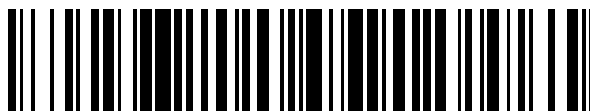


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 831**

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 12164856 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015** **EP 2479276**

54 Título: **Péptido de WT1 restringido a HLA-A*1101 y composiciones farmacéuticas que contienen al mismo**

30 Prioridad:

28.12.2006 JP 2006355356

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

20.01.2016

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 2 556 831 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 de WT1 restringido a HLA-A*1101 y composiciones farmacéuticas que contienen al mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un péptido de WT1 restringido a HLA-A*1101, específicamente 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 de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un LTC. La presente invención también se refiere a un dímero de péptido que tiene la capacidad de inducir un LTC, donde se unen entre sí mediante un enlace disulfuro dos monómeros de péptido que 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. Además, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica al péptido, a una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer que contiene al 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 de patente 1 y 2). WT1 es un factor de transcripción que tiene una estructura de dedo de cinc. Inicialmente, el gen WT1 se consideró un gen supresor de tumores. Sin embargo, estudios posteriores (Documentos no de patente 3, 4, 4 y 6) demostraron que el gen WT1 sin embargo funciona como un oncogén en tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos.

El gen WT1 se expresa a altos niveles en muchos tipos de tumores malignos. Por tanto, se ha examinado si el producto génico de WT1 libre de mutaciones, que es una proteína autóloga, tiene inmunogenicidad en un organismo vivo o no. Los resultados revelaron que la proteína derivada del gen WT1 que se expresa a altos niveles en células tumorales se fragmenta a lo largo del procesamiento intracelular, los péptidos resultantes forman complejos con moléculas de clase I del CMH, y los complejos se presentan sobre la superficie de células, y que los LTC que reconocen dichos complejos pueden inducirse mediante vacunación con péptido (Documentos no de patente 7, 8 y 9). También se demostró que en un ratón inmunizado con un péptido de WT1 o un ADNc de WT1, las células tumorales trasplantadas que expresan un gen WT1 se rechazan con una elevada probabilidad (Documentos no de patente 7 y 10), mientras que los tejidos normales que expresan fisiológicamente el gen WT1 no se dañan por los LTC inducidos (Documento no patente 7). Se demostró en experimentos *in vitro* usando células humanas que cuando se usa péptido Db126 o péptido WH187 (aminoácidos 187-195 de SEC ID N°: 1, SLGEQQYSV) que tienen una gran capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*0201, que es una de las moléculas de clase I de CMH humano, para estimular células mononucleadas de sangre periférica que tienen HLA-A*0201, se inducen LTC específicos de WT1, los LTC tienen una actividad citotóxica específica para células tumorales que expresan un gen WT1 de manera endógena a elevados niveles, y la actividad citotóxica de dichos LTC está restringida a HLA-A2 (Documento no de patente 11). Se demostró en experimentos *in vitro* en células humanas usando péptido de WT1 que se empareja con HLA-A*2402 (que se encuentra con más frecuencia en japoneses entre los alelos de HLA-A) (WT1235; aminoácidos 235-243 de SEC ID N°: 1, CMTWNQMNL) que se inducen LTC específicos de WT1 (TAK-1) (Documento no de patente 12), y que los LTC inducidos no suprimen la actividad formadora de colonias de células madre hematopoyéticas normales que expresan fisiológicamente de manera parcial un gen WT1 (Documentos no de Patente 12 y 13). Estos informes sugieren con fuerza que no solo en ratones, sino también en seres humanos, pueden inducirse LTC específicos de WT1, que dichos LTC tienen una actividad citotóxica contra células tumorales que expresan un gen WT1 a altos niveles, pero que no tienen una actividad citotóxica contra células normales que expresan de manera fisiológica un gen WT1 (Documentos no de patente 7, 10, 11, 12 y 13).

El producto génico de WT1 está presente como una proteína nuclear, y se procesa por proteasomas en el citoplasma para fragmentarse en péptidos. Los péptidos fragmentados se transportan al lumen del retículo endoplásmico mediante moléculas TAP (transportador asociado con procesamiento de antígenos), forman complejos con moléculas de clase I del CMH, y se presentan sobre la superficie de las células. Los LTC específicos de WT1 se inducen como resultado del reconocimiento de los complejos péptido de WT1-molécula de clase I de CMH mediante células precursoras de LTC a través de TCR, por tanto ejerciendo un efecto citotóxico en células tumorales que presentan un producto génico de WT1 a través de moléculas de clase I de CMH (Documentos no de patente 7, 8 y 9). Por tanto, se necesita que al menos que un péptido de WT1 usado en inmunoterapia contra el cáncer que se dirija a un producto génico de WT1 esté en la forma que se une a una molécula de clase I de CMH en un organismo vivo. Sin embargo, las moléculas de clase I de CMH son diversas y las secuencias de los péptidos de WT1 que se unen a las moléculas de clase I de CMH respectivas son diferentes entre sí. Por lo tanto, se necesita proporcionar un péptido que se empareje a cada subtipo de la clase I de CMH. Sin embargo, solo se conocen péptidos restringidos a la molécula de HLA-A*2402, la molécula de HLA-A*0201, la molécula de HLA-A*2601 y a la molécula de HLA-A*3303 como péptidos de WT1 restringidos a molécula de HLA hasta la fecha (Documento de Patente 1, Documento no de patente 11, Documento de Patente 2 y Documento de Patente 3, respectivamente). Por consiguiente, hay una necesidad de encontrar un péptido de WT1 restringido a HLA-A*1101.

Documento de Patente 1: WO 2003/106682
 Documento de Patente 2: WO 2005/095598
 Documento de Patente 3: Solicitud de Patente Japonesa N° 2006-45287,
 Documento no de patente 1: Daniel A. Haber et al., Cell. 29 de junio de 1990; 61(7): 1257-69).
 Documento no de patente 2: Call KM et al., Cell. 9 de febrero de 1990; 60(3): 509-20).
 Documento no de patente 3: Menke AL et al., Int Rev Cytol. 1998; 181:151-212. Review.
 Documento no de patente 4: Yamagami T et al., Blood. 1 de abril de 1996; 87(7): 2878-84).
 Documento no de patente 5: Inoue K et al., Blood. 15 de abril de 1998; 91(8): 2969-76).
 Documento no de patente 6: Tsuboi A et al., Leuk Res. mayo de 1999; 23(5): 499-505).
 Documento no de patente 7: Oka Y et al., J Immunol. 15 de febrero de 2000; 164(4): 1873-80).
 Documento no de patente 8: Melief CJ et al., Immunol Rev. junio de 1995; 145:167-77.
 Documento no de patente 9: Ritz J, J Clin Oncol. febrero de 1994; 12(2): 237-8).
 Documento no de patente 10: Tsuboi A et al., J Clin Immunol. mayo de 2000; 20(3): 195-202).
 Documento no de patente 11: Oka Y et al., Immunogenetics. febrero de 2000; 51(2): 99-107).
 Documento no de patente 12: Ohminami H et al., Blood. 1 de enero de 2000; 95(1): 286-93).
 Documento no de patente 13: Gao L et al., Blood. 1 de abril de 2000; 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 está restringido a una molécula de HLA-A*1101 y comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de WT1, y un polinucleótido que codifica al mismo, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer, que comprenda al mismo.

Medios para resolver los problemas

Como resultado de estudios intensivos a la vista de la situación descrita anteriormente, el presente inventor ha descubierto que entre péptidos que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína de WT1, los péptidos, teniendo cada uno una capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101 pueden inducir un LTC específico de WT1 con un alto rendimiento. Por consiguiente, se ha completado la presente invención.

La presente invención proporciona:

(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 de (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N°: 3), (2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, en la que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido, en la que el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un LTC;

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

(1) una secuencia de aminoácidos de Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N°: 3), (2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en al que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido, en la que el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un LTC, para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención 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 a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de (1) o (2)

(1) una secuencia de aminoácidos de Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N°: 3), (2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en al que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido, en la que el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un LTC, o un vector que comprenda a dicho polinucleótido;

(4) el uso de un polinucleótido que codifica a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N°: 3), (2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en la que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido, en la que el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un LTC, o un vector que comprende a 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 LTC específico de WT1 que sea adecuado para el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, donde el método comprende cultivar una célula mononuclear de sangre periférica obtenida de un sujeto positivo a HLA-A*1101 en presencia de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N°: 3), (2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en la que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido, en la que el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un LTC, para inducir el LTC específico de WT1 a partir de la célula mononuclear de sangre periférica;

(6) un LTC específico de WT1 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que puede obtenerse mediante el método de (5) anterior;

(7) un método para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 y que es adecuada para el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, donde el método comprende cultivar una célula presentadora de antígenos inmadura obtenida de un sujeto positivo a HLA-A*1101 en presencia de un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos de Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N°: 3), (2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en la que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido, en la que el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad de inducir un LTC, para inducir a la célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 a partir de la célula presentadora de antígenos inmadura;

(8) una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que puede obtenerse *in vitro* mediante el método de (7) anterior;

(9) un método para el diagnóstico de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que comprende el uso del LTC de acuerdo con la reivindicación 6 o la célula presentadora de antígenos de acuerdo con (8) anterior.

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 de WT1, y un polinucleótido que codifica al mismo, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer, que comprenda al mismo. Por lo tanto, es posible inducir *in vivo* e *in vitro* LTC específicos de WT1 en sujetos que tienen HLA-A*1101. Debido a que la frecuencia de HLA-A*1101 positivos en japoneses es elevada (aproximadamente un 17,9 %), los LTC específicos de WT1 pueden inducirse en una amplia variedad de sujetos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con WT1₂₅₁.

La Fig. 2 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con WT1₂₇₉.

La Fig. 3 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con WT1₃₁₂.

La Fig. 4 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con WT1₃₁₃.

La Fig. 5 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con WT1₃₃₈.

La Fig. 6 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con WT1₃₇₈.

La Fig. 7 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con WT1₃₈₆.

La Fig. 8 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con WT1₄₁₅.

La Fig. 9 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con WT1₄₃₆.

La Fig. 10 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con péptido WT1₃₇₈ (a, b y c representan las actividades citotóxicas observadas usando CMSP de los donantes sanos 1, 2 y 3 positivos a HLA-A*1101, respectivamente).

La Fig. 11 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con dímero peptídico WT1₃₇₈ (a, b y c representan las actividades citotóxicas observadas usando CMSP de los donantes sanos 1 y 2 positivos a HLA-A*1101, respectivamente).

La Fig. 12 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con péptido WT1₃₇₈ modificado (G → I) (a, b y c representan las actividades citotóxicas observadas usando CMSP de los donantes sanos 1, 2 y 3 positivos a HLA-A*1101, respectivamente).

La Fig. 13 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con péptido WT1₃₇₈ modificado (G → V) (a, b y c representan las actividades citotóxicas observadas usando CMSP de los donantes sanos 1, 2 y 3 positivos a

HLA-A*1101, respectivamente).

La Fig. 14 representa la actividad citotóxica del LTC inducido con péptido WT1₃₇₉ (a, b y c representan las actividades citotóxicas observadas usando CMSP de los donantes sanos 1, 2 y 3 positivos a HLA-A*1101, respectivamente).

5

Mejor modo de realización de 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 de HLA-A*1101, y tiene la capacidad para inducir un LTC (citado en el presente documento también como un "péptido de WT1"). La secuencia de aminoácidos de la proteína WT1 humana se muestra en la SEC ID N°: 1. El péptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 1. Cuando el péptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que comprende cisteína(s), es la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3, tal como se describe más adelante, la estabilidad puede aumentarse sustituyendo la cisteína (o las cisteínas) en 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 (o de las cisteínas) con un grupo protector conocido en la técnica (por ejemplo, un grupo carboximetilo o piridiletilo). El péptido de la presente invención es un péptido antigénico de cáncer que puede inducir un LTC como resultado de la presentación, por una célula presentadora de antígenos, de un péptido generado mediante el procesamiento del péptido de la presente invención en una célula.

Como se ha descrito anteriormente, es un objeto de la presente invención obtener un péptido restringido a HLA-A*1101. Por consiguiente, el péptido de la presente invención tiene una capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101. La capacidad de unión puede determinarse mediante un método conocido en la materia. Los ejemplos de dichos métodos incluyen un método basado en ordenador, tal como Rankpep, BIMAS o SYFPEITHI, y un ensayo de unión competitiva con un péptido conocido que tiene una capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101. Por ejemplo, la capacidad para unirse determinada puede compararse con aquella de un péptido restringido a HLA-A*1101 conocido para juzgar si el péptido de la presente invención tiene una capacidad para unirse, o no. Los ejemplos de péptidos que tienen una capacidad para unirse de acuerdo con la presente invención incluyen un péptido cuya puntuación de afinidad para una molécula de HLA-A*1101, determinada mediante el método descrito en el ejemplo 1, es 4 o más, preferentemente 5 o más, más preferentemente 6 o más.

El péptido de la presente invención además tiene la capacidad para inducir a un LTC. 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 cánceres sólidos, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de cuello de útero o cáncer de ovarios. Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede inducir a un LTC con un alto rendimiento en un sujeto que padezca una de dichas enfermedades. La capacidad para inducir a un LTC se refiere a una capacidad para inducir a un LTC *in vivo* o *in vitro*. Dicha capacidad puede determinarse usando un método general, tal como un método donde se determina una actividad citotóxica de un LTC usando un ensayo de liberación de Cr.

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

La secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos comprendida en el péptido de la presente invención es preferentemente Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N°: 3). Además, puede tener una sustitución de un aminoácido por otros aminoácidos en los nueve aminoácidos. Uno cualquiera de los 9 aminoácidos o los otros aminoácidos sustituidos pueden modificarse de manera adecuada. En cualquier caso, el péptido de la presente invención mantiene una capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101.

Tal como se ha descrito anteriormente, el péptido de la presente invención puede ser uno cualquiera siempre que comprenda una secuencia de aminoácidos que proceda de una proteína WT1 y que consista en 9 aminoácidos contiguos. Por lo tanto, el péptido de la presente invención puede ser, por ejemplo, un péptido que consiste únicamente en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 3.

Pueden unirse diversas sustancias al extremo N-terminal y/o al extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos en el péptido de la presente invención. Por ejemplo, puede unirse un aminoácido, un péptido o un análogo de los mismos. Si dicha sustancia se une al péptido de la presente invención, la sustancia puede procesarse, por ejemplo, por una enzima en un organismo vivo o mediante un proceso tal como procesado intracelular, y finalmente la secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos puede producirse y presentarse como un complejo con una molécula de HLA-A*1101 sobre la superficie de una célula, dando lugar de este modo al efecto de inducción de un LTC. La sustancia puede ser una sustancia que module la solubilidad del péptido de la presente invención, o que aumente su estabilidad (resistencia a proteasas, etc). Como alternativa, puede ser una sustancia que suministre el péptido de la presente invención de manera específica, por

ejemplo, a un tejido u órgano determinado, o puede tener una acción para aumentar la eficacia de la captación por una célula presentadora de antígenos o similares. La sustancia puede ser una sustancia que aumente la capacidad para producir un LTC, tal como un péptido auxiliar o similares.

El péptido de la presente invención puede sintetizarse mediante métodos usados generalmente en la técnica o modificaciones de los mismos. Dichos métodos se describen, por ejemplo, en Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966 ; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., Nueva 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 también puede prepararse usando técnicas de ingeniería genética basándose en la información referente la secuencia de nucleótidos que codifica al péptido de la presente invención. Dichas técnicas de ingeniería genética son bien conocidas para un experto en la materia.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un dímero peptídico que tiene una capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*101 y que tiene una capacidad para inducir a un LTC, donde dos monómeros peptídicos comprendiendo cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína de WT1 y comprendiendo al menos un resto de cisteína se unen entre sí mediante un enlace disulfuro (en lo sucesivo citado como "dímero peptídico de WT1"). La estabilidad del dímero peptídico de la presente invención aumenta en comparación con la del monómero peptídico formando un dímero. El dímero peptídico de la presente invención es un dímero peptídico antígeno tumoral que puede inducir a un LTC como resultado de la presentación por medio de una célula presentadora de antígenos, de un péptido generado mediante el procesamiento del péptido de la presente invención en una célula.

EL dímero peptídico de la presente invención se forma uniendo dos monómeros peptídicos mediante un enlace disulfuro entre restos de cisteína presentes en los monómeros. Por consiguiente, cada uno de los monómeros peptídicos comprendidos en el dímero peptídico de WT1 de la presente invención es el péptido de WT1 tal como se describe anteriormente y comprende al menos un resto de cisteína. El dímero peptídico de WT1 de la presente invención puede ser un homodímero o un heterodímero.

En el dímero peptídico de la presente invención, la secuencia de aminoácidos comprendida por el monómero peptídico comprende preferentemente Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N°: 3).

El dímero peptídico de WT1 de la presente invención puede prepararse usando un método conocido en la técnica. Por ejemplo, si los monómeros peptídicos comprenden un par de restos de cisteína, el dímero peptídico de WT1 de la presente invención puede prepararse, por ejemplo, eliminando todos los grupos protectores, incluyendo aquellos en las cadenas laterales de cisteína, y después sometiendo a la solución de monómero resultante a oxidación al aire en condiciones alcalinas, o añadiendo un oxidante en condiciones alcalinas o ácidas para formar un enlace disulfuro. Los ejemplos de oxidantes incluyen yodo, dimetilsulfóxido (DMSO) y ferrocianato de potasio.

Cuando cada uno de los monómeros peptídicos comprende dos o más restos de cisteína, el dímero peptídico de WT1 de la presente invención también puede prepararse mediante el método descrito anteriormente. En este caso, se obtienen isómeros debido a los diferentes tipos de enlaces disulfuro. Como alternativa, el dímero peptídico de WT1 de la presente invención puede prepararse seleccionando una combinación de grupos protectores para las cadenas laterales de cisteína. Los ejemplos de las combinaciones de grupos protectores incluyen combinaciones de grupo MeBzl (metilbencilo) y grupo Acm (acetamidometilo), grupo Trt (trilito) y grupo Acm, grupo Npys (3-nitro-2-piridiltio) y grupo Acm, y grupo S-Bu-t (S-*terc*-butilo) y grupo Acm. Por ejemplo, en el caso de la combinación de grupo MeBzl y grupo Acm, el dímero peptídico puede prepararse eliminando los grupos protectores distintos del grupo MeBzl y el grupo protector en la cadena lateral de cisteína, sometiendo a la solución de monómero resultante a oxidación al aire para formar un enlace disulfuro entre los restos de cisteína protegidos, y después desproteger y oxidar usando yodo para formar un enlace disulfuro entre los restos de cisteína previamente protegidos mediante Acm.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer que comprende al péptido de WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o al dímero peptídico de WT1. El gen WT1 se expresa a altos niveles en varios cánceres y tumores incluyendo tumores hematopoyéticos, tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y cánceres sólidos, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer de ovarios. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede usarse 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 LTC específicos de WT1 mediante el péptido de WT1 o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101 comprendido en la composición farmacéutica, y las células cancerosas en el sujeto se dañan mediante dichos LTC.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además del péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101 como principio activo, por ejemplo, un vehículo o un excipiente o similares. El péptido de WT1 o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101 comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención induce a un LTC específico de WT1. Por consiguiente, la

- 5 composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un adyuvante adecuado, o puede administrarse junto con un adyuvante adecuado para potenciar la eficacia de la inducción. Los ejemplos de adyuvantes preferentes incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund completo o incompleto e hidróxido de aluminio.
- 10 El método de administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo de condiciones, tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Los ejemplos de dichos métodos incluyen, pero sin limitación, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral. La cantidad del péptido o dímero peptídico comprendida en la composición farmacéutica de la presente invención, así
- 15 como la forma de dosificación y el número de veces de la administración y similares de la composición farmacéutica de la presente invención pueden seleccionarse de manera adecuada dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. La dosis individual del péptido es normalmente de 0,0001 mg a 1000 mg, preferentemente, de 0,001 mg a 1000 mg.
- 20 En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer que comprende administrar una cantidad eficaz del péptido de WT1 y/o del dímero peptídico de WT1 a un sujeto positivo a HLA-A*1101. El cáncer a tratar o prevenir puede ser cualquiera, y los ejemplos del mismo incluyen tumores hematopoyéticos, tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y cánceres sólidos, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células
- 25 germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer de ovarios.

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

- 30 (a) hacer reaccionar un complejo de un péptido de WT1 y una molécula de HLA-A*1101 con una muestra del sujeto; y
(b) determinar la presencia o cantidad de un LTC que reconozca al complejo contenido en la muestra. La muestra de un sujeto puede ser cualquiera siempre que exista la posibilidad de que contenga un linfocito. Los
- 35 ejemplos de muestras incluyen fluidos corporales, tales como sangre o linfa y un tejido. El complejo de un péptido de WT1 y una molécula de HLA-A*1101 puede prepararse, por ejemplo, como un tetramero o pentámero usando un método conocido para un experto en la materia, tal como el método de biotina-estreptavidina. La presencia o cantidad del LTC que reconozca a dicho complejo puede medirse mediante cualquier método conocido para un experto en la materia. En este aspecto de la presente invención, puede marcarse el complejo.
- 40 Puede usarse como marcador un marcador conocido, tal como un marcador fluorescente o un marcador radiactivo. La marcación hace que la determinación de la presencia o cantidad de un LTC sea fácil y rápida.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona una composición para la determinación de la presencia o cantidad de un LTC específico de WT1 en un sujeto positivo a HLA-A*1101 que comprende un péptido de WT1

- 45 restringido a HLA-A*1101.

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

- 50 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la producción de un LTC específico de WT1 usando un complejo de WT1 y una molécula de HLA-A*1101, que comprende:

- (a) hacer reaccionar al complejo con una muestra; y
(b) obtener un LTC que reconozca al complejo contenido en la muestra. El complejo de un péptido de WT1 y una molécula de HLA-A*1101 se describe anteriormente. La muestra puede ser cualquiera siempre que exista la posibilidad de que contenga un linfocito. Los ejemplos de muestras incluyen una muestra de un sujeto, tal como
- 55 sangre, y un cultivo celular. Los LTC que reconocen al complejo pueden obtenerse usando un método conocido para un experto en la técnica, tal como FACS o MACS. La presente invención permite cultivar al LTC específico de WT1 y usarlo para el tratamiento o prevención de varios cánceres.
- 60

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un LTC específico de WT1 que puede obtenerse mediante un método para la producción de un LTC específico de WT1 usando un complejo de WT1 y una molécula de HLA-A*1101.

- 65

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica al péptido de 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 puede determinarse basándose en la secuencia de aminoácidos del péptido de WT1 restringido a HLA-A*1101. El polinucleótido puede prepararse mediante cualquier método conocido para la síntesis de ADN o ARN (por ejemplo, un método sintético químico) o un método de PCR o similares.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende al polinucleótido. El tipo de vector de expresión, la secuencia comprendida distinta de la secuencia del polinucleótido y similares, puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del tipo de hospedador donde se introduce el vector de expresión de la presente invención o el propósito de uso o similares. Es posible tratar o prevenir tumores hematopoyéticos o cánceres sólidos administrando el vector de expresión de la presente invención a un sujeto positivo a HLA-A*1101 para producir un péptido de WT1 restringido a HLA-A*1101 en un organismo vivo e inducir un LTC específico de WT1, y dañar células de tumor hematopoyético o células de cáncer sólido en el sujeto.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende al polinucleótido o al vector de expresión. La composición el método de administración y similares de la composición farmacéutica de la presente invención en este aspecto se describen 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 del vector de expresión a un sujeto positivo a HLA-A*1101. Los ejemplos de cánceres a tratar o prevenir incluyen tumores hematopoyéticos, tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y cánceres sólidos, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer de ovarios.

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula que comprende al vector de expresión. La célula de la presente invención puede prepararse, por ejemplo, transformando una célula hospedadora, 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 hospedadora puede seleccionarse de manera adecuada a partir de varios métodos. El péptido de la presente invención puede prepararse cultivando la célula transformada y recuperando y purificando el péptido de WT1 producido.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un LTC específico de WT1, que está inducido por el péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101. El LTC de la presente invención reconoce a un complejo de un péptido de WT1 y una molécula de HLA-A*1101. Por consiguiente, el LTC de la presente invención puede usarse 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 administrar un LTC específico de WT1 a un sujeto positivo a HLA-A*1101. El método de administración del LTC específico de WT1 puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Los ejemplos de dichos métodos incluyen, pero sin limitación, 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 introducción de un LTC específico de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear de sangre periférica en presencia del péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101 para inducir al LTC específico de WT1 a partir de la célula mononuclear de sangre periférica. El sujeto del que se deriva la célula mononuclear de sangre periférica puede ser cualquiera, siempre que sea positivo para HLA-A*1101. Mediante el cultivo de las células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101, se inducen LTC específicos de WT1 a partir de células precursoras de LTC 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 LTC 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 introducción de un LTC específico de WT1, que comprende un péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101 como un componente esencial. Preferentemente, el kit se usa en el método para la inducción de un LTC específico de WT1. El kit de la presente invención puede comprender además del péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101, por ejemplo, un medio para obtener una célula mononuclear de sangre periférica, un adyuvante, un vaso de reacción o similares. En general, se adjunta con el kit un manual de instrucciones. Mediante el uso del kit de la presente invención, pueden inducirse LTC específicos de WT1 de manera eficiente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una célula presentadora de antígenos (tal como una célula dendrítica) que presenta a un péptido de WT1 mediante una molécula de HLA-A*1101, que está inducido por

el péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101. Mediante el uso de la célula presentadora de antígenos de la presente invención, se inducen LTC específicos de WT1 de una manera eficiente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende administrar la célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 mediante una molécula de HLA-A*1101 a un sujeto positivo a HLA-A*1101. El método de administración de la célula presentadora de antígenos puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Los ejemplos de dichos métodos incluyen, pero sin limitación, 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 una célula presentadora de antígenos que presenta a un péptido de WT1 mediante una molécula de HLA-A*1101, que comprende cultivar una célula presentadora de antígenos inmadura en presencia del péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101 para inducir a la célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 mediante una molécula de HLA-A*1101 a partir de la célula presentadora de antígenos inmadura. La célula presentadora de antígenos inmadura se refiere a una célula, tal como una célula dendrítica inmadura, que puede madurarse hasta una célula presentadora de antígenos. Un sujeto a partir del cual se deriva la célula presentadora de antígenos inmadura puede ser cualquiera siempre que sea positivo a HLA-A*1101. Debido a que las células presentadoras de antígeno están contenidas, por ejemplo, en células mononucleares de sangre periférica, dichas células pueden cultivarse en presencia del péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta a un péptido de WT1 mediante una molécula de HLA-A*1101, que comprende al péptido de WT1 y/o el dímero peptídico de WT1 restringido a HLA-A*1101 como un componente esencial. Preferentemente, el kit se usa en el método para la inducción de una célula presentadora de antígenos. Otros componentes que comprenderá el kit de la presente invención y similares se describen anteriormente. El kit de la presente invención puede usarse para inducir de manera eficiente una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 mediante una molécula de HLA-A*1101.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo contra un péptido de WT1 restringido a HLA-A*1101 o a un polinucleótido que codifica al péptido. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de un cáncer, que comprende el uso del LTC específico de WT1, a la célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 mediante una molécula de HLA-A*1101, o al anticuerpo contra un péptido de WT1 restringido a HLA-A o a un polinucleótido que codifica al péptido. Preferentemente, el LTC específico de WT1 se usa en el método para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, es posible diagnosticar un cáncer incubando el LTC anterior, la célula presentadora de antígenos o el anticuerpo con una muestra de un sujeto positivo a HLA-A*1101 o administrándoselos a un sujeto positivo a HLA-A*1101 y determinar, por ejemplo, la posición, sitio o cantidad del mismo. El LTC, la célula presentadora de antígenos o el anticuerpo pueden estar marcados. Al acoplar un marcador, el método de diagnóstico de la presente invención puede ponerse en práctica de una manera eficaz.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención en más detalle, pero no deben entenderse como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo 1: Selección de péptido de WT1

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

[Tabla 1]

Péptido	Número de aminoácidos	Secuencia de aminoácidos	Puntuación de afinidad
WT1 ₂₅₁ (SEC ID N°: 2)	251-259	AAGSSSVK	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

Péptido	Número de aminoácidos	Secuencia de aminoácidos	Puntuación de afinidad
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 células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante el método de centrifugación de densidad de gradiente Ficoll-Hypaque a partir de sangre periférica que se ha recogido a partir de un donante sano positivo a HLA-A*1101. Las CMSP se sembraron a continuación en una placa de cultivo de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 1×10^7 en medio RPMI 1640 que contiene FCS al 10 %, y se añadió un sobrenadante de cultivo de células B95-8 (células que producen virus EB). Se cultivaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante aproximadamente 1 mes. Se obtuvieron células B-LCL transformadas con virus EB, que son células B tumorales. Se confirmó que las células B-LCL resultantes no expresaban el gen WT1. Las células B-LCL se sometieron a impulsos incubándolas con 20 mg/ml de WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ o WT1₄₃₆ durante 2 horas, y se las irradió con 80 Gy de radiación. Las células B-LCL resultantes (en lo sucesivo citadas como células B-LCL sometidas a impulsos con un péptido de WT1) se usaron como células presentadoras de antígenos para los experimentos posteriores.

Inducción de LTC específicos de WT1

Se cultivaron 3×10^6 CMSP en una placa de cultivo de 24 pocillos en medio completo (RPMI al 45 %, medio AMI-V al 45 % y suero AB humano al 10 %) que contenía 20 mg/ml de WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ o WT1₄₃₆ a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 1 semana para obtener células respondedoras. Se cocultivaron 2×10^6 de las células respondedoras con 1×10^6 células B-LCL sometidas a impulsos con el mismo péptido de WT1 en medio completo durante 1 semana (primera estimulación). Las CMSP se cocultivaron con las células B-LCL sometidas a impulsos con el péptido de WT1 tres veces más (segunda a cuarta estimulación) en las condiciones en las que se añadieron 20 UI/ml (concentración final) de IL2 del modo siguiente: segunda estimulación: dos veces en días alternos a partir de los tres días después del inicio de la estimulación; tercera y cuarta estimulación: tres veces a intervalos de un día a partir del día después del inicio de la estimulación. Las células resultantes se concentraron usando kit de columnas de selección negativa alimentadas por gravedad (StemSp) de tal modo que la proporción de linfocitos T CD8 positivos alcanzó el 80 %, y se cocultivaron con las células B-LCL sometidas a impulsos con el péptido de WT1 (quinta estimulación). Los linfocitos T CD8 (LTC) obtenidos cinco días después de la estimulación final se usaron para la medida de la citotoxicidad.

Actividad citotóxica de LTC

La actividad citotóxica de los LTC se midió usando ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Las células LTC (en lo sucesivo células efectoras) se mezclaron a una proporción (proporción E/T) de 1:1 a 30:1 en 200 ml de medio con células diana a las que se había incorporado ⁵¹Cr, y se cultivaron en una placa de cultivo de 96 pocillos a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 4 horas. Las células B-LCL sometidas a impulsos con el mismo péptido de WT1 usado para la inducción de LTC (BLCL-P), y las células B-LCL sin someterse a impulsos usando un péptido de WT1 (BLCL-NP) se usaron como células diana. Después del cultivo, se recogieron los sobrenadantes mediante centrifugación. Las cantidades de ⁵¹Cr liberadas en los sobrenadantes se midieron usando con contador de centelleo líquido. La actividad citotóxica (%) se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Liberación de } ^{51}\text{Cr en sobrenadante de muestra} - \text{liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr})}{(\text{Liberación máxima de } ^{51}\text{Cr} - \text{liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr}) \times 100}$$

donde Liberación Espontánea de ⁵¹Cr es la liberación de ⁵¹Cr observada cuando las células diana a las que se había incorporado ⁵¹Cr se cultivaron solas en las mismas condiciones, y Liberación Máxima de ⁵¹Cr es la liberación de ⁵¹Cr observada cuando las células diana a las que se había incorporado ⁵¹Cr se lisaron por completo usando Triton X-100 al 1 %. Los resultados se muestran en las Figuras 1-9. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específica (%), y los ejes horizontales representan proporciones E/T. Las BLCL-P se representan usando líneas continuas, y las BLCL-NP se representan usando líneas de puntos. Se confirmó que los LTC inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ o WT1₄₃₆ dañan específicamente a las BLCL-P que presentan al péptido de WT1 como complejo con una molécula de HLA-A*1101 en comparación con las BLCL-NP. Los LTC inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈ o WT1₃₈₆ se usaron para los siguientes experimentos adicionales.

Actividad citotóxica de LTC contra células que expresan WT1 de manera endógena

La actividad citotóxica de LTC inducida por WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈ o WT1₃₈₆ contra B-LCL que expresan WT1 se determinó usando el método descrito anteriormente. Una célula que expresa WT1 se refiere a una B-LCL en la que se ha introducido un gen WT1 humano, y que expresa una proteína de WT1 en la célula, y presenta a un péptido que consiste en aproximadamente 9 aminoácidos resultantes del procesamiento con una molécula de HLA-A*1101. Los resultados se muestran en las Figuras 1, 2, 4, 5 y 7. En las figuras, Las B-LCL que expresan WT1 se representan usando líneas discontinuas. Se confirmó que los LTC inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈ o WT1₃₈₆ tienen una actividad citotóxica contra células que expresan un gen de WT1 de manera endógena.

Preparación de dímero peptídico de WT1

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

Purificación de dímero peptídico de WT1 en bruto

Se disolvieron 158 mg de dímero peptídico de WT1₃₇₈ en 9 ml de DMSO y se inyectó en una columna C₁₈ ODS (5 cm φ x 50 cm L, YMC Co., LTD.) acoplada a HPLC (Shimadzu, tipo LC8AD) y se equilibró con solución 1 (H₂O/AcOH al 1 %) usando una bomba de HPLC. Se dejó reposar la columna durante aproximadamente 30 minutos, y se eluyó con un gradiente de concentración del 0 % al 40 % de solución 2 (CH₃CN/AcOH al 1 %) durante 360 minutos. Se recogieron las fracciones que contenían dímero peptídico de WT1 usando un colector automático de fracciones a la vez que se controlaba la absorbancia UV a 220 nm. Las fracciones recogidas se combinaron, se inyectaron en una columna C₁₈ ODS (4,6 mm φ x 25 cm L, YMC Co., LTD.) acoplada a HPLC (Hitachi, tipo L-4000) y se equilibró con solución 2 al 17 %, y se eluyó con gradiente de concentración del 0 % al 47 % de solución 2 durante 30 minutos para obtener 46,6 mg del dímero peptídico de WT1₃₇₈ purificado a un tiempo de retención de 20,51 minutos. FAB/EM 2365,0 (valor teórico: 2342,70) Na⁺ F = 0,25 %

Inducción de LTC mediante dímero peptídico de WT1

Las capacidades de los dímeros peptídicos de WT1₃₇₈, péptido de WT1₃₇₈, péptido de WT1₃₇₈ modificado (G → I) (SEC ID N°: 11) y péptido de WT1₃₇₈ modificado (G → V) (SEC ID N°: 12) así como péptido de WT1₃₇₉ (SEC ID N°: 13, tal como se divulga en el documento WO 2002/28414) resultantes para inducir un LTC se examinaron usando CMSP procedentes de los donantes 1-3 sanos positivos a HLA-A*1101 de acuerdo con el método descrito anteriormente. Los resultados se muestran en las Figuras 10-14. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específica (%), y los ejes horizontales representan proporciones E/T. Las BLCL-P se representan usando líneas continuas, y las BLCL-NP se representan usando líneas de puntos. Se confirmó que el dímero peptídico WT1₃₇₈ tiene capacidad de inducir un LTC. Además, se ha descubierto que la capacidad de cada péptido de WT1₃₇₉ cuya secuencia de aminoácidos es diferente de la del péptido WT1₃₇₈ en un aminoácido en la secuencia de la proteína de WT1 para inducir un LTC es mucho menor que la del péptido de WT1₃₇₈ y, por lo tanto, el péptido de WT1 de la presente invención tiene un efecto excelente e inesperado en comparación con el péptido conocido.

Aplicabilidad industrial

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

Texto libre del listado de secuencias

SEC ID N°: 11: Péptido de WT1 modificado
SEC ID N°: 12: Péptido de WT1 modificado

Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, donde el péptido tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101, y tiene la capacidad para inducir un LTC.

El péptido tal como se define anteriormente, donde el aminoácido en la posición 9 de la secuencia de aminoácidos es Lys o Arg.

El péptido tal como se ha definido anteriormente, donde la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 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),
10 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).

El péptido tal como se ha definido anteriormente, donde la secuencia de aminoácidos es Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID N°: 2).

- 15 Un dímero peptídico que tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101 y que tiene la capacidad para inducir un LTC, donde se unen entre sí mediante un enlace disulfuro dos monómeros peptídicos que 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.

- 20 El dímero peptídico tal como se ha descrito anteriormente, donde la secuencia de aminoácidos del monómero peptídico se selecciona del grupo que consiste en:

- 25 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).

- 30 Una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención del cáncer, que comprende el péptido tal como se ha definido anteriormente y/o el dímero peptídico tal como se ha definido anteriormente.

- Un método para el tratamiento o prevención de un cáncer que comprende administrar una cantidad eficaz del péptido tal como se ha definido anteriormente y/o el dímero peptídico a un sujeto positivo a HLA-A*1101. Un polinucleótido que codifica al polipéptido tal como se ha definido anteriormente.

- 35 Un vector de expresión que comprende al polinucleótido tal como se ha definido anteriormente.

- Una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende al polinucleótido tal como se ha definido anteriormente o al vector tal como se ha definido anteriormente.

- 40 Un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz del polinucleótido tal como se ha definido anteriormente o el vector tal como se ha definido anteriormente a un sujeto positivo a HLA-A*1101.

- 45 Un LTC específico de WT1, que se induce por el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y/o el dímero peptídico de acuerdo con la reivindicación 5.

- Un método para la inducción de un LTC específico de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear de sangre periférica en presencia del péptido tal como se ha definido anteriormente y/o el dímero peptídico tal como se ha definido anteriormente para inducir un LTC específico de WT1 a partir de la célula mononuclear de sangre periférica.

- 50 Un kit para la inducción de un LTC específico de WT1 que comprende el péptido tal como se ha definido anteriormente y/o el dímero peptídico tal como se ha definido anteriormente como un componente esencial.

- 55 Una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1, que se induce por el péptido tal como se ha definido anteriormente y/o el dímero peptídico tal como se ha definido anteriormente.

- 60 Un método para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1, que comprende cultivar una célula presentadora de antígenos inmadura en presencia del péptido tal como se ha definido anteriormente y/o el dímero peptídico tal como se ha definido anteriormente para inducir a la célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 a partir de la célula presentadora de antígenos inmadura.

- 65 Un kit para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 que comprende el péptido tal como se ha definido anteriormente y/o el dímero peptídico tal como se ha definido anteriormente como un componente esencial.

Un método para el diagnóstico de un cáncer que comprende el uso del LTC tal como se ha definido anteriormente o de la célula presentadora de antígenos tal como se ha definido anteriormente.

Listado de secuencias

- | | |
|----|--|
| 5 | <110> International Institute of Cancer Immunology, Inc. |
| | <120> Péptido de WT1 restringido a HLA-A*1101 y composiciones farmacéuticas que contienen al mismo |
| 10 | <130> 120745ep_46ep |
| | <150> EP 10191234.3 |
| | <151> 14-12-2007 |
| 15 | <150> EP 07850650.8 |
| | <151> 14-12-2007 |
| | <150> JP 2006-355356 |
| | <151> 28-12-2006 |
| 20 | <160> 13 |
| | <170> PatentIn versión 3.2 |
| 25 | <210> 1 |
| | <211> 449 |
| | <212> PRT |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> |
| 30 | <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	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

<211> 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

 $\langle 210 \rangle$ 8

<211> 9

45 <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> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 10	
10		Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys
		1 5
15	<210> 11 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Péptido de WT1 modificado	
20	<400> 11	
		Thr Ile Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
		1 5
25	<210> 12 <211> 9 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Péptido de WT1 modificado	
30	<400> 12	
		Thr Val Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
		1 5
35	<210> 13 <211> 9 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 13	
		Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr
		1 5
		1

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°: 3),

(2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido, donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un LTC.

2. 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°: 3),

(2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido, donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un LTC, para preparar un medicamento para el tratamiento o 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°: 3),

(2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido, donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un LTC, o un vector que comprende dicho polinucleótido.

4. Uso de 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°: 3),

(2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido, donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un LTC, 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 LTC específico de WT1 que sea adecuado para el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, donde el método comprende cultivar una célula mononuclear de sangre periférica obtenida 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°: 3),

(2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido, donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un LTC, para inducir al LTC específico de WT1 a partir de la célula mononuclear de sangre periférica.

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

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

(1) una secuencia de aminoácidos de

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID N°: 3),

(2) una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido, donde el péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de (2) tiene la capacidad para unirse a una

molécula de HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un LTC para inducir a la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido de WT1 a partir de la célula presentadora de antígenos inmadura.

- 5 8. Una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido de WT1 para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101, que puede obtenerse *in vitro* mediante el método de la reivindicación 7.
9. Un método para el diagnóstico del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*1101 que comprende usar el LTC de acuerdo con la reivindicación 6 o la célula presentadora de antígenos de acuerdo con la reivindicación 8.

10

Fig. 1

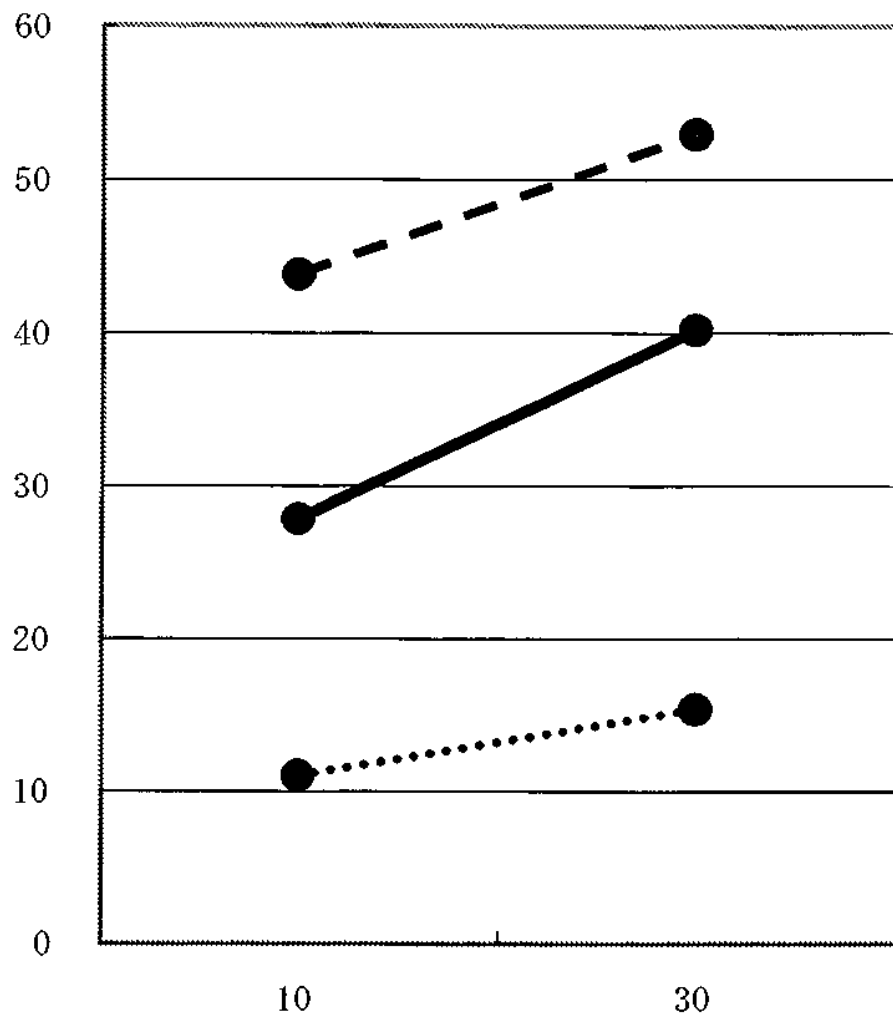


Fig. 2

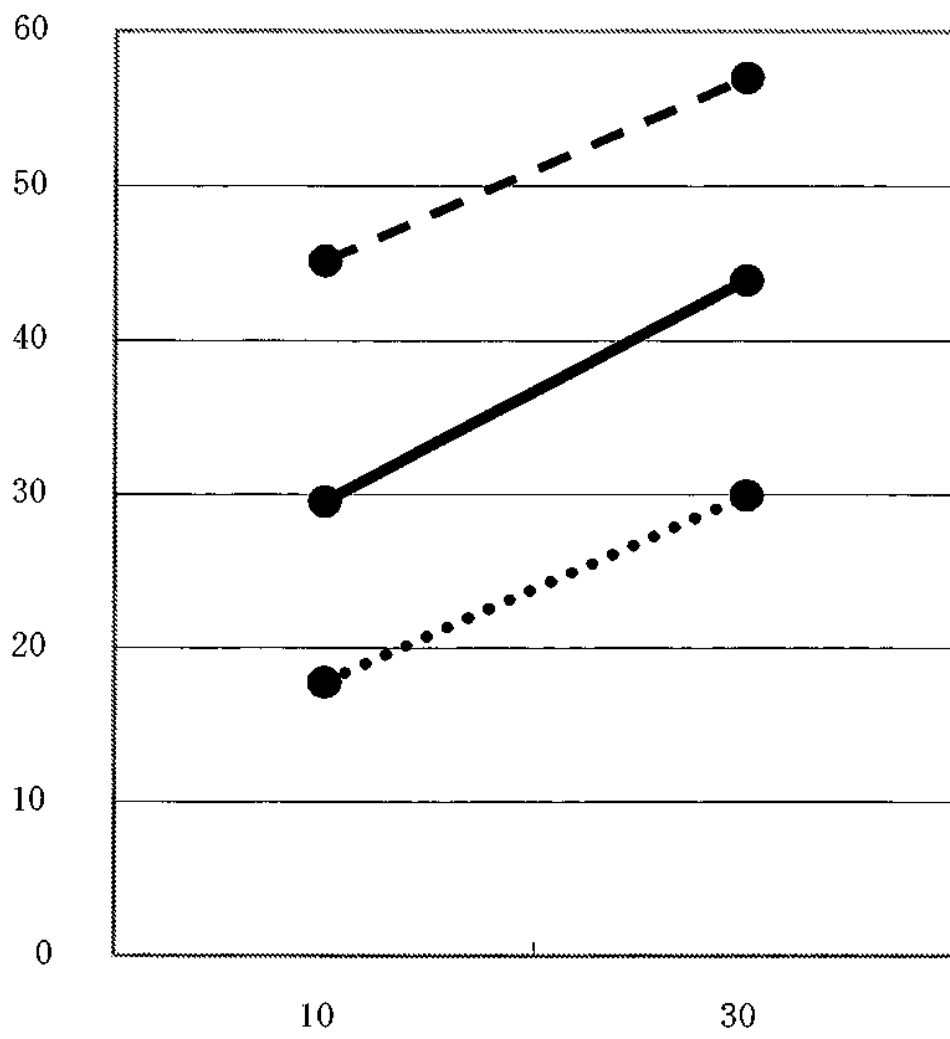


Fig. 3

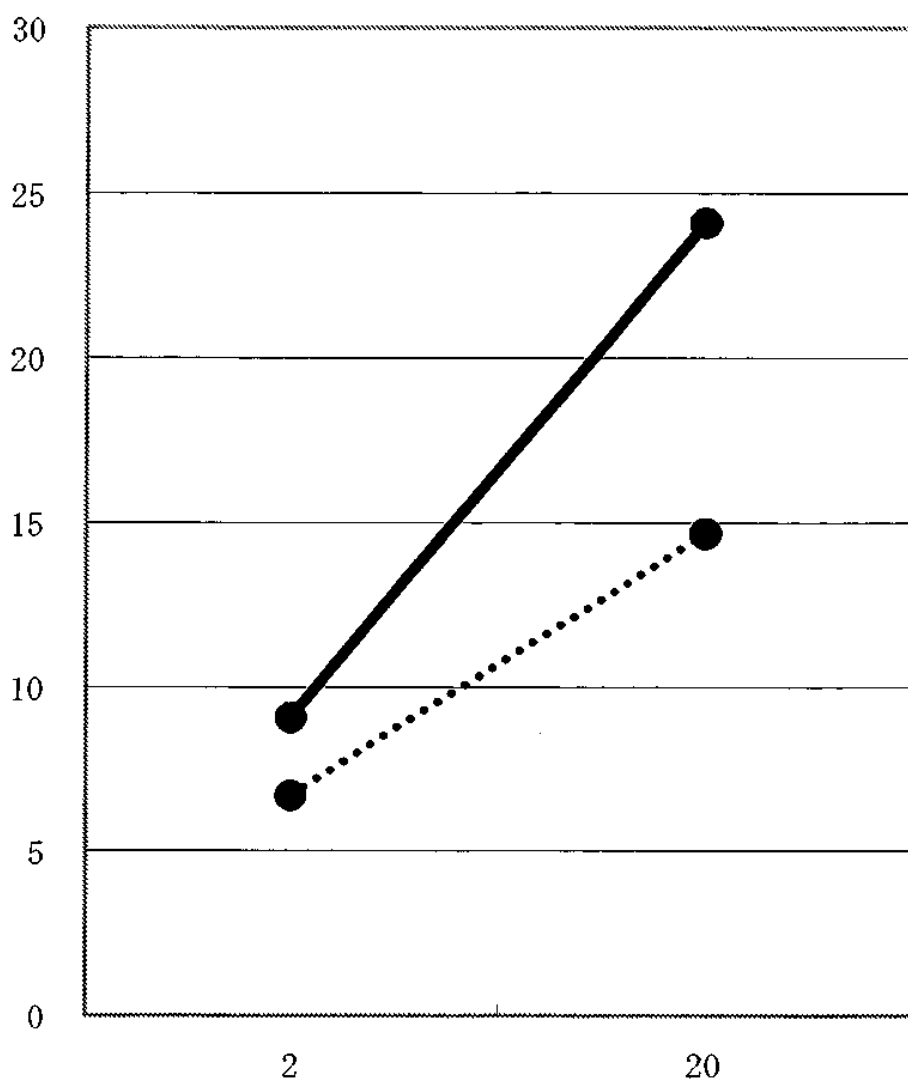


Fig. 4

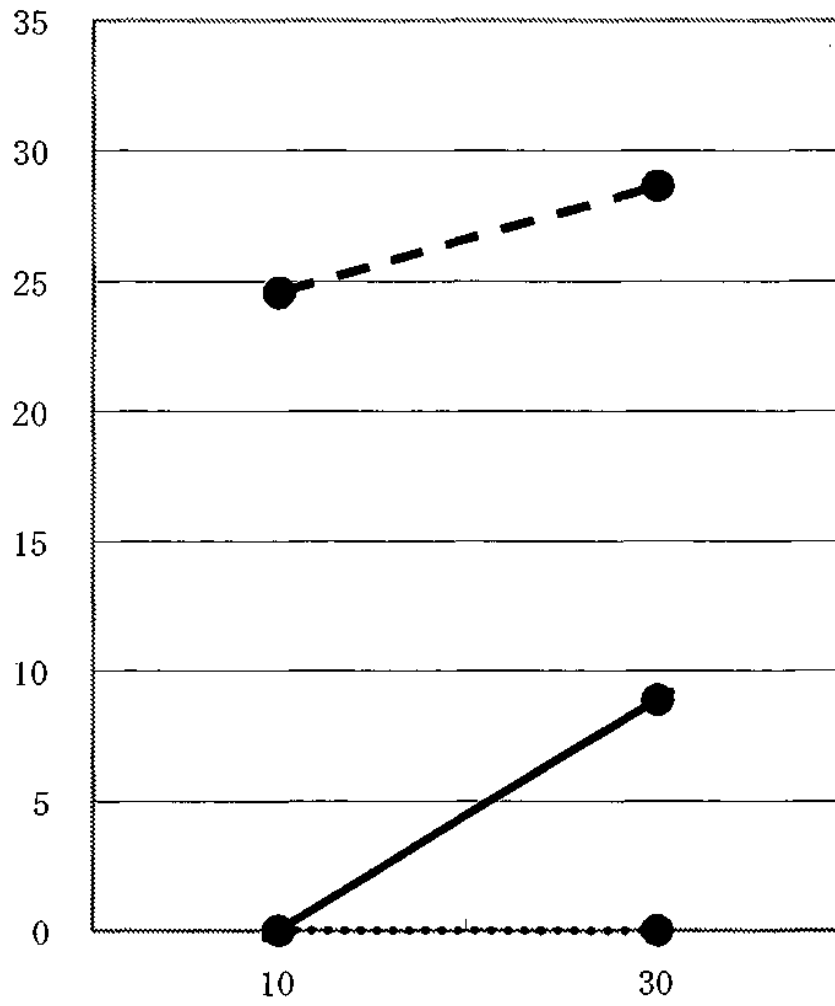


Fig. 5

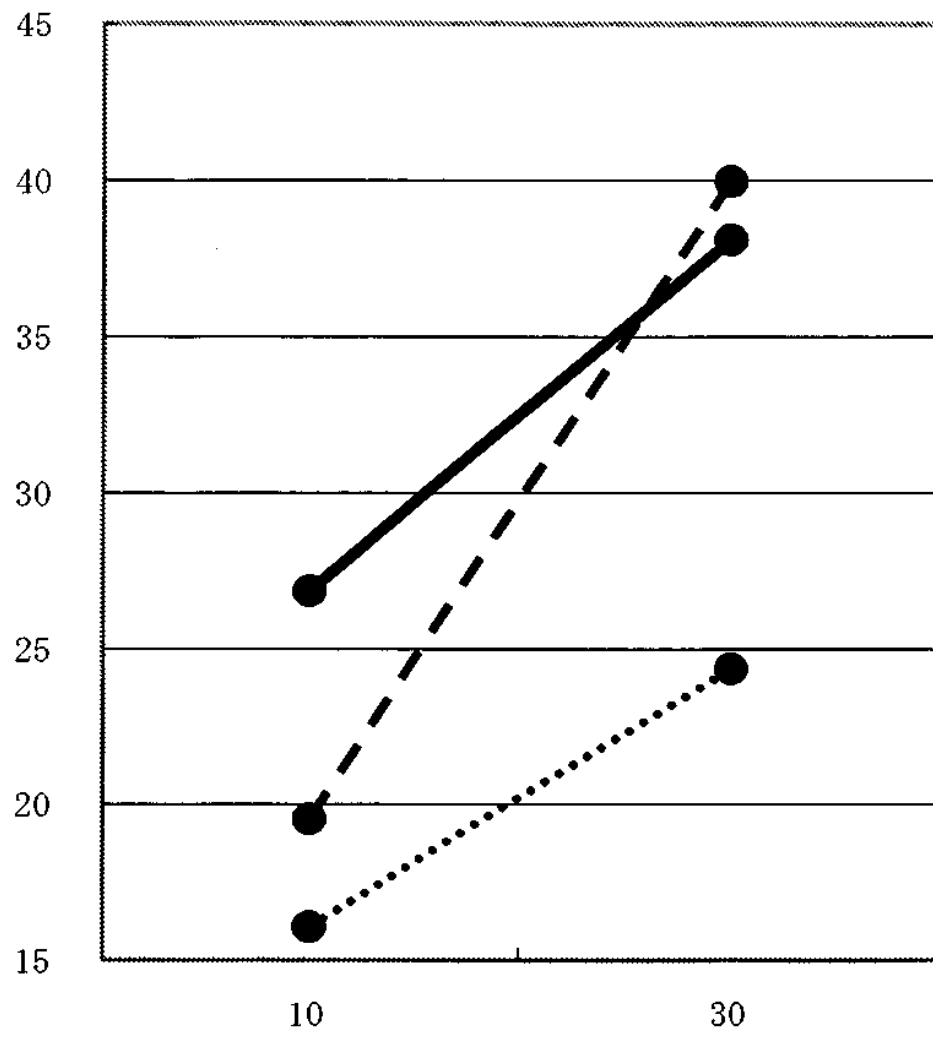


Fig. 6

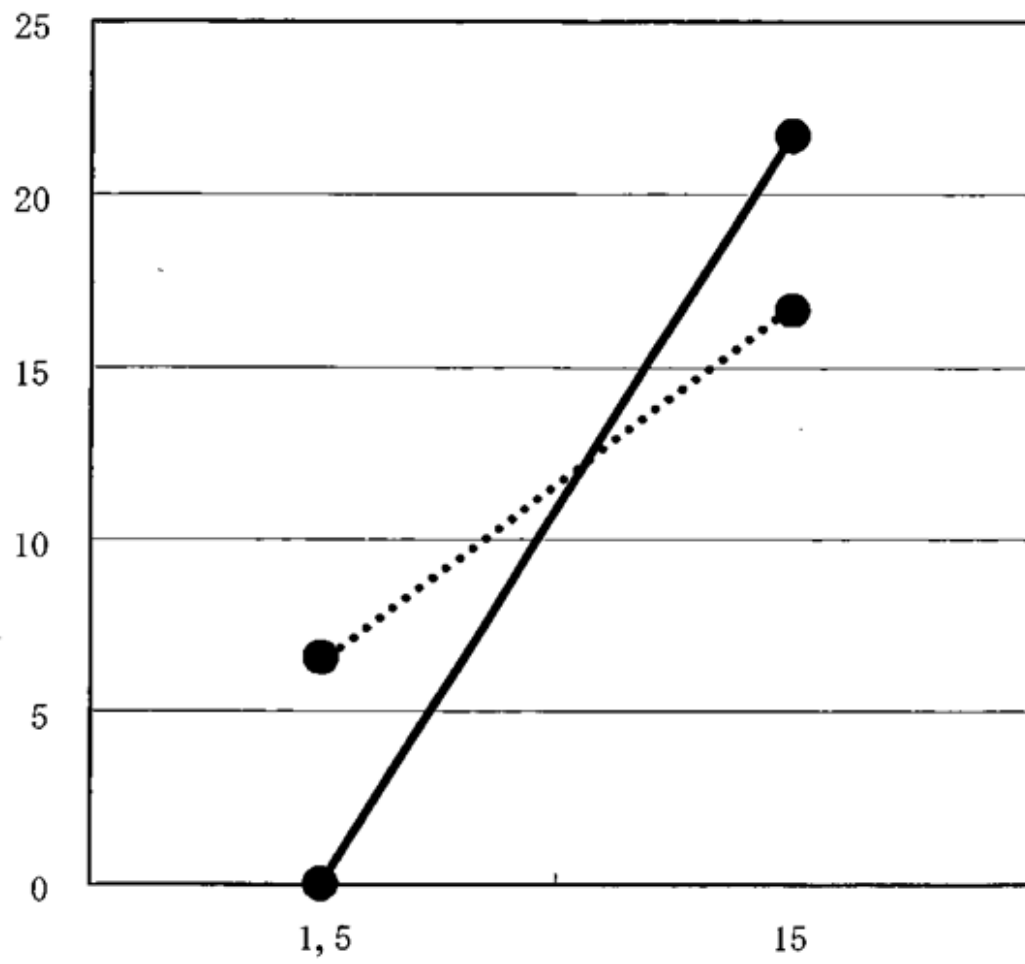


Fig. 7

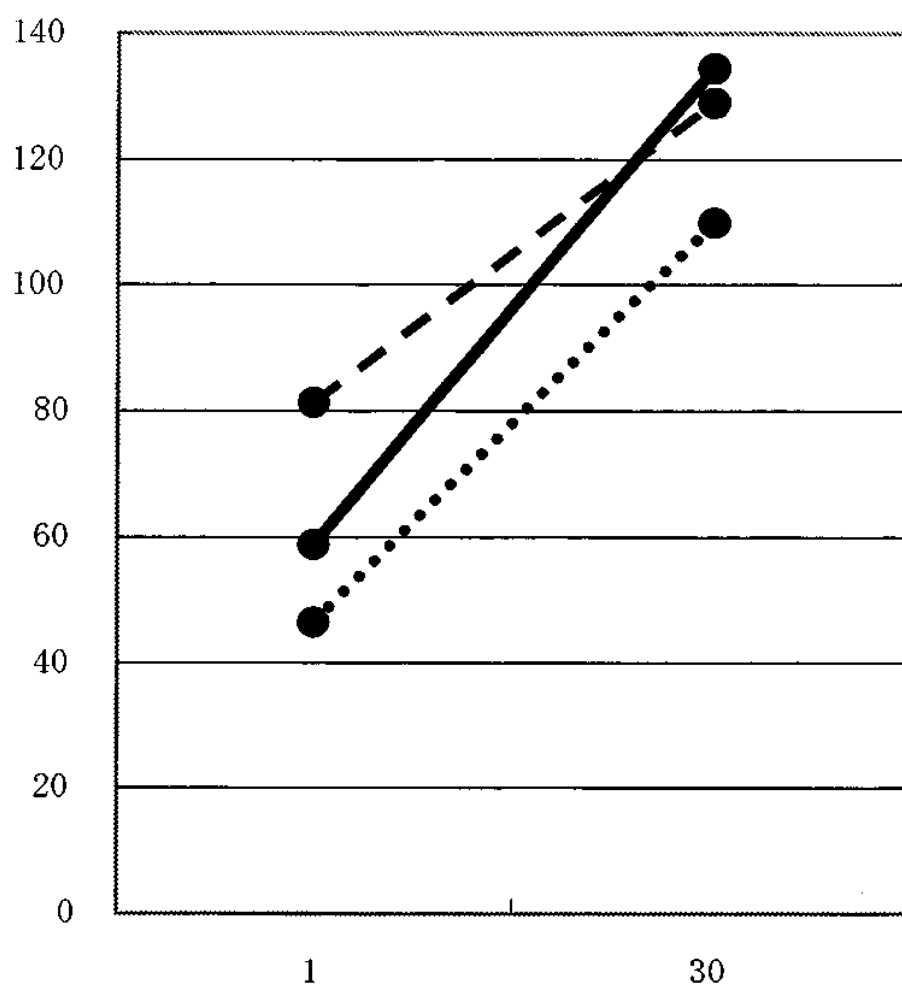


Fig. 8

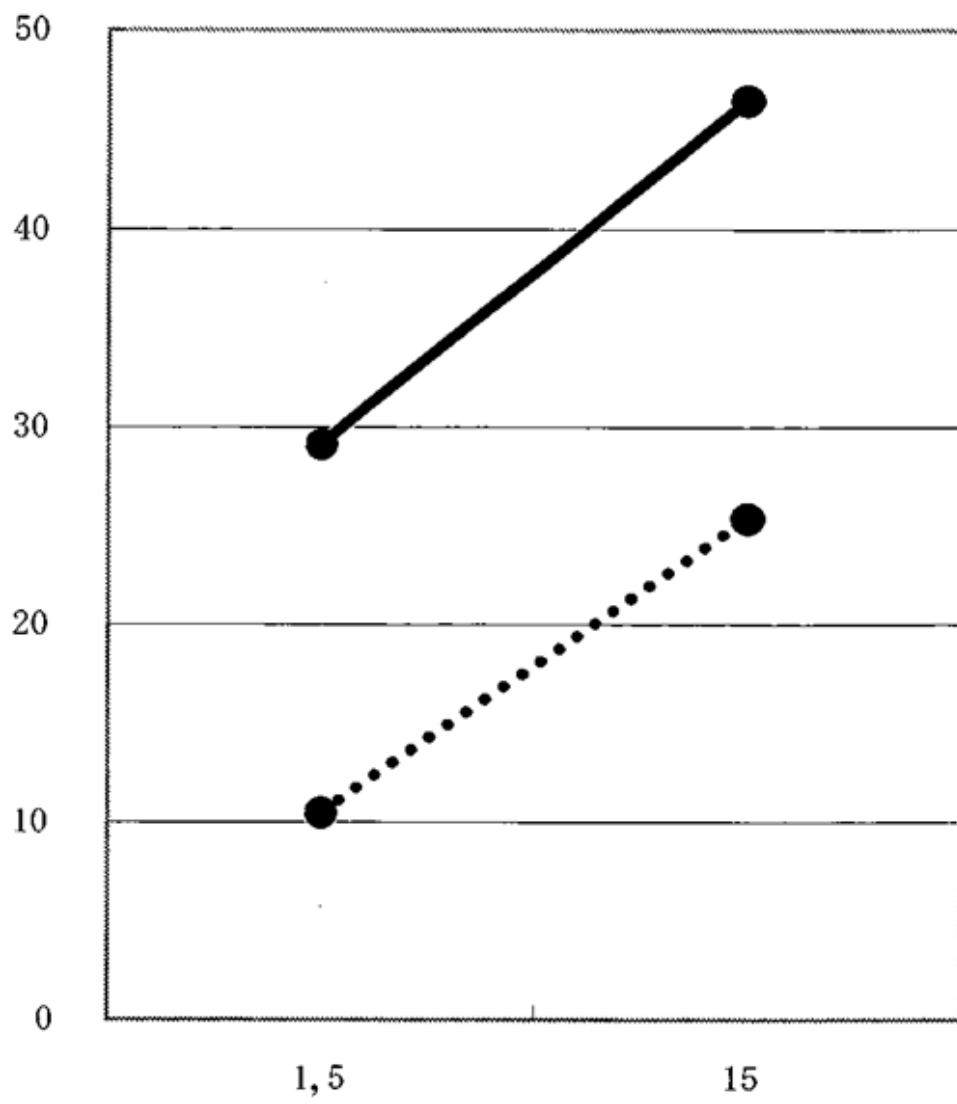


Fig. 9

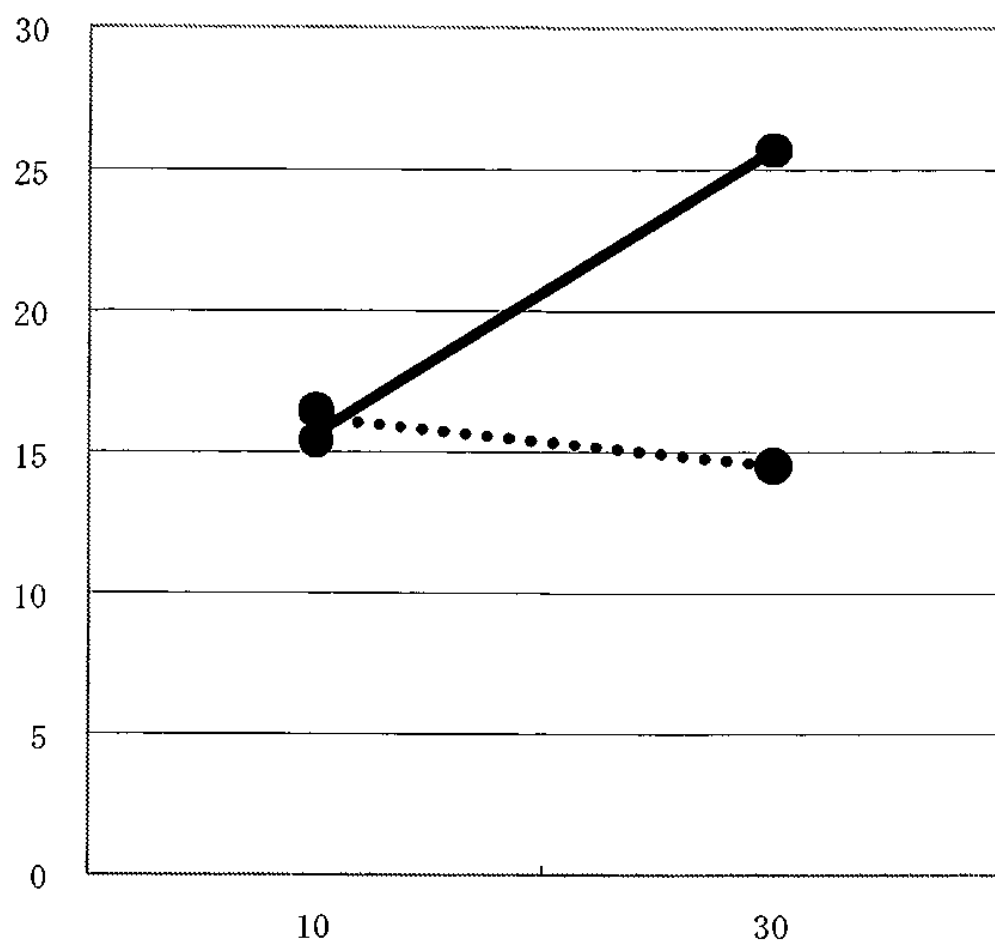


Fig. 10

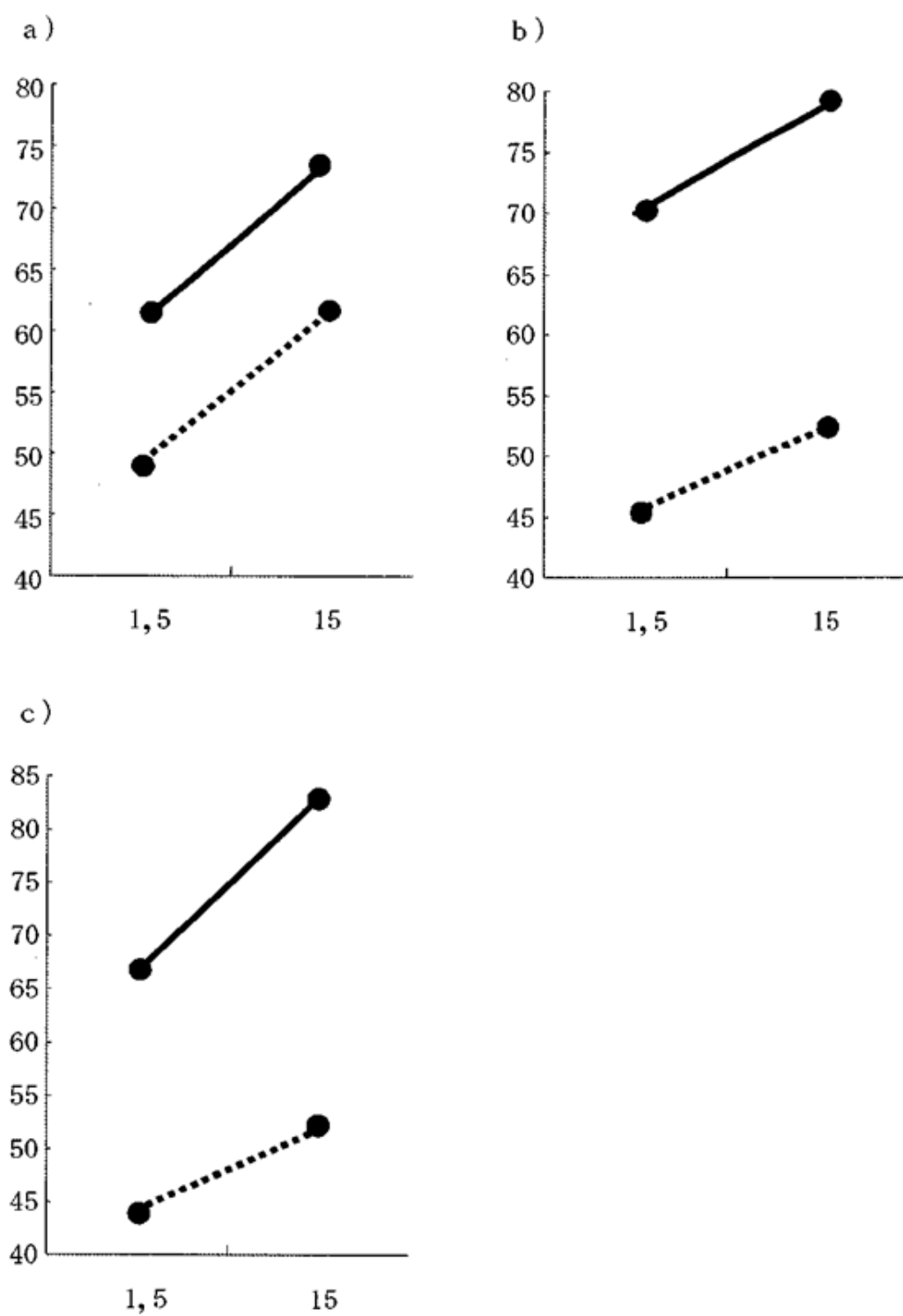


Fig. 11

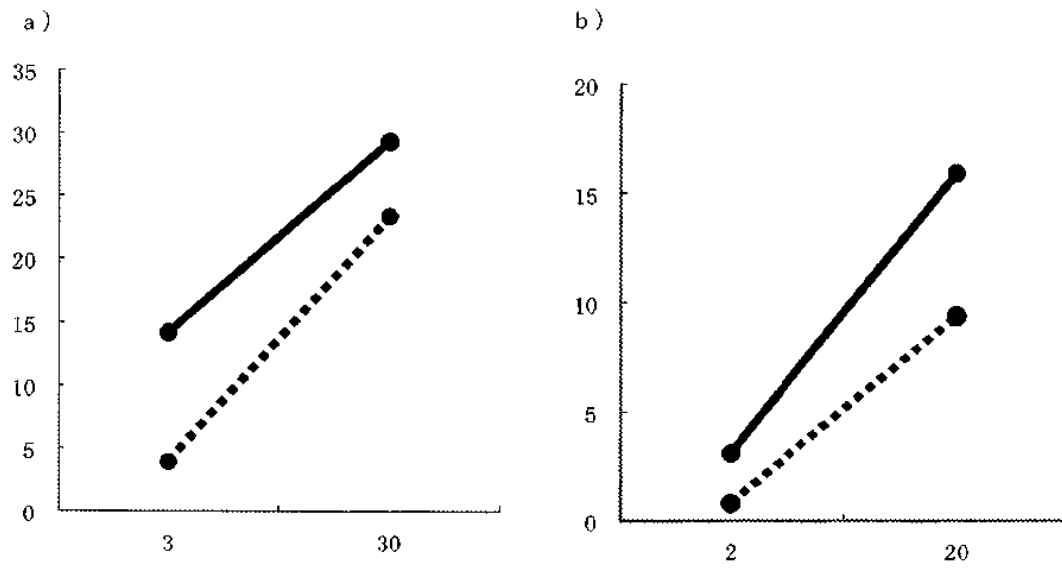


Fig. 12

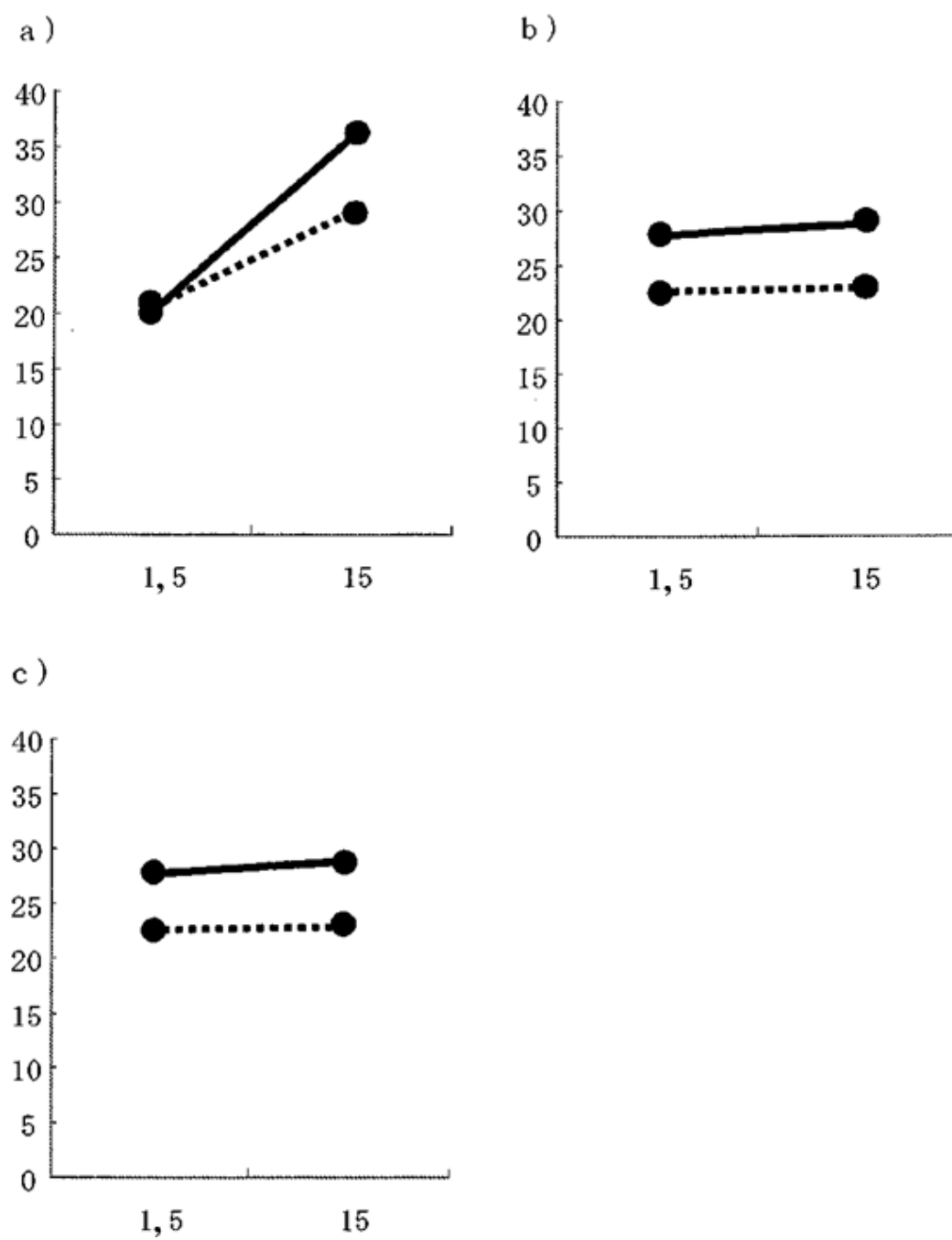
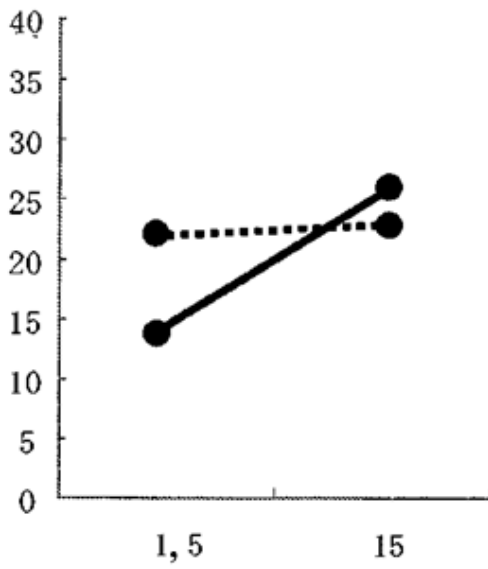
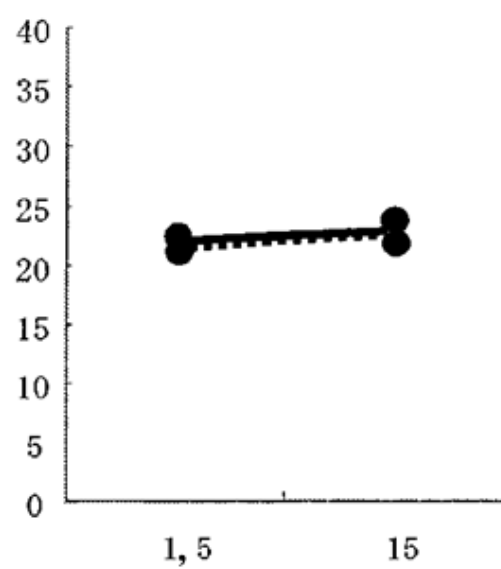


Fig. 13

a)



b)



c)

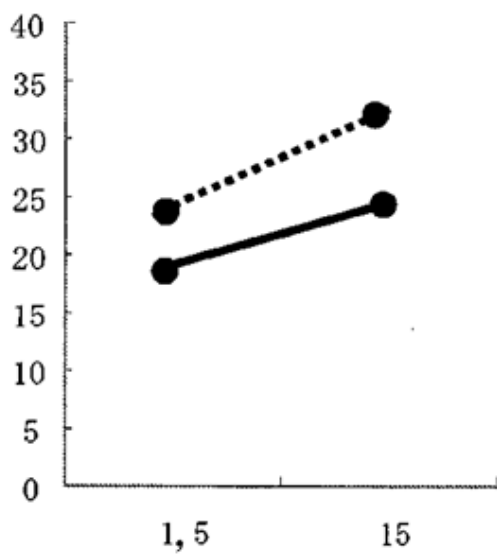


Fig. 14

