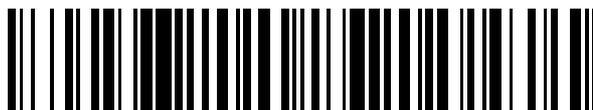


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 062**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2008** **E 08712039 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015** **EP 2119778**

54 Título: **Método para la activación de linfocitos T colaboradores y composición para su uso en el método**

30 Prioridad:

27.02.2007 JP 2007047317

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

10.02.2016

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 2 559 062 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

Método para la activación de linfocitos T colaboradores y composición para su uso en el método

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para la activación *in vitro* de un linfocito T colaborador, que comprende añadir un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno y, de este modo, activar el linfocito T colaborador, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula
10 HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501 y a una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer mediante activación de un linfocito T colaborador.

Antecedentes

15 El gen de WT1 (gen del tumor 1 de Wilms) se identificó como un gen responsable del tumor de Wilms, que es un cáncer renal en niños (documentos de no patente 1 y 2). El WT1 es un factor de transcripción que tiene una estructura en dedo de cinc. Al principio, el gen WT1 se consideró un gen supresor tumoral. No obstante, estudios posteriores (documentos de no patente 3, 4, 5 y 6) mostraron que, en vez de ello, el gen de WT1 funciona como oncogén en tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos.

20 Se ha demostrado que se puede inducir *in vitro* un linfocito T (CTL) específico del péptido WT1 estimulando una célula mononuclear de sangre periférica con un péptido WT1, y dicho CTL daña a una célula de cáncer, tal como una célula de tumor hematopoyético y células de cáncer sólido que expresan endógenamente WT1. El CTL reconoce el péptido WT1 como la forma del complejo donde el péptido WT1 se une a una molécula de MHC de clase I. Por tanto, dicho péptido WT1 es diferente en función de los subtipos de MHC de clase I (documento patente
25 1, documento no de patente 7 y documentos patentes 2, 3 y 4).

La existencia de un linfocito T colaborador específico de un antígeno de cáncer es importante para inducir un CTL eficazmente (Documento de No Patente 8). El linfocito T colaborador es inducido y activado mediante el reconocimiento de un complejo de una molécula de MHC d clase II y un péptido antigénico en una célula presentadora de antígeno. El linfocito T colaborador activado produce una citocina tal como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 o interferón para ayudar al crecimiento, diferenciación o maduración de un linfocito B. El linfocito T colaborador activado también tiene una función para facilitar el crecimiento, diferenciación o maduración de otras subpoblaciones de linfocitos T (por ejemplo, células Tc y TD). Por lo tanto, el linfocito T colaborador activado tiene una función de activar un sistema inmunológico facilitando el crecimiento o la activación de un linfocito B o un linfocito T. Por lo tanto, la mejora de una función de un linfocito T colaborador a través de un péptido antigénico de unión a MHC de clase II (un péptido colaborador) en una inmunoterapia del cáncer para aumentar el efecto de una vacuna contra el cáncer se considera que es útil (documento no patente 9, Documento de patente 13). Hasta la fecha solo se han encontrado un péptido de unión a una molécula de HLA-DRB1*0401 (documento no patente 10), péptido de unión a una molécula de HLA-DRB1*0405 y un péptido de unión a una molécula de HLA-DRB1*1502 (documento patente
30 5) como péptido colaborador de WT1. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar péptidos de unión cada uno a una molécula HLA-DRB1*1501, HLA-DPB1*0901 o HLA-DPB1*0501.

Además, se ha demostrado que entre los péptidos colaboradores hay un péptido colaborador promiscuo que puede unirse a múltiples moléculas de MHC de clase II e inducir linfocitos T colaboradores (documentos no patente 11 y
35 12). Sin embargo, fue muy difícil identificar un péptido colaborador promiscuo que se una a tres o más tipos de moléculas del MHC de clase II y ejerza un efecto suficiente.

Documento de patente 1: WO 2003/106682
Documento de patente 2: WO 2005/095598
Documento de patente 3: WO 2007/097358
Documento de patente 4: Solicitud de Patente Internacional N.º PCT/JP2007/074146
Documento de patente 5: WO 2005/045027
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. Revisión.
Documento no patente 4: Yamagami T et al., Blood. 1996 Apr 1; 87(7):2878-84.
Documento no patente 5: Inoue K et al., Blood. 1998 Apr 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., Immunogenetics. 2000 Feb;51(2):99-107.
Documento no patente 8: Gao FG et al., Cancer Res. 2002 Nov 15; 62 (22): 6438-41.
Documento no patente 9: Zeng G, J Immunother. 2001 May;24(3):195-204
Documento no patente 10: Knights AJ et al., Cancer Immunol Immunother. 2002 Jul;51(5):271-81.
Documento no patente 11: Sotiriadou R et al., Br J Cancer. 2001 Nov 16;85(10):1527-34.
Documento no patente 12: Hural JA et al., J Immunol. 2002 Jul 1;169(1):557-65.
Documento de patente 13: US 2006/0121046
65

Divulgación de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

- 5 Los problemas que se han de resolver mediante la presente invención son proporcionar a un método para la activación de un linfocito T colaborador con un péptido WT1 que tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 o molécula HLA-DPB1*0501, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y / o prevención de un cáncer mediante la activación de un linfocito T colaborador.

10 Medios para resolver los problemas

- Como resultado de estudios intensivos en vista de la situación como se ha descrito anteriormente, el presente inventor ha encontrado que entre los péptidos WT1 que se unen a una molécula HLA-DRB1*0405 y una molécula HLA-DRB1*1502, un péptido WT1 que tiene una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His también se une a una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. Por tanto, la presente invención se ha realizado.

La presente invención proporciona:

- 20 (1) un método para la activación *in vitro* de un linfocito T colaborador, que comprende la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y, de este modo, activar el linfocito T colaborador, donde el péptido WT1 es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEC ID N.º: 2) y tiene una capacidad de unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501, donde dicho linfocito T colaborador es de un sujeto que es uno cualquiera de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 y positivo para HLA-DPB1*0501;
- 25 (2) el método de acuerdo con (1), donde el péptido WT1 tiene una capacidad para unirse a al menos dos de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501;
- 30 (3) el método de acuerdo con (1) o (2), donde el péptido WT1 además tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*0405 y/o una molécula HLA-DRB1*1502;
- (4) el método de acuerdo con uno cualquiera de (1)–(3), donde el péptido WT1 tiene una capacidad para unirse a una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901, molécula HLA-DPB1*0501, molécula HLA-DRB1*0405 y molécula HLA-DRB1*1502;
- 35 (5) el método de acuerdo con uno cualquiera de (1)–(4), donde la adición del péptido WT1 a la célula presentadora de antígeno se realiza mediante la adición del péptido WT1, la adición de un vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el péptido WT1 o la adición de una célula que incluye el vector de expresión;
- (6) una composición farmacéutica que comprende un péptido WT1 para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto que es uno cualquiera de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 y positivo para * HLA-DPB1*0501, donde el péptido WT1 es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEC ID N.º: 2) y tiene una capacidad de unirse a uno cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501;
- 40 (7) una composición farmacéutica que comprende un péptido WT1 para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto que es uno cualquiera de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 y positivo para * HLA-DPB1*0501, que comprende un linfocito T colaborador de dicho sujeto activado con un péptido WT1, donde el péptido WT1 es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEC ID N.º: 2) y tiene una capacidad de unirse a uno cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501.
- 45
- 50

Efectos de la invención

- La presente invención proporciona un método para la activación *in vitro* de un linfocito T colaborador con un péptido WT1 que se une a una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901, molécula HLA-DPB1*0501, molécula HLA-DRB1*0405 y molécula HLA-DRB1*1502, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y / o prevención de un cáncer mediante la activación de un linfocito T colaborador. Por lo tanto, es posible activar *in vivo* e *in vitro* un linfocito T colaborador en el sujeto que tiene cualquiera de tales moléculas de MHC de clase II, tratar y prevenir un cáncer. Debido a que aproximadamente el 90 % de los japoneses están cubiertos por los cinco tipos de subclases de MHC de clase II, los linfocitos T colaboradores se pueden activar para tratar y / o prevenir un cáncer en una gama muy amplia de sujetos.
- 55
- 60

Breve descripción de las figuras

- 65 La Fig. 1 es un gráfico que representa la cantidad de IFN- γ producido por células TA28. 1. En la figura, un eje longitudinal representa la concentración de IFN- γ (pg/ml). Los gráficos corresponden a "el caso de cultivo de

células mononucleares de sangre periférica de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501 en ausencia del péptido WT1", "el caso de cultivar células TA28. 1 en presencia del péptido WT1 (negro)", "el caso del cultivo de células mononucleares de sangre periférica de un sujeto negativo para HLA-DRB1*1501 en ausencia del péptido WT1", "el caso del cultivo de células mononucleares de sangre periférica de un sujeto negativo para HLA-DRB1*1501 en presencia del péptido WT1" a partir de la izquierda, respectivamente.

La Fig. 2 es un gráfico que representa las cantidades de IFN- γ , IL-4 e IL-10 producidas por células TA28. 1. En la figura, un eje longitudinal representa la concentración (pg/ml). Los gráficos corresponden a los valores de IFN- γ , IL-4 e IL-10 a partir de la izquierda.

La Fig. 3 es un gráfico que representa las cantidades de IFN- γ , IL-4 e IL-10 producidas por células E15.2. En la figura, un eje longitudinal representa la concentración (pg/ml). Los gráficos corresponden a los valores de IFN- γ , IL-4 e IL-10 a partir de la izquierda.

La Fig. 4 representa las producciones de IFN- γ e IL-17 por células mononucleares positivas para HLA-DPB1*0501/*0501. En la figura, un eje horizontal representa IFN- γ , y un eje longitudinal representa IL-17. La Fig. 4a representa las células sin estimular con el péptido WT1, y la fig. 4b representa las células estimuladas con el péptido WT1.

La Fig. 5 es un gráfico que representa el crecimiento de células TA28. 1. En la figura, un eje longitudinal representa las cpm ($\times 10^4$). Los gráficos se corresponden con "el caso de cocultivo de células TA28. 1 con células mononucleares de sangre periférica sin pulso con un péptido WT1", "el caso de cocultivo de células TA28. 1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 (negro)", "el caso de cultivar células TA28. 1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con péptido WT1 una en presencia de un anticuerpo anti-MHC de clase I", "el caso de cocultivo de células TA28. 1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un WT1 péptido en la presencia de un anticuerpo anti-HLA-DR (sombreada)", "el caso de cocultivo de células TA28. 1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DQ", "el caso de cocultivo de células TA28. 1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DP" a partir de la izquierda, respectivamente.

La Fig. 6 es un gráfico que representa el crecimiento de células E15.2. En la figura, un eje longitudinal representa las cpm ($\times 10^4$). Los gráficos se corresponden con "el caso de cocultivo de células E15. 2 con células mononucleares de sangre periférica de un sujeto positivo para HLA-DPB1* 0901 sin pulso con un péptido WT1", "el caso de cocultivo de células E15. 2 cocultivo con células mononucleares de sangre periférica de un sujeto positivo para HLA-DPB1 * 0901 con un péptido WT1 (negro)", "los casos de cocultivo de células E15. 2 con células mononucleares de sangre periférica de un sujeto negativa para HLA-DPB1* 0901 sin pulso con un péptido WT1", "el caso de cocultivo células E15. 2 con células mononucleares de sangre periférica de sujeto negativo para HLA-DPB1 * 0901 negativo pulsadas con un péptido WT1" empezando por la izquierda, respectivamente.

La Fig. 7 es un gráfico que representa el crecimiento de células E15.2. En la figura, un eje longitudinal representa las cpm. Los gráficos se corresponden con "el caso de cocultivo de células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica sin pulso con un péptido WT1", "el caso de cocultivo de células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 (negro)", "el caso de cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con péptido WT1 una en presencia de un anticuerpo anti-MHC de clase I", "el caso de cocultivo de células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un WT1 péptido en la presencia de un anticuerpo anti-HLA-DR (sombreada)", "el caso de cocultivo de células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DQ " Y " el caso de cocultivo de células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DP (sombreado)" a partir de la izquierda, respectivamente.

La Fig. 8 es un gráfico que representa el crecimiento de células mononucleares positivas para HLA-DPB1*0501/*0501. En la figura, un eje longitudinal representa las cpm. Los gráficos se corresponden con "el caso sin estimulación con un péptido WT1" y "el caso con estimulación con un péptido WT1" empezando por la izquierda, respectivamente.

La Fig. 9 representa que el crecimiento de células mononucleares positivas para HLA-DPB1*0501/*0501 es suprimido por anticuerpos anti-HLA-DP. En la figura, un eje longitudinal representa las cpm. Los gráficos se corresponden con "el caso sin estimulación con un péptido WT1", "el caso con estimulación con un péptido de control del VIH", "el caso con estimulación con un péptido WT1", "el caso con estimulación con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DR", "el caso con estimulación con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DQ" y "el caso con estimulación con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DP" empezando por la izquierda, respectivamente.

Fig. 10 es un gráfico que representa el crecimiento de células E15. 2 en los casos de utilización de diversas concentraciones de un péptido WT1. En la figura, un eje longitudinal representa cpm ($\times 10^4$), y un eje horizontal representa la concentración del péptido WT1.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la activación de un linfocito T colaborador, que comprende la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y de este modo activar el linfocito T colaborador, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501,

molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. la presente invención, el péptido WT1 se refiere un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 2 (mostrándose una parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína WT1 humana en la SEC ID N.º 1), y tiene una capacidad para unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501, o un péptido donde
 5 diversas sustancias tales como un aminoácido, un péptido o un análogo de los mismos pueden estar unidos al extremo N y/o al extremo C del péptido. La sustancia puede procesarse, por ejemplo, mediante una enzima en un cuerpo vivo o por medio de un proceso tal como procesamiento intracelular, y, por último, el péptido WT1 se convierte en la forma que puede unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. La sustancia puede ser una sustancia que module la solubilidad del
 10 péptido WT1 de la presente invención o que aumente su estabilidad (resistencia a la proteasa). Como alternativa, puede ser una sustancia que libere el péptido WT1 de la presente invención específicamente, por ejemplo, en un tejido u órgano dado, o que aumente la eficiencia de la captación por una célula presentadora de antígeno. Como alternativa, puede ser un péptido WT1 que está restringido a un mismo tipo de una molécula de MHC clase I como la de un sujeto del que deriva una célula presentadora de antígeno.

El péptido WT1 de la presente invención tiene una capacidad de unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. Por tanto, el péptido WT1 puede ser un péptido que tiene la capacidad de unirse a al menos dos de una molécula de HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501 o un péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*1501 y/o molécula HLA-DPB1*0901 y/o molécula HLA-DPB1*0501, y una molécula de HLA de clase II, aparte de las moléculas, por ejemplo, un péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405 y/o una molécula HLA-DRB1*1502, un péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-DPB1*0901, molécula HLA-DRB1*0405 y/o molécula HLA-DRB1*1502, un péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-DPB1*0501, molécula HLA-DRB1*0405 y/o molécula HLA-DRB1*1502, o
 25 un péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901, molécula HLA-DPB1*0501, molécula HLA-DRB1*0405 y/o molécula HLA-DRB1*1502. El péptido WT1 que tiene una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEC ID N.º: 2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DRB1*0405 y una molécula HLA-DRB1*1502. En general, un péptido de unión a MHC de clase II consiste en 10-25 aminoácidos. Por lo tanto, el péptido WT1 tiene, preferiblemente, una secuencia de aminoácidos que consiste en 10-25 aminoácidos.

El péptido WT1 mencionado anteriormente se puede sintetizar mediante métodos usados generalmente en la técnica o modificaciones de los mismos. Dichos métodos se describen en, por ejemplo, Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vo12, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide-Gosei, Maruzen Co., Ltd., 1975; Peptide-Gosei No Kiso To Jikken, Maruzen Co., Ltd., 1985; y Iyakuhiin No Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide-Gosei, Hirokawa -Book store, 1991.

El péptido WT1 mencionado anteriormente también se puede preparar usando técnicas de ingeniería genética sobre la base de la información sobre la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido WT1. El experto en la técnica conoce bien dichas técnicas de ingeniería genética.

La célula presentadora de antígeno se refiere a una célula, tal como una célula dendrítica, que puede presentar el péptido WT1 junto con una molécula de MHC de clase II a un linfocito T colaborador. Por lo tanto, un sujeto del que deriva la célula presentadora de antígeno debe tener la misma subclase de MHC de clase II (por ejemplo, HLA-DRB1*1501, HLA-DPB1*0901, HLA-DPB1*0501, HLA-DRB1*0405 o HLA-DRB1*1502) como a la que se une el péptido WT1 añadido.

En general, un linfocito T colaborador activado mediante el reconocimiento de un péptido antigénico a través de una molécula de MHC clase II en la superficie de una célula presentadora de antígeno por el complejo TCR-CD3 sobre la superficie del linfocito T, y la estimulación de una integrina en la superficie del linfocito T mediante un ligando de la integrina en la superficie de la célula presentadora de antígeno. En la presente invención, la activación del linfocito T colaborador abarca no solo la activación del linfocito T colaborador, sino también la inducción y crecimiento del linfocito T colaborador. Como se ha descrito anteriormente, el linfocito T colaborador activado tiene una función de activar un sistema inmunológico aumentando la inducción, el crecimiento o la activación de un linfocito B o un linfocito T. Por lo tanto, el método para la activación de un linfocito T colaborador de la presente invención se puede utilizar como una terapia adyuvante en el tratamiento de un cáncer. Como alternativo, el linfocito T colaborador activado *in vitro* utilizando el método de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir un cáncer o puede usarse como una terapia adyuvante en el mismo. La activación del linfocito T colaborador se puede determinar mediante la medición de la cantidad de la producción o secreción de una citocina tal como un interferón y una interleucina.

La adición del péptido WT1 a la célula presentadora de antígeno puede ponerse en práctica directamente mediante la adición del péptido WT1, o indirectamente mediante la adición de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o la adición de una célula que comprende el vector de expresión. El vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el péptido WT1, y la célula que comprende el

vector de expresión pueden producirse mediante el método bien conocido por la persona experta en la técnica.

5 También se divulga una composición para la activación de un linfocito T colaborador mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende el péptido WT1, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a uno cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. Cuando se administra la composición de la presente invención a un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, HLA-DPB1*0901 o HLA-DPB1*0501, un sistema inmunológico en el sujeto es activado mediante la activación del linfocito T colaborador en el sujeto. El gen de WT1 se expresa a niveles altos 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 urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovarios. Por tanto, la composición de la presente invención se puede usar como terapia adyuvante el tratamiento o prevención de un cáncer. Como alternativa, el linfocito T colaborador activado usando la composición de la presente invención se puede utilizar, por ejemplo, como un adyuvante en el tratamiento de un cáncer.

20 Como se ha descrito anteriormente, el péptido WT1 mencionado anteriormente puede ser un péptido que tiene una capacidad para unirse a al menos dos de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501 o un péptido que tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*1501 y/o molécula HLA-DPB1*0901 y/o molécula HLA-DPB1*0501, y una molécula de MHC de clase II distinta de ellas. Por lo tanto, siempre que la célula presentadora de antígeno deriva de un sujeto positivo para una subclase de MHC de clase II a la que se puede unir el péptido WT1 de la presente invención, puede dar como resultado el efecto de la activación del linfocito T colaborador de la composición de la presente invención.

25 La composición anteriormente mencionada puede comprender además del péptido WT1, por ejemplo, un vehículo, un excipiente o un aditivo. Debido a que el péptido WT1 comprendido en dicha composición activa el péptido colaborador específicamente al péptido WT1, la composición puede comprender un péptido WT1 restringido a MHC de clase I, o puede usarse con el péptido.

30 El método para utilizar dicha composición se puede seleccionar adecuadamente dependiendo de condiciones tales como la activación deseada del linfocito T colaborador, el estado de la célula presentadora de antígeno. Los ejemplos de tales métodos incluyen la administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral, y la adición a un medio de cultivo de la célula presentadora de antígeno. La cantidad del péptido WT1 comprendido en la composición, así como la forma, el número de veces de uso de la composición de la presente invención se pueden seleccionar adecuadamente dependiendo de condiciones tales como la activación deseada del linfocito T colaborador, el estado de la célula presentadora de antígeno.

40 También se divulga una composición para la activación de un linfocito T colaborador mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o una célula que comprende el vector de expresión, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a uno cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. El vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el péptido WT1 y la célula que comprende el vector de expresión se han descrito anteriormente.

45 También se divulga el uso de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un péptido WT1, o una célula que comprende el vector de expresión para la fabricación de la composición mencionada anteriormente.

50 También se divulga un kit para la activación de un linfocito T colaborador mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende el péptido WT1, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a uno cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. Preferentemente, el kit se usa en el método para la activación de un linfocito T colaborador. El kit puede comprender además del péptido WT1, por ejemplo, un medio de obtener una célula presentadora de antígeno, o un medio para determinar la actividad de los linfocitos T colaboradores. En general, se adjunta al kit un manual de instrucciones. Usando el kit de la presente invención se pueden inducir linfocitos T colaboradores específicos de WT1 con eficiencia.

60 También se divulga un kit para la activación de un linfocito T colaborador mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o una célula que comprende el vector de expresión, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501.

65 También se divulga un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto, que comprende la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y, de este modo activar, un linfocito T colaborador, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501,

molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. En el método mencionado anteriormente, el sistema inmunológico en el sujeto se activa mediante la activación de un linfocito T colaborador, y un cáncer en el sujeto se trata o se previene. La adición del péptido WT1 a la célula presentadora de antígeno puede ponerse en práctica directamente mediante la adición del péptido WT1, o indirectamente mediante la adición de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o la adición de una célula que comprende el vector de expresión.

Como se ha descrito anteriormente, el linfocito T colaborador reconoce el complejo de una cualquiera de las moléculas de MHC de clase II, particularmente una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 o molécula HLA-DPB1*0501 y el péptido WT1. Por lo tanto, el sujeto es un sujeto que tiene una molécula de MHC de clase II a la que se une el péptido WT1, por ejemplo, sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 o positivo para HLA-DPB1*0501. Como se ha descrito anteriormente, el péptido WT1 de la presente invención puede ser un péptido que tiene una capacidad para unirse a al menos dos de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501 o un péptido que tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*1501 y/o molécula HLA-DPB1*0901 y/o molécula HLA-DPB1*0501, y una molécula de MHC de clase II distinta de ellas. Por lo tanto, en tal caso, es posible tratar o prevenir un cáncer en un sujeto positivo para una subclase de MHC de clase II a la que el péptido WT1 de la presente invención puede unirse. 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 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 urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovarios. Además, el método de la presente invención se puede utilizar con un método para el tratamiento o prevención de un cáncer con un péptido WT1 restringido a moléculas de MHC de clase I o una composición farmacéutica para el mismo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto mediante la activación de un linfocito T colaborador mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende el péptido WT1, donde el péptido WT1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2 y tiene una capacidad de unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. El gen de WT1 se expresa a niveles altos 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 urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovarios. Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para el tratamiento o prevención de un cáncer.

Como se ha descrito anteriormente, el péptido WT1 mencionado anteriormente es un péptido que tiene una capacidad para unirse a al menos dos de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501 o un péptido que tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*1501 y/o molécula HLA-DPB1*0901 y/o molécula HLA-DPB1*0501, y una molécula de MHC de clase II distinta de ellas. Por lo tanto, siempre que la célula presentadora de antígeno deriva de un sujeto positivo para una subclase de MHC de clase II a la que el péptido WT1 se puede unir, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir un cáncer.

Cuando se administra la composición farmacéutica de la presente invención a, por ejemplo, un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 o positivo para HLA-DPB1*0501, puede activarse un sistema inmunológico en un sujeto puede ser activado mediante la activación del linfocito T colaborador por el péptido WT1 comprendido en la composición farmacéutica, de este modo tratando o evitando un cáncer. Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar en un procedimiento para el tratamiento o prevención de un cáncer.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además del péptido WT1 como ingrediente activo, por ejemplo, un vehículo o un excipiente. El péptido WT1 comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención se une a una molécula de MHC de clase II sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno y activa un linfocito T colaborador. Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además un activador, factor de crecimiento, inductor de linfocitos T colaboradores, o puede comprender un péptido WT1 restringido de MHC de clase II.

El método para administrar de la composición farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar adecuadamente en función de condiciones tales como el tipo de enfermedad, la afección del sujeto o el sitio diana. Ejemplos de dichos métodos incluyen administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral. La cantidad del péptido comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención, así como la forma de dosificación y el número de veces de la administración de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden seleccionar adecuadamente en función de condiciones tales como el tipo de enfermedad, la afección del sujeto o el sitio diana. La única dosis del péptido normalmente es de 0,0001 mg - 1.000 mg, preferentemente de 0,001 mg -

1.000 mg.

5 También se divulga una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto mediante la activación de un linfocito T colaborador mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o una célula que comprende el vector de expresión, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501.

10 También se divulga el uso de un péptido WT1, un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un péptido WT1, o una célula que comprende el vector de expresión para la fabricación de la composición.

15 También se divulga un anticuerpo que se une específicamente a un péptido WT1, donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DPB1*0901 y una molécula HLA-DPB1*0501. El anticuerpo se puede preparar por los medios o métodos conocidos para la persona experta en la técnica. El anticuerpo puede usarse para el diagnóstico de diversos tipos de cáncer o el pronóstico de los mismos.

20 También se divulga un método para la determinación de la presencia o cantidad de un péptido WT1 en un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 o positivo para HLA-DPB1*0501, que comprende:

(a) hacer reaccionar un anticuerpo anti-WT1 con una muestra del sujeto; y
 (b) determinar la presencia o cantidad del anticuerpo anti-WT1 que se une específicamente al péptido WT1 contenido en la muestra. Por ejemplo, es posible diagnosticar un cáncer o el pronóstico del mismo incubando el anticuerpo anti-WT1 con una muestra de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 o positivo para HLA-DPB1*0501, o la administración del anticuerpo anti-WT1 a un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 o positivo para HLA-DPB1*0501, y determinar, por ejemplo, la posición, el sitio o la cantidad del mismo. El anticuerpo anti-WT1 se refiere a un anticuerpo que puede reconocer específicamente el péptido WT1 anteriormente mencionado. El anticuerpo anti-WT1 puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo anti-WT1 puede estar marcado. Un marcador conocido, tal como un marcador fluorescente o un marcador radioactivo, se puede usar como marcador. Marcándolo, la presencia o cantidad del péptido WT1 se pueden determinar fácilmente y rápidamente.

35 También se divulga un kit para la determinación de la presencia o cantidad de un péptido WT1 que comprende el anticuerpo anti-WT1 como un componente esencial.

40 Por otra parte, en la determinación de la presencia o cantidad del péptido WT1, cuando el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*0405 y/o molécula HLA-DRB1*1502, es posible determinar la presencia o cantidad del péptido WT1 en un sujeto con una subclase tal del MHC de clase II.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende un linfocito T colaborador con un péptido WT1, el péptido WT1, donde el péptido WT1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º 2 y tiene la capacidad de unirse a una cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501. El cáncer se tratar o previene mediante la inducción, el crecimiento o la activación de un linfocito T o linfocito T mediante el linfocito T colaborador activado. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención en este aspecto se puede usar junto con otro método para el tratamiento o la prevención de un cáncer, o la composición farmacéutica para el mismo. La activación del linfocito T colaborador con el péptido WT1 abarca no solo el activación directa con el péptido WT1 sino también la activación indirecta con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o una célula que comprende el vector de expresión

50 La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además del linfocito T colaborador activado como ingrediente activo, por ejemplo, un vehículo o un excipiente. El método para administrar de la composición farmacéutica se puede seleccionar adecuadamente en función de condiciones tales como el tipo de enfermedad, la afección del sujeto o el sitio diana. Los ejemplos de dichos métodos incluyen administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral. La cantidad del linfocito T colaborador comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención, así como la forma de dosificación y el número de veces de la administración de la composición farmacéutica se pueden seleccionar adecuadamente en función de una condición condiciones tal como el tipo de enfermedad, la afección del sujeto o el sitio diana.

65 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y de este modo activar el linfocito T colaborador y administrar el T colaborador a un sujeto, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501.

También se divulga el uso de un péptido WT1 para la fabricación de la composición farmacéutica que comprende un linfocito T colaborador activado.

5 También se divulga un método para la determinación de la presencia o cantidad de un linfocito T colaborador específico de WT1 en uno cualquiera de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 o positivo para HLA-DPB1*0501, que comprende:

- 10 (a) hacer reaccionar un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 o molécula HLA-DPB1*0501 con una muestra del sujeto; y
- 15 (b) determinar la presencia o la cantidad de un linfocito T colaborador que reconoce el complejo contenido en la muestra. La muestra del sujeto puede ser una cualquiera siempre que exista una posibilidad de que contenga un linfocito. Los ejemplos de las muestras incluyen fluido corporal, tal como sangre o linfa y un tejido. El complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 o molécula HLA-DPB1*0501 se puede preparar, por ejemplo, como un tetrámero o pentámero usando un procedimiento conocido para un experto en la técnica, tal como el método de biotina-estreptavidina. La presencia o la cantidad del linfocito T colaborador que reconocen dicho complejo se puede medir mediante un procedimiento conocido para un experto en la técnica. El complejo mencionado anteriormente puede estar marcado. Un marcador conocido, tal como un marcador fluorescente o un marcador radioactivo, se puede usar como marcador. Marcándolo, la presencia o cantidad del linfocito T colaborador se pueden determinar fácilmente y rápidamente. El método se puede utilizar para diagnosticar un cáncer o para el pronóstico del mismo.

25 También se describe una composición para la determinación de la presencia o cantidad de un linfocito T colaborador en una cualquiera de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 y positivo para HLA-DPB1*0501, que comprende un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 o molécula HLA-DPB1*0501.

30 También se divulga un kit para la determinación de la presencia o cantidad de un linfocito T colaborador en un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 y positivo para HLA-DPB1*0501, que comprende un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 o molécula HLA-DPB1*0501.

35 Además, en la determinación de la presencia o cantidad del linfocito T colaborador, cuando el péptido WT1 tiene una capacidad para una molécula HLA-DRB1*0405 y/o molécula HLA-DRB1*1502 en la determinación de la presencia o cantidad del linfocito T colaborador, es posible determinar la presencia o cantidad del linfocito T colaborador en un sujeto con una subclase tal del MHC de clase II. En tal caso, se usa un complejo de un péptido WT1 y una molécula de MHC de clase II a la que se une el péptido WT1.

40 También se divulga un método para la obtención de un linfocito T colaborador utilizando un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 o molécula HLA-DPB1*0501, que comprende:

- 45 (a) hacer reaccionar una muestra con el complejo; y
- (b) obtener un linfocito T colaborador que reconoce el complejo contenido en la muestra. El complejo se ha descrito anteriormente. La muestra puede ser una cualquiera siempre que exista una posibilidad de que contenga un linfocito. Los ejemplos de las muestras incluyen una muestra de un sujeto, tal como sangre y un cultivo celular. El linfocito T colaborador que reconoce el complejo se puede obtener usando un procedimiento conocido para un experto en la técnica, tal como FACS o MACS. El método permite el cultivo de los linfocitos T colaboradores obtenidos y su uso para el tratamiento o prevención de varios cánceres.

50 También se divulga un linfocito T colaborador que se puede obtener mediante un método para obtener un linfocito T colaborador usando un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 o molécula HLA-DPB1*0501.

55 También se divulga un kit para la obtención de un linfocito T colaborador, que comprende un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 o molécula HLA-DPB1*0501.

60 Además, en la obtención del linfocito T colaborador, cuando el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*0405 y/o molécula HLA-DRB1*1502, es posible obtener un linfocito T colaborador que reconoce un complejo de tal subclase de MHC de clase II y un péptido WT1. En tal caso, se usa el complejo del péptido WT1 y una molécula de MHC de clase II a la que se une.

También se divulga un método para la determinación de la presencia o cantidad de un linfocito T colaborador específico de WT1 en un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901, positivo para HLA-DPB1*0501, positivo para HLA-DRB1*0405 o positivo para HLA-DRB1*1502, que comprende:

- 65 (a) estimular una célula mononuclear de sangre periférica, linfocitos invasivos, células tumorales, células en el líquido ascítico, células en el líquido pleural, células en el líquido cefalorraquídeo, células de médula ósea o de

ganglio linfático con un péptido WT1; y

(b) determinar la producción de una citocina o la reacción del linfocito T colaborador,

donde una presencia o un aumento en la cantidad de la producción de la citocina o la reacción del linfocito T colaborador indica la presencia o cantidad del linfocito T colaborador específico de WT1. Las células tales como células mononucleares de sangre periférica, linfocitos invasivos, células tumorales, células en el líquido ascítico, células en el líquido pleural, células en el líquido cefalorraquídeo, células de médula ósea y de células de los ganglios linfáticos utilizadas en el método pueden derivar de un sujeto sano o de un paciente de cáncer. Mediante el uso de las células de un sujeto sano, es posible determinar si el sujeto sufre un cáncer o no, si el sujeto tiene predisposición al mismo o no. Mediante el uso de las células de un paciente de cáncer, es posible predecir si la inmunoterapia con WT1 tiene efecto en el paciente de cáncer o no. La estimulación de las células con el péptido WT1 puede ponerse en práctica *in vitro* o *in vivo*. Debido a la facilidad, se prefiere la estimulación *in vitro*. La presencia de la producción de la citocina o la reacción del linfocito T colaborador, o la cantidad de la producción de la citocina o la reacción del linfocito T colaborador se pueden determinar mediante un método conocido.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención con mayor detalle.

Ejemplos

1. Preparación de célula presentadora de antígeno. Se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la sangre periférica que se había extraída de un donante sano (positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 o positivo para HLA-DPB1*0501). Las PBMC se sembraron a una placa de plástico de 6 pocillos a una densidad de 1×10^7 células / pocillo en 1% de suero AB (Nabi, Miami, FL), medio X-VIVO 15 (Cambrex), y se cultivaron durante 2 horas. Después del cultivo, se eliminaron las células en suspensión, y las células adherentes restantes se cultivaron en 1.000 UI/ml IL-4 (PeproTech), 1.000 UI/ml de GM-CSF (PeproTech), 1 % de suero AB y medio X-VIVO 15. El día 2 y el día 4, se cambió el medio, y se añadieron IL-4 y GM-CSF. El día 6, se añadieron 100 UI / ml de TNF- α para madurar las células presentadoras de antígeno.

2. Inducción de linfocitos T CD4+ específicos de WT1

Las células T CD4 + se separaron de la sangre derivada del mismo donante utilizando RosetteSep para la separación de las células T positivas para CD4 (StemCell). Las células T CD4 + (3×10^6 células) se añadieron a cada pocillo de una placa de 24 pocillos. Se estimularon con células presentadoras de antígeno autólogas (3×10^5 células) que habían sido pulsadas con 20 μg / ml de péptido WT1 (SEC ID N $^\circ$. 2) Y se irradiaron con 25 Gy de radiación. Al día siguiente después de la estimulación, se añadieron 20 UI / ml de IL-2. Del mismo modo, las células T CD4 + estimuladas se estimularon usando las células presentadoras de antígeno pulsadas con 20 μg / ml de péptido WT1 cada dos semanas. Además, el medio se cambió al medio que contiene IL-2 cada dos días después de la segunda estimulación. Los linfocitos T CD4 + inducidos en total por tres veces de estimulación (las células positivas para HLA-DRB1*1501 y HLA-DPB1*0901 se definieron como células TA28. y E15. 2, respectivamente) se usaron para los experimentos siguientes.

3. Medición de IFN- γ

Las células TA28. 1 y las células mononucleares de sangre periférica de un sujeto a partir del cual se derivaron las células TA28. 1 se cultivaron en la presencia de 20 μg /ml de péptido WT1 / ml durante 24 horas. Después del cultivo, la cantidad de IFN- γ en el sobrenadante se cuantificó usando el kit de ELISA. Como control se usó una célula mononuclear de sangre periférica de un sujeto negativo para HLA-DRB1*1501. Los resultados se muestran en la figura 1. Se confirmó que las células TA28. 1 reconocen el péptido WT1 específicamente a una molécula HLA-DRB1*1501 para aumentar la cantidad producida de IFN- γ (es decir, la activación).

Además, se confirmó que las células TA28. 1 y las células E15. 2 no producen IL-4 e IL-10 usando el kit de ELISA. Los resultados se muestran en las Figs. 2 y 3. Se confirmó que las células TA28. 1 y E15. 2 son células Th1.

Se usaron células mononucleares positivas para HLA-DPB1*0501/0501 para llevar a cabo los siguientes experimentos. Las células se suspendieron en X-VIVO (1 % de suero AB), y se añadieron 20 μg / ml de péptido WT1, 10 μg / ml de brefeldina A y 0,5 μg / ml de CD28 / 49d. Se incubaron a 37 $^\circ\text{C}$ y 5 % de CO_2 durante 4 horas. Como control, se utilizó una célula incubada sin la adición de un péptido WT1. Después de lavar con tampón, se añadieron un anticuerpo anti-CD3-PerCP y un anticuerpo anti-CD4-APC, y se incubaron a 4 $^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Después de lavar con tampón, las células se fijaron y se permeabilizaron usando BD Cytofix / Cytoperm (4 $^\circ\text{C}$, 20 minutos). Después de lavar con BD perm/tampón de lavado, se añadieron anti-INF- γ -FITC (BD, clon: B27) y anti-IL-17-PE (eBioscience, clon: eBio64DEC17) y se incubaron a 4 $^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Después de lavar con tampón, las células se analizaron con FACS. Los resultados se muestran en la fig. 4. Se confirmó que las células mononucleares positivas para HLA-DPB1*0501 crecían y producían IFN- γ e IL-17.

4. Ensayo de crecimiento

El ensayo de crecimiento se realizó mediante el método de incorporación de [³H]-timidina. Las células TA28.1 (3 x 10⁴ células) y las células mononucleares de sangre periférica (positivas para HLA-DRB1*1501; 1 x 10⁵ células) que habían sido pulsadas con los péptidos WT1 e irradiadas se cocultivaron en una placa de 96 pocillos. Después de cocultivo durante 80 horas, se añadieron 37kBq / pocillo de [³H] -timidina (Amersham Biosciences). Se incubaron durante otras 16 horas, y se midieron usando un contador β de centelleo. Las mediciones se representan como recuento / minuto (cpm). Como control, se utilizó una célula mononuclear de sangre periférica sin pulsar con un péptido. Además, con el fin de confirmar que la señal de activación es específica para una molécula HLA-DRB1*1501 se usaron un anticuerpo anti-MHC de clase I, un anticuerpo anti-HLA-DR, un anticuerpo anti-HLA-DQ y un anticuerpo anti-HLA-DP. Los resultados se muestran en la fig. 5. Se confirmó que las células TA28. 1 se activaban mediante una señal a través del péptido WT1 y HLA-DRB1*1501, y se cultivaron. Se confirmó, además, que el crecimiento era específico para HLA-DRB1*1501, ya que fue suprimido por el anticuerpo anti-HLA-DR.

Del mismo modo, se utilizaron células E15. 2 células para realizar el ensayo de crecimiento. Como control adicional se usaron células mononucleares de sangre periférica de un sujeto negativo para HLA-DPB1*0901. Los resultados se muestran en las Figs. 6 y 7. Se confirmó que las células E15. 2 eran activados por una señal a través del péptido WT1 y HLA-DPB1 * 0901, y se cultivaron. Se confirmó, además, que el crecimiento era específico para HLA-DPB1*0901, ya que fue suprimido por el anticuerpo anti-HLA-DP.

Adicionalmente, se usaron células mononucleares positivas para HLA-DPB1*0501/0501 para llevar a cabo el ensayo de crecimiento. Como control se usó una célula mononuclear de sangre periférica de un sujeto negativo para HLA-DPB1*0501. Los resultados se muestran en las Figs. 8 y 9. Se confirmó que las células mononucleares positivas para HLA-DPB1*0501/0501 eran activadas por una señal a través del péptido WT1 y HLA-DPB1*0501, y se cultivaron. Se confirmó, además, que el crecimiento era específico para HLA-DPB1*0501, ya que fue suprimido por el anticuerpo anti-HLA-DP.

Además, el ensayo de crecimiento de las células E15. 2 se realizó con diversas concentraciones del péptido WT1. La concentración del péptido WT1 utilizado fue 0,08, 0,4, 2, 10, 50, 100 o 150 µg / ml. Los resultados se muestran en la fig. 10. Se confirmó que los péptidos WT1 crecían en las células E15. 2 de una manera dependiente de la concentración.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona a un método para la activación *in vitro* de un linfocito T colaborador con un péptido WT1 que tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1 * 1,501, molécula HLA-DPB1 * 0901 o molécula HLA -DPB1 * 0. 501, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y / o prevención de un cáncer mediante la activación de un linfocito T colaborador. Por tanto, la presente invención se puede usar en los campos de medicina y similares, por ejemplo en los campos de desarrollo y preparación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de varios tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos que expresan el gen WT1 a niveles elevados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Osaka University

<120> Método y composición farmacéutica para activar linfocitos T

<130> 668070

<150> JP 2007-047317

<151> 27-02-2007

<160> 2

<170> PatentIn versión 3. 2

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 559 062 T3

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

ES 2 559 062 T3

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

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gn Met His Ser Arg Lys His
 1 5 10 15

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para la activación *in vitro* de un linfocito T colaborador, que comprende la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y activando así el linfocito T colaborador, donde el péptido WT1 es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEC ID N.º: 2) y tiene una capacidad de unirse a uno cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501, donde dicho linfocito T colaborador es de un sujeto que es uno cualquiera de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 y positivo para HLA-DPB1*0501.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a al menos dos de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el péptido WT1 además tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*0405 y/o una molécula HLA-DRB1*1502.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el péptido WT1 tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la adición del péptido WT1 a la célula presentadora de antígeno se realiza mediante la adición del péptido WT1, la adición de un vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el péptido WT1 o la adición de una célula que incluye el vector de expresión.
6. Una composición farmacéutica que comprende un péptido WT1 para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto que es uno cualquiera de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 y positivo para HLA-DPB1*0501, donde el péptido WT1 es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEC ID N.º: 2) y tiene una capacidad de unirse a uno cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501.
7. Una composición farmacéutica para su uso en un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto que es uno cualquiera de un sujeto positivo para HLA-DRB1*1501, positivo para HLA-DPB1*0901 y positivo para HLA-DPB1*0501, que comprende un linfocito T colaborador de dicho sujeto activado con un péptido WT1, donde el péptido WT1 es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEC ID N.º: 2) y tiene una capacidad de unirse a uno cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, molécula HLA-DPB1*0901 y molécula HLA-DPB1*0501.

Fig. 1

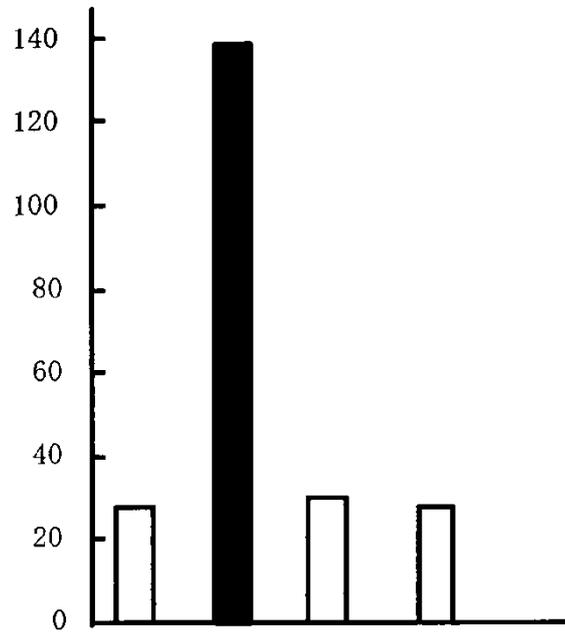


Fig. 2

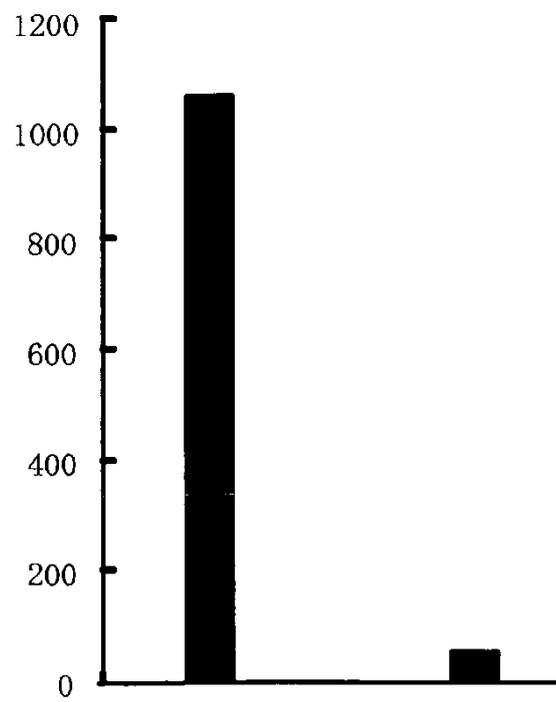


Fig. 3

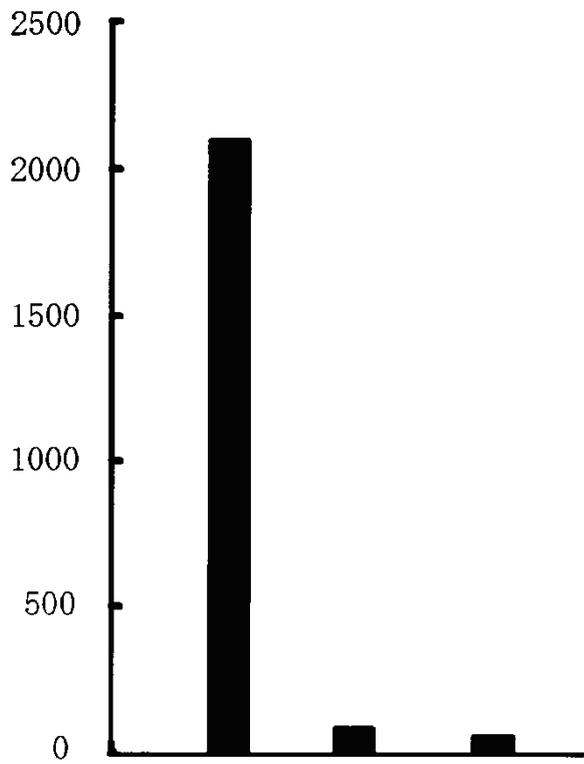


Fig. 4

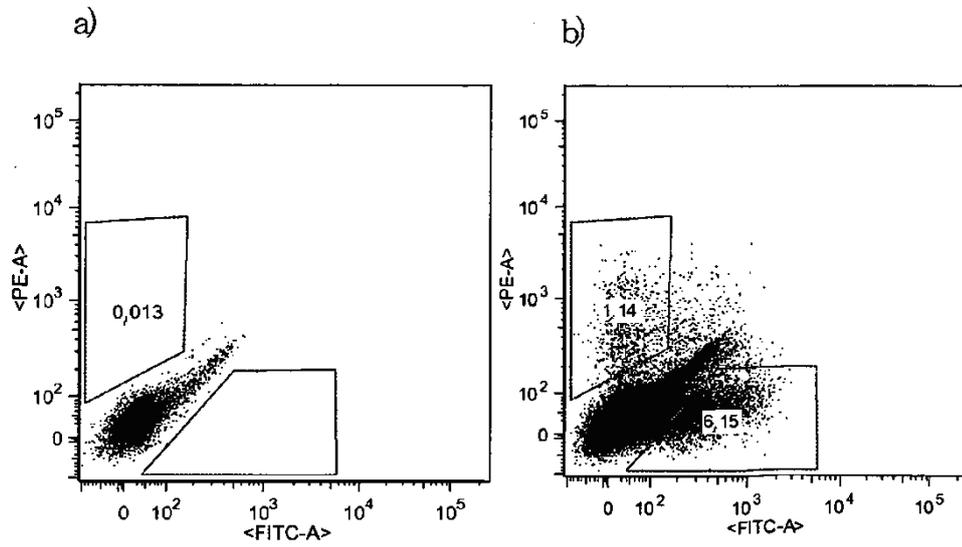


Fig. 5

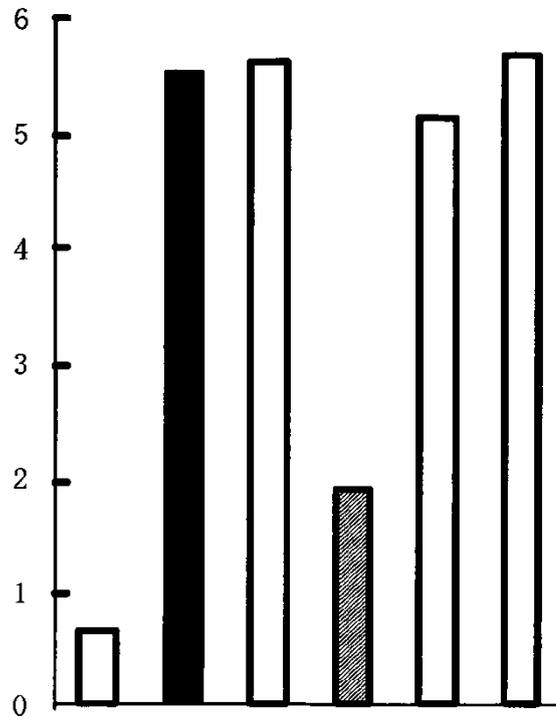


Fig. 6

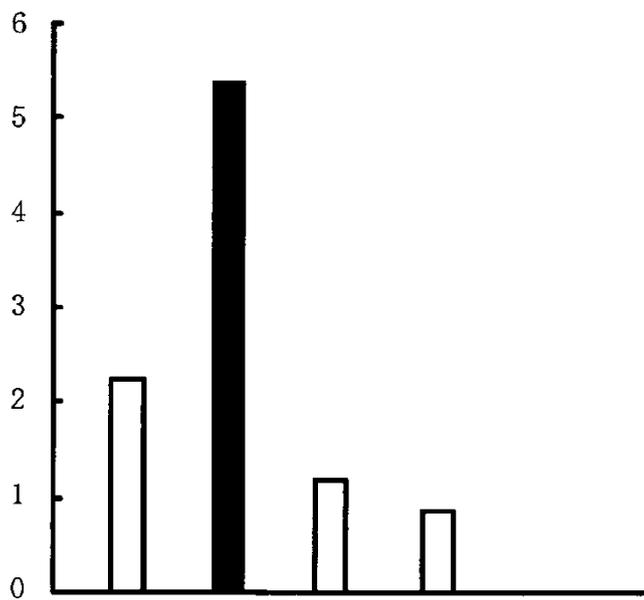


Fig. 7

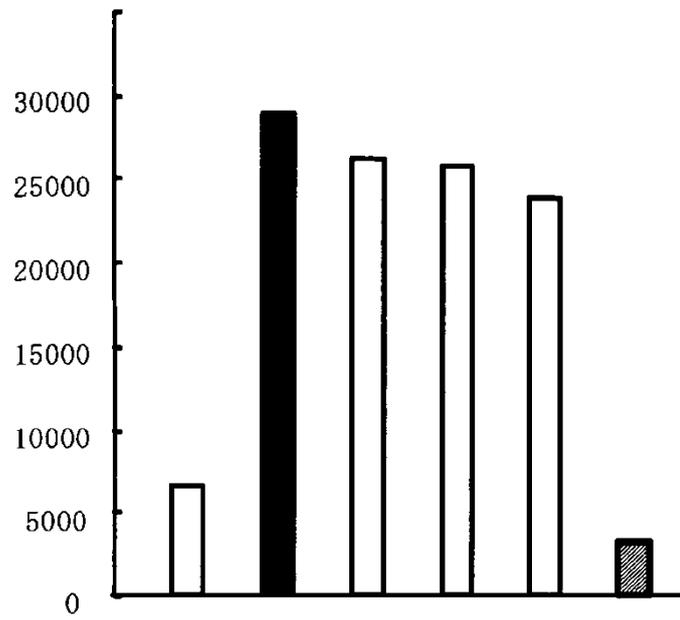


Fig. 8

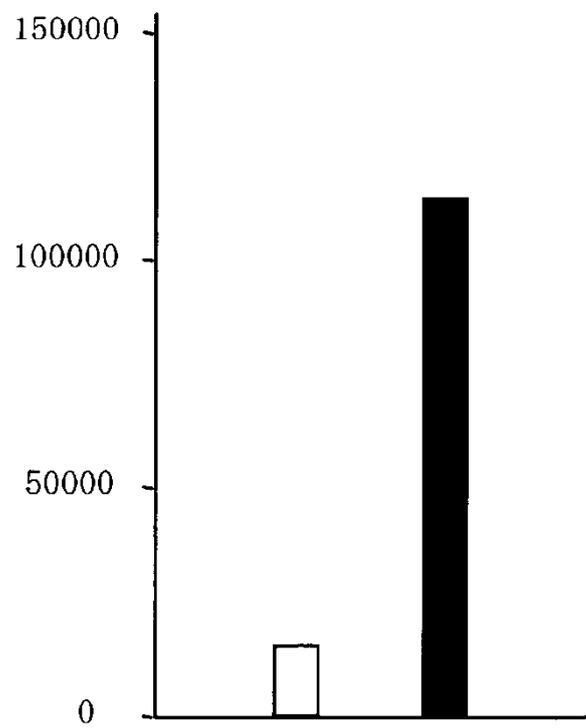


Fig. 9

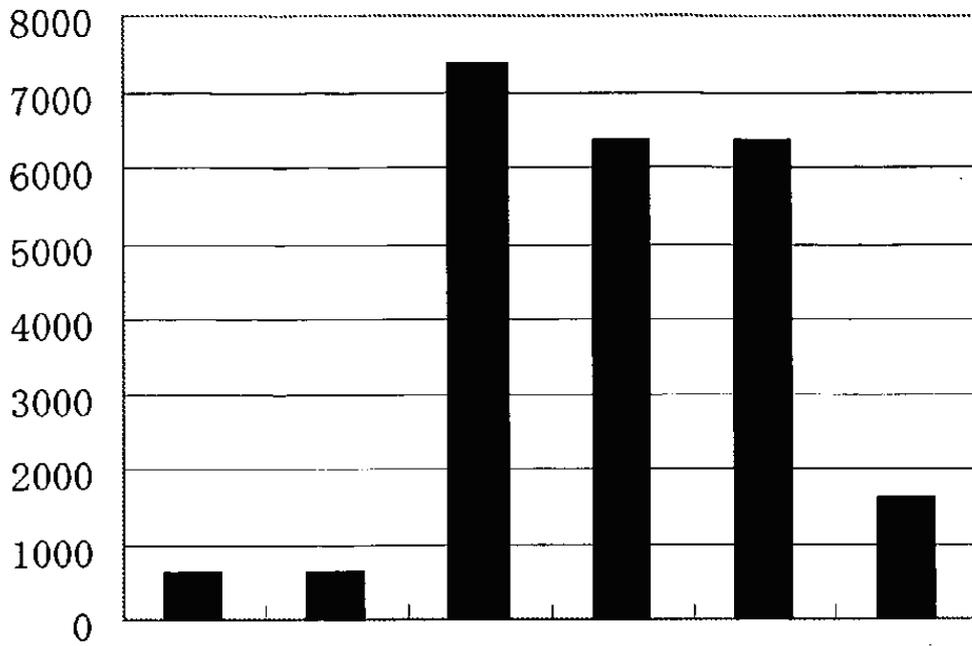


Fig. 10

