

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 486**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2003 E 03795414 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 1550453**

54 Título: **Preparación de péptidos antigénicos contra el cáncer**

30 Prioridad:

12.09.2002 JP 2002266876

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

22.06.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SUGIYAMA, HARUO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 538 486 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación de péptidos antigénicos contra el cáncer5 **Campo técnico**

[0001]La presente invención se refiere a formulaciones que comprenden un péptido antigénico contra el cáncer restringido por HLA-A24. Específicamente, se refiere a formulaciones en emulsión utilizadas como vacuna contra el cáncer para el tratamiento de diversos cánceres, y kits para la preparación de las formulaciones.

10

Técnica anterior

[0002]Las inmunidades celulares, particularmente las células T citotóxicas (referidas como CTL en lo sucesivo), juegan un papel importante en la eliminación de células cancerosas o de células infectadas por virus de un organismo vivo. Las CTL reconocen un complejo formado entre un péptido antigénico derivado de una proteína antigénica contra el cáncer en una célula cancerosa (péptido antigénico contra el cáncer) y un antígeno de clase I del MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) (referido como antígeno HLA en el caso de humano), y con ello atacar y dañar las células cancerosas.

15

20

[0003]Los ejemplos representativos de proteínas antigénicas contra el cáncer se enumeran en las Tablas descritas en Immunity, vol. 10: 281, 1999. Los ejemplos específicos incluyen antígenos melanosomales tales como una proteína específica de tejido melanocítico, gp100 (J. Exp. Med., 179: 1005, 1994), MART-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 3515, 1994), y tirosinasa (J. Exp. Med., 178: 489, 1993); así como marcadores de tumores, tales como HER2-neu (J. Exp. Med., 181: 2109, 1995), CEA (J. Natl. Cancer Inst., 87: 982, 1995) y PSA (J. Natl. Cancer Inst., 89: 293, 1997) como proteínas antigénicas contra el cáncer distintas de las de los melanomas. Péptidos antigénicos contra el cáncer son péptidos que consisten en aproximadamente 8 a 11 residuos de aminoácidos, que se generan a través del procesamiento de las proteínas antigénicas contra el cáncer con proteasas intracelulares (Cur. Opin. Immunol., 5: 709, 1993; Cur. Opin. Immunol., 5: 719, 1993; Cell, 82: 13, 1995; Immunol. Rev., 146: 167, 1995). Los péptidos antigénicos contra el cáncer generados de este modo se unen a los antígenos de clase I del MHC (antígenos HLA) para formar complejos y, a continuación los complejos son presentados sobre las superficies celulares, y reconocidos por las CTL como se ha descrito anteriormente. En el desarrollo de productos médicos para la inmunoterapia del cáncer (vacunas contra el cáncer) basados en la rotura de células cancerosas por las CTL, es por lo tanto muy importante identificar un péptido antigénico contra el cáncer de la proteína antigénica contra el cáncer, que pueda inducir eficazmente las CTL.

25

30

35

[0004]Existen multitud de subtipos de moléculas antigénicas de clase I del MHC, y la secuencia de aminoácidos de un péptido antigénico que puede unirse al respectivo subtipo obedece a cierta regla (motivo de unión) que corresponde a un tipo de moléculas antigénicas del MHC. En cuanto al motivo de unión para HLA-A2, por ejemplo, el aminoácido de la posición 2 es leucina, metionina o isoleucina, y el aminoácido en la posición 9 es valina, leucina, o isoleucina. En cuanto el motivo de unión para HLA-A24, el aminoácido de la posición 2 es tirosina, fenilalanina, metionina o triptófano, y el aminoácido de la posición 9 es fenilalanina, leucina, isoleucina, triptófano o metionina. Recientemente, cualquier secuencia peptídica que se espera que sea capaz de unirse a antígenos HLA, incluyendo los motivos como mostrados más arriba puede ser buscada en bases de datos (por ejemplo, soporte lógico BIMAS; http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind/). Por lo tanto, con el fin de identificar un péptido antigénico contra el cáncer que pueda inducir las CTL de la proteína antigénica contra el cáncer, se identifican en primer lugar las regiones de péptidos que consisten en aproximadamente 8 a 11 residuos de aminoácidos que coinciden con el motivo de unión o la secuencia peptídica esperada para un tipo de HLA previsto a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína antigénica contra el cáncer.

40

45

50

[0005]Sin embargo, un péptido que ha sido identificado basándose en el motivo de unión o la secuencia peptídica esperada no necesariamente tiene una actividad inductora de las CTL. Puesto que un péptido antigénico contra el cáncer se genera mediante el procesamiento intracelular de una proteína antigénica contra el cáncer, un péptido que no ha sido generado a través de procesamiento no puede ser un péptido antigénico. Además, puesto que existen muchas proteínas antigénicas contra el cáncer originalmente en un organismo vivo, las CTL pueden ser tolerantes a tales antígenos contra el cáncer, incluso si un péptido que tiene el motivo de unión o la secuencia de unión esperada se genera intracelularmente como un péptido antigénico contra el cáncer. Aquellas muestran que, con el fin de identificar un péptido antigénico contra el cáncer que tiene una actividad inductora de las CTL, una predicción meramente basada en el motivo de unión o la secuencia peptídica esperada para un tipo de HLA previsto es insuficiente, y debe ser importante una evaluación *in vivo* para determinar una actividad para inducir las CTL.

55

60

[0006]Se aisló un gen supresor de cáncer de Wilms WT1 (gen WT1) del cromosoma 11p13 como uno de los genes causantes de cáncer de Wilms basándose en el análisis del síndrome WAGR que estaba complicado por los cánceres de Wilms, aniridia, anomalía urogenital, retraso mental, etc. (Nature, 343: 774, 1990). El ADN genómico de WT1 tiene aproximadamente 50 Kb, y se compone de diez exones, de los cuales el ADNc tiene aproximadamente 3

kb. La secuencia de aminoácidos deducida a partir del ADNc es la mostrada en el SEQ ID NO: 1 (Cell, 60:509, 1990). Se ha sugerido que el gen WT1 promueve el crecimiento de células de leucemia a partir de los hechos de que el gen WT1 está altamente expresado en la leucemia humana, y que el crecimiento celular de las células leucémicas es suprimido por el tratamiento con oligómeros antisentido de WT1 (Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 104627/1997). Se ha demostrado a continuación que el gen WT1 es una nueva proteína antigénica contra el cáncer de leucemia y de cánceres sólidos (J. Immunol., 164: 1873-1880, 2000, J. Clin. Immunol., 20, 195-202, 2000) a partir del hecho de que el gen WT1 está también altamente expresado en cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical, y cáncer de ovario (Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Núm. 104627/1997, Publicación de patente japonesa (Kokai) Núm. 35484/1999). La inmunoterapia del cáncer (vacunas contra el cáncer) se puede aplicar preferiblemente a la mayor cantidad posible de pacientes de cáncer, y por lo tanto es importante identificar péptidos antigénicos contra el cáncer a partir de WT1, que está altamente expresado en muchos tipos de cánceres, y desarrollar vacunas contra el cáncer basadas en esos péptidos antigénicos contra el cáncer. En este contexto, los documentos WO00/06602 y WO00/18795 describen péptidos antigénicos contra el cáncer de tipo natural compuestos de una porción de la proteína WT1, pero esos péptidos antigénicos contra el cáncer todavía no se han examinado para determinar su eficacia *in vivo*.

Descripción de la invención

[0007]La presente invención pretende proporcionar péptidos antigénicos contra el cáncer derivados de WT1, que tienen eficacia *in vivo*, particularmente utilidad clínica, y vacunas contra el cáncer como formas de dosificación adecuadas para dichos péptidos antigénicos contra el cáncer.

[0008]El autor de la presente solicitud realizó el estudio clínico de los pacientes que habían dado su consentimiento informado con la aprobación de la Junta de Revisión Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Osaka, y encontró que la administración de algunos péptidos antigénicos contra el cáncer en una forma de dosificación particular a pacientes con cáncer aminora eficientemente sus condiciones patológicas, completando así la presente invención.

[0009]De este modo, la presente invención se refiere a:

- (1) una emulsión de agua-en-aceite que comprende como un ingrediente eficaz un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3) que induce CTL que reconoce el péptido WT1 de tipo salvaje de manera restringida por HLA- A24, en donde la emulsión está en una forma de dosificación unitaria que comprende de 0,1 a 100 mg del péptido;
- (2) un procedimiento para la preparación de la emulsión de agua en aceite de acuerdo con la invención, que comprende mezclar una preparación que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3) que induce CTL que reconocen el péptido WT1 de tipo salvaje de una manera restringida por HLA-A24, junto con un emulsionante y un aceite; y
- (3) un kit para la preparación de la emulsión de agua en aceite de acuerdo con la invención, que incluye un recipiente que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3) que induce CTL que reconocen el péptido WT1 de tipo salvaje de una manera restringida por HLA-A24, y un recipiente que comprende un emulsionante y un aceite; y
- (4) el uso de la emulsión de agua-en-aceite de acuerdo con la invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente de cáncer que es positivo para HLA-A24 y positivo para WT1.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 son gráficos que muestran el cambio en los niveles de marcadores tumorales en el paciente con cáncer de pulmón (hembra) antes y después de la administración del péptido WT1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2).

La Fig. 2 son gráficos que muestran el cambio en los niveles de marcadores tumorales en el paciente con cáncer de pulmón (macho) antes y después de la administración del péptido WT1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

(1) Ingrediente eficaz

[0011]Un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3 que comprende como ingrediente eficaz en una emulsión de agua-en-aceite de la presente invención se deriva de WT1 humano (Cell, 60 509,1990. Núm. de Acceso de la Base de datos NCBI XP_034418, SEQ ID NO: 1). Específicamente, un péptido que tiene una

secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 es un péptido parcial que abarca desde las posiciones 235 a 243 en WT1 humano (documento WO00/06602), mientras que un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3 es un tipo de péptido alterado en donde Met en la posición 236 en la región que abarca las posiciones 235 a 243 es alterado a Tyr (documento WO02/079253 (Fecha de publicación internacional: 10 de Octubre de 2002)).

[0012]El autor de la presente invención realizó el estudio clínico y de ese modo encontró por primera vez que esos péptidos mostrados más arriba tienen la propiedad de ser presentados en una célula presentadora de antígenos para inducir las CTL *in vivo* de una manera restringida por el antígeno HLA-A24. Tal propiedad puede ser examinada mediante la determinación del nivel en sangre de un marcador tumoral elevado en pacientes con cáncer en un momento definido después de la administración del péptido, o contando el número de CTL a través de un método de tetrámero de HLA (Int. J. Cancer. 100, 565-570 (2002)).

[0013]Los péptidos descritos anteriormente pueden prepararse de acuerdo con un método utilizado generalmente en la química de péptidos. Los ejemplos de tales preparaciones son los descritos en la bibliografía incluyendo "Peptide Synthesis", Interscience, Nueva York, 1966; "The Proteins", vol. 2, Academic Press Inc., Nueva York, 1976; "Pepuchido-Gosei", Maruzen Co. Ltd., 1975; "Pepuchido-Gosei-no-Kiso-a-Jikkenn", Maruzen Co. Ltd., 1985; y "Iyakuhiin-no-Kaihatu, Zoku, vol. 14, Peputido-Gosei", Hirokawa Shoten, 1991.

[0014]Los péptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3 en donde se modifica un grupo amino del aminoácido N-terminal o un grupo carboxilo del aminoácido C-terminal.

[0015]Específicamente, grupos modificadores del grupo amino del aminoácido N-terminal incluyen un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo fenilo, un grupo cicloalquilo, un grupo acilo, y similares, de los cuales se pueden seleccionar de 1 a 3. Los ejemplos del grupo acilo incluyen un grupo alcanilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, un grupo alcanilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono sustituido con un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido con un grupo cicloalquilo que tiene de 5 a 7 átomos de carbono, un grupo alquilsulfonilo que tiene 1 a 6 átomos de carbono, un grupo fenilsulfonilo, un grupo alcoxicarbonilo que tiene de 2 a 6 átomos de carbono, un grupo alcoxicarbonilo sustituido con un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido con cicloalcoxi que tiene de 5 a 7 átomos de carbono, un grupo fenoxicarbonilo, y similares .

[0016]Los péptidos en donde un grupo carboxilo del aminoácido C-terminal está modificado incluyen ésteres y amidas. Los ejemplos específicos de los ésteres incluyen un éster alquílico C1-C6, un éster alquílico C0-C6 sustituido con un grupo fenilo, un éster cicloalquílico C5-C7, y similares, mientras que los ejemplos específicos de las amidas incluyen una amida, una amida sustituida con uno o dos grupos alquilo C1-C6, una amida sustituida con uno o dos grupos alquilo C0-C6 sustituido con un grupo fenilo, una amida que forma un azacicloalcano de 5 a 7 miembros que contiene el átomo de nitrógeno de la amida, y similares.

(2) Emulsiones de agua-en-aceite

[0017]Según se utiliza en la presente memoria, una emulsión de agua-en-aceite se conoce como una emulsión que comprende aceite como un medio de dispersión, y agua como un líquido dispersado en el que el agua se dispersa en forma de gotitas finas en el aceite.

[0018]Un emulsionante y un aceite están generalmente para preparar emulsiones de agua-en-aceite de la presente invención. Los agentes emulsionantes no se limitan a uno concreto, siempre y cuando los agentes permitan que un ingrediente eficaz se disperse en un aceite, y, específicamente, incluyen, de mono-laurato de polioxietilensorbitán (Polysorbate 20), monopalmitato de polioxietilensorbitán (Polysorbate 40), y mono-estearato de polioxietilensorbitán (Polysorbate 60). Los aceites utilizables en el presente documento incluyen Drakeol 6VR, escualano, y oleato de etilo.

[0019]Se pueden utilizar apropiadamente en la invención Montanide ISA (marca registrada) 720, Montanide ISA (marca registrada) 51, y similares, ya que contienen tanto emulsionante como aceite en una cantidad adecuada cada uno.

[0020]Las emulsiones de agua-en-aceite de la presente invención se pueden preparar con referencia a, por ejemplo, Ikuo Suzuki, et al., "Iyakuhiin-no-Kaihatu, vol. 15, Seizai-no-Butsurikagakuteki-Seishitsu", Hirokawa Shoten, 1989, Octubre, págs. 291-306. Por ejemplo, un péptido como un ingrediente eficaz se disuelve o suspende primero en agua destilada o solución salina fisiológica para proporcionar una preparación que comprende un ingrediente activo. A continuación, la preparación se mezcla con un emulsionante y un aceite como se comentó anteriormente. La mezcla puede llevarse a cabo con un mezclador, un homogeneizador, un homogeneizador de ultrasonidos, o similares. La mezcla puede llevarse a cabo en un hospital o una clínica.

[0021]La razón de mezcla de un ingrediente eficaz con respecto a un emulsionante y un aceite puede ser ajustada por un experto en la técnica para que se encuentre en un intervalo en el que se pueden preparar las emulsiones de

agua-en-aceite. Las razones típicas incluyen Montanide ISA (marca registrada) 51 : ingrediente eficaz = 50 : 50 (p : p), y Montanide ISA (marca registrada) 720 : ingrediente eficaz = 70 : 30 (p : p).

5 [0022] Las emulsiones de agua-en-aceite de la presente invención pueden comprender uno o los dos péptidos descritos anteriormente.

10 [0023] Las emulsiones de agua-en-aceite de la presente invención pueden ser una formulación que está en una forma de dosificación unitaria que comprende de 0,1 a 100 mg, preferiblemente de 0,1 a 20 mg del péptido. La dosis del péptido se define como una cantidad necesaria para inducir las CTL *in vivo* de una manera restringida por el antígeno HLA-A24, y la dosis más preferida es de 1 a 10 mg. Dosis particular se puede ajustar según sea apropiado dentro del intervalo descrito anteriormente dependiendo de la enfermedad que vaya a ser tratada, la edad y el peso del paciente, y similares.

15 [0024] Las emulsiones de agua-en-aceite de la presente invención se pueden utilizar apropiadamente como una vacuna contra el cáncer. La vacuna contra el cáncer es eficaz en el tratamiento o la prevención de cánceres. Las enfermedades a las que se va a administrar la vacuna contra el cáncer de acuerdo con la presente invención incluyen los cánceres en el que el nivel de expresión del gen WT1 es elevado, incluyendo cánceres de la sangre 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 embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical, y cáncer de ovario.

20 [0025] Con respecto a esto, como otra realización, la invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer, que comprende administrar la emulsión de agua en aceite de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesite que es positivo para HLA-A24, y positivo para WT1.

25 [0026] La administración de las emulsiones de la invención se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, inyección intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, y se prefieren inyecciones intradérmicas y subcutáneas puesto que sus administraciones pueden inducir eficazmente las CTL. Aunque su número e intervalo de administración se puede ajustar apropiadamente dependiendo de la enfermedad que se vaya a tratar o prevenir, de las diferencias individuales del paciente, y similares, es típico administrar la forma de dosificación unitaria de la presente invención más de una vez, preferiblemente una vez cada varios días a cada varios meses.

(3) Kits

35 [0027] Como otra realización, la presente invención proporciona un kit para la preparación de las emulsiones de agua-en-aceite de acuerdo con la invención, que incluyen un recipiente que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 3 de acuerdo con la invención, y un recipiente que comprende un emulsionante y un aceite.

40 [0028] Los recipientes que se utilizan en el presente kit incluyen viales de vidrio o plástico que se pueden sellar. El péptido, el emulsionante y el aceite son los descritos anteriormente.

45 [0029] Los péptidos incluidos en un recipiente están usualmente en forma de producto liofilizado. En este caso, el kit de la presente invención también puede incluir un recipiente que comprende agua esterilizada o solución salina fisiológica en una cantidad para preparar una disolución o suspensión que contiene una concentración adecuada del péptido. Alternativamente, el kit puede incluir un recipiente que comprende un péptido en un estado de disolución o suspensión acuosa.

50 [0030] Cada uno de los péptidos, y el emulsionante y el aceite están usualmente incluidos en un recipiente en una cantidad para ser administrada una vez. Por ejemplo, están incluidos en un recipiente de 0,1 a 100 mg, preferiblemente de 1 a 20 mg del péptido, mientras que está incluida en un recipiente una cantidad del emulsionante y el aceite necesario para convertir el péptido utilizado en una emulsión de agua-en-aceite.

55 [0031] El kit de la presente invención se puede utilizar para preparar fácilmente la emulsión de agua en aceite de acuerdo con la invención inmediatamente antes de su uso en un hospital o una clínica.

Ejemplos

60 [0032] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y ejemplos de formulación, pero no está limitada por estos ejemplos en ningún aspecto. El estudio clínico en los ejemplos se llevó a cabo en pacientes que habían dado su consentimiento informado con la aprobación de la Junta de Revisión Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Osaka.

Ejemplo 1

Efecto del péptido WT1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2) en el paciente con cáncer de pulmón (1)

5 **[0033]**El presente ejemplo ilustra el caso del paciente de cáncer de pulmón (mujer) con metástasis en fase IV, a la que se administró la vacuna de péptido WT1. El péptido WT1 utilizado en este ejemplo fue el péptido WT1 de tipo salvaje: Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2) sintetizado por MPS Inc. (U.S.) de grado GMP, que era un péptido parcial de las posiciones 235 a 243 de la proteína WT1 demostrándose que era presentado sobre la molécula HLA-A*2402 para inducir las CTL específicas del péptido.

10 **[0034]**Una disolución del tipo péptido WT1 salvaje se mezcla con el mismo peso de Montanide ISA (marca registrada) 51 (Seppic, Inc.) para proporcionar una emulsión de agua-en-aceite. Se vertieron 800 µl de disolución de péptido de 1 mg/ml en 800 mg (aproximadamente 1016 µl) de Montanide ISA (marca registrada) 51 y se utilizó una jeringa de vidrio conectada a una aguja 21G para introducir y sacar la mezcla 10 veces en un vaso de precipitados con el fin de completar la mezcla, proporcionando de este modo una emulsión.

15 **[0035]**De este modo, se preparó una alícuota de 680 µl de la emulsión (0,3 mg de péptido) justo antes de cada administración. Para la administración, la parte alícuota de la emulsión se inyectó por vía intradérmica en la parte superior del brazo del paciente siete veces en total, i.d. el día 0, 14, 28, 42, 56, 85, y 99, en donde el día 0 representa el día en que se realizó la primera administración. El nivel sanguíneo de un marcador tumoral, CEA, en el paciente fue de aproximadamente 400 ng/ml de nueve meses antes de la administración del péptido, y el nivel aumentó drásticamente, alcanzando aproximadamente 2000 ng/ml dos meses antes de la administración del péptido.

20 **[0036]**El cambio en los niveles de marcadores tumorales que comienzan el día antes de la administración del péptido se muestra en la figura. 1. El CEA (antígeno carcinoembrionario) se determinó utilizando IMxCEA Dinapack (Dinabott, Inc.), mientras que SLX (antígeno sialil Lex-i) fue determinado por Sumikin Bio-Science Co., Ltd.

25 **[0037]**La Fig. 1 muestra que el aumento en el nivel de CEA en la sangre fue suprimido por la administración del péptido, y especialmente el nivel en sangre se redujo significativamente en y después de la quinta administración. La Fig. 1 también muestra que el nivel de SLX en sangre se incrementó hasta la cuarta administración del péptido, pero posteriormente, el aumento se suprimió de manera que el nivel en sangre se estabilizó en el inferior.

30 **[0038]**La hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) típica fue determinante para comprobar la respuesta inmunitaria específica para el péptido administrado. Se encontró que la quinta administración indujo una fuerte hinchazón en el sitio de la administración del péptido, lo que sugiere que se estableció una inmunidad específica.

35 **[0039]**Además, el establecimiento de una inmunidad específica fue también sugerido por el método ELISPOT (*J. Immunol. Meth.*, 110: 29, 1988) por medio del cual se encontró que las células T que producían de IFN-γ en respuesta al péptido específicamente eran más en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) que recibían el péptido en comparación con las PBMC que no recibían el péptido.

40 **[0040]**Esos resultados muestran que la administración de la emulsión de agua en aceite que comprende el péptido WT1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2) suprimió el desarrollo del tumor.

Ejemplo 2

45

Efecto péptido WT1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2) en el paciente con cáncer de pulmón (2)

50 **[0041]**El presente ejemplo ilustra el caso del paciente de cáncer de pulmón (varón) con metástasis en la etapa IV, al que se administró la vacuna de péptido WT1. De una manera similar al Ejemplo 1, una disolución de péptido WT1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2) se mezcló con Montanide ISA (marca registrada) 51 para proporcionar una emulsión de agua-en-aceite justo antes de cada administración, en donde la emulsión se inyectó por vía intradérmica en la parte superior del brazo del paciente en seis ocasiones en total, i.d. el día 0, 14, 28, 42, 56 y 71, en donde día 0 representa el día en que se realizó la primera administración.

55 **[0042]**El cambio en los niveles de marcadores tumorales antes y después de la administración del péptido se muestra en la Fig. 2. Los niveles de marcadores tumorales, CEA y SLX, se determinaron de una manera similar al Ejemplo 1, y el nivel de CYFRA (fragmentos de citoqueratina 19) se determinó utilizando Elecsys CYFRA producido por Roche.

60 **[0043]**La Fig. 2 muestra que el nivel de SLX en sangre antes de la administración del péptido fue de 50 U/ml, que es mayor que el límite superior del nivel normal, 38 U/ml, y el nivel se redujo para alcanzar el nivel normal en y después de la segunda la administración. La Fig. 2 también muestra que el nivel de CYFRA en sangre antes de la administración del péptido fue mayor que el límite superior del nivel normal, 2 ng/ml, y el nivel se redujo por debajo del límite superior del nivel normal en y después de la tercera administración. Además, la Fig. 2 muestra que el nivel

de CEA en sangre antes de la administración del péptido, que fue mayor que el límite superior del nivel normal, 5 ng/ml, se redujo en y después de la segunda administración.

5 **[0044]** Esos resultados muestran que la administración de la emulsión de agua-en-aceite que comprende el péptido WT1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2) suprimió el desarrollo del tumor.

Ejemplo 3

10 Efecto del péptido tipo WT1 alterado (SEQ ID NO: 3) en el paciente de leucemia

10 **[0045]** El presente ejemplo ilustra el caso del paciente de cáncer (varón) que padecía leucemia mieloblástica aguda (AML-M1) transformada de Síndromes mielodisplásicos (MDS), al que se administró la vacuna de péptido WT1. El péptido WT1 usado en este ejemplo fue péptido WT1 de tipo alterado: Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3) sintetizado por MPS Inc. (USA) de grado GMP. De una manera similar al Ejemplo 1, el péptido se mezcló con Montanide ISA (marca registrada) 51 para proporcionar una emulsión de agua-en-aceite, y la emulsión se inyectó por vía intradérmica en la parte superior del brazo del paciente. Los blastos leucémicos ocupaban 50% de la médula ósea dos días antes de la administración, mientras que el número total de leucocitos era de 1500/μl el día antes de la administración. Dos días después de la administración, el número total de leucocitos se redujo a 700/μl, y los blastos leucémicos de la médula ósea se redujeron a 27%. Cuando se administró un factor hematopoyético, G-CSF, al paciente a la luz de la disminución del número total de leucocitos, el número total se recuperó a 2150/μl, y los blastos leucémicos de la médula ósea fueron 11% siete días después de la administración.

25 **[0046]** Esos resultados muestran que la administración de la emulsión de agua-en-aceite que comprende el péptido WT1 de tipo alterado (SEQ ID NO: 3) mejoró las condiciones de la leucemia con una disminución de la razón de los blastos leucémicos en la médula ósea.

30 **[0047]** Posteriormente, el número de células T citotóxicas (CTL) reactivas con la molécula de HLA-A*2402 que presenta el péptido WT1 tipo salvaje en el mismo paciente se determinó por medio de un método de tetrámero de HLA. El tetrámero de HLA-A*2402 se preparó utilizando el péptido WT1 de tipo salvaje de acuerdo con el método descrito en Int. J. Cancer. 100, 565-570 (2002). En un citómetro de flujo, FACS, las células se tñieron con los dos colores del tetrámero de HLA-A*2402 marcado con PE y anticuerpo CD8 marcado con FITC, y las células doblemente positivas fueron asignados a las CTL que reconocían el péptido WT1 de tipo salvaje, es decir, CTL reactivas con células cancerosas positivas para WT1. La frecuencia de CTL tres días antes de la administración del péptido fue de 1,1%, mientras que la frecuencia se incrementó hasta el 8,8% dos días después de la administración.

40 **[0048]** Este resultado muestra que la administración de la emulsión de agua-en-aceite que comprende el péptido WT1 permitió aumentar drásticamente las CTL reactivas con las células cancerosas positivas para WT1. Esto también sugiere que las CTL pueden destruir los blastos leucémicos para reducir la razón de blastos leucémicos en la médula ósea.

40 **Aplicabilidad industrial**

45 **[0049]** La presente invención proporciona emulsiones de agua en aceite que comprenden como ingrediente eficaz un péptido restringido por HLA-A24 derivado de WT1 que tiene una actividad inductora de las CTL en el estudio clínico, y kits para la preparación de las mismas. La invención sería eficaz para mejorar las condiciones de muchos pacientes de cáncer.

50 **LISTA DE SECUENCIAS**

50 <110> Haruo Sugiyama
 <120> FORMULACIONES DE PÉPTIDOS ANTIGÉNICOS CONTRA EL CÁNCER
 <130> L1397 EP
 <140> PCT/JP2003/011675
 <141> 09/12/2003
 55 <150> JP 2002-266876
 <151> 09/12/2002
 <160> 3
 <210> 1
 <211> 449
 60 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ES 2 538 486 T3

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30
 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45
 Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240

ES 2 538 486 T3

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

Leu

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

10 <210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Péptido sintético

<400> 3

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una emulsión de agua-en-aceite que comprende como ingrediente eficaz un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3) que induce CTL que reconoce el péptido WT1 de tipo salvaje de una manera restringida por HLA-A24; en donde la emulsión está en una forma de dosificación unitaria que comprende de 0,1 a 100 mg del péptido.
- 10 2. La emulsión de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la emulsión se va a utilizar como una vacuna contra el cáncer.
- 15 3. Un procedimiento para la preparación de la emulsión de agua-en-aceite de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende mezclar una preparación que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3) que induce CTL que reconoce el péptido WT1 de tipo salvaje de una manera restringida por HLA-A24, junto con un emulsionante y un aceite.
- 20 4. Un kit para la preparación de la emulsión de agua-en-aceite de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que incluye un recipiente que comprende un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3) que induce CTL que reconoce el péptido WT1 tipo salvaje de una manera restringida por HLA-A24, y un recipiente que comprende un emulsionante y un aceite.
- 25 5. El kit de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el kit se va a utilizar para preparar la emulsión de agua en aceite de acuerdo con la reivindicación 1 justo antes del uso.
6. El uso de la emulsión de agua en aceite de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente de cáncer que es positivo para un HLA-A24 y positivo para WT1.

Fig. 1

Administraciones de péptido

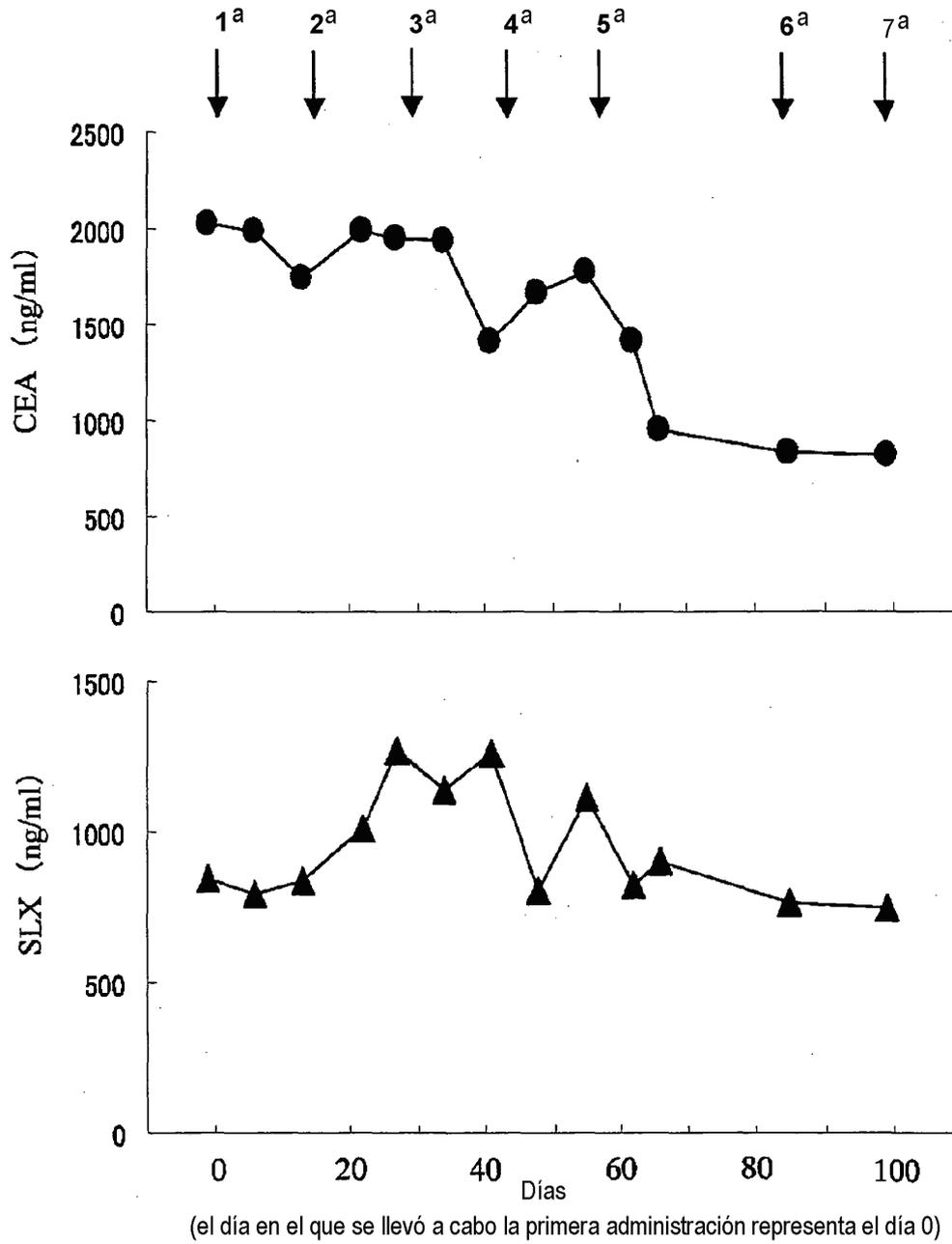
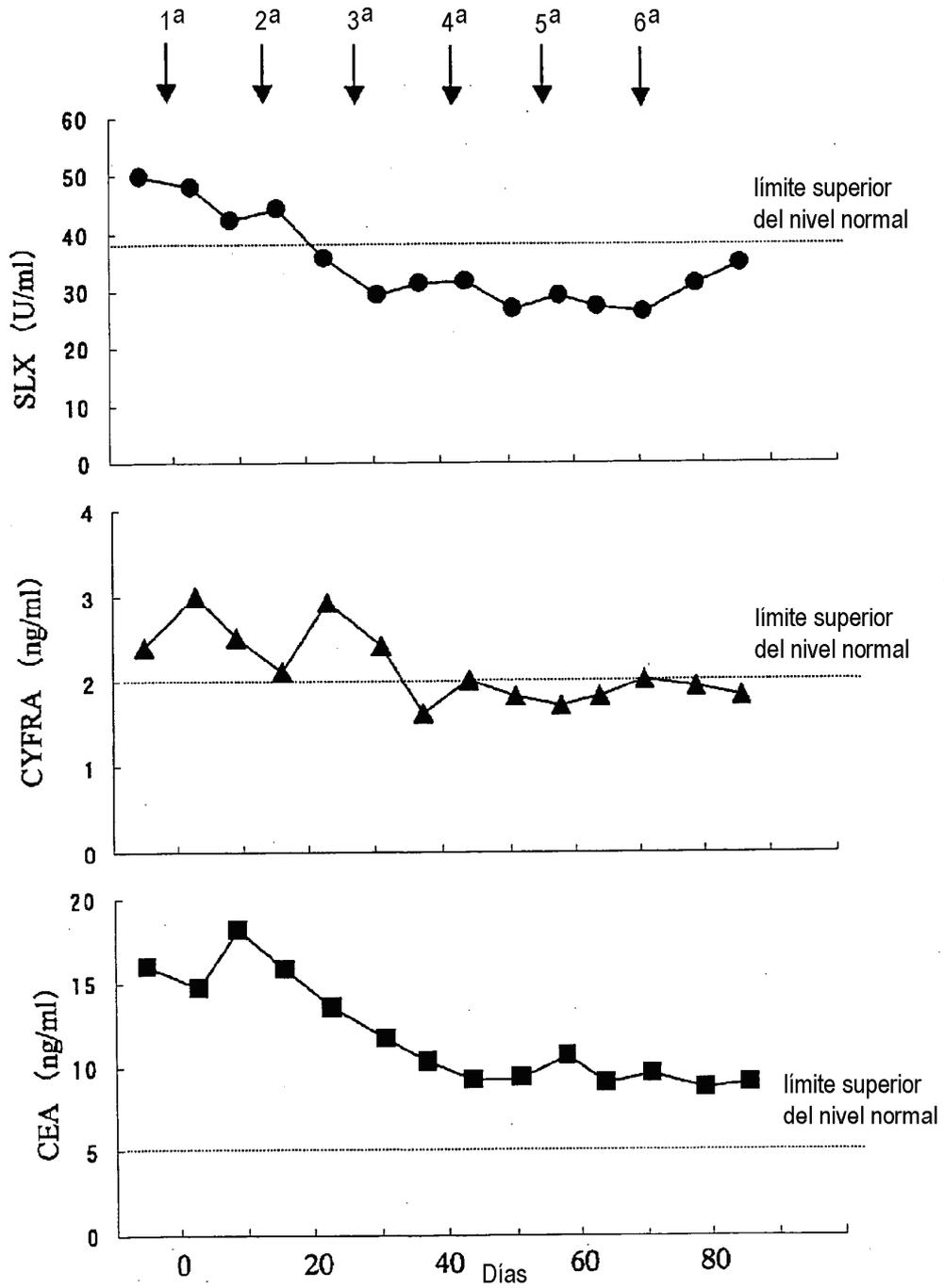


Fig. 2

Administraciones de péptido



(el día en el que se llevó a cabo la primera administración representa el día 0)