

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 337**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/14 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2013 PCT/JP2013/083580**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14098012**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2013 E 13864968 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 2933261**

54 Título: **Método para activar células T auxiliares**

30 Prioridad:

17.12.2012 JP 2012274494

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2021

73 Titular/es:

**OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)
 9, Kanda-Tsukasa-machi, 2-chome, Chiyoda-ku
 Tokyo 101-8535, JP y
 INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
 IMMUNOLOGY, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KUBO, HIROSHI;
 SOGO, SHINJI y
 SUGIYAMA, HARUO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 805 337 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 activar células T auxiliares

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición para su uso en (1) la activación de células T auxiliares, (2) la activación de células T citotóxicas o (3) el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto; células presentadoras de antígenos; células T auxiliares; células T citotóxicas (CTL); y una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un cáncer que comprende dichas células presentadoras de antígenos y/o dichas células T auxiliares y/o dichas células T citotóxicas.

Técnica anterior

15 El gen WT1 (gen del tumor 1 de Wilms) se identificó como un gen causante de tumor de Wilms que es un cáncer de riñón en la infancia, y el gen codifica un factor de transcripción que tiene una estructura de dedo de cinc (Documentos No Relacionados con Patentes 1 y 2). Estudios posteriores mostraron que el gen anterior sirve como un gen canceroso en tumores de órganos hematopoyéticos o cánceres sólidos (Documentos No Relacionados con Patentes 3 a 6).

20 Se demostró que las células T citotóxicas (CTL) específicas de péptidos son inducidas por la estimulación in vitro de células mononucleares de sangre periférica utilizando un péptido que tiene una porción de una secuencia de aminoácidos que codifica la proteína WT1, y estos CTL dañan las células cancerosas de los tumores de órganos hematopoyéticos o cánceres sólidos que expresan WT1 de forma endógena. Los CTL reconocen el péptido anterior en forma de un complejo unido a una molécula del MHC de clase I, y por lo tanto el péptido difiere según los subtipos de MHC de clase I (Documentos Relacionados con Patentes 1 a 4 y Documento No Relacionado con Patentes 7).

30 Por otro lado, la presencia de células T auxiliares específicas para un antígeno canceroso es importante para inducir los CTL de manera efectiva (documento no de patente 8). Las células T auxiliares se inducen y activan al reconocer un complejo de una molécula de MHC de clase II con un péptido antigénico sobre las células presentadoras de antígenos. Las células T auxiliares activadas ayudan a la proliferación, diferenciación y maduración de las células B mediante la producción de citocinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 o interferones. Dado que tales células T auxiliares tienen la función de activar el sistema inmunitario al promover la proliferación y activación de las células B y las células T, se sugiere que la mejora de la función de las células T auxiliares a través de un péptido antigénico de unión al MHC de clase II en la inmunoterapia contra el cáncer es útil para mejorar los efectos de una vacuna contra el cáncer (Documento No Relacionado con Patentes 9).

40 Recientemente se ha demostrado que un péptido auxiliar promiscuo que se puede unir a múltiples moléculas MHC de clase II y activar células T auxiliares está presente entre los péptidos particulares que tienen una porción de una secuencia de aminoácidos que codifica una proteína WT1 (en adelante, también denominados péptidos WT1 en la presente memoria descriptiva) (Documentos Relacionados con Patentes 5 y 6).

45 Se ha descrito la capacidad del péptido WT1 de SEQ ID NO: 2 (WT1₃₃₂) para unirse a las moléculas MHC de clase II HLA-DRB1*04:05, HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*15:02 y HLA-DPB1*09:01, y su capacidad para activar las células T auxiliares (Documento No Relacionado con Patentes 10).

Sin embargo, fue muy difícil verificar si los péptidos WT1 también tienen efecto o no sobre otras moléculas del MHC de clase II, debido a los muchos tipos de moléculas del MHC de clase II.

50 Documentos de la técnica anterior**Documentos No Relacionados con Patentes**

Documento Relacionado con Patentes 1: Publicación Internacional Núm. WO 2003/106682
 55 Documento Relacionado con Patentes 2: Publicación Internacional Núm. WO 2005/095598
 Documento Relacionado con Patentes 3: Publicación Internacional Núm. WO 2007/097358
 Documento Relacionado con Patentes 4: Solicitud Internacional Núm. PCT/JP2007/074146
 Documento Relacionado con Patentes 5: Publicación Internacional Núm. WO 2005/045027
 Documento Relacionado con Patentes 6: Publicación Internacional Núm. WO 2008/105462

60

Documentos No Relacionados con Patentes

Documento No Relacionado con Patentes 1: Daniel A. Haber et al., Cell. 29 de junio de 1990; 61(7): 1257-69
 Documento No Relacionado con Patentes 2: Call KM et al., Cell. 9 de febrero de 1990; 60(3):509-20

Documento No Relacionado con Patentes 3: Menke AL et al., Int Rev Cytol. 1998; 181: 151-212. Revisión
 Documento No Relacionado con Patentes 4: Yamagami T et al., Blood. 1 de abril de 1996; 87(7):2878-84
 Documento No Relacionado con Patentes 5: Inoue K et al., Blood. 15 de abril de 1998; 91(8):2969-76
 Documento No Relacionado con Patentes 6: Tsuboi A et al., Leuk Res. Mayo de 1999; 23(5):499-505
 Documento No Relacionado con Patentes 7: Oka Y et al., Immunogenetics. Febrero de 2000; 51(2):99-107
 Documento No Relacionado con Patentes 8: Gao FG et al., Cancer Res. 15 de noviembre de 2002; 62(22):6438-41
 Documento No Relacionado con Patentes 9: Zeng G, J Immunother. Mayo de 2001; 24(3):195-204
 Documento No Relacionado con Patentes 10: Fujiki F et al., Microbiol Immunol. 2008; 52(12):591-600

10 **Descripción de la invención**

Problemas a resolver por la invención

15 Por consiguiente, un objeto que se logrará mediante la presente invención es proporcionar una composición para su uso en la activación de las células T auxiliares en un sujeto, una composición para su uso en la activación de células T citotóxicas en un sujeto, siendo el sujeto positivo para moléculas particulares del MHC de clase II, células presentadoras de antígenos, células T auxiliares, células T citotóxicas y una composición farmacéutica para tratar/prevenir un cáncer.

20 Medios para resolver los problemas

En estas circunstancias, los autores de la presente invención han estudiado exhaustivamente y han encontrado que un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His se une a una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, y activa las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas. De ese modo se ha completado la presente invención.

La presente invención proporciona:

30 (1) Una composición para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer mediante la activación de células T auxiliares en un sujeto, en donde dicha composición comprende un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido, o células que contienen el vector de expresión, en donde las células T auxiliares reconocen un complejo del péptido WT1 y una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA -DRB1*14:05, una molécula HLADQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, en donde el péptido WT1 es:

40 (a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o
 (b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, delección o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01;
 45 y en donde dichas células T auxiliares son de un sujeto seleccionado entre un sujeto positivo para HLA-DRB1*08:02, un sujeto positivo para HLA-DRB1*13:02, un sujeto positivo para HLA-DRB1*14:03, un sujeto positivo para HLA -DRB1*14:05, un sujeto positivo para HLA-DQB1*03:02 y un sujeto positivo para HLA-DQB1*04:01;

50 (2) Una composición para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer mediante la activación de células T citotóxicas en un sujeto, en donde dicha composición comprende un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido, o células que contienen el vector de expresión, en donde dicha composición se administra a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01,
 55 en donde el péptido WT1 es:

60 (a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o
 (b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, delección o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una

molécula HLA-DQB1*04:01 molécula, y

en donde dichas células T citotóxicas son de un sujeto seleccionado entre un sujeto positivo para HLA-DRB1*08:02, un sujeto positivo para HLA-DRB1*13:02, un sujeto positivo para HLA-DRB1*14:03, un sujeto positivo para HLA-DRB1*14:05, un sujeto positivo para HLA-DQB1*03:02 y un sujeto positivo para HLA-DQB1*04:01;

5

(3) Una composición para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto, en donde dicha composición comprende un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión, en donde la composición se administra a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01, y en donde el péptido WT1 es:

10

(a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o

(b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, deleción o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01;

15

20

(4) Células presentadoras de antígenos que presentan un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula del MHC de clase II, en donde la molécula del MHC de clase II es una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, en donde el péptido WT1 es:

25

(a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o

(b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, deleción o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01;

30

35

(5) Células T auxiliares que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula del MHC de clase II, en donde la molécula del MHC de clase II es una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, en donde el péptido WT1 es:

40

(a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o

(b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, deleción o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01;

45

50

(6) Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto, que comprende como ingrediente activo, cualquiera de las células presentadoras de antígenos descritas en el apartado (4) anterior, o las células T auxiliares descritas en el apartado (5) anterior. En realizaciones particulares de las células presentadoras de antígenos o las células T auxiliares, el péptido WT1 es un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2);

55

(7) La composición para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer mediante la activación de células T auxiliares en un sujeto, el tratamiento o la prevención del cáncer mediante la activación de células T citotóxicas en un sujeto, o el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto de acuerdo con cualquiera de los apartados (1) a (3), en donde dicha composición comprende el péptido WT1;

60

(8) La composición para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer mediante la activación de células T auxiliares en un sujeto, el tratamiento o la prevención del cáncer mediante la activación de células T

citotóxicas en un sujeto, o el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto de acuerdo con cualquiera de los apartados (1) a (4), en donde el péptido WT1 es un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2);

5 (9) Las células presentadoras de antígenos de acuerdo con el apartado (4), en donde el péptido WT1 es un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2);

10 (10) Las células T auxiliares de acuerdo con el apartado (5), en donde el péptido WT1 es un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

Efectos de la invención

15 De acuerdo con la presente invención, se proporcionan una composición para su uso en la activación de células T auxiliares en un sujeto, una composición para su uso en la activación de células T citotóxicas en un sujeto, y una composición para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto, en donde las composiciones comprenden un péptido WT1 que tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01.

Breve descripción de los dibujos

25 La Fig. 1 muestra la restricción HLA del Clon R82-1. El eje horizontal muestra la cantidad de producción de IFN- γ (pg/ml) tras la adición de WT1-332 (columna de color negro) o disolvente (columna de color blanco). El eje vertical muestra los tipos de células B-LCL presentadoras de antígenos. Los datos representan la media \pm DT (por triplicado). \$: Los datos incluyen valores extrapolados.

30 La Fig. 2 muestra la restricción HLA del Clon R132-1. El eje horizontal muestra la cantidad de producción de IFN- γ (pg/ml) tras la adición de WT1-332 (columna de color negro) o disolvente (columna de color blanco). El eje vertical muestra los tipos de células B-LCL presentadoras de antígenos. Los datos representan la media \pm DT (por triplicado). \$: Los datos incluyen valores extrapolados.

35 La Fig. 3 muestra la restricción HLA del Clon R143-1. El eje horizontal muestra la cantidad de producción de IFN- γ (pg/ml) tras la adición de WT1-332 (columna de color negro) o disolvente (columna de color blanco). El eje vertical muestra los tipos de células B-LCL presentadoras de antígenos. Los datos representan la media \pm DT (por triplicado). \$: Los datos incluyen valores extrapolados.

40 La Fig. 4 muestra la restricción HLA del Clon R145-2. El eje horizontal muestra la cantidad de producción de IFN- γ (pg/ml) tras la adición de WT1-332 (columna de color negro) o disolvente (columna de color blanco). El eje vertical muestra los tipos de células B-LCL presentadoras de antígenos. Los datos representan la media \pm DT (por triplicado). \$: Los datos incluyen valores extrapolados.

45 La Fig. 5 muestra la restricción HLA del Clon Q32-1. El eje horizontal muestra la cantidad de producción de IFN- γ (pg/ml) tras la adición de WT1-332 (columna de color negro) o disolvente (columna de color blanco). El eje vertical muestra los tipos de células B-LCL presentadoras de antígenos. Los datos representan la media \pm DT (por triplicado). \$: Los datos incluyen valores extrapolados.

La Fig. 6 muestra la restricción HLA del Clon Q41-1. El eje horizontal muestra la cantidad de producción de IFN- γ (pg/ml) tras la adición de WT1-332 (columna de color negro) o disolvente (columna de color blanco). El eje vertical muestra los tipos de células B-LCL presentadoras de antígenos. Los datos representan la media \pm DT (por triplicado). \$: Los datos incluyen valores extrapolados.

Modos para llevar a cabo la invención

50 En la presente memoria se describe un método para activar células T auxiliares o células T citotóxicas, que incluye la etapa de activar células T auxiliares o células T citotóxicas mediante la adición de un péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II. La etapa de activación de las células T citotóxicas se puede llevar a cabo pasando por la etapa de activación de las células T auxiliares. Asimismo, el péptido WT1 utilizado es uno que tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01. Por otra parte, el péptido WT1 utilizado puede ser uno que tenga la capacidad de unirse a al menos dos o más moléculas del MHC de clase II de las moléculas del MHC de clase II anteriores. Asimismo, el péptido WT1 utilizado puede tener la capacidad de unirse a cualquier molécula del MHC de clase II, por ejemplo, de las moléculas HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

El péptido WT1 puede ser un péptido que tenga una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína WT1 humana representada en SEQ ID NO: 1. Un péptido demasiado largo es susceptible de una acción de proteasa, y un péptido demasiado corto no se puede unir bien a un péptido que se acomode bien en el surco. La longitud del

péptido según la presente invención es de 16 a 21 aminoácidos, por ejemplo, 16 aminoácidos, 17 aminoácidos, 18 aminoácidos o 19 aminoácidos. Los ejemplos específicos del péptido según la presente invención son aquellos que contienen la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

Además, el péptido WT1 utilizado en la presente invención incluye variantes del péptido anterior. Las variantes pueden contener, por ejemplo, un péptido seleccionado del grupo que consiste en péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos en la que un aminoácido de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 es sustituido, eliminado o añadido. La sustitución de aminoácidos en péptidos se puede llevar a cabo en cualquier posición y con cualquier tipo de aminoácido, y se prefiere la sustitución conservativa de aminoácidos. Los ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen la sustitución de un residuo Glu por un residuo Asp, un residuo Phe por un residuo Tyr, un residuo Leu por un residuo Ile, un residuo Ala por un residuo Ser y un residuo His por un residuo Arg. Preferiblemente, la adición o eliminación de aminoácidos se puede llevar a cabo en el extremo N y el extremo C de los péptidos, pero se puede llevar a cabo en una secuencia interior. Los ejemplos específicos preferidos de los péptidos de acuerdo con la presente invención son aquellos que tienen SEQ ID NO: 2. A este respecto, cualquiera de los péptidos anteriores debe tener la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, y debe activar las células T auxiliares o las células T citotóxicas (en la presente memoria también se hace referencia a ellas como CTL). Asimismo, las moléculas del MHC humano generalmente se denominan moléculas HLA y, por lo tanto, MHC se utiliza como sinónimo de HLA en la presente memoria descriptiva.

Por otra parte, los péptidos se pueden obtener modificando la secuencia de aminoácidos anterior. Los residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos anterior se pueden modificar mediante un método conocido. Tal modificación puede ser, por ejemplo, esterificación, alquilación, halogenación y fosforilación en un grupo funcional en una cadena lateral de un residuo de aminoácido. Asimismo, es posible unir varias sustancias al extremo N y/o al extremo C de un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos anterior. Por ejemplo, se pueden unir al péptido un aminoácido, un péptido y un análogo de los mismos. Por ejemplo, se puede añadir una etiqueta de histidina, o se puede formar una proteína de fusión junto con una proteína tal como tioredoxina. Alternativamente, se puede unir una marca detectable al péptido WT1. En caso de que estas sustancias se unan al péptido, se pueden tratar, por ejemplo, mediante una enzima in vivo o mediante un procedimiento tal como el procesamiento intracelular para generar finalmente un péptido que consista en la secuencia de aminoácidos anterior, que se presente sobre la superficie celular como un complejo con una molécula del MHC de clase II, pudiendo así obtener un efecto de inducción de células T auxiliares y/o células T citotóxicas. Estas sustancias pueden ser las que regulan la solubilidad del péptido, las que mejoran la estabilidad del péptido, tal como la resistencia a la proteasa, las que permiten el suministro específico del péptido, por ejemplo, a un tejido u órgano dados, o las que tienen una acción potenciadora de una eficacia de absorción de células presentadoras de antígenos u otra acción. Asimismo, estas sustancias pueden ser aquellas que aumentan la capacidad de inducir los CTL, por ejemplo, péptidos auxiliares distintos del péptido según la presente invención.

El péptido WT1 utilizado en la presente invención se puede sintetizar utilizando un método empleado habitualmente en la técnica o un método modificado del mismo. Tal método de síntesis se describe, por ejemplo, en Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., Nueva York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1975; Basis and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1985; y Development of Medicines (continuación), Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten Co., 1991. Asimismo, el péptido utilizado en la presente invención se puede preparar utilizando un mecanismo de ingeniería genética basado en la información de una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido. Tal mecanismo de ingeniería genética es bien conocido por los expertos en la técnica. Tal técnica se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos como los descritos en la bibliografía (Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983).; DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)).

Asimismo, las composiciones para su uso según la presente invención se refieren a una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido WT1 descrito anteriormente. La secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido WT1 puede ser una secuencia de ADN o una secuencia de ARN. En la presente invención, tal secuencia de polinucleótidos se puede utilizar en lugar del péptido WT1. Tal secuencia de polinucleótidos se puede utilizar mediante la integración en un vector adecuado. El vector incluye plásmidos, vectores de fago y vectores de virus, por ejemplo, pUC118, pUC119, pBR322, pCR3, pYES2, pYEUra3, pKCR, pCDM8, pGL2, pcDNA3.1, pRc/RSV, pRc/CMV, pAcSGHisNT-A, λZAPII y λgt11. El vector puede contener, según sea necesario, factores tales como un promotor inducible por expresión, un gen que codifica una secuencia señal, un gen marcador para selección y un terminador. Los expertos en la técnica conocen un método para introducir estos genes en células u organismos y un método para expresarlos.

Las células presentadoras de antígenos utilizadas en la presente invención son aquellas que pueden presentar un péptido antigénico que contiene el péptido WT1 anterior junto con una molécula del MHC de clase II a las células T

auxiliares, y pueden, por ejemplo, incluir células dendríticas y células mononucleares de sangre periférica. Por consiguiente, los sujetos de los cuales se obtienen las células presentadoras de antígenos utilizadas en la presente invención deben tener la misma molécula que una molécula del MHC de clase II a la que se puede unir el péptido WT1 añadido (por ejemplo, una o más cualesquiera de las moléculas del MHC de clase II de una molécula HLA - DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01).

La adición del péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos se puede realizar directamente mediante la adición del péptido WT1, o indirectamente mediante la adición de un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o mediante la adición de células que contienen el vector de expresión. Específicamente, la adición de un péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos se puede llevar a cabo haciendo que las células presentadoras de antígenos entren en contacto con el péptido WT1, o introduciendo un polinucleótido que codifique el péptido WT1 o un vector de expresión que contenga el polinucleótido en las células presentadoras de antígenos. La adición anterior se puede llevar a cabo mediante un método conocido en la técnica. El polinucleótido anterior que codifica el péptido WT1, el vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el péptido WT1 y las células que contienen el vector de expresión se pueden obtener mediante un mecanismo bien conocido por los expertos en la técnica. Específicamente, el polinucleótido utilizado en la presente invención se puede determinar basándose en una secuencia de aminoácidos del péptido WT1 anterior (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2). El polinucleótido anterior se puede preparar, por ejemplo, mediante una síntesis de ADN o ARN y un método de PCR. Asimismo, los tipos de vectores de expresión que contienen el polinucleótido anterior, las secuencias contenidas además de la secuencia del polinucleótido anterior se pueden seleccionar adecuadamente dependiendo de los propósitos y tipos de anfitriones en los que se introducen los vectores de expresión. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, vectores de fago y vectores de virus. Las células que contienen un vector de expresión se pueden preparar, por ejemplo, transformando células anfitrionas. Las células anfitrionas incluyen células de *Escherichia coli*, células de levadura, células de insectos y células animales. Un método para transformar células anfitrionas puede ser un método convencional, y es posible utilizar, por ejemplo, un método de fosfato de calcio, un método de DEAE-dextrano, un método de electroporación y un lípido para la transferencia de genes.

En general, las células T auxiliares se activan cuando un complejo TCR-CD3 sobre una superficie de una célula T reconoce un péptido antigénico a través de una molécula del MHC de clase II sobre una superficie de células presentadoras de antígeno, y la integrina sobre una superficie de células T es estimulada por un ligando de integrina sobre la superficie de células presentadoras de antígenos. La activación de células T auxiliares en la presente memoria descriptiva incluye no solo la activación de células T auxiliares sino también la inducción y proliferación de células T auxiliares. Asimismo, las células T auxiliares activadas pueden ser células T indiferenciadas (por ejemplo, células T no sometidas a tratamiento previo). Las células T auxiliares activadas tienen una función que activa el sistema inmunitario al promover la inducción, proliferación y activación de células B y células T citotóxicas. Por consiguiente, el método descrito en la presente memoria se puede utilizar como una terapia adyuvante para tratar un cáncer. Asimismo, las células T auxiliares activadas *in vitro* utilizando el método descrito en la presente memoria se pueden utilizar para tratar o prevenir un cáncer, o como un agente adyuvante para lo mismo. La activación de las células T auxiliares se puede evaluar, por ejemplo, midiendo la producción o la secreción de citocinas tales como los interferones (por ejemplo, interferón- γ) y las interleucinas.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria una composición para activar células T auxiliares o células T citotóxicas mediante la adición de un péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos. La activación de las células T citotóxicas se puede llevar a cabo pasando a través de la activación de las células T auxiliares. Aunque se pueden ilustrar en la composición un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector que contiene el polinucleótido y las células que contienen el vector, se puede utilizar cualquier molécula siempre que sea un factor capaz de presentar un péptido WT1 como un péptido antigénico sobre una superficie de células presentadoras de antígenos. Estos factores se pueden obtener mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica como se describe anteriormente.

El péptido WT1 utilizado en la presente invención tiene la capacidad de unirse a cualquiera de una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, como se describió anteriormente. Además, el péptido WT1 utilizado en la presente invención puede tener la capacidad de unirse a al menos dos o más moléculas del MHC de clase II de las moléculas del MHC de clase II anteriores. Además, el péptido WT1 utilizado en la presente invención puede tener la capacidad de unirse a cualquier molécula del MHC de clase II de moléculas HLA-DR, HLA-DQ o HLA-DP.

Cuando la composición descrita en la presente memoria se administra a un sujeto que tiene una o más moléculas del MHC de clase II de una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, se activa el sistema inmunitario mediante la activación de células T auxiliares y/o células T citotóxicas en el sujeto.

Asimismo, el gen WT1 es altamente expresado en varios cánceres y tumores, por ejemplo, en neoplasias malignas hematológicas como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, así como en cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino y cáncer de ovario, y por lo tanto, la composición se puede utilizar como un agente coadyuvante para el tratamiento o la prevención de un cáncer. Alternativamente, las células T auxiliares y las células T citotóxicas, que se activan utilizando la composición, se pueden utilizar, por ejemplo, como un agente coadyuvante para el tratamiento de los cánceres anteriores.

Además del péptido WT1 anterior, el polinucleótido que codifica el péptido WT1, el vector que contiene el polinucleótido y las células que contienen el vector, la composición puede contener, por ejemplo, un portador, un excipiente y un aditivo. El péptido WT1 anterior contenido en la composición puede activar las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas de una manera específica del péptido WT1, y por lo tanto, la composición puede contener un péptido WT1 restrictivo del MHC de clase I conocido, o se puede aplicar junto con tal péptido.

El método para aplicar la composición se puede seleccionar adecuadamente dependiendo de condiciones tales como el grado deseado de activación de células T auxiliares y/o células T citotóxicas, y el estado de las células presentadoras de antígenos. El método de aplicación incluye, por ejemplo, la administración a un sujeto mediante administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración transnasal y administración oral, o adición a un fluido de cultivo de células presentadoras de antígenos. La cantidad del péptido WT1 anterior contenido en la composición, la forma de la composición y la frecuencia de aplicación de la composición se pueden seleccionar adecuadamente dependiendo de condiciones tales como el grado deseado de activación de células T auxiliares y/o células T citotóxicas, y el estado de las células presentadoras de antígenos.

En otro aspecto más, se describe en la presente memoria un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto, que incluye la etapa de activar las células T auxiliares o las células T citotóxicas mediante la adición de un péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01. El método activa el sistema inmunitario en un sujeto activando las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas, tratando o previniendo de ese modo un cáncer en un sujeto. En el método, la etapa de activación de las células T citotóxicas se puede llevar a cabo pasando por la etapa de activación de las células T auxiliares. La adición del péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos se puede realizar directamente mediante la adición del péptido WT1, o indirectamente mediante la adición de un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o mediante la adición de células que contienen el vector de expresión. El polinucleótido anterior que codifica el péptido WT1, el vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el péptido WT1 y las células que contienen el vector de expresión se pueden obtener mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica, como se describió anteriormente. Los sujetos a los que se puede aplicar el método son aquellos positivos con respecto a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01. Los cánceres a los que se puede aplicar el método pueden ser cánceres e incluyen, por ejemplo, tumores de órganos hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, así como cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino y cáncer de ovario. Asimismo, el método se puede utilizar junto con un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer utilizando un péptido WT1 restrictivo de moléculas del MHC de clase I o una composición farmacéutica del mismo.

En otro aspecto más, se describe en la presente memoria el uso de un péptido WT1 para preparar la composición anterior, de un polinucleótido que codifica el péptido WT1, de un vector que contiene el polinucleótido y de células que contienen el vector.

En otro aspecto adicional, se describe en la presente memoria un kit que contiene el péptido WT1 anterior, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector, para activar células T auxiliares y/o células T citotóxicas añadiendo el péptido WT1 a células presentadoras de antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01. Preferiblemente, el kit se utiliza en el método anterior para activar células T auxiliares o células T citotóxicas. El kit puede contener, por ejemplo, un medio de obtención de células presentadoras de antígenos, un medio de evaluación de actividad de células T auxiliares y/o células T citotóxicas, además del péptido WT1. En general, el kit se acompaña con un manual de instrucciones. Es posible activar eficazmente las células T auxiliares o las células T

citotóxicas utilizando el kit.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células presentadoras de antígenos que presentan un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula del MHC de clase II. En este caso, la molécula del MHC de clase II puede ser cualquier molécula entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, o pueden ser al menos dos o más moléculas de las moléculas del MHC de clase II anteriores. Las células presentadoras de antígenos de la presente invención se pueden preparar utilizando un mecanismo conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar aislando células que tienen una capacidad de presentación de antígeno de un paciente con cáncer, y a continuación pulsando las células aisladas con el péptido WT1 anterior (por ejemplo, el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2) o con un polinucleótido que codifica el péptido WT1, o introduciendo un vector de expresión que contiene el polinucleótido en las células, permitiendo así que un complejo de un péptido antigénico que contiene el péptido WT1 con una molécula del MHC de clase II se presente sobre la superficie celular (Cancer Immunol. Immunother. 46:82, 1998, J. Immunol., 158: p1796, 1997, Cancer Res., 59: p1184, 1999, Cancer Res., 56: p5672, 1996, J. Immunol., 161: p5607, 1998, J. Exp. Med., 184: p465, 1996). En la presente memoria descriptiva, las células que tienen capacidad de presentación de antígenos no están limitadas en la medida en que expresan una molécula del MHC de clase II capaz de presentar un péptido WT1 sobre la superficie celular, y se prefieren las células mononucleares de sangre periférica o las células dendríticas que tienen una alta capacidad de presentación de antígenos. Asimismo, la presencia de las células presentadoras de antígenos de la presente invención se confirma por un aumento de la actividad de las células T citotóxicas, que se confirma por un aumento de la cantidad de interferón- γ , como se muestra en los Ejemplos. Las células presentadoras de antígenos de la presente invención se utilizan eficazmente en una terapia celular (por ejemplo, terapia de células dendríticas) como ingrediente activo de una composición farmacéutica.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona células T auxiliares que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula del MHC de clase II. En este caso, la molécula del MHC de clase II puede ser cualquier molécula entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, o pueden ser al menos dos o más moléculas de las moléculas del MHC de clase II anteriores. Las células T auxiliares de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquellas que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 con una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01. Los expertos en la técnica pueden preparar y obtener fácilmente las células T auxiliares de la presente invención utilizando un mecanismo conocido en la técnica (Iwata, M. et al., Eur. J. Immunol, 26, 2081 (1996)).

En otro aspecto más, la presente invención proporciona células T citotóxicas que se activan mediante células T auxiliares que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula del MHC de clase II.

Las células T citotóxicas de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquellas activadas por células T auxiliares que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2 con una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente las células T citotóxicas de la presente invención utilizando una técnica conocida. Por ejemplo, se preparan aislando linfocitos de sangre periférica de un paciente y estimulándolos in vitro con un péptido (por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2), un polinucleótido que codifica el péptido, o un vector de expresión que contiene el polinucleótido (Journal of Experimental Medicine 1999, 190:1669). Las células T citotóxicas así preparadas se pueden utilizar como ingrediente activo de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de un cáncer.

En otro aspecto más, se describe en la presente memoria un tetrámero de HLA que tiene el péptido antigénico anterior que contiene un péptido WT1 y una molécula del MHC de clase II. La molécula del MHC de clase II puede ser cualquier molécula entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, o pueden ser al menos dos o más moléculas de las moléculas MHC de clase II anteriores. En la presente memoria descriptiva, el tetrámero de HLA representa un producto tetramerizado que se obtiene por biotilación de un complejo (monómero de HLA) obtenido por asociación de una proteína HLA con un péptido, y después se une el producto biotilado a avidina. Los tetrámeros de HLA que contienen varios péptidos antigénicos están disponibles comercialmente, y es posible preparar el tetrámero de HLA fácilmente (Science 279: 2103-2106 (1998), Science 274: 94-96 (1996)). El tetrámero se marca preferiblemente con fluorescencia para que las células T auxiliares y las células T citotóxicas unidas puedan ser seleccionadas o detectadas fácilmente mediante un método de detección

conocido tal como citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. También es posible utilizar un multímero tal como un pentámero y un dendrímero, según sea necesario. En la presente memoria descriptiva, el multímero representa un producto multimerizado que se obtiene uniendo dos o más complejos (monómeros de HLA) obtenidos por asociación de una proteína de HLA con un péptido utilizando una técnica conocida.

5 En otro aspecto, se describe en la presente memoria una composición farmacéutica para activar células T auxiliares o células T citotóxicas, que contiene, como ingrediente activo, cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, células presentadoras de antígenos, células T auxiliares, células T citotóxicas o tetrámero. La composición farmacéutica puede contener, como ingrediente activo, una o más cualesquiera de las composiciones
10 mencionadas anteriormente, células presentadoras de antígenos, células T auxiliares, células T citotóxicas o tetrámero. La composición farmacéutica se puede utilizar para el tratamiento o la prevención de un cáncer. La composición farmacéutica se puede aplicar a varios cánceres y tumores que expresan WT1, por ejemplo, a tumores de órganos hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, así como a cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino y cáncer de ovario. Además, la composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01. La composición farmacéutica se puede utilizar junto con otros
20 métodos para el tratamiento o la prevención de un cáncer o una composición farmacéutica para lo mismo. Además, la composición farmacéutica puede contener un agente activador, un agente de proliferación y un agente inductor de células T auxiliares o células T citotóxicas, o puede contener un péptido WT1 restrictivo del MHC de clase I conocido.

25 Además de un ingrediente activo, la composición farmacéutica puede contener, por ejemplo, un portador y un excipiente. El método de administración de la composición farmacéutica se puede seleccionar adecuadamente dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado de los sujetos y el sitio diana. El método incluye, por ejemplo, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración transnasal y administración oral. La cantidad del ingrediente activo anterior contenido en la composición farmacéutica, la forma de dosificación de la composición y la frecuencia de administración de la composición se pueden seleccionar adecuadamente dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado de los sujetos y el sitio diana.

35 En otro aspecto más, se describe en la presente memoria un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer, que incluye la etapa de administrar cualquiera de la composición mencionada anteriormente, células presentadoras de antígenos, células T auxiliares, células T citotóxicas o tetrámero a un sujeto en una cantidad eficaz, en donde el sujeto tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01. Los cánceres que se pueden tratar o prevenir mediante el método son varios cánceres y tumores que expresan WT1, por ejemplo, tumores de órganos hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, así como cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de intestino, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino y cáncer de ovario. El método se puede utilizar junto con otros métodos para el tratamiento o
45 la prevención de un cáncer, por ejemplo, un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer utilizando un péptido WT1 restrictivo de la molécula del MHC de clase I conocido.

50 En otro aspecto más, se describe en la presente memoria el uso de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente, células presentadoras de antígenos, células T auxiliares, células T citotóxicas o tetrámero para preparar la composición farmacéutica anterior.

55 En un aspecto, se describe en la presente memoria un anticuerpo que se une específicamente al péptido WT1 o al polinucleótido que codifica el péptido WT1 anterior (en adelante, el anticuerpo también se denomina anticuerpo anti-WT1). El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Específicamente, se puede mencionar un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2. Ya se conoce un método para preparar dicho anticuerpo, y el anticuerpo también se puede preparar de acuerdo con tal método convencional (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (ed.), 1987, John Wiley and Sons (pub.), Sección 11.12-11.13, Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D. et al. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (pub.), Nueva York, 1989). Por ejemplo, un animal no humano tal como un conejo doméstico se inmuniza utilizando un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID
60 NO: 2 como inmunógeno, y se puede obtener un anticuerpo policlonal a partir de suero del animal mediante un método convencional. Por otro lado, en el caso de un anticuerpo monoclonal, un animal no humano tal como un ratón se inmuniza utilizando el péptido (un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2), y las células de bazo y células de mieloma resultantes se fusionan para preparar células de hibridoma, a

partir de las cuales se puede obtener el anticuerpo monoclonal (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (ed.), 1987, John Wiley and Sons (pub.), Sección 11.4-11.11). Asimismo, la preparación del anticuerpo anti-WT1 se puede llevar a cabo reforzando una reacción inmunológica utilizando diversos coadyuvantes dependiendo del anfitrión. Tales coadyuvantes incluyen un gel mineral (por ejemplo, coadyuvante de Freund e hidróxido de aluminio), un tensioactivo y un coadyuvante humano. El anticuerpo anti-WT1 se puede utilizar para cromatografía de afinidad y diagnóstico inmunológico. El método para el diagnóstico inmunológico se puede seleccionar adecuadamente entre inmunotransferencia, radioinmunoensayo (RIA), ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), medición fluorescente o luminiscente.

En otro aspecto, se describe en la presente memoria un método para determinar la presencia o cantidad de un péptido WT1 en un sujeto positivo con respecto a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, incluyendo el método incluye las etapas de:

- (a) hacer reaccionar una muestra obtenida del sujeto con el anticuerpo anti-WT1 anterior, y a continuación
- (b) determinar la presencia o cantidad del anticuerpo anti-WT1 anterior contenido en la muestra.

Se puede utilizar una muestra obtenida de un sujeto que tiene una molécula del MHC clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01 como muestra en la etapa (a) anterior. Las muestras utilizadas en la etapa (a) anterior incluyen, por ejemplo, fluido corporal y tejidos tales como sangre y linfocitos. Los expertos en la técnica pueden obtener muestras adecuadamente, hacerlas reaccionar con un anticuerpo y llevar a cabo otros procedimientos utilizando un mecanismo conocido. La etapa (b) incluye, por ejemplo, la determinación de la localización, el sitio y la cantidad del anticuerpo anti-WT1 anterior y, por lo tanto, se puede utilizar para el diagnóstico y el pronóstico. El anticuerpo anti-WT1 anterior puede estar marcado. Como marca, se pueden utilizar marcas conocidas tales como una marca fluorescente y una marca radiactiva. Mediante el marcaje, se hace posible llevar a cabo la determinación de la presencia o cantidad de un péptido WT1 de manera simple y rápida.

En otro aspecto más, se describe en la presente memoria un kit para determinar la presencia o cantidad de un péptido WT1, que contiene el anticuerpo anti-WT1 anterior como constituyente esencial. El kit del puede contener, por ejemplo, medios para obtener el anticuerpo anti-WT1 y medios para evaluar el anticuerpo anti-WT1, además del anticuerpo anti-WT1 anterior. En general, el kit se acompaña de un manual de instrucciones. Al utilizar el kit, se hace posible determinar la presencia o cantidad de un péptido WT1 simple y rápidamente en el método anterior para determinar la presencia o cantidad de un péptido WT1.

En otro aspecto más, se describe en la presente memoria un método para determinar la presencia o cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 o células T citotóxicas específicas de WT1 en un sujeto positivo con respecto a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, incluyendo el método las etapas de:

- (a) estimular una muestra obtenida del sujeto utilizando un péptido WT1, y
- (b) determinar la presencia o cantidad de citocinas, células T auxiliares o células T citotóxicas, y en donde el aumento de la presencia o cantidad de citocinas, células T auxiliares o células T citotóxicas muestra la presencia o cantidad de las células T auxiliares específicas de WT1 células o células T citotóxicas específicas de WT1.

Las muestras pueden ser cualquier muestra en la medida en que contengan células presentadoras de antígenos, e incluyen, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica, linfocitos invasivos, células tumorales, células de fluido ascítico, células de derrame pleural, células de líquido cefalorraquídeo, células de médula ósea y células de ganglios linfáticos. La muestra utilizada se puede obtener de donantes sanos o de pacientes con cáncer. Al utilizar esas células obtenidas de donantes sanos, por ejemplo, es posible diagnosticar si los donantes están afectados por un cáncer, o si los donantes tienen una predisposición a un cáncer u otras afecciones. Al utilizar esas células obtenidas de pacientes con cáncer, por ejemplo, es posible predecir si una inmunoterapia con WT1 tiene efecto en los pacientes con cáncer u otras afecciones. En el método, las muestras obtenidas se pueden cultivar antes y después de la estimulación con un péptido WT1, y los expertos en la técnica pueden determinar adecuadamente las condiciones de cultivo.

La estimulación de estas células con un péptido WT1 se puede llevar a cabo utilizando un mecanismo conocido, tal como la electroporación, y se puede llevar a cabo in vitro o in vivo. Mediante un método conocido se puede determinar la producción de una citocina, la presencia de una reacción de células T auxiliares o células T citotóxicas, la cantidad de una citocina producida o la cantidad de células T auxiliares o células T citotóxicas que han reaccionado.

En otro aspecto más, se describe en la presente memoria un kit para determinar la presencia o cantidad de un péptido WT1, que contiene el péptido WT1 anterior como componente esencial. El kit puede contener, por ejemplo, un medio de obtención de muestras, un medio de evaluación tal como citocinas, además del péptido WT1 anterior. En general, se adjunta al kit un manual de instrucciones. Al utilizar el kit, se hace posible determinar la presencia o cantidad de un péptido WT1 simple y rápidamente en el método anterior para determinar la presencia o cantidad de un péptido WT1.

También se describen en la presente memoria:

- 10 una composición que comprende un péptido WT1 para activar células T auxiliares mediante la adición del péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos, en donde las células T auxiliares reconocen un complejo del péptido WT1 y una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, y una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de un cáncer que comprende la composición como ingrediente activo;
- 15 una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de un cáncer, que comprende, como ingrediente activo, cualquiera de un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión, y que se administra a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, un HLA-DQB1*03:02 molécula, y una molécula HLA-DQB1*04:01; y
- 20 un método para activar las células T auxiliares, que comprende la etapa de activar las células T auxiliares mediante la adición de un péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos, en donde las células T auxiliares reconocen un complejo del péptido WT1 y una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01.

También se describe lo siguiente:

- 30 (1) Una composición para activar las células T auxiliares que comprende un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión, en donde las células T auxiliares reconocen un complejo del péptido WT1 y una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01.
- 35 (2) Una composición para activar células T citotóxicas que comprende un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión, en donde la composición se administra a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01.
- 40 (3) Una composición para el tratamiento o la prevención de un cáncer que comprende un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión, en donde la composición se administra a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01.
- 45 (4) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1)-(3), que comprende un péptido WT1.
- 50 (5) La composición de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1)-(4), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2), una variante o una modificación de la misma.
- 55 (6) La composición de acuerdo con el apartado (5), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).
- 60 (7) Células presentadoras de antígenos que presentan un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula del MHC clase II, en donde la molécula del MHC clase II es una molécula del MHC clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02 molécula, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01.
- (8) Células presentadoras de antígenos de acuerdo con el apartado (7), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2), una variante o una modificación de la misma.
- (9) Células presentadoras de antígenos de acuerdo con el apartado (8), en donde el péptido WT1 es un

péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

(10) Células T auxiliares que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula del MHC clase II, en donde la molécula del MHC clase II es una molécula del MHC clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01.

(11) Células T auxiliares de acuerdo con el apartado (10), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2), una variante o una modificación de la misma.

(12) Células T auxiliares de acuerdo con el apartado (11), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

(13) Células T citotóxicas que son activadas por las células T auxiliares de acuerdo con el apartado (12).

(14) Una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de un cáncer, que comprende, como ingrediente activo, cualquiera de las células presentadoras de antígenos de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (7)-(9), células T auxiliares de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (10)-(12), o células T citotóxicas de acuerdo con la reivindicación (13).

También se describe en la presente memoria lo siguiente:

(1) Un método para activar las células T auxiliares, que comprende la etapa de activar las células T auxiliares mediante la adición de un péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos, en donde las células T auxiliares reconocen un complejo del péptido WT1 y una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01.

(2) El método de acuerdo con el apartado (1), en donde la adición de un péptido WT1 a las células presentadoras de antígenos se lleva a cabo haciendo que las células presentadoras de antígenos entren en contacto con el péptido WT1, o introduciendo un polinucleótido que codifique el péptido WT1 o un vector de expresión que contenga el polinucleótido en las células presentadoras de antígenos.

(3) Un método para activar células T citotóxicas, que comprende administrar un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01.

(4) Un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer, que comprende administrar el péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01.

(5) El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1)-(4), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2), una variante o una modificación de la misma.

(6) El método de acuerdo con el apartado (5), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

También se describe en la presente memoria lo siguiente:

(1) El uso de un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión para la preparación de un medicamento para activar las células T auxiliares, en donde las células T auxiliares reconocen un complejo del péptido WT1 y una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01.

(2) El uso de un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión para la preparación de un medicamento para activar las células T citotóxicas, en donde el medicamento se administra a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 molécula, y una molécula HLA-DQB1*04:01.

(3) El uso de un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer, en donde el medicamento se administra a un

sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 molécula, y una molécula HLA-DQB1*04:01.

(4) El uso de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1)-(3), para la preparación de un medicamento que comprende un péptido WT1.

(5) El uso de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1)-(4), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2), una variante o una modificación de la misma.

(6) El uso de acuerdo con el apartado (5), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

Los ejemplos no abarcados por el alcance de las reivindicaciones tienen fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Establecimiento de células del clon Th1 específicas del péptido WT1 (SEQ ID NO: 2)

Se establecieron células del clon Th1 específicas del péptido WT1 (SEQ ID NO: 2) (denominado WT1-332 en lo sucesivo) (denominadas en adelante "las células clon Th1") como se describe a continuación.

(1) Materiales de prueba

Los principales materiales utilizados se indican a continuación.

Compuesto de prueba

[Tabla 1]

Nombre del compuesto	Numero de lote	Proveedor
WT1-332 *	100521	American Peptide Company, Inc.
Condiciones de almacenamiento: congelador ajustado previamente a -30°C		
* WT1-332: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2)		

Preparación del compuesto de prueba

Se disolvió WT1-332 en ácido acético 10 mM a 20 mg/ml. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó en un congelador ajustado previamente a -30°C.

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como células alimentadoras

1) Nombre de la célula: PBMC

2) Fuente: Sangre periférica de donantes adultos humanos sanos

Después de que se realizara el anonimato vinculable y se obtuviera el consentimiento informado por escrito bajo el control de un administrador de información personal, se obtuvo sangre del donante y se manipuló en este experimento.

3) Condición de la muestra: cualquiera de las alimentadoras es diferente de la muestra para la clonación.

4) Recolección de sangre: 40 ml de sangre periférica heparinizada.

Línea celular B-LCL como célula alimentadora

5) Nombre de la célula: línea celular B-LCL

6) Fuente: Sangre periférica humana

7) Proveedor: RIKEN CELL BANK o IHWG CELL BANK

Grupos

[Tabla 2]

Grupo Núm.	Agente	Medición	Pocillo*
1	disolvente	ICS o producción de IFN- γ (pg/ml)	1 o 3
2	WT1-332		

* Después de la tinción de citocinas intracelulares (ICS) y la clonación, se realizó la primera prueba ELISA en un pocillo.

Reactivos

- 5 Entre los reactivos utilizados en la prueba, a continuación se enumeran los importantes.

[Tabla 3]

Nombre	Número de Cat.	Proveedor
Conjunto OptEIA ELISA (IFN- γ humano)	555142	BD Biosciences
Conjunto de reactivos BD OptEIA B	550534	BD Biosciences
Fitoheماغlutinina (PHA)	30852801	remel.
MicroBeads MACS CD4	120-000-440	Milteny Biotec

Preparación de medio de cultivo

- 10 Se utilizaron suero AB humano y suero bovino fetal (FBS) después de la inactivación y la filtración a través de un filtro de 0,2 μ m. Se utilizaron veinte U/ml de heparina HBSS, FBS/RPMI-1640 al 10% (100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin) y AIM-V que contiene suero humano AB al 10% (Invitrogen) para la separación de las PBMC, el cultivo de células B-LCL y otros cultivos, respectivamente. El cultivo celular se realizó en una incubadora a 15 37°C-5% de CO₂ en cada medio.

(2) Métodos de prueba

Preparación de PBMC

- 20 Las PBMC se prepararon por centrifugación por densidad a partir de sangre periférica de voluntarios sanos y una parte de las PBMC se utilizó para inducir células T específicas de WT1-332. Las células restantes se crioconservaron en un banco de células (Juji Field Inc.) y se utilizaron como células alimentadoras o células presentadoras de antígenos para la reestimulación.

Inducción de células T específicas de WT1-332

- 25 Las PBMC así preparadas se sembraron en placas de 24 pocillos a 1,5 x 10⁶ células/pocillo en 10 pocillos y se añadió WT1-332 a una concentración final de 20 μ g/ml e IL-7 a una concentración final de 10 ng/ml y se comenzaron a cultivar (Día 0, volumen medio total: 2 ml/pocillo).

- 30 Después de 1 semana, las células fueron reestimuladas. Primero, se cultivaron las PBMC ajustadas a 3,0 x 10⁶ células/pocillo o menos para la presentación de antígenos durante 2 h con WT1-332 a una concentración final de 20 μ g/ml, y se cultivaron adicionalmente durante 45 minutos con mitomicina C (MMC) (concentración final = 50 μ g/ml), y a continuación, tras lavar con AIM-V, las células se utilizaron como células presentadoras de antígenos. A continuación, después de que se recogieran las PBMC cultivadas y se eliminaran las células adherentes, las células restantes se sembraron a 1,15-1,43 x 10⁶ células/pocillo y nuevamente se cultivaron con el mismo número de células presentadoras de antígenos tratadas con WT1/MMC añadidas con IL-7 a una concentración final de 10 ng/ml (Día 7). Dos días después, la mitad del medio se cambió por 40 U/ml de medio que contenía IL-2, y las células se cultivaron adicionalmente durante una semana, mientras que la mitad del medio se cambió por 20 U/ml de medio que contenía IL-2 cada dos días. .

Tinción de citocinas intracelulares (ICS)

- 45 El día 14, las células cultivadas se recogieron y sembraron en una placa de fondo redondo de 96 pocillos a 2,0x10⁵ células/pocillo en dos pocillos, y a continuación se cultivaron durante 4 h añadiendo 20 μ g/ml de WT1-332 en un pocillo y disolvente en el otro pocillo y se cultivaron durante 2 h más con 1 x Brefeldin (concentración final). Las células se recogieron, se añadió anticuerpo anti-CD4 humano marcado con PE y anticuerpo anti-CD8 humano

marcado con FITC, y se incubaron durante 15 minutos a 4°C. Después de lavar con Tampón de Tinción, a las células se les añadió Cytofix Cytoperm Fix/Perm y se trataron durante 20 minutos a 4°C. Después de lavar con Perm./Wash Buffer, las células se añadieron con anticuerpo anti-IFN- γ humano marcado con PerCP, y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron con Perm./Wash Buffer y se analizaron por FACS.

5 Descongelación, siembra y subcultivo de células B-LCL como células alimentadoras

10 Las células criopreservadas se descongelaron y se comenzaron a cultivar a 3×10^5 células/pocillo, y a continuación se subcultivaron en el momento de la subconfluencia. Las células B-LCL así obtenidas se utilizaron como células alimentadoras para la estimulación con PHA.

Aislamiento de células CD4⁺ por MACS

15 De acuerdo con el protocolo de recomendación del fabricante, se aislaron células CD4⁺ mediante selección positiva de las células cultivadas utilizando Microbeads MACS.

Clonación y amplificación de células Th1 específicas de WT1-332 mediante dilución limitante

20 Se trataron las células alimentadoras B-LCL y las PBMC (3×10^6 /ml o menos) con una solución de mitomicina C (concentración final = 50 μ g/ml) durante 45 minutos en una incubadora con CO₂. Después de lavar con AIM-V, se mezclaron dos tipos de células B-LCL y dos tipos de PBMC, 4 tipos de células en total (concentración final: $2,5 \times 10^5$ células/ml para PBMC y $2,5 \times 10^4$ células/pocillo para células B-LCL/ml). Se preparó un conjunto de mezclas de acuerdo con el número de muestras a clonar, y se añadió PHA a una concentración final de 200 ng/ml para elaborar una mezcla líquida de células de alimentación que contenían PHA.

25 A continuación, de las muestras de células CD4⁺, se seleccionaron muestras que mostraban una elevada razón de células CD4⁺IFN- γ ⁺ en ICS, y la concentración de células CD4⁺ se ajustó a 10 células/ml con la mezcla líquida de células alimentadoras que contenía PHA preparada de este modo, y las células se sembraron sobre una placa de 96 pocillos a 100 μ l/pocillo (número total de PBMC: $5,0 \times 10^4$ células/pocillo; células B-LCL: $5,0 \times 10^3$ células/pocillo; PHA: 200 ng/ml; células CD4⁺: una célula/pocillo) y se comenzaron a cultivar. Cinco días después, se añadió una cantidad igual de 80 U/ml de medio que contenía IL-2 al medio de cultivo, y después de eso, la mitad del medio se cambió por 80 U/ml de medio que contenía IL-2 cada dos días. Durante el cultivo, las células de un pocillo que mostraban una amplificación clara se aumentaron a escala hasta 48 placas por pocillo, y se continuaron cultivando.

35 El día 10 después del inicio de la clonación y después de eso a intervalos de 14 días, se aplicó estimulación con PHA para la amplificación como se ha descrito anteriormente, excepto que la placa de cultivo, el número total de PBMC, el número total de células B-LCL, la concentración final de PHA, y el número de células del clon Th1 que se iba a amplificar se cambiaron a una placa de 24 pocillos, $1,0 \times 10^6$ células/pocillo, $1,0 \times 10^5$ células/pocillo, 50 ng/ml y $2,0 \times 10^5$ células/pocillo o menos, respectivamente. Asimismo, se añadió IL-2 el día 3 desde el inicio del cultivo, y la concentración de IL-2 del medio que se iba a añadir adicionalmente se ajustó a 200 U/ml.

Estimulación peptídica de células del clon Th1

45 Para verificar la reactividad antigénica de las células del clon Th1 que se habían clonado y amplificado, se sembraron las células del clon Th1 recogidas en placas de fondo redondo de 96 pocillos en un pocillo o tres pocillos. A los pocillos, se les añadió ácido acético 10 μ M o 20 μ g/ml de péptido, y se inició el cultivo (la cantidad total de medio: 200 μ l/pocillo). Se recogieron los sobrenadantes de cultivo después de aproximadamente 24 h.

ELISA

50 Se midió la concentración de IFN- γ en cada sobrenadante de cultivo después de que el sobrenadante de cultivo se diluyera 4 veces con Diluyente de Ensayo (Becton Dickinson). La concentración de IFN- γ se midió utilizando el conjunto BD OptEIA ELISA (IFN- γ humano, Becton Dickinson) de acuerdo con el protocolo del fabricante, excepto que el anticuerpo se diluyó 500 veces, el rango de la curva de calibración se cambió a 18,75-1200 pg/ml, y el tiempo de reacción cromogénica se cambió a 5 min. Asimismo, se utilizó un valor de extrapolación cuando un valor medido excedía el rango de medición, y el valor medido se consideró 0 cuando la absorbancia era menor que 0.

Preparación del banco de células maestras de células del clon Th1

60 Las células del clon Th1 de las cuales se confirmó la reactividad antigénica se criopreservaron en un banco de células y se utilizaron como bancos de células maestras.

Evaluación

Para evaluar si las células Th1 específicas de WT1-332 habían sido inducidas significativamente en las células CD4⁺ cultivadas durante 14 días bajo el estímulo de WT1-332, se calcularon la proporción de células Th1 específicas de WT1-332 (%) y la proporción de células Th1 no específicas de WT1-332 (%) de acuerdo con las siguientes fórmulas.

5 Razón de células Th1 específicas de WT1-332 (%)
 = número de células CD4⁺, IFN-γ⁺ intracelular con estimulación por WT1-332/número total de células viables x número total de células viables x razón de células CD4⁺ tras el fraccionamiento/razón de células CD4⁺ antes del fraccionamiento x 100

10 Razón de células Th1 no específicas de WT1-332 (%)
 = número de células CD4⁺, IFN-γ⁺ intracelular con estimulación por AcOH/número total de células viables x 100 X razón de células CD4⁺ después del fraccionamiento/razón de células CD4⁺ antes del fraccionamiento x 100

15 La clonación se llevó a cabo en 6 a 7 muestras para las cuales el valor obtenido restando la razón de Th1 no específico de WT1-332 de la razón Th1 específica de WT1-332 fue alto.

20 La concentración de IFN-γ del sobrenadante de cultivo de cada grupo se midió mediante ELISA, y cuando la producción de IFN-γ tras la adición de WT1-332 fue mayor que con la adición de disolvente 500 pg/ml o más y 1,2 veces o más, se consideró que los grupos mantenían la reactividad antigénica y se utilizaron en experimentos posteriores.

(3) Resultados

25 Se establecieron varias células del clon Th1. Se confirmó, como resultado de la tipificación, que algunos de los clones obtenidos tenían nuevos alelos restringidos. Los resultados se mostraron en la Tabla 4. En el Ejemplo 2, utilizando esos clones, se determinó si WT1-332 podía activar las células Th1 de una manera restringida a los tipos específicos de HLA.

30 [Tabla 4]

ID de clon	Nombre del clon	Tipo HLA					
		DRB1		DPB1		DQB1	
ClonR82-1	Núm. 147-2F1	<u>08:02</u>	14:03	02:01	02:01	03:01	03:02
ClonR132-1	Núm. 144-2D7	01:01	<u>13:02</u>	04:01	04:02	N. T.	N. T.
ClonR143-1	Núm. 61-3F9	<u>14:03</u>	15:02	02:01	03:01	N. T.	N. T.
ClonR145-2	Núm. 77-3H6	04:05	<u>14:05</u>	05:01	05:01	N. T.	N. T.
ClonQ32-1	Núm. 147-2G6	08:02	14:03	02:01	02:01	03:01	<u>03:02</u>
ClonQ41-1	Núm. 106-1H11	04:05	15:01	05:01	05:01	<u>04:01</u>	06:02

* El subrayado muestra nuevos alelos restringidos.
 *N.T. significa que no se realizó la tipificación HLA para el tipo de HLA.

Ejemplo 2: Determinación del alelo restringido de la célula del clon Th1 específica de WT1-332 establecida

35 Utilizando las células del clon Th1 específicas de WT1-332 establecidas en el Ejemplo 1 (denominadas en adelante "las células del clon Th1"), se determinó si WT1-332 podría activar las células Th1 de una manera restringida a los tipos específicos de HLA y se confirmaron los alelos restringidos.

(1) Compuesto de prueba

40 Línea celular B-LCL

ES 2 805 337 T3

[Tabla 5-1]

Células B-LCL presentadoras de antígenos para el análisis de restricción DRB1*08:02									
Característica de HLA	B-LCL	Tipo de HLA							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3,4,5	
DRB1*08:02 (+)	HEV núm. 0052	08:02	14:03	05:01	05:01	03:02	03:01	blanco	B3*01:01
DRB1*08:02 (+)	HEV núm. 0324	08:02	15:02	04:02	09:01	04:02	06:01	blanco	B5*01:02
DRB1*08:02 (-)	HEV núm. 0042	04:05	13:01	05:01	05:01	04:01	06:03	B4*01:03	B3*01:01
DRB1*08:02 (-)	HEV núm. 0238	04:06	12:01	05:01	02:01	03:01	03:02	B3*02:02	B4*01:03
DRB1*08:02 (-)	HEV núm. 0013	04:05	11:01	02:01	05:01	03:01	04:01	B4*01:03	B3*02:02
DRB1*08:02 (-)	HEV núm. 0057	09:01	09:01	02:01	09:01	03:03	03:03	B4*01:03	B4*01:03

[Tabla 5-2]

Células B-LCL presentadoras de antígenos para el análisis de restricción DRB1*13:02									
Característica de HLA	B-LCL	Tipo de HLA							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3,4,5	
DRB1*13:02 (-)	HEV núm. 0201	01:01	04:05	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	blanco
DRB1*13:02 (-)	HEV núm. 0073	01:01	09:01	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	blanco
DRB1*13:02 (-)	HEV núm. 0271	09:01	09:01	04:02	05:01	03:03	03:03	B4*01:03	B4*01:03
DRB1*13:02 (-)	1333-8272	08:01	10:01	04:01	02:01	04:02	05:01	blanco	blanco
DRB1*13:02 (+)	HEV núm. 0046	04:01	13:02	04:01	05:01	03:01	06:04	B4*01:02	B3*03:01
DRB1*13:02 (-)	HEV núm. 0038	04:01	12:02	04:01	05:01	03:01	03:01	B4*01:02	B3*03:01
DRB1*13:02 (-)	HEV núm. 0110	04:01	04:03	02:01	05:01	03:01	03:02	B4*01:03	B4*01:02
DRB1*13:02 (-)	HEV núm. 0024	04:10	12:02	13:01	05:01	03:01	04:02	B4*01:03	B3*03:01
DRB1*13:02 (-)	HEV núm. 0342	09:01	08:03	14:01	05:01	03:01	03:03	B4*01:03	blanco

[Tabla 5-3]

Células B-LCL presentadoras de antígenos para el análisis de restricción DRB1*14:03									
Característica de HLA	B-LCL	Tipo de HLA							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3,4,5	
DRB1*14:03 (+)	HEV núm. 0052	08:02	14:03	05:01	05:01	03:02	03:01	blanco	B3*01:01
DRB1*14:03 (-)	HEV núm. 0324	08:02	15:02	04:02	09:01	04:02	06:01	blanco	B5*01:02
DRB1*14:03 (-)	HEV núm.	04:05	13:01	05:01	05:01	04:01	06:03	B4*01:03	B3*01:01

ES 2 805 337 T3

Células B-LCL presentadoras de antígenos para el análisis de restricción DRB1*14:03									
Característica de HLA	B-LCL	Tipo de HLA							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3,4,5	
	0042								
DRB1*14:03 (-)	HEV núm. 0238	04:06	12:01	05:01	02:01	03:01	03:02	B3*02:02	B4*01:03
DRB1*14:03 (-)	HEV núm. 0035	04:05	15:02	05:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02
DRB1*14:03 (-)	HEV núm. 0012	04:05	08:03	05:01	05:01	04:01	06:01	B4*01:03	blanco
DRB1*14:03 (-)	HEV núm. 0057	09:01	09:01	02:01	09:01	03:03	03:03	B4*01:03	B4*01:03
DRB1*14:03 (-)	HEV núm. 0013	04:05	11:01	02:01	05:01	03:01	04:01	B4*01:03	B3*02:02
DRB1*14:03 (-)	HEV núm. 0342	09:01	08:03	14:01	05:01	03:01	03:03	B4*01:03	blanco
DRB1*14:03 (-)	HEV núm. 0050	04:05	15:02	03:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02

[Tabla 5-4]

Células B-LCL presentadoras de antígenos para el análisis de restricción DRB1*14:05									
Característica de HLA	B-LCL	Tipo HLA							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3,4,5	
DRB1*14: 05 (-)	HEV núm. 0201	01:01	04:05	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	blanco
DRB1*14: 05 (-)	HEV núm. 0073	01:01	09:01	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	blanco
DRB1*14: 05 (+)	ISH5	09:01	14:05	05:01	05:01	05:03	03:03	B3*02:02	B4*01:03
DRB1*14: 05 (-)	HEV núm. 0271	09:01	09:01	05:01	04:02	03:03	03:03	B4*01:03	B4*01:03
DRB1*14: 05 (-)	HEV núm. 0058	14:06	13:02	04:01	05:01	03:01	06:04	B3*03:01	B3*02:02
DRB1*14: 05 (-)	HEV núm. 0055	08:03	14:01	04:02	05:01	05:03	06:01	B3*02:02	blanco
DRB1*14: 05 (-)	HEV núm. 0035	04:05	15:02	05:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02
DRB1*14: 05 (-)	HEV núm. 0050	04:05	15:02	03:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02

[Tabla 5-5]

Antígeno presentando células B-LCL para análisis de restricción DQB1*03:02									
Característica de HLA	B-LCL	Tipo HLA							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3,4,5	
DQB1*03:02 (+)	HEV núm. 0052	08:02	14:03	05:01	05:01	03:02	03:01	blanco	B3*01:01
DQB1*03:02 (-)	HEV núm. 0324	08:02	15:02	04:02	09:01	04:02	06:01	blanco	B5*01:02

Antígeno presentando células B-LCL para análisis de restricción DQB1*03:02									
Característica de HLA	B-LCL	Tipo HLA							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3,4,5	
DQB1*03:02 (+)	HEV núm. 0238	04:06	12:01	05:01	02:01	03:01	03:02	B3*02:02	B4*01:03
DQB1*03:02 (-)	HEV núm. 0042	04:05	13:01	05:01	05:01	04:01	06:03	B4*01:03	B3*01:01
DQB1*03:02 (-)	HEV núm. 0013	04:05	11:01	02:01	05:01	03:01	04:01	B4*01:03	B3*02:02

[Tabla 5-6]

Células B-LCL presentadoras de antígenos para el análisis de restricción DQB1*04:01									
Característica de HLA	B-LCL	Tipo de HLA							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3,4,5	
DQB1*04:01 (-)	HEV núm. 0201	01:01	04:05	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	blanco
DQB1*04:01 (-)	HEV núm. 0073	01:01	09:01	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	blanco
DQB1*04:01 (+)	HEV núm. 0174	04:05	15:01	05:01	05:01	04:01	06:02	B4*01:03	B5*01:01
DQB1*04:01 (+)	HEV núm. 0013	04:05	11:01	02:01	05:01	03:01	04:01	B4*01:03	B3*02:02
DQB1*04:01 (+)	HEV núm. 0035	04:05	15:02	05:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02
DQB1*04:01 (+)	HEV núm. 0050	04:05	15:02	03:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02

(2) Método de prueba

5 Preparación de medio

Se utilizaron suero AB humano y FBS después de la inactivación y la filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Se utilizaron 20 U/ml de heparina HBSS, RPMI-1640 que contenía FBS al 10% y P/S al 1% (100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina) y AIM-V (Invitrogen) que contenía suero humano AB al 10% para la separación de las PBMC, el cultivo de células B-LCL y otro cultivo, respectivamente. El cultivo celular se realizó en una incubadora a 37°C-5% de CO₂ en cada medio.

Método de experimentación

15 La restricción HLA de células del clon Th1 se determinó usando células B-LCL pulsadas con WT1-332 que tienen un alelo apropiado como células presentadoras de antígeno y midiendo la cantidad de IFN-γ producido.

20 Específicamente, las células del clon Th1 se cultivaron bajo el estímulo de PHA utilizando las células alimentadoras B-LCL y PBMC xenogénicas preparadas a partir de sangre periférica como células alimentadoras. A continuación, las células B-LCL tratadas con WT1-332 o disolvente se utilizaron como células presentadoras de antígenos y se cultivaron con las células del clon Th1 recogidas. La cantidad de IFN-γ producida se midió para determinar si estaba presente el estímulo de antígeno específico de WT1-332. Basándose en los tipos de HLA de clase II de cada clon Th1, se utilizaron células B-LCL que tienen algunos tipos diferentes de HLA como células presentadoras de antígenos, y de ese modo se determinó la restricción de HLA de clase II del clon Th1.

25 Descongelación y siembra de células B-LCL como células alimentadoras

Las células crioconservadas se descongelaron el día 0 y se comenzaron a cultivar a 1×10^5 células/pocillo. Las células se recogieron el día 3 y se utilizaron como células alimentadoras para la estimulación con PHA.

30 Preparación de PBMC

Las PBMC se prepararon mediante centrifugación por densidad de sangre periférica de voluntarios sanos para el día 2. Después de contar el número de células, se recogieron los sedimentos celulares y se volvieron a suspender en el banco celular (Mitsubishi Chemical Medience Corporation), y a continuación se dispensaron en criotubos para crioconservarlos en un congelador ajustado a -80°C. En el momento de la estimulación con PHA, las células crioconservadas se descongelaron y se proporcionaron como PBMC alimentadoras.

Descongelación y siembra de células del clon Th1

El día 2, las células crioconservadas se descongelaron y se comenzaron a cultivar a 2×10^6 células/pocillo o menos en 20 U/ml de medio que contenía IL-2. Las células se recogieron el día 3 y se utilizaron como células del clon Th1 para la estimulación con PHA.

Estimulación con PHA de células del clon Th1

El día 3, las células B-LCL alimentadoras y las PBMC se trataron con solución de mitomicina C (concentración final = 50 µg/ml) durante 45 minutos en una incubadora con CO₂. Después de lavar con AIM-V, se mezclaron dos tipos de PBMC y dos tipos de células B-LCL, 4 tipos de células en total (concentración final: $1,0 \times 10^6$ células/ml para PBMC y $1,0 \times 10^5$ células/pocillo para células B-LCL/ml). Se preparó un conjunto de mezclas de acuerdo con el número de células del clon Th1 a sembrar, y se añadió PHA a una concentración final de 100 ng/ml para preparar una mezcla líquida de células alimentadoras que contenía PHA. A continuación, las células del clon Th1 cultivadas se sembraron en placas de 24 pocillos a 0,5 ml/pocillo (concentración celular $4,0 \times 10^5$ células/ml), y adicionalmente se añadieron a la mezcla líquida de células alimentadoras que contenía PHA a 0,5 ml/pocillo, y las células se cultivaron. El día 6, se añadió una cantidad igual de 200 U/ml de medio que contenía IL-2 al medio de cultivo, y el día 8, día 10, día 12 y día 14, la mitad del medio se cambió por 40 U/ml de medio que contenía IL-2. El día 15, las células se utilizaron para el análisis de restricción. Cuando las células alcanzaron la confluencia durante el cultivo, las células se subcultivaron utilizando 20 U/ml de medio que contenía IL-2.

Descongelación y siembra de células B-LCL como células presentadoras de antígenos para el análisis de restricción

El día 11, las células crioconservadas se descongelaron y se comenzaron a cultivar a aproximadamente 1×10^5 células/pocillo. Las células se recogieron el día 15 y se utilizaron para el análisis de restricción.

Análisis de restricción

Las células del clon Th1 se recolectaron el día 15, y se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos de acuerdo con el número de células recolectadas a $1,0-2,5 \times 10^4$ células/100 µl/pocillo en 3 pocillos. Se dispensaron las células B-LCL como células presentadoras de antígenos ajustadas a 1×10^6 células/ml en dos tubos cónicos a 4-7 ml, y a uno se le añadió ácido acético a una concentración final de 10 µM y al otro WT1-332 a una concentración final de 20 µg/ml. Después de 2 h de cultivo, las células se lavaron con AIM-V y se añadieron a las placas de 96 pocillos sobre las que se sembraron células del clon Th1 a $2,5 \times 10^4$ células/100 µl/pocillo y a continuación se cultivaron durante 16 horas o más. Para confirmar la reactividad de WT1-332, se prepararon pocillos a los que se añadieron WT1-332 o disolvente en lugar de células B-LCL en la misma placa.

ELISA

Se midió la concentración de IFN-γ en cada sobrenadante de cultivo después de que el sobrenadante de cultivo se diluyera 100 veces con diluyente de ensayo (Becton Dickinson). La concentración de IFN-γ se midió utilizando el conjunto BD OptEIA ELISA (IFN-γ humano, Becton Dickinson) de acuerdo con el protocolo del fabricante, excepto que el rango de la curva de calibración se cambió a 5-640 pg/ml, y el tiempo de reacción cromogénica se cambió a 10 min. Asimismo, se utilizó un valor de extrapolación cuando el valor medido excedió el rango de medición, y el valor medido se consideró 0 cuando la absorbancia fue menor que 0.

Evaluación

La cantidad de IFN-γ en cada sobrenadante de cultivo.

(3) Resultados

(i) Análisis de restricción HLA de células del clon Th1 CloneR82-1 (DRB1*08:02/14:03, DPB1*02:01, DQB1*03:01/03:02)

Se detectó la producción de IFN-γ de CloneR82-1 mediante la estimulación con B-LCL DRB1*08:02(+) pulsadas con WT1-332 (HEV núm. 0052 y HEV núm. 0324) (Fig. 1). Por lo tanto, se reveló que CloneR82-1 era un clon Th1 restringido a HLA-DRB1*08:02 específico para WT1-332.

(ii) Análisis de restricción HLA de células del clon Th1 CloneR132-1 (DRB1*01:01/13:02, DPB1*04:01/04:02)

La producción de IFN- γ de CloneR132-1 se detectó mediante la estimulación con B-LCL DRB1*13:02(+) pulsadas con WT1-332 (HEV núm. 0046) (Fig. 2). Por lo tanto, se reveló que CloneR132-1 era un clon Th1 restringido a HLA-DRB1*13:02 específico para WT1-332.

(iii) Análisis de restricción HLA de células del clon Th1 CloneR143-1 (DRB1*14:03/15:02, DPB1*02:01/03:01)

Se detectó la producción de IFN- γ de CloneR143-1 mediante la estimulación con B-LCL DRB1*14:03(+) pulsadas con WT1-332 (HEV núm. 0052) (Fig. 3). Por lo tanto, se reveló que CloneR132-1 era un clon Th1 restringido a HLA-DRB1*14:03 específico para WT1-332.

(iv) Análisis de restricción HLA de células del clon Th1 CloneR145-2 (DRB1*04:05/14:05, DPB1*05:01)

La producción de IFN- γ de CloneR145-2 se detectó por la estimulación con B-LCL DRB1*14:05(+) pulsadas con WT1-332 (ISH5) (Fig. 4). Por lo tanto, se reveló que el clon R145-2 era un clon Th1 restringido a HLA-DRB1*14:05 específico para WT1-332.

(v) Análisis de restricción HLA de células del clon Th1 CloneQ32-1 (DRB1*08:02/14:03, DPB1*02:01, DQB1*03:01/03:02)

La producción de IFN- γ de CloneQ32-1 se detectó mediante la estimulación con B-LCL DQB1*03:02(+) pulsadas con WT1-332 (HEV núm. 0052 y HEV núm. 0238) (Fig. 5). Por lo tanto, se reveló que CloneQ32-1 era un clon Th1 restringido a HLA-DQB1*03:02 específico para WT1-332.

(vi) Análisis de restricción HLA de células del clon Th1 CloneQ41-1 (DRB1*04:05/15:01, DPB1*05:01, DQB1*04:01/06:02)

La producción de IFN- γ de CloneQ41-1 se detectó mediante la estimulación con varias células presentadoras de antígenos pulsadas con WT1-332 (HEV núm. 0174, HEV núm. 0013, HEV núm. 0035 y HEV núm. 0050), pero no con HEV núm. 0201 y HEV núm. 0073 pulsados con WT1-332 (Fig. 6). DQB1*04:01 solo se expresó en HEV núm. 0174, HEV núm. 0013, HEV núm. 0035 y HEV núm. 0050. Por lo tanto, se reveló que CloneQ41-1 era un clon Th1 restringido a DQB1*04:01 específico para WT1-332.

Aplicabilidad industrial

En la presente memoria se describe un método para activar células T auxiliares y/o células T citotóxicas utilizando un péptido WT1 que tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01 y una composición para las mismas, una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de un cáncer mediante la activación de células T auxiliares y/o células T citotóxicas, que es aplicable al campo de los productos farmacéuticos, por ejemplo, los campos de desarrollo y producción de agentes preventivos o remedios para diversos tumores de órganos hematopoyéticos y cánceres sólidos que expresan fuertemente un gen WT1.

Texto libre de la lista de secuencias

SEQ ID NO: 2: Péptido sintético

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. Universidad de Osaka

<120> Método para activar células T auxiliares

<130> 671805

<150> JP 2012-274494

<151> 17-12-2012

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.2

ES 2 805 337 T3

<210> 1
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 1
 Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30
 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45
 Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50 55 60
 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80
 Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95
 Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125
 Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175
 Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp

ES 2 805 337 T3

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> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His

1

5

10

15

5

10

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer mediante la activación de células T auxiliares en un sujeto, en donde dicha composición comprende un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión, en donde las células T auxiliares reconocen un complejo del péptido WT1 y una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, en donde el péptido WT1 es:

(a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o

(b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, deleción o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01;

y en donde dichas células T auxiliares son de un sujeto seleccionado entre un sujeto positivo para HLA-DRB1*08:02, un sujeto positivo para HLA-DRB1*13:02, un sujeto positivo para HLA-DRB1*14:03, un sujeto positivo para HLA-DRB1*14:05, un sujeto positivo para HLA-DQB1*03:02 y un sujeto positivo para HLA-DQB1*04:01.

2. Una composición para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer mediante la activación de células T citotóxicas en un sujeto, en donde dicha composición comprende un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión, en donde dicha composición se administra a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, en donde el péptido WT1 es:

(a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o

(b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, deleción o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, y en donde dichas células T citotóxicas son de un sujeto seleccionado entre un sujeto positivo para HLA-DRB1*08:02, un sujeto positivo para HLA-DRB1*13:02, un sujeto positivo para HLA-DRB1*14:03, un sujeto positivo para HLA-DRB1*14:05, un sujeto positivo para HLA-DQB1*03:02 y un sujeto positivo para HLA-DQB1*04:01.

3. Una composición para su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto, en donde dicha composición comprende un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido o células que contienen el vector de expresión, en donde la composición se administra a un sujeto que tiene una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01, y en donde el péptido WT1 es:

(a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o

(b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, deleción o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01.

4. La composición para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer mediante la activación de células T auxiliares en un sujeto, el tratamiento o la prevención del cáncer mediante la activación de células T citotóxicas en un sujeto, o el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha composición comprende el péptido WT1.

5. La composición para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer mediante la activación de células T auxiliares, el tratamiento o la prevención del cáncer mediante la activación de células T citotóxicas, o el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el

péptido WT1 es un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

5 6. Células presentadoras de antígenos que presentan un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula del MHC clase II, en donde la molécula del MHC clase II es una molécula del MHC clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02, y una molécula HLA-DQB1*04:01, en donde el péptido WT1 es:

10 (a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o
 (b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, deleción o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II
 15 seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01.

20 7. Las células presentadoras de antígenos según la reivindicación 6, en donde el péptido WT1 es un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

25 8. Células T auxiliares que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula del MHC clase II, en donde la molécula del MHC clase II es una molécula del MHC clase II seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01, en donde el péptido WT1 es:

30 (a) un péptido de 16-21 aminoácidos de longitud que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); o
 (b) el péptido del apartado (a) en donde la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 tiene una sustitución, deleción o adición de un aminoácido y tiene la capacidad de unirse a una molécula del MHC de clase II
 35 seleccionada entre una molécula HLA-DRB1*08:02, una molécula HLA-DRB1*13:02, una molécula HLA-DRB1*14:03, una molécula HLA-DRB1*14:05, una molécula HLA-DQB1*03:02 y una molécula HLA-DQB1*04:01.

9. Las células T auxiliares de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el péptido WT1 es un péptido que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

40 10. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto, que comprende, como ingrediente activo, cualquiera de las células presentadoras de antígenos según la reivindicación 6 o 7, o las células T auxiliares según la reivindicación 8 o 9.

Fig. 1

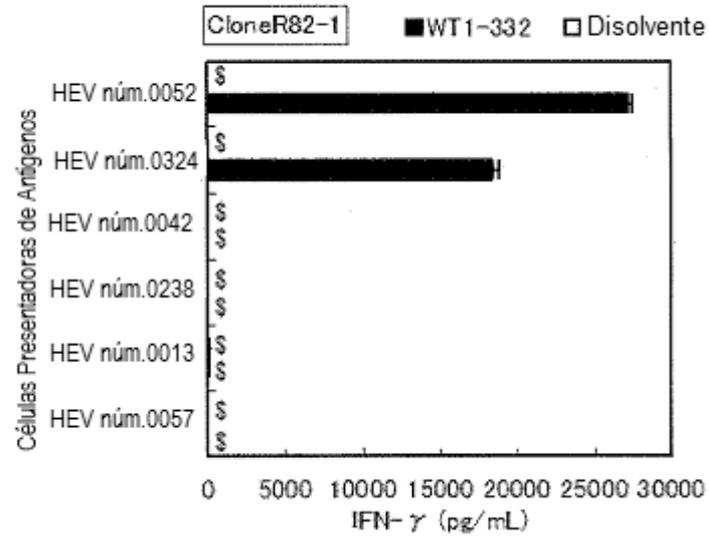


Fig. 2

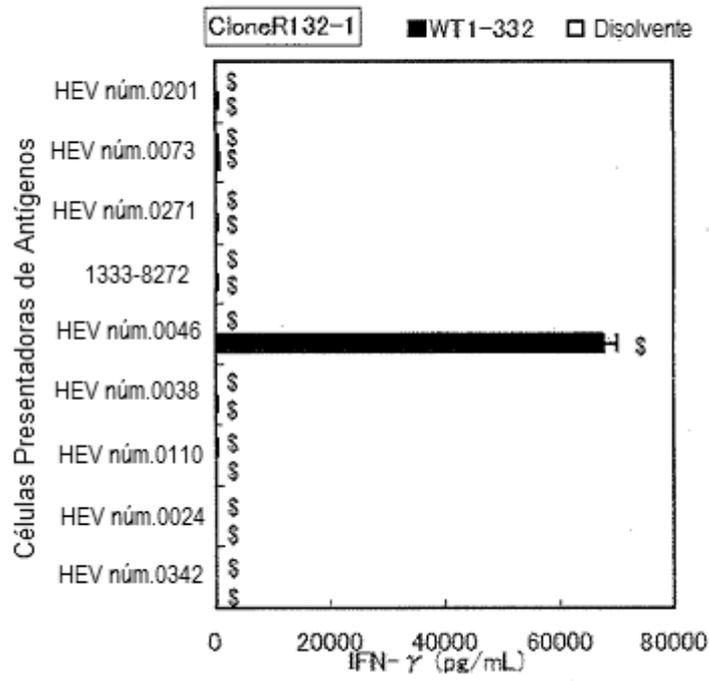


Fig. 3

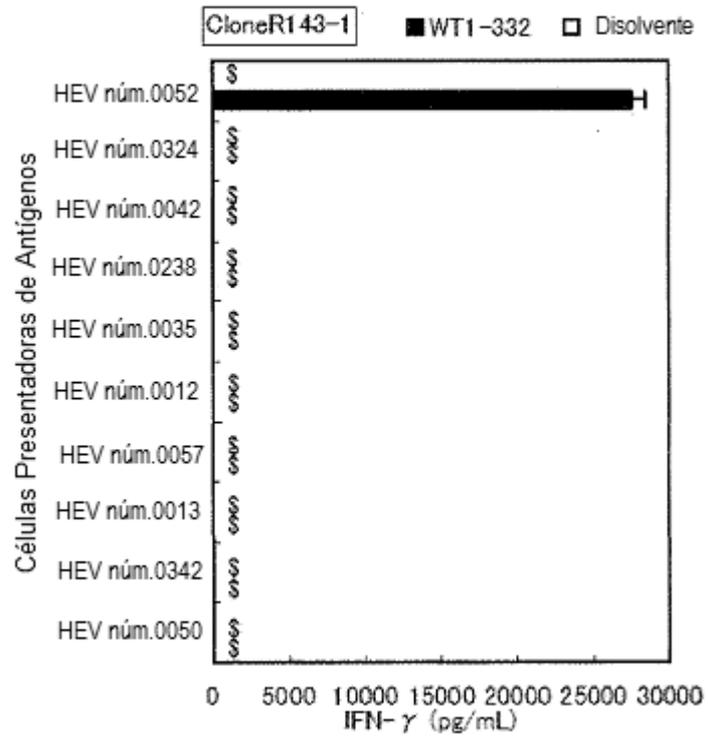


Fig. 4

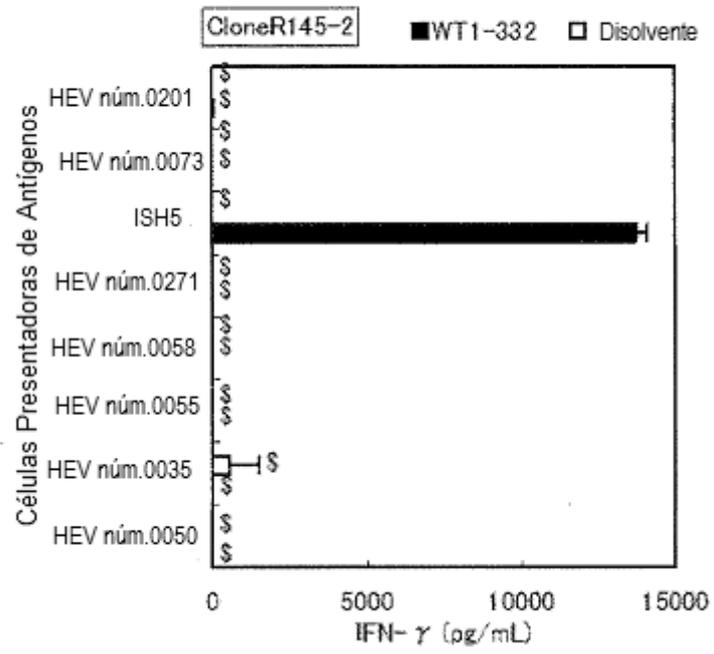


Fig. 5

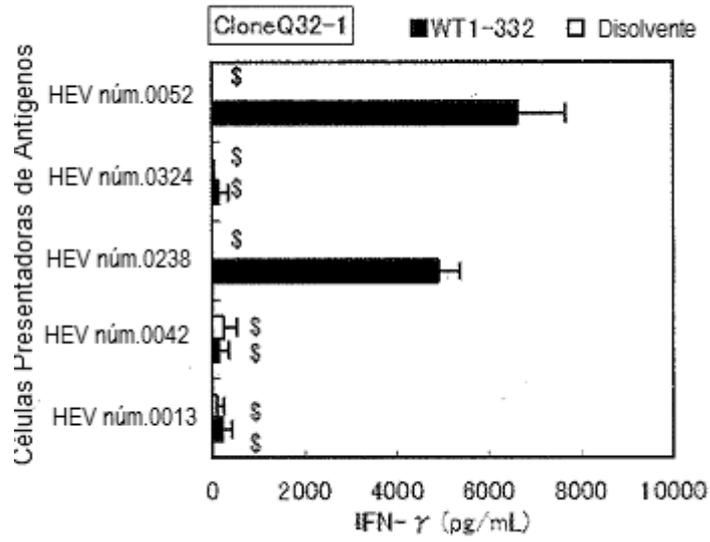


Fig. 6

