

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 775**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

C07K 14/82 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2007 E 12164855 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2479275**

54 Título: **Péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo**

30 Prioridad:

28.12.2006 JP 2006355356

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

23.12.2015

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

ES 2 554 775 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

Péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101, específicamente un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, donde el péptido tiene capacidad para unirse a una moléculas HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL. La presente invención también se refiere a dímero peptídico que tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL, donde dos monómeros peptídicos comprenden cada uno una secuencia que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1 y comprenden al menos un resto de cisteína que están unidos entre ellos por medio de un enlace disulfuro. Además, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido, una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer que comprende el mismo y similares.

Antecedentes

El gen WT1 (gen 1 del tumor de Wilms) se identificó como un gen responsable del tumor de Wilms que es un cáncer renal en niños (Documentos no patente 1 y 2). El WT1 es un factor de transcripción que tiene una estructura en dedo de zinc. Al principio, se consideró que el gen WT1 era un gen supresor de tumores. Sin embargo, estudios posteriores (Documentos no patentes 3, 4, 5 y 6) demostraron que el gen WT1 funcionaba más bien como un oncogén en tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos.

El gen WT1 se expresa con altos niveles en muchos tipos de tumores malignos. Entonces, se examinó si el producto genético WT1 libre de mutaciones, que es una proteína autóloga, tiene o no inmunogenicidad en un ser vivo. Los resultados revelaron que la proteína derivada del gen WT1 que se expresa con altos niveles en células tumorales se fragmenta por medio de un proceso intracelular, los péptidos resultantes forman complejos con moléculas del MHC clase I, y los complejos se presentan en las superficies de las células, y que los CTL que reconocen tales complejos pueden inducirse por vacunación peptídica (Documentos no patentes 7, 8 y 9). También se demostró que un ratón inmunizado con un péptido WT1 o un ADNc WT1, rechaza las células tumorales trasplantadas que expresan un gen WT1 con una alta probabilidad (Documentos no patentes 7 y 10), mientras que los tejidos normales que expresan fisiológicamente el gen WT1 no son dañados por los CTL que se inducen (Documento de patente 7). Se ha demostrado en experimentos *in vitro*, utilizando células humanas, que cuando se utiliza el péptido Db126 o el péptido WH187 (aminoácidos 187-195 de la SEC ID N° 1, SGLEQQYSV) que tienen una gran capacidad para unirse a una molécula HLA-A*0201, que es una de las moléculas del MHC clase I humano, para estimular las células mononucleares de sangre periférica que tienen HLA-A*0201, se inducen CTL específicos de WT1, los CTL inducidos tienen una actividad citotóxica específica para las células tumorales que expresan endógenamente un gen WT1 a altos niveles, y la actividad citotóxica de tales CTL está restringida a HLA-A2 (Documento de patente 11). Se ha demostrado en experimentos *in vitro* en células humanas utilizando el péptido WT1 que coincidía con HLA-A*2402 (que se encuentra más frecuentemente en la población japonesa entre los alelos HLA-A) (WT1₂₃₅; aminoácidos 235-243 de la SEC ID N° 1, CMTWNQMNL) que se inducen CTL específicos de WT1 (TAK-1) (Documento no patente 12), y los CTL inducidos no suprimen la actividad formadora de colonias de las células madre hematopoyéticas normales que expresan fisiológicamente un gen WT1 parcialmente (Documentos no patentes 12 y 13). Estos informes sugieren fuertemente que no solamente en los ratones sino también en los seres humanos, se pueden inducir CTL específicos de WT1, tales CTL tienen una actividad citotóxica contra las células tumorales que expresan un gen WT1 con altos niveles, pero no tienen una actividad citotóxica contra las células normales que expresan fisiológicamente un gen WT1 (Documentos de patentes 7, 10, 11, 12 y 13).

El producto del gen WT1 está presente como una proteína nuclear, y se procesa en los proteosomas del citoplasma para fragmentarse en péptidos. Los péptidos fragmentados se transportan al lumen del retículo endoplásmico por las moléculas TAP (transportadoras asociadas con el procesamiento antigénico), forman complejos con moléculas del MHC clase I, y se presentan en la superficie de las células. Los CTL específicos de WT1 se inducen como resultado del reconocimiento de los complejos péptido WT1- molécula MHC clase I por las células precursoras de CTL por medio del TCR, ejerciendo de esta manera un efecto citotóxico sobre las células tumorales que presentan un producto del gen WT1 por medio de moléculas del MHC clase I (Documentos de patentes 7, 8 y 9). Entonces, se necesita al menos que un péptido WT1 que se utilice en inmunoterapia dirigida del cáncer contra un producto del gen WT1 esté en la forma en que se une a una molécula del MHC clase I en un organismo vivo. Sin embargo, las moléculas del MHC clase I son diferentes y las secuencias de aminoácidos de los péptidos WT1 que se unen a cada subtipo del MHC clase I respectivas son diferentes entre ellos. Por lo tanto, se necesita proporcionar un péptido que se una con cada subtipo de MHC clase I. Sin embargo, solo se conocen hasta la fecha los péptidos restringidos a la molécula HLA-A*2402, molécula HLA-A*0201, molécula HLA-A*2601 y molécula HLA-A*3303 como péptidos WT1 restringidos a moléculas HLA (Documento patente 1, Documento no patente 11, Documento patente 2 y Documento patente 3, respectivamente). Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101.

Documento Patente 1: WO 2003/106682
 Documento Patente 2: WO 2005/095598
 Documento Patente 3: Solicitud de Patente Japonesa N° 2006-45287
 Documento no Patente 1: Daniel A. Haber et al., Cell. 1990 Jun 29; 61(7):1257-69.
 Documento no Patente 2: Call KM et al., Cell. 1990 Feb 9; 60 (3): 509-20.
 Documento no Patente 3: Menke AL et al., Int Rev Cytol. 1998; 181:151-212. Review.
 Documento no Patente 4: Yamagami T et al., Blood. 1996 Abr 1; 87(7):2878-84.
 Documento no Patente 5: Inoue K et al., Blood. 1998 Abr 15; 91 (8):2969-76.
 Documento no Patente 6: Tsuboi A et al., Leuk Res. 1999 May; 23(5):499-505.
 Documento no Patente 7: Oka Y et al., J Immunol. 2000 Feb 15; 164(4):1873-80.
 Documento no Patente 8: Melief CJ et al., Immunol Rev. 1995 Jun; 145:167-77.
 Documento no Patente 9: Ritz J, J Clin Oncol. 1994 Feb; 12 (2):237-8.
 Documento no Patente 10: Tsuboi A et al., J Clin Immunol. 2000 May; 20(3):195-202.
 Documento no Patente 11: Oka Y et al., Immunogenetics. 2000 Feb; 51 (2):99-107.
 Documento no Patente 12: Ohnishi H et al., Blood. 2000 Ene 1; 95(1):286-93.
 Documento no Patente 13: Gao L et al., Blood. 2000 Abr 1; 95(7):2198-203.

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

Los problemas a resolver por la presente invención son proporcionar un péptido que esté restringido a la molécula HLA-A*1101 y comprenda una secuencia de aminoácidos de una proteína WT1, y un polinucleótido que codifica el mismo, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer, que comprende el mismo, y similares.

Medios de resolver los problemas

Como resultado de estudios intensos en vista de la situación que se describe anteriormente, el presente inventor ha descubierto que entre los péptidos que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, cada péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 puede inducir un CTL específico de WT1 con una alta tasa. Por lo tanto, la presente invención ha sido completada.

La presente invención proporciona:

- (1) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de la proteína WT1, donde el péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL;
- (2) el péptido de acuerdo con (1), donde el aminoácido en la posición 9 de la secuencia de aminoácidos es Lys o Arg;
- (3) el péptido de acuerdo con (1), donde la secuencia de aminoácidos se selecciona de entre el grupo de:

Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID N° 2),
 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N° 3),
 Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys (SEC ID N° 4),
 Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg (SEC ID N° 5),
 Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys (SEC ID N° 6),
 Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID N° 7),
 Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (SEC ID N° 8),
 Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (SEC ID N° 9), y
 Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys (SEC ID N° 10);

- (4) el péptido de acuerdo con (3), donde la secuencia de aminoácidos es Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID N° 2);
- (5) un dímero peptídico que tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101 y que tiene la capacidad de inducir CTL, en el cual los dos monómeros peptídicos comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, y que comprenden al menos un resto de cisteína, están unidos por medio de un enlace disulfuro;
- (6) el dímero peptídico de acuerdo con (5), donde la secuencia de aminoácidos del monómero peptídico se selecciona de entre el grupo que consiste en:

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N° 3),
 Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID N° 7),
 Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (SEC ID N° 8), y
 Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (SEC ID N° 9);

(7) una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el péptido de acuerdo con (1) y/o el dímero peptídico de acuerdo con (5);
 (8) un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad eficaz del péptido de acuerdo con (1) y/o el dímero peptídico de acuerdo con (5) a un sujeto positivo a HLA-A*1101;
 (9) un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con (1);
 (10) un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con (9);
 (11) una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el polinucleótido de acuerdo con (9) o el vector de acuerdo con (10);
 (12) un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad eficaz del polinucleótido de acuerdo con (9) o el vector de acuerdo con (10) a un sujeto positivo a HLA-A*1101;
 (13) un CTL específico de WT1, que es inducido por el péptido de acuerdo con (1) y/o el dímero peptídico de acuerdo con (5);
 (14) un método para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende el cultivo de una célula mononuclear de sangre periférica en presencia del péptido de acuerdo con (1) y/o el dímero peptídico de acuerdo con (5) para inducir CTL específicos de WT1 a partir de la célula mononuclear de sangre periférica;
 (15) un kit para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende el péptido de acuerdo con (1) y/o el dímero peptídico de acuerdo con (5) como un componente esencial;
 (16) una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, que es inducida por el péptido de acuerdo con (1) y/o el dímero peptídico de acuerdo con (5);
 (17) un método para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, que comprende el cultivo de una célula presentadora de antígeno inmadura en presencia del péptido de acuerdo con (1) y/o el dímero peptídico de acuerdo con (5) para inducir una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a partir de una célula presentadora de antígeno inmadura;
 (18) un kit para inducir la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, que comprende el péptido de acuerdo con (1) y/o el dímero peptídico de acuerdo con (5) como un componente esencial; y
 (19) un método para diagnosticar un cáncer, que comprende la utilización del CTL de acuerdo con (13) o la célula presentadora de antígeno de acuerdo con (16).

Efectos de la invención

La presente invención proporciona un péptido que está restringido a HLA-A*1101 y comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, y un polinucleótido que codifica el mismo, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer, que comprende el mismo, y similares. Por lo tanto es posible inducir CTL específicos de WT1 *in vivo* e *in vitro* en sujetos que tienen HLA-A*1101. Debido a que la tasa de positivos a HLA-A*1101 entre la población japonesa es alta (aproximadamente un 17,9%), los CTL específicos de WT1 se pueden inducir en un amplio intervalo de sujetos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₂₅₁.
 La Fig. 2 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₂₇₉.
 La Fig. 3 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₃₁₂.
 La Fig. 4 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₃₁₃.
 La Fig. 5 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₃₃₈.
 La Fig. 6 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₃₇₈.
 La Fig. 7 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₃₈₆.
 La Fig. 8 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₄₁₅.
 La Fig. 9 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₄₃₆.
 La Fig. 10 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por el péptido WT1₃₇₈ (a, b y c representan las actividades citotóxicas que se observaron utilizando PBMC de los donantes sanos positivos a HLA-A*1101 1, 2 y 3, respectivamente).
 La Fig. 11 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por el dímero peptídico WT1₃₇₈ (a y b representan las actividades citotóxicas que se observaron utilizando PBMC de los donantes sanos positivos a HLA-A*1101 1 y 2, respectivamente).
 La Fig. 12 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con el péptido WT1₃₇₈ modificado (G→I) (a, b y c representan las actividades citotóxicas que se observaron utilizando PBMC de los donantes sanos positivos a HLA-A*1101 1, 2 y 3, respectivamente).
 La Fig. 13 representa la actividad citotóxica del CTL inducida con el péptido modificado WT1₃₇₈ (G→V) (a, b, y c representan las actividades citotóxicas que se observaron utilizando PBMC de los donantes sanos positivos a HLA-A*1101 1, 2 y 3, respectivamente).
 La Fig. 14 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por el péptido WT1₃₇₉ (a, b y c representan las actividades citotóxicas que se observaron utilizando PBMC de los donantes sanos positivos a HLA-A*1101 1, 2 y 3, respectivamente).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, donde el péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL (también denominado en el presente documento un "péptido WT1"). La secuencia de aminoácidos de la proteína WT1 humana se muestra en la SEC ID N° 1. El péptido de la presente invención que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende cisteína(s) es la secuencia de aminoácidos SEC ID N° 5 como se describe posteriormente, se puede aumentar la estabilidad sustituyendo las cisteína(s) de la secuencia de aminoácidos con otra sustancia tal como otro aminoácido (por ejemplo, serina, alanina y ácido α -aminobutírico) o modificando el grupo SH de la cisteína(s) con un grupo protector conocido en la técnica (por ejemplo, un grupo carboximetilo o un grupo piridiletilo). El péptido de la presente invención es un péptido antigénico de cáncer que puede inducir un CTL como resultado de la presentación, por una célula presentadora de antígeno, de un péptido que se genera procesando el péptido de la presente invención en una célula.

Como se ha descrito anteriormente, es un objetivo de la presente invención obtener un péptido restringido a HLA-A*1101. Por lo tanto, el péptido de la presente invención tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101. La capacidad para unirse se puede determinar por un método conocido en la técnica. Ejemplos de estos métodos incluyen un método basado en computadora tal como BIMAS o SYFPEITHI, y un ensayo de unión competitiva con un péptido conocido que tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101. Por ejemplo, se puede comparar una determinada capacidad de unirse con la de un péptido restringido a HLA-A*1101 conocido para juzgar si el péptido de la presente invención tiene la capacidad de unirse o no. Ejemplos de péptidos que tienen la capacidad de unirse de acuerdo con la presente invención incluyen un péptido del que se ha determinado un valor de afinidad con una molécula de HLA-A*1101 como se determina por el método que se describe en el ejemplo 1 es 4 o más, preferentemente 5 o más, más preferentemente 6 o más.

El péptido de la presente invención tiene la capacidad además para inducir un CTL. El gen WT1 se expresa en su forma nativa a altos niveles, por ejemplo, en tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y 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 uterino o cáncer ovárico. Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede inducir un CTL con una alta tasa en un sujeto que padece tal enfermedad. La capacidad para inducir un CTL se refiere a la capacidad para inducir un CTL *in vivo* o *in vitro*. Tal capacidad puede determinarse utilizando un método general tal como un método en el que se determina la actividad citotóxica de un CTL utilizando un ensayo de liberación de Cr.

El péptido de la presente invención puede tener una Lys o Arg en la posición 9 de la secuencia de aminoácidos. Se considera que teniendo tal aminoácidos, la capacidad del péptido para unirse a una molécula HLA-A*1101 se vuelve mayor.

La secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contenida en el péptido de la presente invención es preferentemente, Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg (SEC ID N° 5). Además, puede tener una sustitución de uno o varios, preferentemente de uno a cinco aminoácidos con otros aminoácidos en cualquiera de los nueve aminoácidos de la SEC ID N° 5. Cualquiera de los 9 aminoácidos u otros aminoácidos sustituidos se pueden modificar apropiadamente. En cualquiera de los casos, el péptido de la presente invención mantiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101.

Como se ha descrito anteriormente, el péptido de la presente invención puede ser cualquiera, siempre que contenga una secuencia de aminoácidos que se deriva de una proteína WT1 y consiste en 9 aminoácidos contiguos. Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede ser, por ejemplo, un péptido que consiste solamente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 5, o una proteína WT1 o una parte de la misma que comprende cualquier secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID N° 5. Varias sustancias se pueden unir al extremo N y/o el extremo C de la secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos en el péptido de la presente invención. Por ejemplo, se puede unir un aminoácido, un péptido o un análogo del mismo. Si tal sustancia se une al péptido de la presente invención, la sustancia se puede procesar, por ejemplo, por una enzima en un organismo vivo o por medio de un proceso tal como un proceso intracelular, y finalmente, se puede producir la secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos y presentarse como un complejo con una molécula de HLA-A*1101 en la superficie de una célula, resultando de esta manera en el efecto de inducción de un CTL. La sustancia puede ser una sustancia que modula la solubilidad del péptido de la presente invención, o aumentar su estabilidad (resistencia a proteasas, etc.). De manera alternativa puede ser una sustancia que suministre el péptido de la presente invención específicamente, por ejemplo, a un tejido u órgano determinado, o puede tener la acción de aumentar la eficacia de la captación por una célula presentadora de antígeno o similar. La sustancia puede ser una sustancia que aumenta la capacidad para inducir un CTL, tal como un péptido auxiliar o similar.

El péptido de la presente invención se puede sintetizar por métodos que se utilizan en general en la técnica o modificaciones de los mismos. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976 ; Peptide-Gosei, Maruzen Co., Ltd., 1975; Peptide-Gosei No Kiso To Jikken, Maruzen Co., Ltd., 1985; e Iyakuin No Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide-Gosei,

Hirokawa - Book store, 1991.

El péptido de la presente invención se puede preparar también utilizando técnicas de modificación genética que se basan en la información sobre la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la presente invención. Tales técnicas de modificación genética son bien conocidas por un experto en la técnica.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a un dímero peptídico que tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101 y que tiene la capacidad de inducir un CTL, en el que dos monómeros peptídicos comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1 y que comprenden al menos un resto de cisteína, se unen entre ellos a través de un enlace disulfuro (de aquí en adelante también denominado un "dímero peptídico WT1"). La estabilidad del dímero peptídico de la presente invención está aumentada en comparación con la del monómero peptídico al formar un dímero. El dímero peptídico de la presente invención es un dímero peptídico antigénico tumoral que puede inducir un CTL como resultado de la presentación, por una célula presentadora de antígeno, de un péptido generado por procesamiento del péptido de la presente invención en una célula.

El dímero peptídico de la presente invención se forma uniendo dos monómeros peptídicos por medio de un enlace disulfuro entre los restos de cisteína presentes en los monómeros. Por lo tanto, cada uno de los monómeros peptídicos contenidos en el dímero peptídico WT1 de la presente invención es el péptido WT1 que se ha descrito anteriormente y comprende al menos un resto de cisteína. El dímero peptídico WT1 de la presente invención puede ser un homodímero o un heterodímero.

El dímero peptídico WT1 de la presente invención se puede preparar utilizando un método conocido en la técnica. Por ejemplo, si los monómeros peptídicos comprenden un par de restos de cisteína, el dímero peptídico WT1 de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, retirando todos los grupos protectores incluyendo los de la cisteína de las cadenas laterales, y luego sometiendo la solución de monómeros resultante a la oxidación al aire bajo condiciones alcalinas, o añadiendo un oxidante bajo condiciones ácidas o alcalinas para formar un enlace disulfuro. Ejemplos de los oxidantes incluyen yodo, dimetilsulfóxido (DMSO) y ferricianida potásica.

Cuando cada uno de los monómeros peptídicos comprende dos o más restos de cisteína, el dímero peptídico WT1 de la presente invención se puede preparar también por el método que se ha descrito anteriormente. En este caso, se obtienen isómeros debido a los diferentes tipos de enlaces disulfuro. De manera alternativa, el dímero peptídico WT1 de la presente invención se puede preparar seleccionando una combinación de grupos protectores para la cisteína de las cadenas laterales. Ejemplos de las combinaciones de los grupos protectores incluyen combinaciones del grupo MeBzl (metilbenzilo) y el grupo Acm (acetamidometilo), el grupo Trt (tritilo) y el grupo Acm, el grupo Npys (3-nitro-2-piridilio) y el grupo Acm, y el grupo S-Bu-t (S-terc-butilo) y el grupo Acm. Por ejemplo, en el caso de la combinación del grupo MeBzl y el grupo Acm, el dímero peptídico WT1 se puede preparar retirando los grupos protectores distintos del grupo MeBzl y el grupo protector en la cadena lateral de cisteína, sometiendo la solución de monómero resultante a la oxidación al aire para formar un enlace disulfuro entre los restos de cisteína protegidos, y luego desprotegiendo y oxidando utilizando yodo para formar un enlace disulfuro entre los restos de cisteína que estaban protegidos anteriormente por Acm.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición para el tratamiento o prevención de un cáncer que comprende el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1. El gen WT1 se expresa a altos niveles en varios cánceres y tumores que incluyen tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y 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 uterino o cáncer ovárico. Por lo tanto, la composición de la presente invención se puede utilizar para el tratamiento o prevención de un cáncer. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra a un sujeto positivo a HLA-A*1101, se inducen CTL específicos de WT1 por el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 o el dímero peptídico WT1 contenido en la composición farmacéutica, y se dañan las células cancerosas en el sujeto por tales CTL.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además del péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1 como ingrediente activo, por ejemplo, un vehículo, un excipiente o similares. El péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1 contenido en la composición farmacéutica de la presente invención induce un CTL específico de WT1. Por lo tanto la composición farmacéutica de la presente invención puede contener un adyuvante adecuado, o se puede administrar con un adyuvante adecuado con el fin de aumentar la eficacia de inducción. Ejemplos de adyuvantes preferibles incluyen, pero no se limitan a, adyuvante completo o incompleto de Freund e hidróxido de aluminio.

El método de administración de la composición de la presente invención se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de las condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral. La cantidad del péptido o dímero peptídico contenido en la composición farmacéutica de la presente invención, así como la forma de

dosificación, el número de veces de administración y similares de la composición farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar adecuadamente dependiendo de las condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. La dosis única del péptido es habitualmente, 0,0001 mg - 1000 mg, preferentemente, 0,001 - 1000 mg.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad eficaz del péptido WT1 y/o dímero peptídico WT1 a un sujeto positivo a HLA-A*1101. El cáncer que se va a tratar o prevenir puede ser uno cualquiera, y ejemplos de los mismos incluyen tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y en
10 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 uterino o cáncer ovárico.

15 En un aspecto más, la presente invención se refiere a un método para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que comprende:

- (a) hacer reaccionar un complejo de un péptido WT1 y una molécula de HLA-A*1101 con una muestra del sujeto; y
- 20 (b) determinar la presencia o cantidad de un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra. La muestra de un sujeto puede ser uno cualquiera siempre que haya la posibilidad de que contenga un linfocito. Ejemplos de las muestras incluyen fluidos corporales tales como la sangre o linfa y un tejido. El complejo de un péptido WT1 y una molécula de HLA-A*1101 se puede preparar, por ejemplo, como un tetramero o pentámero utilizando un método conocido por un experto en la técnica tal como un método de biotina-estreptavidina. La presencia o cantidad del CTL que reconoce tal complejo se puede medir por un método conocido por un experto en la
25 técnica. En este aspecto de la presente invención, el complejo se puede marcar. Se puede utilizar como marcador un marcador conocido tal como un marcador fluorescente o un marcador radioactivo. El marcado hace que la determinación de la presencia o cantidad de un CTL sea fácil y rápida.

30 Por lo tanto, la presente invención también proporciona una composición para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo a HLA-A*1101 que comprende un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101.

Además, la presente invención proporciona un kit para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que comprende un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101.
35

En un aspecto más, la presente invención se refiere a un método para la producción de un CTL específico de WT1 utilizando un complejo de un péptido WT1 y una molécula de HLA-A*1101, que comprende:

- (a) hacer reaccionar el complejo con una muestra; y
- 40 (b) obtener un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra. El complejo de un péptido WT1 y una molécula de HLA-A*1101 se ha descrito anteriormente. La muestra puede ser una cualquiera siempre que haya la posibilidad de que contenga un linfocito. Ejemplos de las muestras incluyen una muestra de un sujeto tal como sangre, y un cultivo celular. El CTL que reconoce el complejo se puede obtener utilizando un método que conoce un experto en la técnica tal como FACS o MACS. La presente invención permite cultivar el CTL específico de
45 WT1 y su uso para el tratamiento y prevención de varios cánceres.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un CTL específico de WT1 que se puede obtener por un método para la producción de un CTL específico de WT1 utilizando un complejo de un péptido WT1 y una molécula de HLA-A*1101.
50

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101. El polinucleótido de la presente invención puede ser ADN o ARN. La secuencia de bases del polinucleótido de la presente invención se puede determinar en base a la secuencia de aminoácidos del péptido WT1 restringido a HLA-A*1101. El polinucleótido se puede preparar por un método conocido para la síntesis de ADN o ARN (por
55 ejemplo, un método de síntesis química), un método PCR o similares.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende el polinucleótido. El tipo de vector de expresión, la secuencia que comprende distinta de la secuencia del polinucleótido y similar se puede seleccionar adecuadamente dependiendo del tipo del huésped en el que se va a introducir el vector de expresión de la presente invención, el propósito para que se utiliza, o similares. Es posible tratar o prevenir tumores hematopoyéticos o cánceres sólidos por la administración del vector de expresión de la presente invención en un sujeto positivo a HLA-A*1101 para producir un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 en un organismo vivo e inducir un CTL específico de WT1, y producir un daño en las células del tumor hematopoyético o las células del
60 cáncer sólido en el sujeto.

65 En un aspecto más, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o

prevención de un cáncer, que comprende el polinucleótido o el vector de expresión. La composición, método de administración y similares de la composición de la presente invención en esta aspecto se ha descrito anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer que comprende la administración de una cantidad eficaz del polinucleótido o el vector de expresión a un sujeto positivo a HLA-A*1101. Ejemplos de cánceres que se van a tratar o prevenir incluyen tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y 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 uterino o cáncer ovárico.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula que comprende el vector de expresión. La célula de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, transformando una célula huésped tal como E. coli, levaduras, células de insecto, o células animales con el vector de expresión. El método para la introducción del vector de expresión en una célula huésped se puede seleccionar adecuadamente de entre varios métodos. Cultivando la célula transformada, y recuperando y purificando el péptido WT1 producido, se puede preparar el péptido de la presente invención.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a un CTL específico de WT1, que se induce por el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1. El CTL de la presente invención reconoce un complejo de un péptido WT1 y una molécula de HLA-A*1101. Por lo tanto, el CTL de la presente invención se puede utilizar para dañar específicamente una célula tumoral positiva a HLA-A*1101 y que expresa WT1 a un alto nivel.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de un CTL específico de WT1 a un sujeto positivo a HLA-A*1101. El método de administración del CTL específico de WT1 se puede seleccionar adecuadamente dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración nasal y administración oral.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende el cultivo de una célula mononuclear de sangre periférica en presencia del péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1 para inducir el CTL específico de WT1 a partir de la célula mononuclear de la sangre periférica. El sujeto a partir del que se deriva la célula mononuclear de sangre periférica puede ser uno cualquiera siempre que sea positivo a HLA-A*1101. Cultivando las células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1, se inducen los CTL específicos de WT1 a partir de células precursoras de CTL contenidas en las células mononucleares de sangre periférica. Es posible tratar o prevenir tumores hematopoyéticos o cánceres sólidos en un sujeto positivo a HLA-A*1101 administrando el CTL específico de WT1 obtenido de acuerdo con la presente invención al sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1 como un componente esencial. Preferentemente, el kit se utiliza en el método para la inducción de un CTL específico de WT1. El kit de la presente invención puede comprender además del péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1, por ejemplo, un medio para obtener una célula mononuclear de sangre periférica, un adyuvante, un matraz de reacción o similares. En general se adjunta un manual de instrucciones al kit. Utilizando el kit de la presente invención, se pueden inducir eficazmente CTL específicos de WT1.

En un aspecto más la presente invención se refiere a una célula presentadora de antígeno (tal como una célula dendrítica) que presenta un péptido WT1 por medio de una molécula HLA-A*1101, que es inducida por el péptido restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico. Utilizando la célula presentadora de antígeno de la presente invención, se inducen CTL específicos de WT1 eficazmente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de células presentadoras de antígeno que presentan un péptido WT1 por medio de una molécula de HLA-A*1101 a un sujeto positivo a HLA-A*1101. El método de administración de la célula presentadora de antígeno se puede seleccionar adecuadamente de condiciones tal como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero no se limitan, la administración intravenosa, administración intradérmica, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración nasal y administración oral.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 por medio de una molécula de HLA-A*1101, que comprende el cultivo de una célula presentadora de antígeno inmadura en presencia del péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1 para inducir la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 por medio de una molécula de HLA-A*1101 a partir de la célula presentadora de antígeno inmadura. La célula presentadora de antígeno inmadura se refiere a una célula tal como una célula dendrítica inmadura que puede madurar en una célula

presentadora de antígeno. Un sujeto del que se deriva la célula presentadora de antígeno inmadura puede ser uno cualquiera siempre que sea positivo a HLA-A*1101. Debido a que las células presentadoras de antígeno inmaduras están contenidas, por ejemplo, en células mononucleares de sangre periférica, tales células se pueden cultivar en presencia del péptido WT1 y/o el dímero peptídico WT1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 por medio de una molécula de HLA-A*1101, que comprende el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero peptídico WT1 como componente esencial. Preferentemente, el kit se utiliza en el método para la inducción de una célula presentadora de antígeno. Otro componente que va a estar contenido en el kit de la presente invención y similares se han descrito anteriormente. El kit de la presente invención se puede utilizar para inducir eficazmente una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 por medio de una molécula de HLA-A*1101.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo contra un péptido restringido a HLA-A*1101 o un polinucleótido que codifica el péptido. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de un cáncer, que comprende el uso de CTL específicos de WT1, la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 por medio de una molécula de HLA-A*1101, o el anticuerpo contra el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 o un polinucleótido que codifica el péptido. Preferentemente se utiliza el CTL específico de WT1 en el método para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, es posible diagnosticar un cáncer incubando el CTL, la célula presentadora de antígeno o el anticuerpo con una muestra de un sujeto positivo a HLA-A*1101 o administrándolo a un sujeto positivo a HLA-A*1101, y determinando, por ejemplo, la posición, sitio o cantidad del mismo. El CTL, la célula presentadora de antígeno o el anticuerpo pueden estar marcados. Uniendo un marcador, el método para el diagnóstico de la presente invención se puede practicar eficazmente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención en más detalle, pero no se conciben para limitar el ámbito de la misma.

Ejemplo 1: Selección del péptido WT1

Se utilizó el RANKPEP (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>) para seleccionar los WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ y WT1₄₃₆ que tienen una alta capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101 derivados de los péptidos de una proteína WT1 (SEC ID N° 1). Las secuencias de aminoácidos, el número de aminoácidos de la SEC ID N° 1 y los valores de la afinidad con una molécula de HLA-A*1101 de estos péptidos se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Péptido	Número de aminoácidos	Secuencia de aminoácidos	Valor de la afinidad
WT1 ₂₅₁ (SEC ID N° 2)	251-259	AAGSSSSVK	15,18
WT1 ₂₇₉ (SEC ID N° 3)	279-287	PILCGAQYR	11,47
WT1 ₃₁₂ (SEC ID N° 4)	312-320	RSASETSEK	14,96
WT1 ₃₁₃ (SEC ID N° 5)	313-321	SASETSEKR	6,87
WT1 ₃₃₈ (SEC ID N° 6)	338-346	SHLQMHSRK	13,72
WT1 ₃₇₈ (SEC ID N° 7)	378-386	TGVKPFQCK	11,33
WT1 ₃₈₆ (SEC ID N° 8)	386-394	KTCQRKFSR	13,82
WT1 ₄₁₅ (SEC ID N° 9)	415-423	SCRWPSCQK	10,29
WT1 ₄₃₆ (SEC ID N° 10)	436-444	NMHQRNMTK	14,19

Preparación de células B-LCL

Se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por el método de centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque de la sangre periférica que se habían recolectados de donantes sanos positivos a HLA-A*1101. Las PBMC se sembraron entonces en placas de cultivo celular de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 1×10^7 en medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FCS, y se añadieron los sobrenadantes del cultivo de células B95-8 (células que producen el virus EB). Se cultivaron a 37 °C con un 5% de CO₂ durante aproximadamente un mes. Se obtuvieron células B-LCL transformadas con el virus EB, que son células B de células tumorales. Se confirmó que las células B-LCL resultantes no expresaban el gen WT1. Se pulsaron las células B-LCL

incubándolas con 20 µg/ml de WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ o WT1₄₃₆ durante 2 horas, y se radiaron con 80 Gy de radiación. Las células B-LCL resultantes (de aquí en adelante denominadas células B-LCL pulsadas con un péptido WT1) se utilizaron como células presentadoras de antígeno para los experimentos siguientes.

5

Inducción de CTL específicos de WT1

Se cultivaron 3 x 10⁶ PBMC autólogas en una placa de cultivo celular de 24 pocillos en un medio completo (un 45% de RPMI, un 45% de medio AMI-V y un 10% de AB sérica) que contenía 20 µg/ml de WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ o WT1₄₃₆ a 37 °C con un 5% de CO₂ durante una semana para obtener células de respuesta. Se co-cultivaron 2 x 10⁶ de las células de respuesta resultantes con 1 x 10⁶ de las células B-LCL pulsadas con el mismo péptido WT1 en medio completo durante 1 semana (primera estimulación). Las PBMC se co-cultivaron con las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1 tres veces más (segunda a cuarta estimulaciones) bajo condiciones en las que se añadían 20 UI/ml (concentración final) de IL2 de la siguiente manera: segunda estimulación: dos veces día sí día no a partir de 3 días tras el inicio de la estimulación; tercera y cuarta estimulaciones: tres veces a intervalos de un día desde el día después del inicio de la estimulación. Las células resultantes se concentraron utilizando el kit de alimentación en gravedad de columnas de selección negativa (StemSp) de maneja que la proporción de células T positivas a CD8 llegaba aproximadamente al 80%, y se cultivaron con las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1 (quinta estimulación). Las células T positivas a CD8 (CTL) que se obtenían 5 días después de la estimulación final se utilizaron para la medición de la actividad citotóxica.

Actividad citotóxica de CTL

Se midió la actividad citotóxica de los CTL utilizando el ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Las células CTL (de aquí en adelante denominadas células efectoras) se mezclaron en la proporción (relación E/T) de 1:1 a 30:1 en 200 µl de medio con células diana en las que se había incorporado ⁵¹Cr, y se cultivaron en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 37 °C con un 5% de CO₂ durante 4 horas. Se utilizaron las células B-LCL pulsadas con el mismo péptido WT1 que el que se utilizó para la inducción de los CTL (BLCL-P), las células B-LCL sin pulsar con un péptido WT1 (BLCL-NP) se utilizaron como células diana. Tras el cultivo, se recolectaron los sobrenadantes por centrifugación. Se midieron las cantidades de ⁵¹Cr liberado en los sobrenadantes utilizando un contador de centelleo líquido. La actividad citotóxica (%) se determinó utilizando la siguiente fórmula:

(liberación de ⁵¹Cr en el sobrenadante de la muestra - liberación de ⁵¹Cr espontánea) / (liberación de ⁵¹Cr máxima - liberación de ⁵¹Cr espontánea) x 100

donde la liberación de ⁵¹Cr espontánea es la liberación de ⁵¹Cr que se observa cuando las células diana en las que se había incorporado el ⁵¹Cr se cultivaban solas bajo la misma condición, y la liberación de ⁵¹Cr máxima es la liberación de ⁵¹Cr que se observa cuando las células diana en las que se había incorporado el ⁵¹Cr estaban completamente lisadas utilizando un 1% de Triton X-100. Los resultados se muestran en las Fig. 1- 9. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específica (%), y los ejes horizontales representan las relaciones E/T. Las BLCL-P se representan utilizando líneas continuas, y las BLCL-NP se representan utilizando líneas interrumpidas. Se confirmó que los CTL inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ o WT1₄₃₆ dañaban específicamente las BLCL-P que presentaban el péptido WT1 como un complejo con una molécula de HLA-A*1101 en comparación con las BLCL-NP. Los CTL inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, o WT1₃₈₆ se utilizaron para los experimentos adicionales posteriores.

Actividad citotóxica de CTL contra la célula que expresa el WT1 endógenamente

Se determinó la actividad citotóxica de los CTL inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, o WT1₃₈₆ contra B-LCL que expresaban WT1 utilizando el método que se ha descrito anteriormente. Una célula que expresa WT1 se refiere a una B-LCL en la que se ha introducido el gen WT1 humano, y que expresa una proteína WT1 en la célula, y presenta un péptido que consiste en 9 aminoácidos que resultan de su procesamiento con una molécula de HLA-A*1101. Los resultados se muestran en las Figs. 1, 2, 4, 5, y 7. En las figuras, las B-LCL que expresan WT1 se representan utilizando líneas discontinuas. Se confirmó que los CTL inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, o WT1₃₈₆ tienen actividad citotóxica contra células que expresan el gen WT1 endógenamente.

Preparación de un dímero peptídico WT1

Se oxidó al aire una mezcla de 227,5 mg del monómero peptídico WT1₃₇₈, 227,5 mg de N-metilglucamina (NMG) y 23 ml de agua agitando a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 días. A la mezcla resultante, se añadió una solución acuosa de 2 g de acetato sódico en 5 ml de agua y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos. A la solución resultante, se añadieron 200 ml de agua y aproximadamente 200 ml de acetonitrilo, y la mezcla se filtró a través de un embudo Kiriya (papel de filtro N° 5C) y se lavó con agua (aproximadamente 50 ml x 3). Al residuo, se añadieron aproximadamente 200 ml de agua y el residuo se liofilizó para obtener 158 mg del dímero peptídico WT1₃₇₈ en bruto.

Purificación del dímero peptídico WT1 en bruto

Se disolvieron 158 mg de dímero peptídico WT1₃₇₈ en bruto en 9 ml de DMSO y se inyectó en una columna ODS C₁₈ (5 cm Φ x 50 cm L, YMC Co., LTD) unida a una HPLC (Shimadzu, tipo LC8AD) y se equilibró con la solución 1 (H₂O/1% AcOH) utilizando una bomba HPLC. La columna se dejó en reposo durante aproximadamente 30 minutos, y se eluyó con un gradiente de concentración del 0% al 40% de la solución 2 (CH₃CN/1% AcOH) durante 360 minutos. Las fracciones que contenían el dímero peptídico WT1 se recolectaron utilizando un recolector de fracción automático mientras se controlaba la absorbancia UV a 220 nm. Las fracciones recolectadas se combinaron, se inyectaron en una columna ODS C₁₈ (4,6 mm Φ x 25 cm L, YMC Co., LTD.) unida a una HPLC (Hitachi, tipo L-4000) y se equilibró con un 17% de solución 2 y se eluyó con un gradiente de concentración del 0% al 47% de solución 2 durante 30 minutos para obtener 46,6 mg del dímero peptídico WT1₃₇₈ purificado a un tiempo de retención de 20,51 minutos. FAB.MS 2365.0 (valor teórico: 2342.70) Na⁺ F = 0,25%.

Inducción de CTL por el dímero WT1

Se examinaron las capacidades del dímero peptídico WT1₃₇₈, el péptido WT1₃₇₈, el péptido WT1₃₇₈ modificado (G→I) (SEC ID N° 11) y el péptido WT1₃₇₈ modificado (G→V) (SEC ID N° 12) así como el péptido WT1₃₇₉ (SEC ID N° 13, como se desvela en el documento WO 2002/28414) para inducir un CTL utilizando PBMC de los donantes sanos positivos a HLA-A*1101 1-3 de acuerdo con el método que se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en las Figs. 10-14. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específicas (%), y los ejes horizontales representan las relaciones E/T. Las BLCL-P están representadas por líneas continuas y las BCLC-NP se representan utilizando líneas discontinuas. Se confirmó que el dímero peptídico WT1₃₇₈ tiene una capacidad para inducir un CTL. Además, se descubrió que la capacidad para cada péptido WT1₃₇₉ cuya secuencia de aminoácidos es diferente del péptido WT1₃₇₈ por un aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la proteína WT1 para inducir un CTL es mucho menor que la del péptido WT1₃₇₈ y por lo tanto, el péptido WT1 de la presente tiene un efecto excelente e inesperado en comparación con el péptido conocido.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101, un polinucleótido que codifica el péptido, una composición farmacéutica que comprende el mismo y similares. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar en los campos de la medicina y similares, por ejemplo en los campos del desarrollo y preparación de una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de varios tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos que expresan el gen WT1 a altos niveles.

Listado de secuencias del texto libre

SEC ID N° 11: Péptido WT1 modificado

SEC ID N° 12: Péptido WT1 modificado

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.

<120> Péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y composiciones farmacéuticas que comprenden el mismo

<130> 120745ep_46ep

<150> EP 10191234.3

<151> 14-12-2007

<150> EP 07850650.8

<151> 14-12-2007

<150> JP 2006-355356

<151> 28-12-2006

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1           5           10           15

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

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

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

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg
1 5

5

<210> 4

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
1 5

15

<210> 5

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 5

Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg
1 5

25

<210> 6

$\langle 211 \rangle$ 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 6

Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys
1 5

35

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

40

Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
1 5

45

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg
1 5

50

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys
1 5

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

<400> 10

Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys
1 5

15

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Péptido WT1 modificado

<400> 11

Thr Ile Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
1 5

25

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

30

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido WT1 modificado

35

<400> 12

Thr Val Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
1 5

40

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

45

Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que comprende un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5, en la que se sustituye un aminoácido con otro aminoácido,

donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL.

2. El uso de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5, en la que se sustituye un aminoácido con otro aminoácido,

donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL, para preparar un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101.

3. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que comprende un polinucleótido que codifica un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5, en la que se sustituye un aminoácido con otro aminoácido,

donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL, o un vector que comprende dicho polinucleótido.

4. El uso de un polinucleótido que codifica un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5, en la que se sustituye un aminoácido con otro aminoácido.

donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL, o un vector que comprende dicho polinucleótido, para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101.

5. Un método para la inducción de un CTL específico de WT1 que es adecuado para el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, donde el método comprende el cultivo de una célula mononuclear de sangre periférica que se obtiene de un sujeto positivo a HLA-A*1101 en presencia de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5, en la que se sustituye un aminoácido con otro aminoácido,

donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL, para inducir un CTL específico de WT1 a partir de la célula mononuclear de sangre periférica.

6. Un CTL específico de WT1 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que se puede obtener por el método de la reivindicación 5.

7. Un método para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 y que es adecuado para el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, donde el método comprende el cultivo de una célula presentadora de antígeno inmadura que se obtiene de un sujeto positivo a HLA-A*1101 en presencia de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 5, en la que se sustituye un aminoácido con otro aminoácido.

5 donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un CTL, para inducir la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a partir de la célula presentadora de antígeno inmadura.

10 8. Una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que se puede obtener *in vitro* por el método de la reivindicación 7.

9. Un método para el diagnóstico de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que comprende la utilización del CTL de acuerdo con la reivindicación 6 o la célula presentadora de antígeno de acuerdo con la reivindicación 8.

Fig. 1

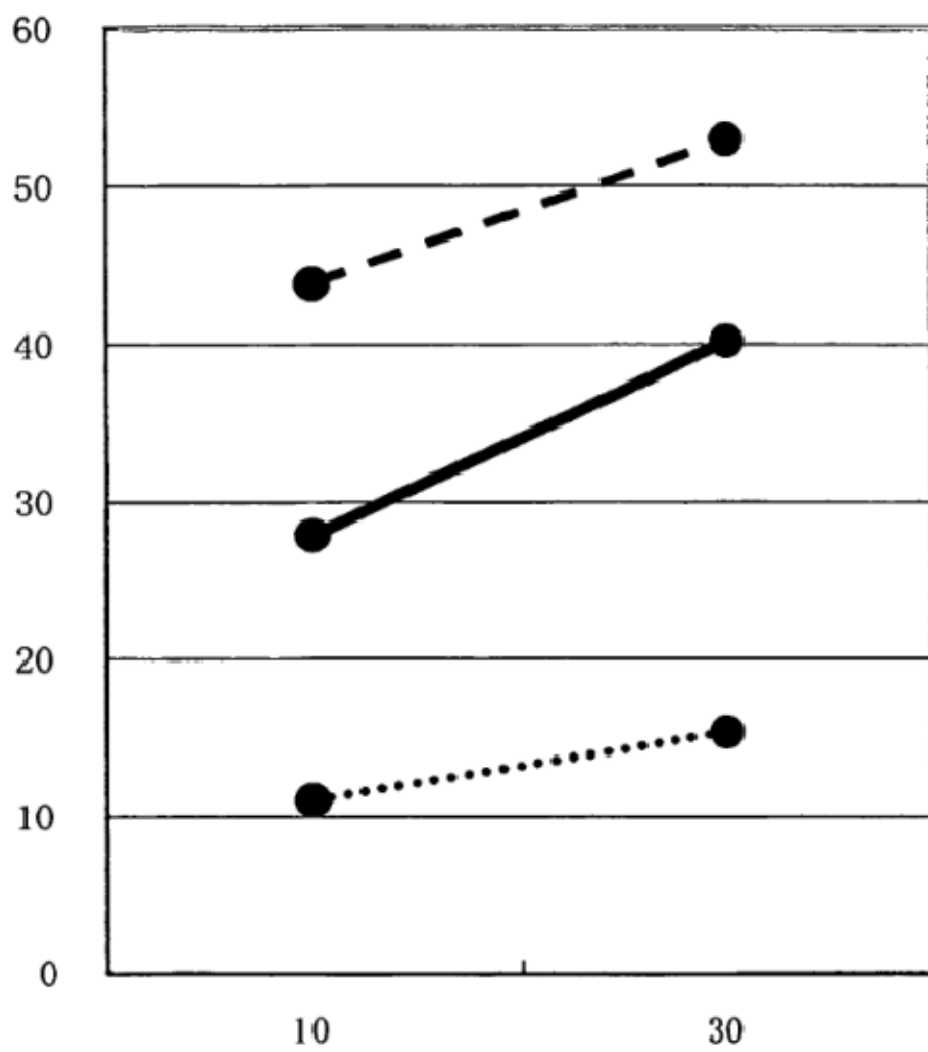


Fig. 2

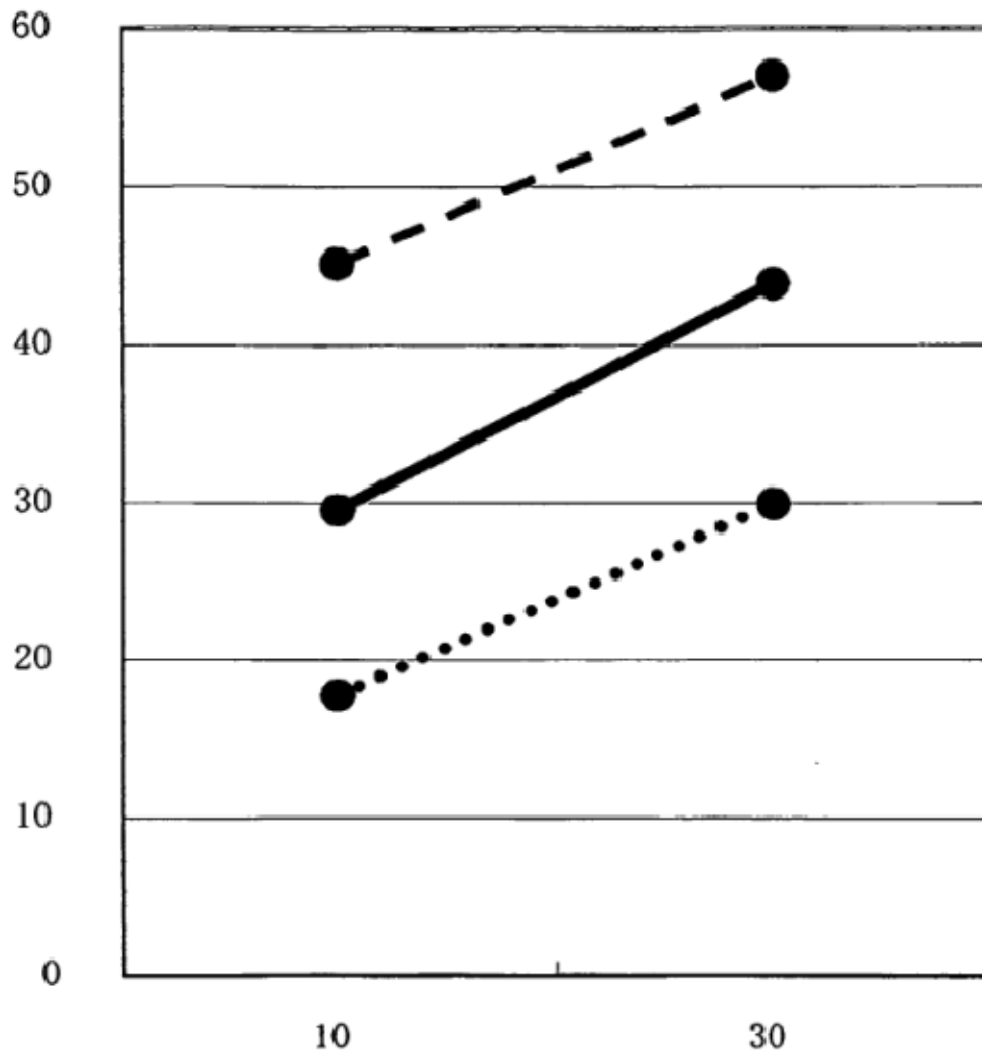


Fig. 3

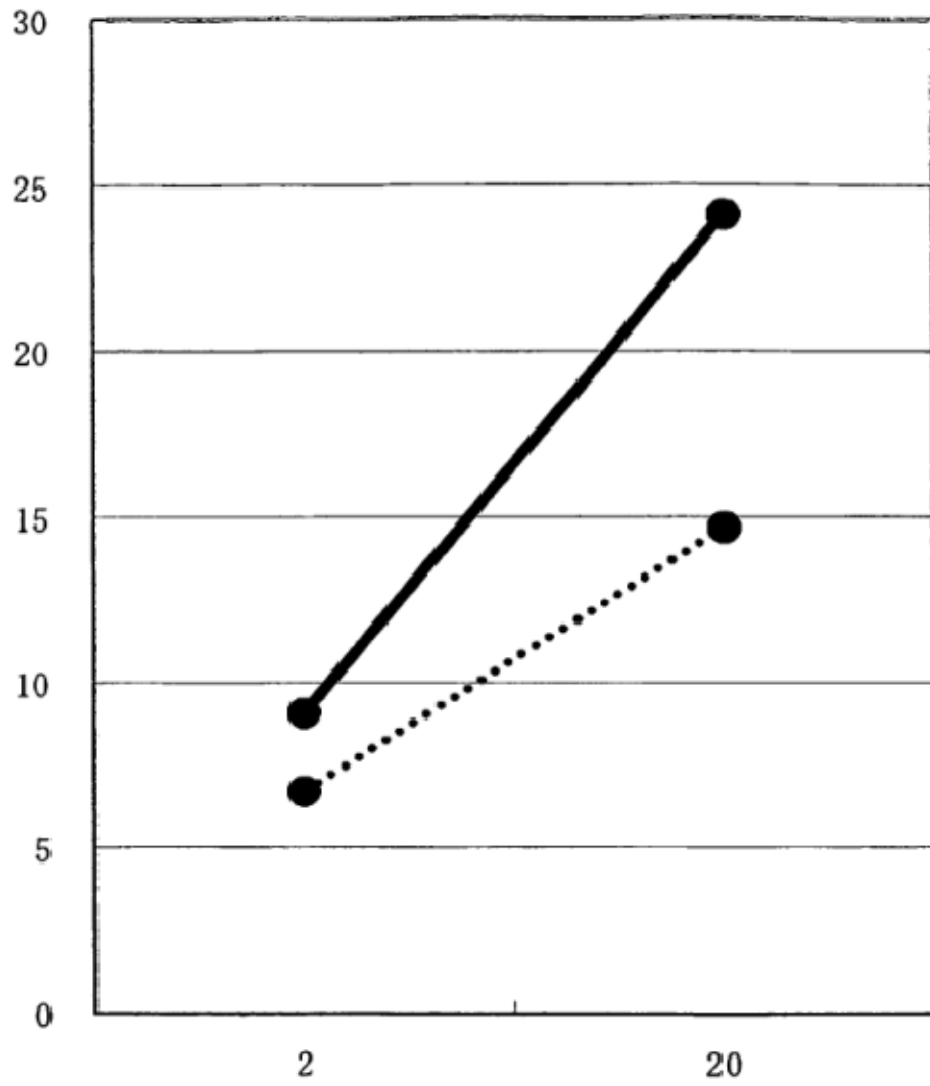


Fig. 4

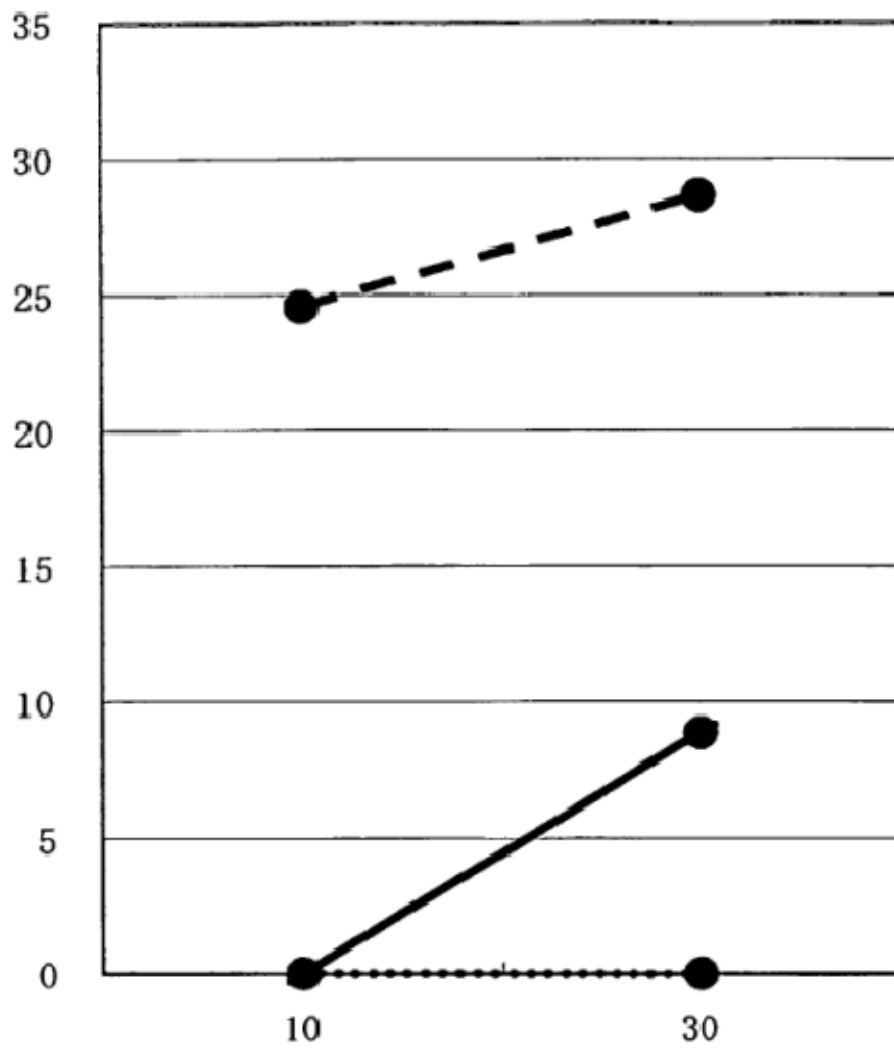


Fig. 5

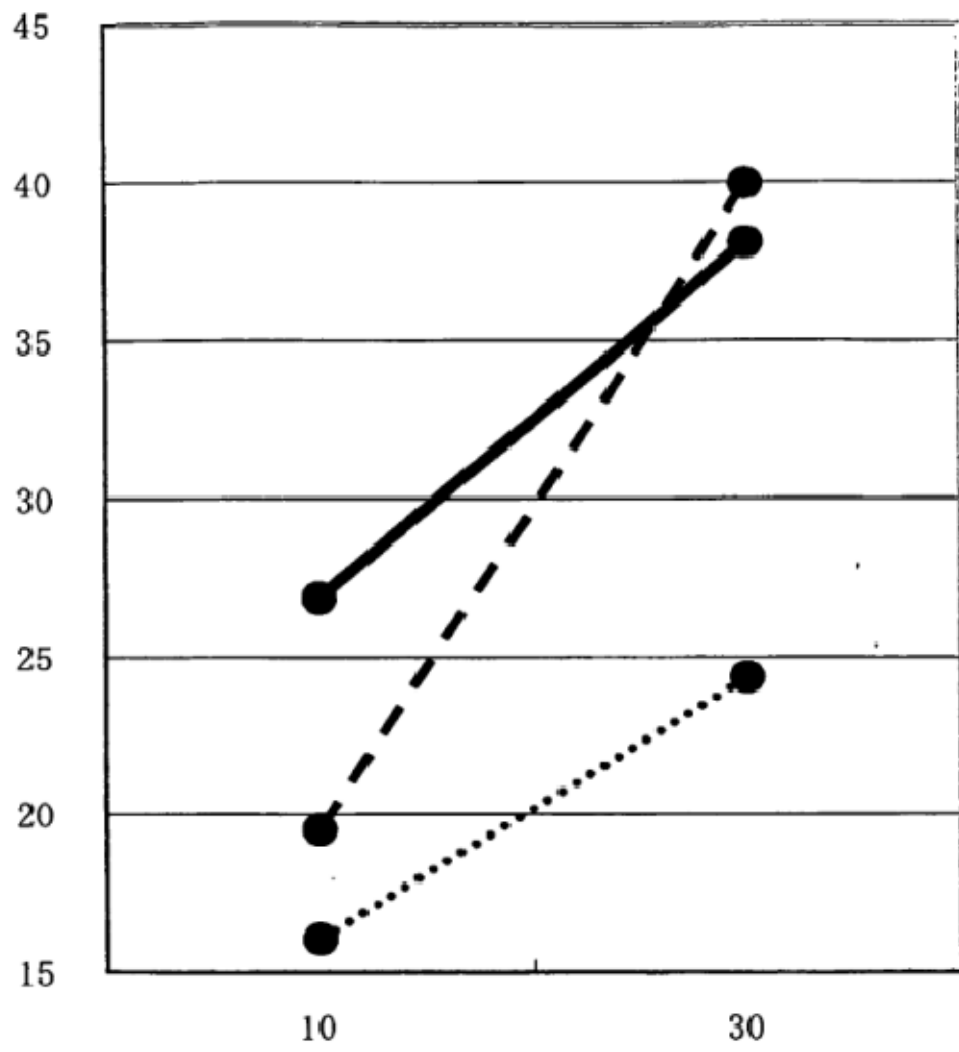


Fig. 6

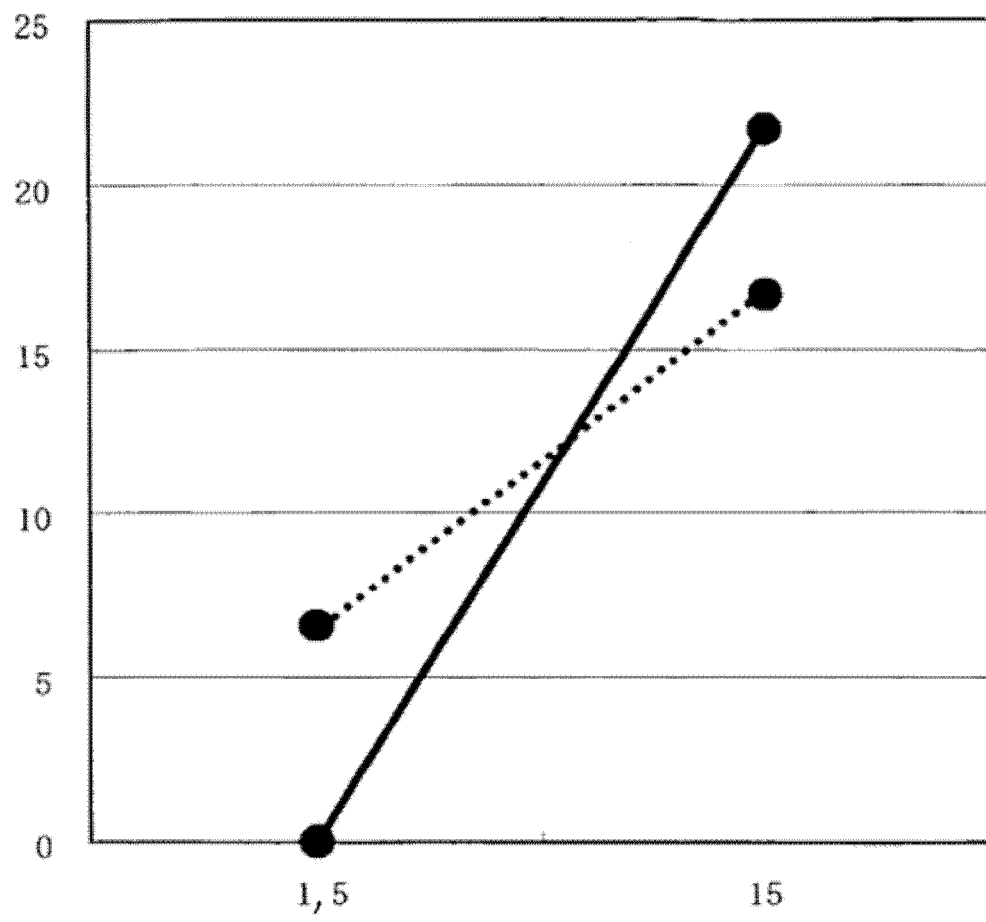


Fig. 7

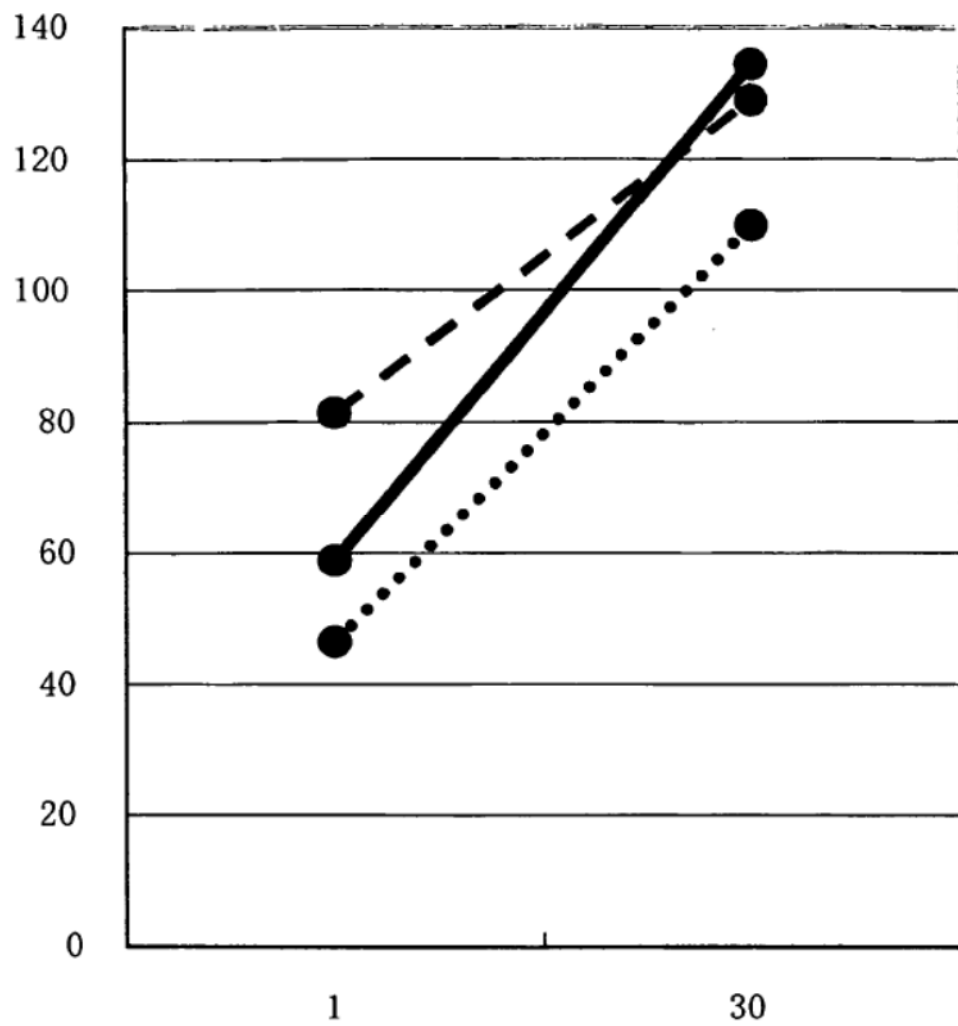


Fig. 8

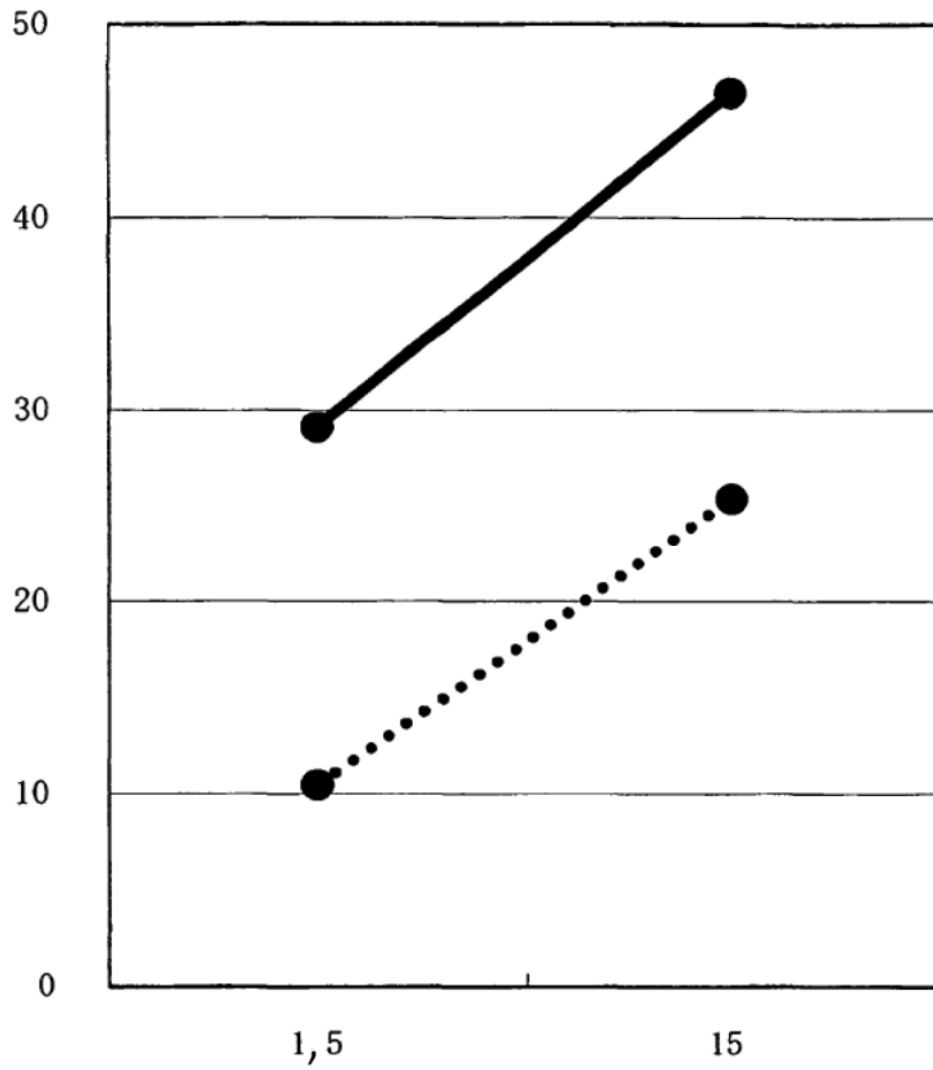


Fig. 9

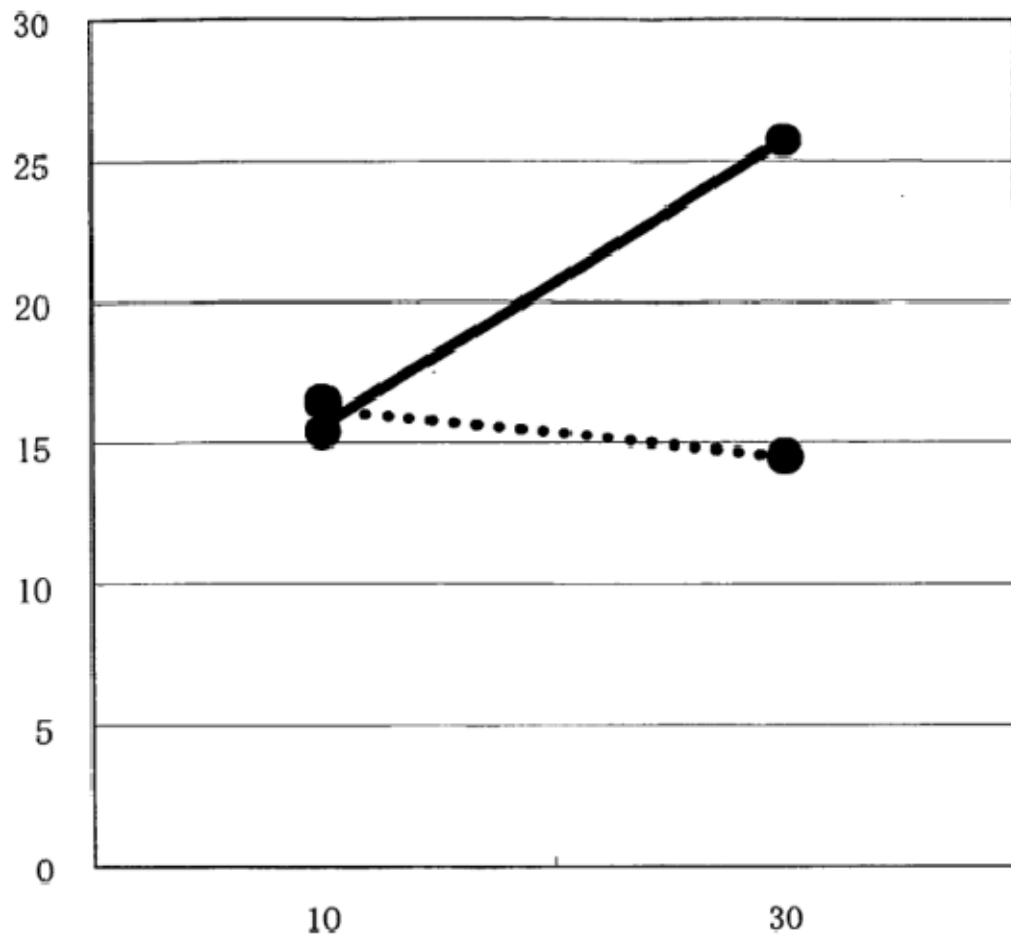


Fig. 10

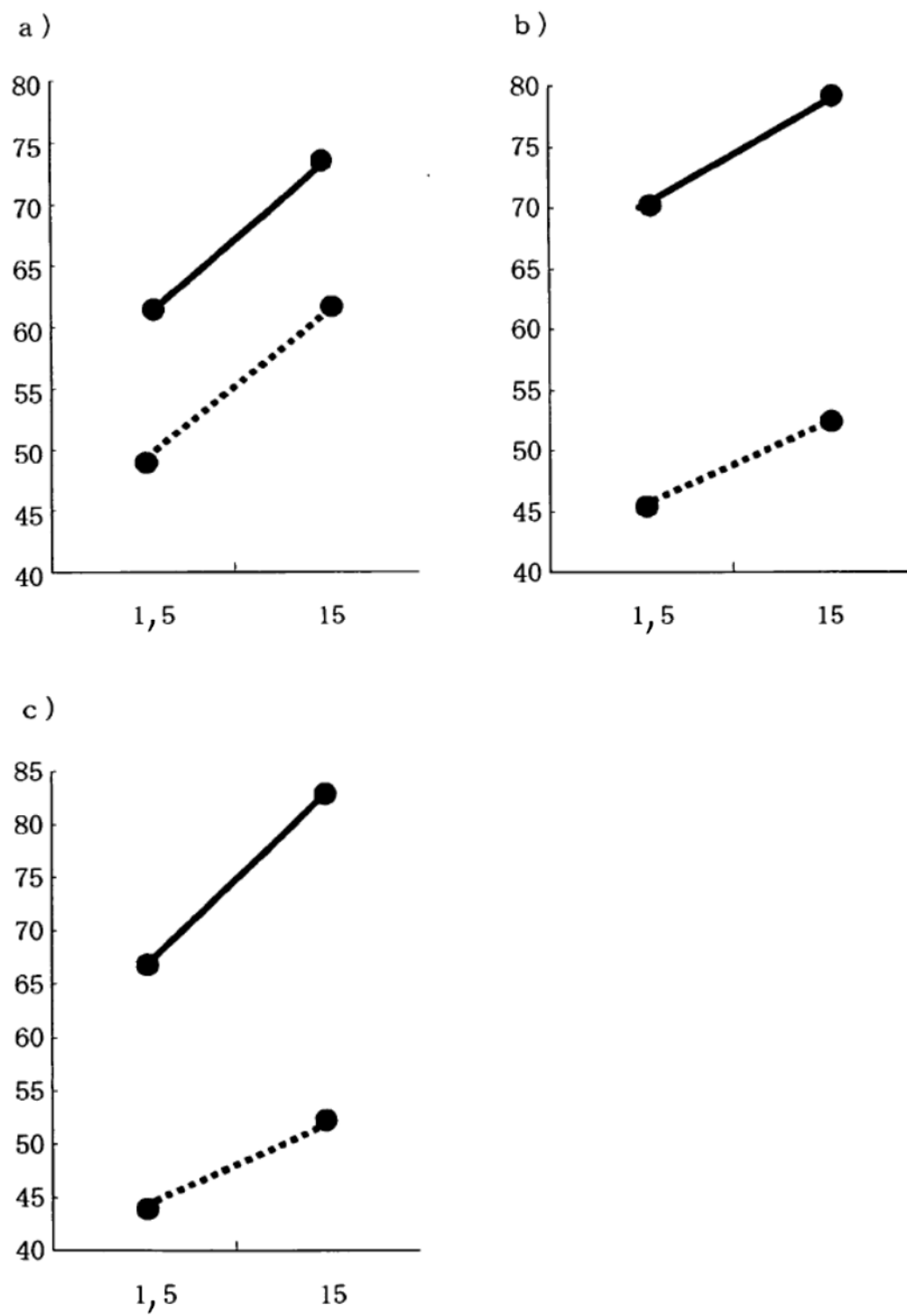


Fig. 11

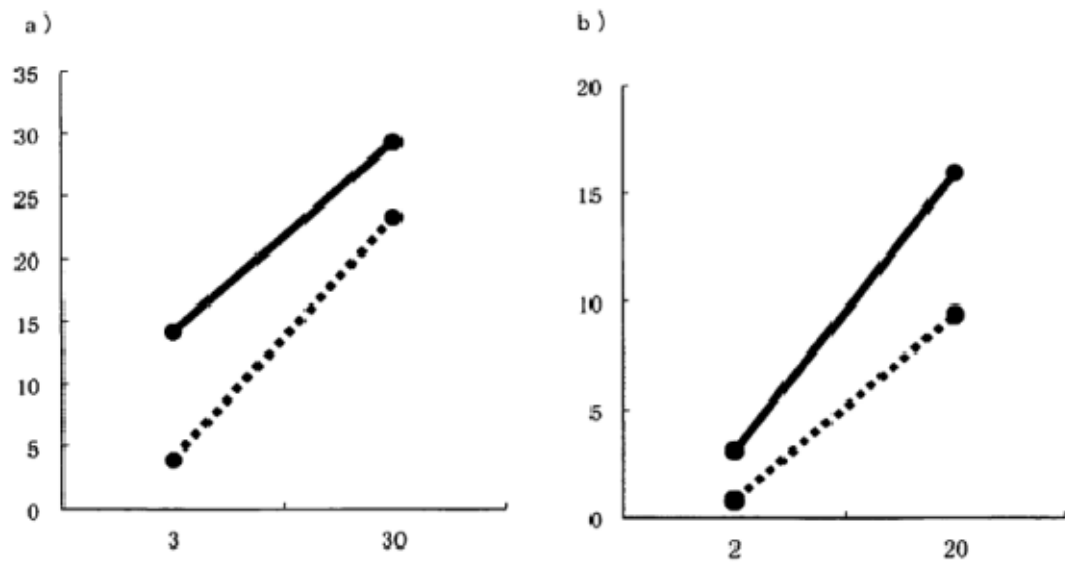
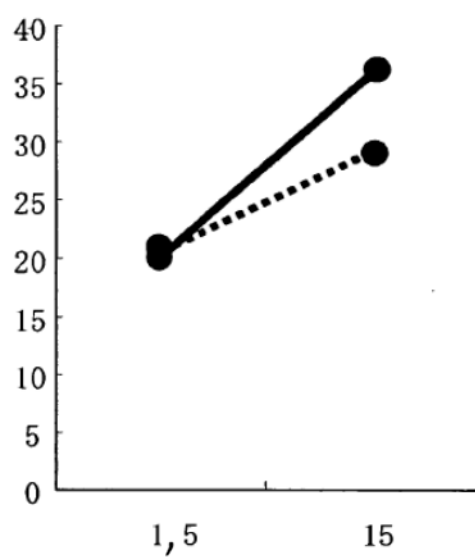
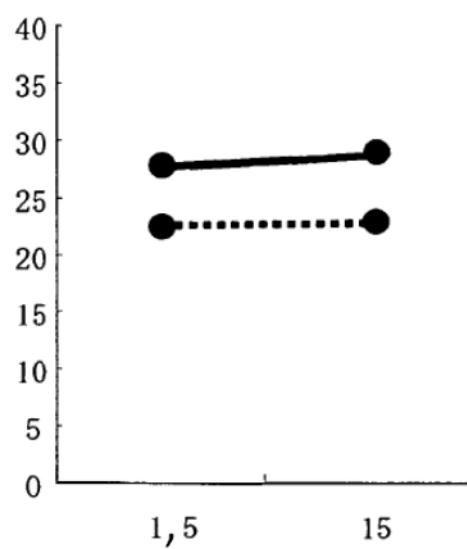


Fig. 12

a)



b)



c)

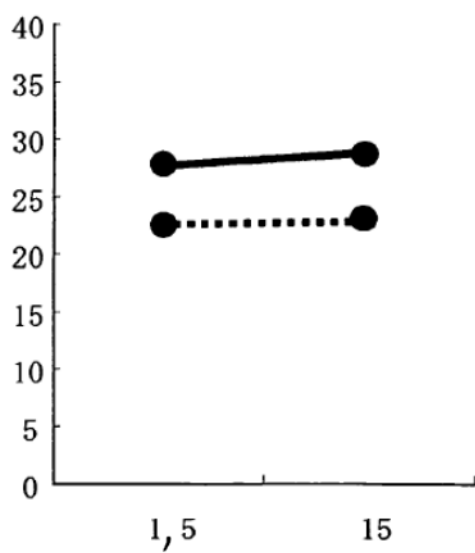


Fig. 13

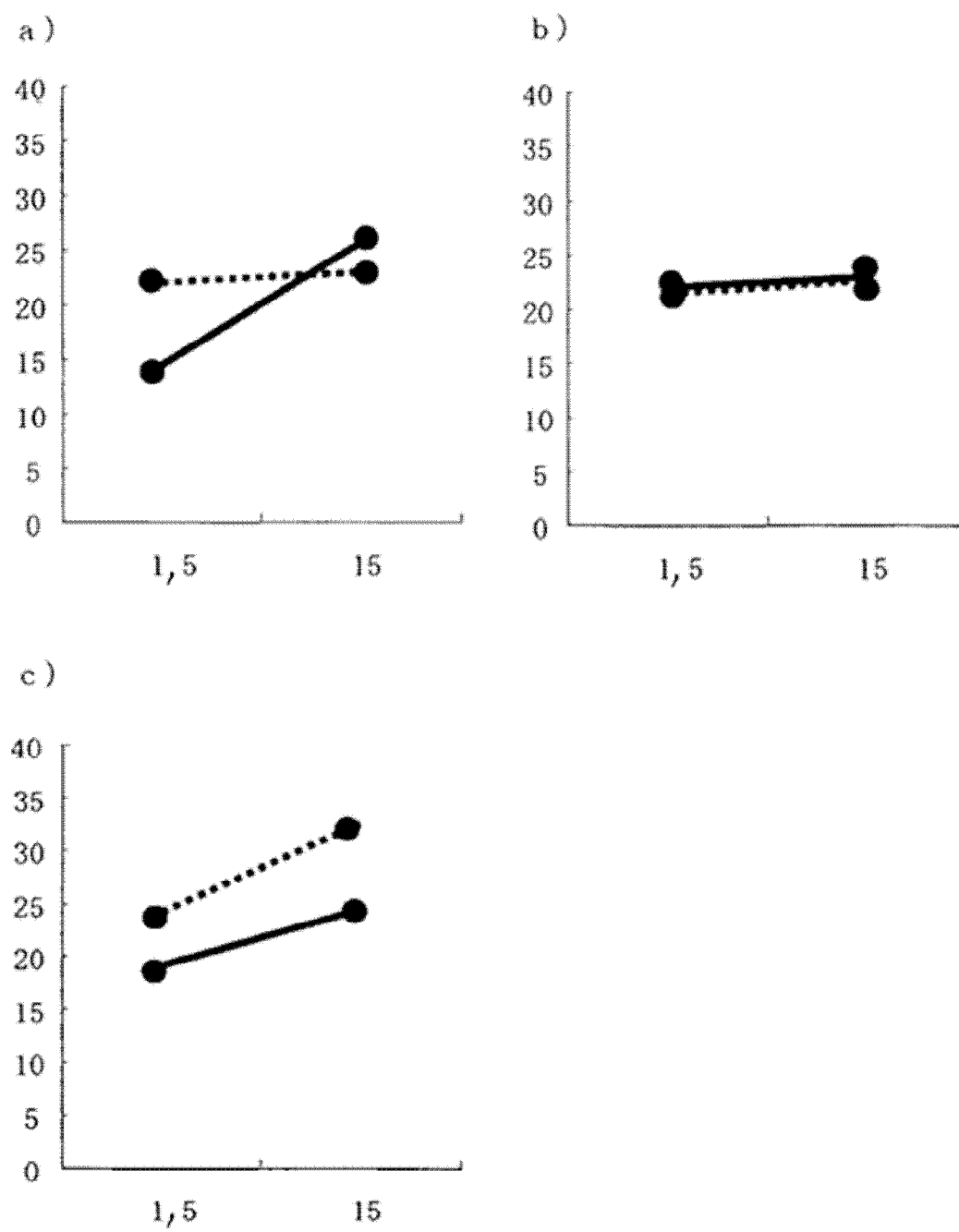


Fig. 14

