro 55 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly 65 75 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe 85 90 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

155

160

150

| Gly | His | Thr | Pro | Ser 165 | His | His | Ala | Ala | Gln 170 | Phe | Pro | Asn | His | Ser 175 | Phe |
|------------|------------|--------------------|------------|---------------------|------------|-------------------|--------------------|------------|--------------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|
| Lys | His | Glu | Asp 180 | Pro | Met | Gly | Gln | Gln 185 | Gly | Ser | Leu | Gly | Glu 190 | Gln | Gln |
| Tyr | Ser | Val 195 | Pro | Pro | Pro | Val | Tyr 200 | Gly | Cys | His | Thr | Pro 205 | Thr | Asp | Ser |
| Cys | Thr 210 | Gly | Ser | Gln | Ala | Leu 215 | Leu | Leu | Arg | Thr | Pro 220 | Tyr | Ser | Ser | Asp |
| Asn 225 | Leu | Туг | Gln | Met | Thr 230 | Ser | Gln | Leu | Glu | Cys 235 | Met | Thr | Trp | Asn | Gln 240 |
| Met | Asn | Leu | Gly | Ala 2 4 5 | Thr | Leu | Lys | Gly | Val 250 | Ala | Ala | Gly | Ser | Ser 255 | Ser |
| Ser | Val | Lys | Trp 260 | Thr | Glu | Gly | Gln | Ser 265 | Asn | His | Ser | Thr | Gly 270 | Tyr | Glu |
| Ser | Asp | Asn 275 | His | Thr | Thr | Pro | Ile 280 | Leu | Cys | Gly | Ala | Gln 285 | Tyr | Arg | Ile |
| His | Thr 290 | His | Gly | Val | Phe | Arg 295 | Gly | Ile | Gln | Asp | Val 300 | Arg | Arg | Val | Pro |
| Gly 305 | Val | Ala | Pro | Thr | Leu 310 | Val | Arg | Ser | Ala | Ser 315 | Glu | Thr | Ser | Glu | Lys 320 |
| Arg | Pro | Phe | Met | Cys 325 | Ala | Tyr | Pro | Glу | Су s 330 | Asn | Lys | Arg | Tyr | Phe 335 | Lys |
| Leu | Ser | His | Leu 340 | Gln | Met | His | Ser | Arg 345 | Lys | His | Thr | Gly | G1u 350 | Lys | Pro |
| Tyr | Gln | Су s 355 | Asp | Phe | Lys | Asp | Су s 360 | Glu | Arg | Arg | Phe | \$er 365 | Arg | Ser | Asp |
| Gln | Leu 370 | Lys | Arg | His | Gln | Arg 375 | Arg | His | Thr | Gly | Val 380 | Lys | Pro | Phe | Gln |
| Суs 385 | Lys | Thr | Суѕ | Gln | Arg 390 | Lys | Phe | Ser | Arg | Ser 395 | Asp | His | Leu | Lys | Thr 400 |

```
His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
                                405
             Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
             Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
             Leu
       <210> 2
       <211> 9
 5
       <212> PRT
       <213> Artificial
       <220>
       <223> Péptido sintético
10
       <400> 2
                               Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                                  5
       <210>3
15
       <211>9
       <212> PRT
       <213> Artificial
20
       <220>
       <223> Péptido sintético
       <400> 3
                               Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
25
       <210>4
       <211>9
       <212> PRT
30
       <213> Artificial
       <220>
       <223> Péptido sintético
35
       <400> 4
                               Gly Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                                  5
       <210>5
       <211>9
40
       <212> PRT
       <213> Artificial
       <220>
45
       <223> Péptido sintético
```

| | <400> 5 | | | | | | | | | |
|----|--|----------|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|
| | | Ala 1 | Leu | Gly | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
| 5 | <210> 6 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| 10 | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| | <400> 6 | | | | | | | | | |
| 15 | | Val 1 | Leu | Gly | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
| 20 | <210> 7 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| 25 | <400> 7 | | | | | | | | | |
| | | Leu 1 | Leu | Gly | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
| 30 | <210> 8 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| 35 | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| | <400> 8 | | | | | | | | | |
| | | Ile 1 | Leu | Gly | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
| 40 | <210> 9 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| 45 | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| 50 | <400> 9 | | | | | | | | | |
| | | Met 1 | Leu | Gly | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
| 55 | <210> 10 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |

```
<220>
        <223> Péptido sintético
 5
        <400> 10
                                Trp Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                                     5
        <210> 11
10
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
15
        <223> Péptido sintético
        <400> 11
                                  Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                  1
20
        <210> 12
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
25
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 12
30
                                 Tyr Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                                     5
        <210> 13
        <211>9
35
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
40
        <400> 13
                                 Ser Val Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                 1
45
        <210> 14
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Artificial
50
        <223> Péptido sintético
        <400> 14
                                  Ser Gln Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
55
```

```
<210> 15
        <211>9
        <212> PRT
 5
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
10
        <400> 15
                                 Ser Ile Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
        <210> 16
15
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Artificial
20
        <223> Péptido sintético
        <400> 16
                                  Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
25
        <210> 17
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Artificial
30
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 17
35
                                  Ser Leu Leu Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                                      5
        <210> 18
        <211> 9
40
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
45
        <400> 18
                                  Ser Leu Ala Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                  1
                                                       5
50
        <210> 19
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
55
        <220>
        <223> Péptido sintético
```

| | <400> 19 | | | | | | | | | |
|----|--|----------|-------|-------|-------|------------|-------|-----|-----|-------|
| | | Ser 1 | Leu | Val | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
| 5 | <210> 20 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| 10 | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| | <400> 20 | | | | | | | | | |
| | | Ser 1 | Leu | Met | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
| 15 | | | | | | | | | | |
| 20 | <210> 21 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| 25 | <400> 21 | | | | | | | | | |
| | | Sei 1 | r Leu | ı Pro | o Glu | ı Glr 5 | n Glr | туг | Ser | . Val |
| 30 | <210> 22 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| 35 | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| | <400> 22 | | | | | | | | | |
| | | Ser 1 | Leu | Trp | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
| 40 | <210> 23 <211> 9 <212> PRT | | | | | | | | | |
| 45 | <213> Artificial <220> | | | | | | | | | |
| | <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| 50 | <400> 23 | | | | | | | | | |
| | | Ser 1 | Leu | Phe | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
| 55 | <210> 24 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |

```
<220>
        <223> Péptido sintético
 5
        <400> 24
                                 Ser Leu Tyr Glu Gln Gln Tyr Ser Val
        <210> 25
10
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
15
        <223> Péptido sintético
        <400> 25
                                  Ser Leu Ser Glu Gln Gln Tyr Ser Val
20
        <210> 26
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
25
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 26
30
                                 Ser Leu Ile Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                                     5
        <210> 27
        <211> 9
35
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
40
        <400> 27
                                 Gly Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                                     5
        <210> 28
45
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Artificial
50
        <223> Péptido sintético
        <400> 28
                                Ala Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                 1
                                                     5
55
```

```
<210> 29
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
 5
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 29
10
                                  Val Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                                       5
        <210> 30
        <211>9
        <212> PRT
15
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
20
        <400> 30
                                 Leu Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
25
        <210> 31
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Artificial
30
        <223> Péptido sintético
        <400> 31
                                 Ile Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                                      5
                                 1
35
        <210> 32
        <211>9
        <212> PRT
40
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
45
        <400> 32
                                 Met Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
        <210> 33
50
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
55
        <223> Péptido sintético
        <400> 33
```

```
Trp Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                                     5
        <210> 34
        <211>9
        <212> PRT
 5
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
10
        <400> 34
                                Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
15
        <210> 35
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
20
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 35
                                 Tyr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
25
        <210> 36
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
30
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 36
35
                                Arg Val Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
        <210> 37
40
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
45
        <223> Péptido sintético
        <400> 37
                                 Arg Gln Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
50
        <210>38
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Artificial
55
        <220>
```

| | ∠222> Dántido sintático | |
|------------|----------------------------------|---|
| | <223> Péptido sintético | |
| | <400> 38 | |
| | | Arg Ala Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu |
| 5 | | 1 5 |
| 3 | .040. 00 | |
| | <210> 39 <211> 9 | |
| 10 | <212> PRT | |
| 10 | <213> Artificial | |
| | <220> <223> Péptido sintético | |
| 15 | <400> 39 | |
| | | |
| | | Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu 5 |
| | <210> 40 | |
| 20 | <211> 9 <212> PRT | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 25 | <223> Péptido sintético | |
| | <400> 40 | |
| | | Arg Tle Dhe Dro Ach Ala Dro Tur Leu |
| | | Arg Ile Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu 1 5 |
| 30 | .040- 44 | |
| | <210> 41 <211> 9 | |
| | <212> PRT <213> Artificial | |
| 35 | | |
| | <220> <223> Péptido sintético | |
| | · | |
| 40 | <400> 41 | |
| | | Arg Met Ile Pro Asn Ala Pro Tyr Leu |
| | | 1 5 |
| | <210> 42 | |
| 45 | <211> 9 <212> PRT | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 5 0 | <223> Péptido sintético | |
| 50 | <400> 42 | |
| | | And Mah Tau Dua 200 210 Die Tie Tie |
| | | Arg Met Leu Pro Asn Ala Pro Tyr Leu 1 5 |
| <i></i> | 2040× 40 | |
| 55 | <210> 43 <211> 9 <212> PRT | |

```
<213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
 5
        <400> 43
                                 Arg Met Gly Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
        <210> 44
10
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
15
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 44
                                 Arg Met Ala Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                                     5
20
        <210>45
        <211>9
        <212> PRT
25
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 45
30
                                 Arg Met Val Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                 1
        <210>46
35
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
40
        <400>46
                                  Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                                      5
45
        <210> 47
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
50
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 47
55
```

| | | Arg Met Pro Pro Asn Ala Pro Tyr Leu 1 5 |
|----|--|--|
| 5 | <210> 48 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | |
| 10 | <220> <223> Péptido sintético | |
| | <400> 48 | |
| | | Arg Met Trp Pro Asn Ala Pro Tyr Leu |
| | | 1 5 |
| 15 | <210> 49 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | |
| 20 | <220> <223> Péptido sintético | |
| 25 | <400> 49 | |
| | | Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val 1 |
| 30 | <210> 50 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | |
| 35 | <220> <223> Péptido sintético <400> 50 | |
| | | Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ala 1 5 |
| 40 | <210> 51 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | |
| 45 | <220> <223> Péptido sintético | |
| | <400> 51 | |
| 50 | | Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile 1 5 |
| 55 | <210> 52 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | |

```
<220>
        <223> Péptido sintético
 5
        <400> 52
                                 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Met
                                                     5
        <210>53
10
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
15
        <223> Péptido sintético
        <400> 53
                                 Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Leu
                                                     5
20
        <210> 54
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Artificial
25
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 54
30
                                 Asp Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                                     5
        <210> 55
        <211>9
        <212> PRT
35
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
40
        <400> 55
                                 Glu Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
45
        <210> 56
        <211> 9
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
50
        <223> Péptido sintético
        <400> 56
                                 His Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
55
```

```
<210> 57
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
 5
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 57
10
                                  Lys Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
        <210> 58
        <211>9
15
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
20
        <400> 58
                                  Asn Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
25
        <210> 59
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
30
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400>59
                                 Pro Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                                      5
35
        <210>60
        <211>9
        <212> PRT
40
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
45
        <400>60
                                 Gln Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val
                                                      5
        <210>61
        <211> 9
50
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
55
        <223> Péptido sintético
        <400>61
```

| | | Arg 1 | Leu | Gly | Glu | Gln 5 | Gln | Tyr | Ser | Val |
|----|--|----------|-------|-----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|
| 5 | <210> 62 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| 10 | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| | <400> 62 | | | | | | | | | |
| | | Thr 1 | Leu | Gly | Glu | Gln 5 | Gln | Туг | Ser | Val |
| 15 | <210> 63 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| 20 | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| | <400> 63 | | | | | | | | | |
| | | Asp 1 | Met | Phe | Pro | Asn 5 | Ala | Pro | Tyr | Leu |
| 25 | | • | | | | J | | | | |
| 30 | <210> 64 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| 35 | <400> 64 | | | | | | | | | |
| | | Glu 1 | Met | Phe | Pro | Asn 5 | Ala | Pro | Tyr | Leu |
| 40 | <210> 65 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| 45 | <220> <223> Péptido sintético | | | | | | | | | |
| | <400> 65 | | | | | | | | | |
| | | His: | Met : | Phe | | Asn 5 | Ala | Pro | Tyr | Leu |
| 50 | -240> 66 | 1 | | | | 9 | | | | |
| | <210> 66 <211> 9 <212> PRT <213> Artificial | | | | | | | | | |
| 55 | <220> | | | | | | | | | |

```
<223> Péptido sintético
        <400>66
                                Lys Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                1
                                                    5
 5
       <210>67
       <211>9
       <212> PRT
10
        <213> Artificial
       <220>
        <223> Péptido sintético
15
       <400> 67
                                 Asn Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
       <210>68
20
       <211>9
       <212> PRT
        <213> Artificial
       <220>
25
       <223> Péptido sintético
       <400>68
                                Pro Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                                    5
30
       <210> 69
       <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
35
       <220>
        <223> Péptido sintético
        <400>69
40
                                Gln Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
        <210> 70
       <211>9
45
        <212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
50
       <400> 70
                                 Ser Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
                                 1
                                                    5
55
       <210>71
        <211>9
```

```
<212> PRT
        <213> Artificial
        <220>
 5
        <223> Péptido sintético
        <400>71
                                  Thr Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
10
        <210> 72
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
15
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 72
20
                                  Arg Ile Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile
                                                      5
        <210>73
        <211> 9
        <212> PRT
25
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
30
        <400> 73
                                  Arg Ile Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val
                                                      5
35
        <210> 74
        <211>9
        <212> PRT
        <213> Artificial
40
        <220>
        <223> Péptido sintético
        <400> 74
                                  Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Ile
                                                      5
45
        <210> 75
        <211>9
        <212> PRT
50
        <213> Artificial
        <220>
        <223> Péptido sintético
55
        <400> 75
```

REIVINDICACIONES

1. Un péptido parcial, una composición que contiene dicho péptido parcial, o una vacuna contra el cáncer que comprende un ADN o ARN que codifica un péptido parcial, para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es

```
el péptido WT1<sub>187</sub>: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2), el péptido WT1<sub>126</sub>: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3), el péptido WT1<sub>187</sub>P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11), el péptido WT1<sub>187</sub>P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16), el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20), el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34), el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39), el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46) o el péptido WT1<sub>126</sub>P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).
```

2. El péptido parcial o composición de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es

```
el péptido WT1<sub>187</sub>: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2), el péptido WT1<sub>126</sub>: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3), el péptido WT1<sub>187</sub>P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11), el péptido WT1<sub>187</sub>P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16), el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20), el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34), el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39), el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46) o el péptido WT1<sub>126</sub>P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).
```

- 30 3. El péptido parcial o composición de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es el péptido WT1₁₂₆: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3).
- 4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, que comprende adicionalmente un adyuvante.
 - 5. El uso de un péptido parcial, una composición que contenga dicho péptido parcial, o una vacuna contra el cáncer que comprende un ADN o ARN que codifica un péptido parcial, donde dicho péptido parcial es un péptido como se define en la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206.
 - 6. El uso de un péptido parcial o una composición de acuerdo con la reivindicación 5 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es

```
el péptido WT1<sub>187</sub>: Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 2), el péptido WT1<sub>126</sub>: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3), el péptido WT1<sub>187</sub>P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11), el péptido WT1<sub>187</sub>P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16), el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20), el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34), el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39), el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46) o el péptido WT1<sub>126</sub>P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).
```

40

55

60

7. El uso de un péptido parcial o composición de acuerdo con la reivindicación 6 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, donde el péptido parcial es

el péptido WT1₁₂₆: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 3).

- 8. El uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0206, que comprende adicionalmente un adyuvante.
- 9. Un método ex vivo para la inducción de CTL específicos del WT1, que comprende el cultivo, en presencia de un péptido parcial de acuerdo con la reivindicación 1, de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

derivadas de una persona positiva al HLA-A*0206, para obtener CTL específicos de WT1 inducidos a partir de ellas.

- 10. Un método *ex vivo* para la inducción de células dendríticas que presentan un péptido parcial de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el cultivo, en presencia del péptido parcial, de las células dendríticas inmaduras derivadas de una persona positiva al HLA-A*0206, para obtener células dendríticas inducidas a partir de ellas que presentan el péptido parcial.
- 11. Un método de diagnóstico del cáncer in vitro para personas positivas al HLA-A*0206, que comprende
- i) una etapa de detección o cuantificación de un péptido parcial de acuerdo con la reivindicación 1, un anticuerpo contra él o CTL específicos del WT1 inducidos por un método de acuerdo con la reivindicación 9 en una muestra de una persona positiva al HLA-A*0206, y una etapa de comparación de la cantidad de dicho péptido parcial, dicho anticuerpo contra él o dichos CTL específicos del WT1, con el caso en el que el cáncer no se ha desarrollado, o
- ii) una etapa de determinación de la posición o región de los CTL específicos de WT1 o células dendríticas en el sujeto positivo al HLA-A*0206 al cual se han administrado dichos CTL específicos de WT1 que se han inducido por el método de acuerdo con la reivindicación 9 o dichas células dendríticas que se han inducido de acuerdo con la reivindicación 10.
- 20 12. Una composición vacunal contra el cáncer para personas positivas al HLA-A*0201, que comprenden el siguiente péptido:

```
el péptido WT1<sub>187</sub>P1F: Phe Leu Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 11), el péptido WT1<sub>187</sub>P2M: Ser Met Gly Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 16), el péptido WT1<sub>187</sub>P3M: Ser Leu Met Glu Gln Gln Tyr Ser Val (SEQ ID NO: 20), el péptido WT1<sub>126</sub>P1F: Phe Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 34), el péptido WT1<sub>126</sub>P2L: Arg Leu Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 39), el péptido WT1<sub>126</sub>P3M: Arg Met Met Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 46) o el péptido WT1<sub>126</sub>P9V: Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Val (SEQ ID NO: 49).
```

30

- 13. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 12 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0201.
- 14. La composición de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en personas positivas al HLA-A*0201.

Fig. 1

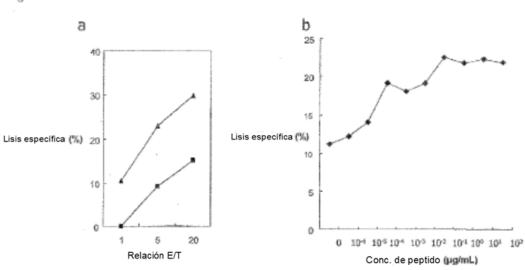


Fig. 2

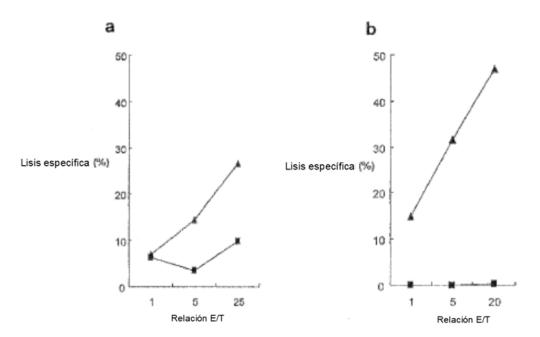


Fig. 3

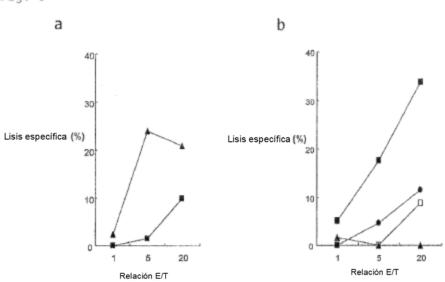


Fig. 4

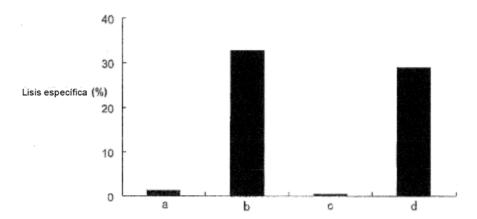


Fig. 5

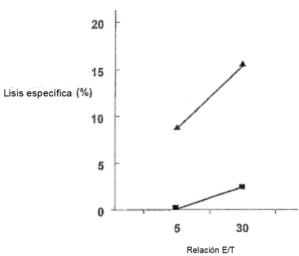
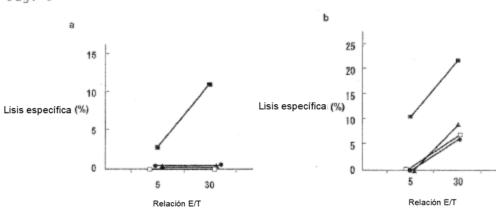


Fig. 6



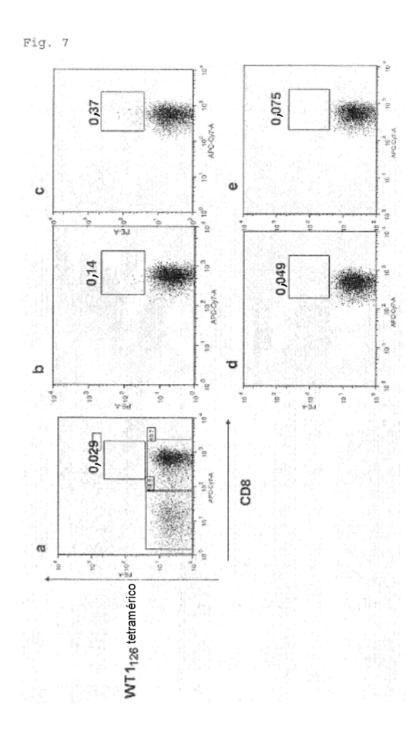
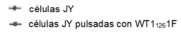


Fig. 8



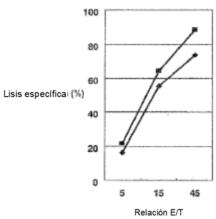


Fig. 9

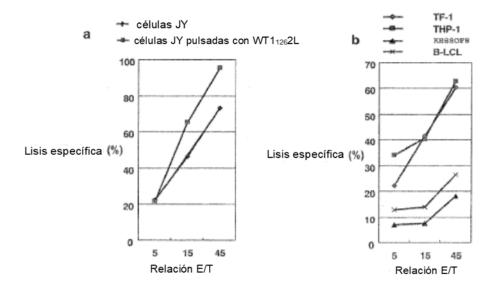


Fig. 10

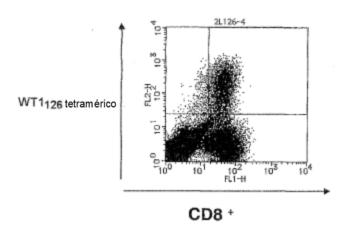


Fig. 11

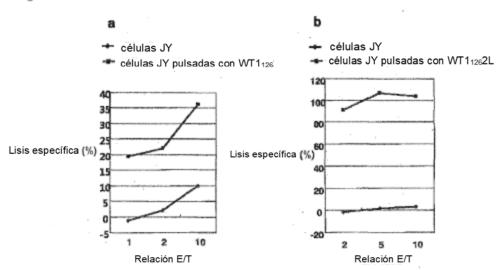


Fig. 12

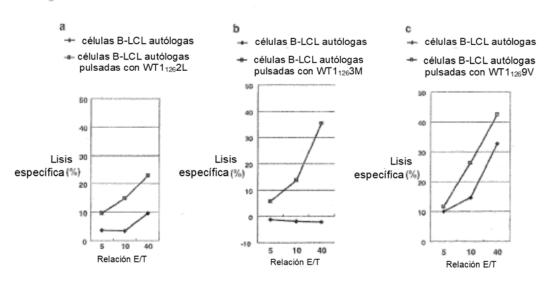


Fig. 13

- → células B-LCL autólogas
- células B-LCL autólogas transfectadas con el gen WT1 (que expresan WT1)

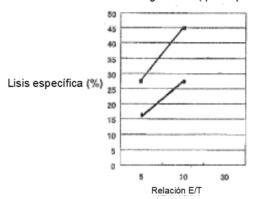
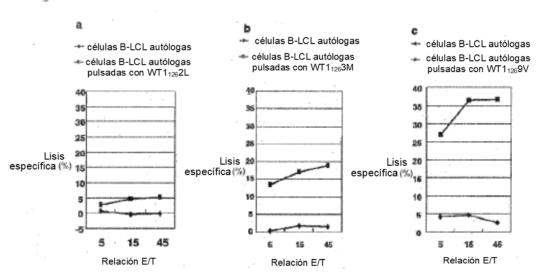
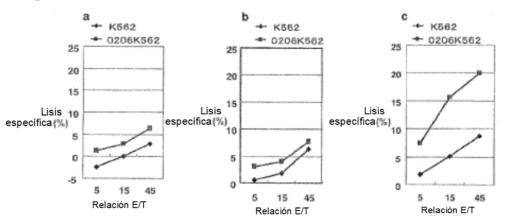
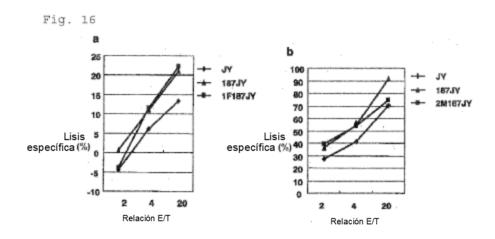


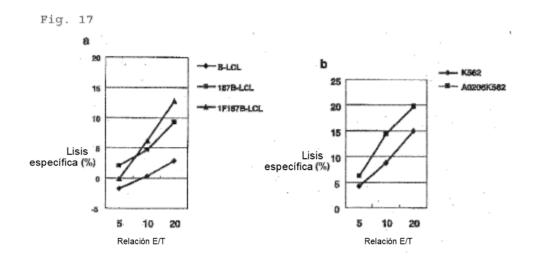
Fig. 14

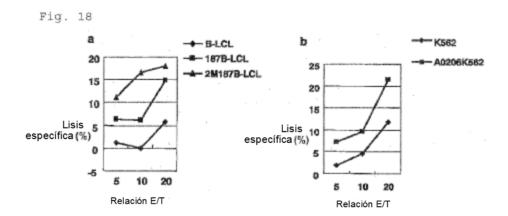












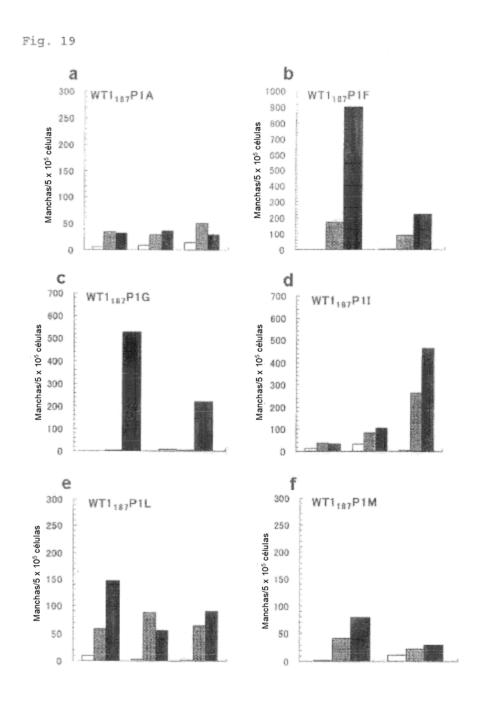
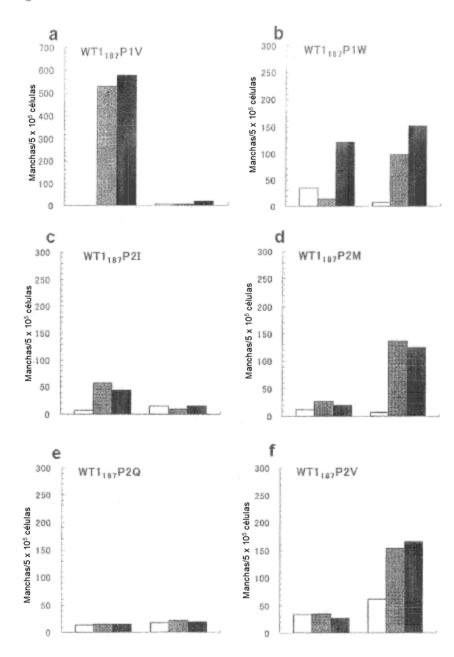
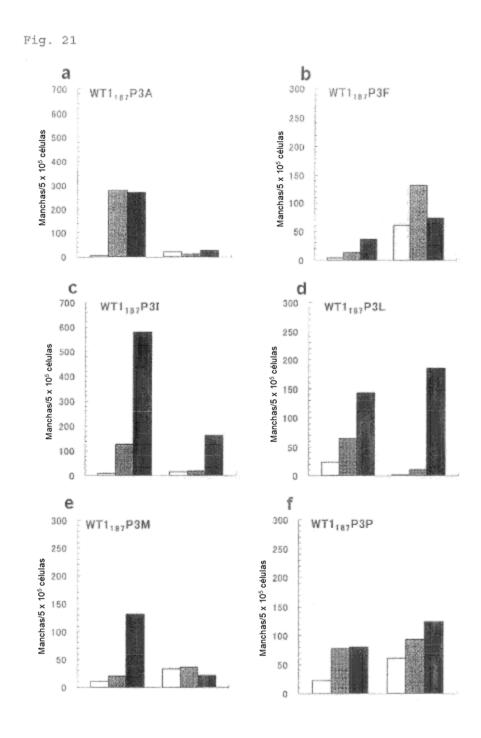
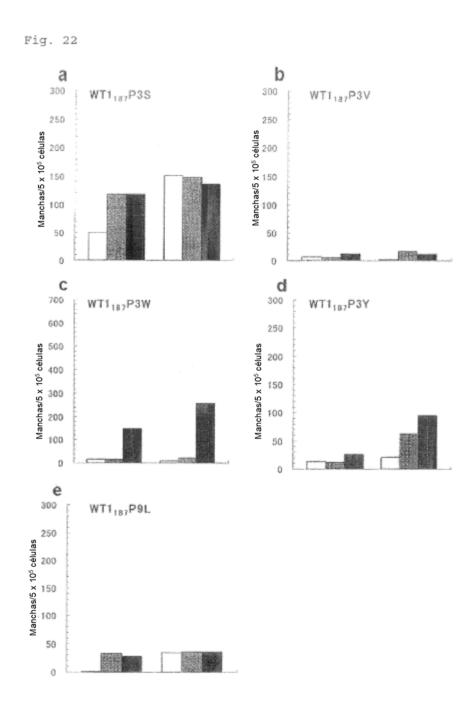
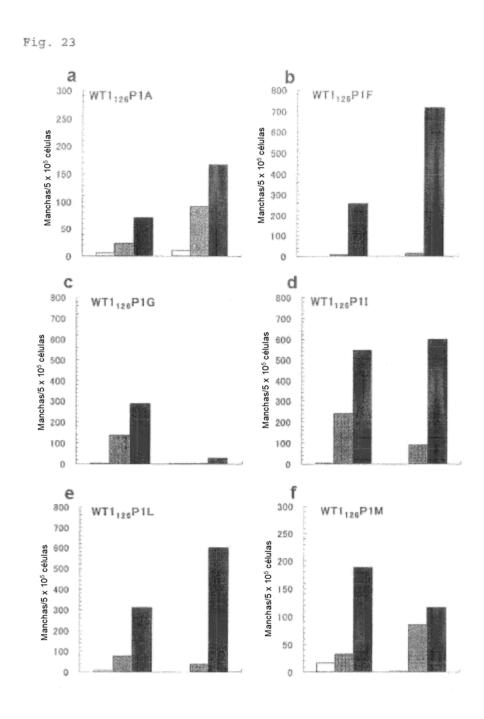


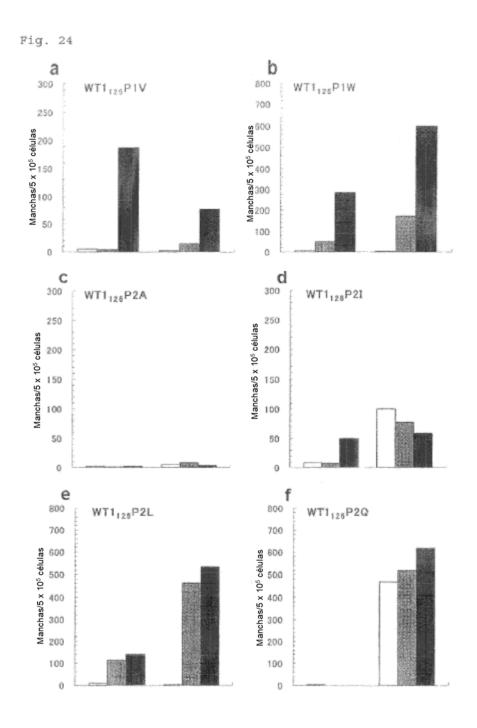
Fig. 20

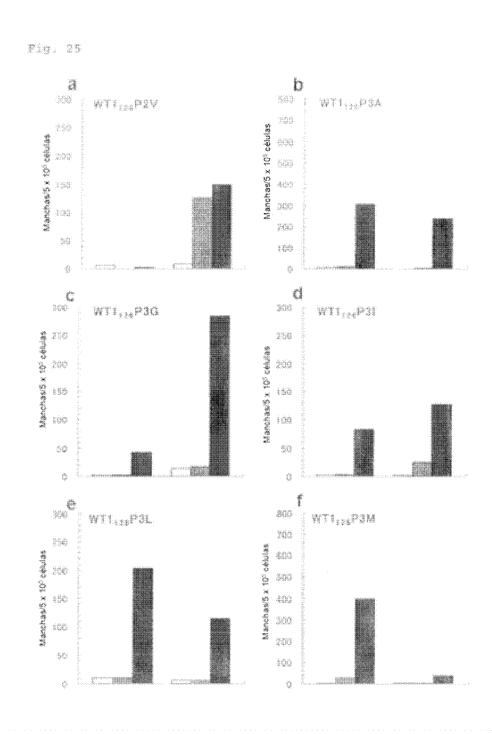


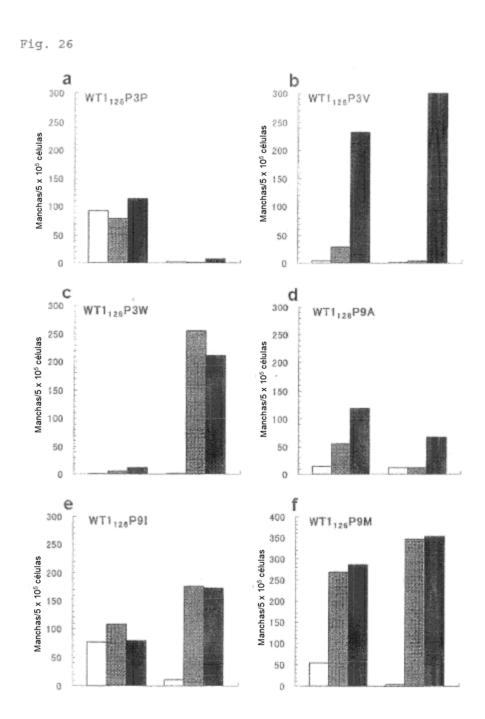


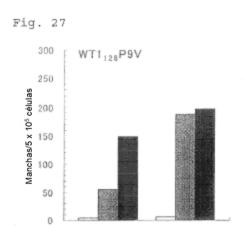


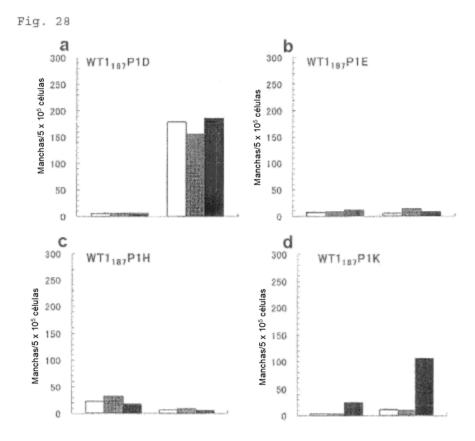












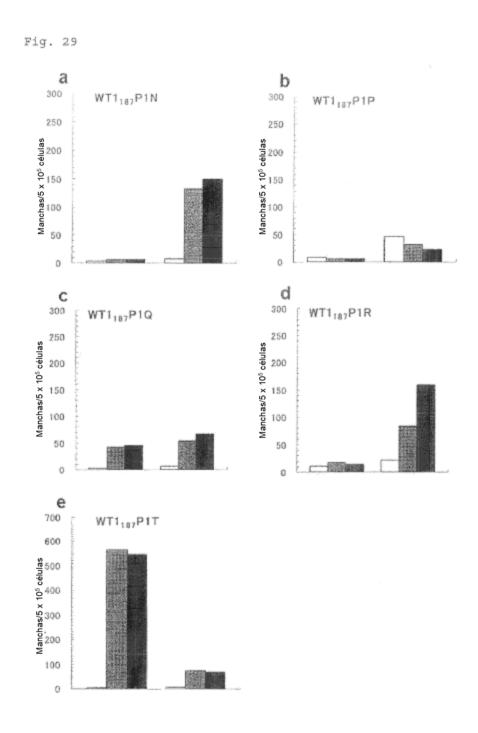


Fig. 30

