



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 785**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01) **A61K 35/12** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01) **C07K 16/32** (2006.01)
C12N 5/07 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05727848 .3**

96 Fecha de presentación : **30.03.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1731605**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

54 Título: **Péptidos antigénicos del cáncer derivados de WT1.**

30 Prioridad: **31.03.2004 JP 2004-105219**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2010

73 Titular/es: **INTERNATIONAL INSTITUTE OF
CANCER IMMUNOLOGY, Inc.
13-9, Enoki-cho
Suita-shi, Osaka 564-0053, JP**

72 Inventor/es: **Sugiyama, Haruo**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 341 785 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

Péptidos antigénicos del cáncer derivados de WT1.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la utilización de péptidos antigénicos del cáncer derivados de WT1.

Antecedentes

10 El gen WT1 (gen 1 del tumor de Wilms) ha sido identificado como uno de los genes causantes de tumor de Wilms que es un tumor renal infantil (Cell 60: 509, 1990, Nature 343: 774, 1990). El gen WT1 codifica el factor de transcripción WT1, y WT1 desempeña una función importante en muchos procesos tales como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de células y el desarrollo de tejidos (Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998). El gen WT1
15 fue definido originalmente como un gen supresor de tumores. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que el gen WT1 se expresa en leucemia y en varios cánceres sólidos, incluyendo cáncer de pulmón y cáncer de mama, indicando que el gen WT1 ejerce más bien una función oncogénica estimulando el crecimiento del cáncer. Además, se demostró *in vitro* que, cuando células mononucleares de sangre periférica positivas para HLA-A*0201 o para HLA-A*2402 son estimuladas con péptidos derivados de WT1, se inducen linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos
20 para los péptidos y destruyen las células de leucemia o de tumores sólidos que expresan endógenamente WT1. Estos resultados demostraban que WT1 es una molécula diana prometedoras para inmunoterapia del cáncer (Int. J. Hematol. 76: 127, 2002). Sin embargo, no se ha determinado si dicho WT1 contiene porción(es) peptídica(s) capaz(es) de unirse al antígeno HLA-A2 6 ni tampoco se ha informado de la existencia de tal(es) péptido(s).

25 Además, aunque se dedujeron las secuencias de unión para un péptido antigénico del cáncer capaz de unirse a HLA-A*0201 (un miembro de los antígenos HLA-A2) (WO 00/18795), solamente unos cuantos péptidos antigénicos del cáncer han demostrado ser eficaces hasta ahora (WO 00/06602 y WO 00/026249).

Descripción de la invención

30 Se describen péptidos antigénicos del cáncer derivados de WT1, su utilización como inductores de CTLs, etcétera. El alcance de la protección conferida está definido en las reivindicaciones.

35 Los presentes inventores han llevado a cabo investigaciones intensas encaminadas a la identificación de nuevos péptidos antigénicos del cáncer derivados de WT1. Como resultado, se reveló que los péptidos mostrados en las SEC ID N^{os}: 2, 8 y 9 pueden inducir CTLs restringidos por el HLA-A26. Esto es, los presentes inventores han encontrado por vez primera que WT1 contiene una(s) porción(es) peptídica(s) antigénica(s) del cáncer que se une(n) al antígeno HLA-A26 entre varias subclases de antígenos HLA y que es(son) reconocida(s) por CTLs. Este hallazgo condujo al desarrollo de una nueva terapia de vacunas contra el cáncer que pueden inducir CTLs específicos para WT1 en
40 pacientes con cáncer positivos para HLA-A2 6.

El péptido antigénico del cáncer derivado de WT1 anteriormente mencionado y un polinucleótido que codifica el mismo, etcétera, según se describen en la presente, pueden ser utilizados eficazmente como inductores de CTLs, concretamente como una vacuna contra el cáncer. Además, los péptidos antigénicos del cáncer descritos en la presente
45 pueden ser utilizados eficazmente como ingrediente de un agente detector de CTLs específicos para WT1. La presente invención ha sido establecida sobre la base de estos hallazgos. Por tanto, la presente invención está relacionada con:

- (1). La utilización de un péptido con una secuencia de aminoácidos según se muestra en cualquiera de las SEC ID N^{os}: 2, 8 y 9 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer en un paciente positivo para HLA-A26.
50
- (2). La utilización de acuerdo con (1), en la que la composición farmacéutica es una vacuna contra el cáncer.
- (3). Una composición farmacéutica que contiene un péptido con una secuencia de aminoácidos como la mostrada en cualquiera de las SEC ID N^{os}: 2, 8 y 9 para el tratamiento o la prevención del cáncer en un paciente positivo para HLA-A26.
55
- (4). La composición farmacéutica de acuerdo con (3), que es utilizada como inductora de CTLs.
- (5). La composición farmacéutica de acuerdo con (3), que es utilizada como vacuna contra el cáncer.
60
- (6). Una célula presentadora de antígeno sobre la cual se presenta un complejo entre un péptido como el descrito en (1) y un antígeno HLA-A26.
- (7). Un CTL que reconoce un complejo entre un péptido como el descrito en (1) y un antígeno HLA-A26.
65
- (8). Un monómero, dímero, tetrámero o pentámero de HLA que contiene un péptido como el descrito en (1) junto con un antígeno HLA-A26.

ES 2 341 785 T3

- (9). Un reactivo para la detección de CTLs específicos para un péptido antigénico del cáncer derivado de WT1 que se une a HLA-A26, donde el reactivo contiene como ingrediente un monómero, un dímero, un tetramero o un pentámero de HLA como el descrito en (8).

5

Por tanto, se describe en el contexto de la presente invención:

- (1) Un péptido derivado de la secuencia de aminoácidos del WT1 humano mostrada en la SEC ID N°: 1 y que tiene actividad como péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26;
- 10 (2) El péptido de (1) anterior, que comprende o consta de 8-11 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos del WT1 humano mostrada en la SEC ID N°: 1;
- 15 (3) El péptido de (1) o (2) anterior, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, en la SEC ID N°: 8 o en la SEC ID N°: 9;
- (4) Un péptido antigénico tumoral que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, en la SEC ID N°: 8 o en la SEC ID N°: 9;
- 20 (5) Un péptido epitópico que comprende un péptido descrito en cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores;
- (6) Un polinucleótido que codifica un péptido como el descrito en cualquiera de los puntos (1) a (5) anteriores;
- (7) Un vector de expresión que contiene el polinucleótido descrito en el punto (6) anterior;
- 25 (8) Una célula que contiene el vector de expresión descrito en el punto (7) anterior;
- (9) Un proceso para producir un péptido como el descrito en cualquiera de los puntos (1) a (5) anteriores, que comprende el cultivo de la célula descrita en el punto (8) anterior bajo condiciones en las que el péptido pueda ser expresado;
- 30 (10) Un anticuerpo que se une específicamente a un péptido como el descrito en cualquiera de los puntos (1) a (4) anteriores;
- 35 (11) Una célula presentadora de antígeno sobre la cual se presenta un complejo entre un péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26 derivado de la secuencia de aminoácidos del WT1 humano mostrada en la SEC ID N°: 1, péptido que se describe en cualquiera de los puntos (2) a (4) anteriores, y un antígeno HLA-A26;
- 40 (12) Un CTL que reconoce un complejo entre un péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26 derivado de la secuencia de aminoácidos del WT1 humano mostrada en la SEC ID N°: 1, péptido que está descrito en cualquiera de los puntos (2) a (4) anteriores, y un antígeno HLA-A26;
- (13) Una composición farmacéutica que contiene un péptido como el descrito en cualquiera de los puntos (1) a (5) anteriores, un vector de expresión como el descrito en el punto (7) anterior, una célula como la descrita en el punto (8) anterior, una célula presentadora de antígeno como la descrita en el punto (11) anterior o un CTL como el descrito en el punto (12) anterior, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- 45 (14) La composición farmacéutica del punto (13) anterior, la cual es utilizada como inductora de CTLs;
- 50 (15) La composición farmacéutica del punto (13) anterior, que es utilizada como vacuna contra el cáncer;
- (16) Un monómero, dímero, tetramero o pentámero de HLA que contiene un péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26 derivado de la secuencia de aminoácidos del WT1 humano mostrada en la SEC ID N°: 1, péptido que está descrito en cualquiera de los puntos (2) a (4) anteriores, junto con un antígeno HLA-A26;
- 55 (17) Un reactivo para la detección de CTLs específicos para un péptido antigénico del cáncer derivado de WT1 que se une a HLA-A26, reactivo que contiene como ingrediente un monómero, un dímero, un tetramero o un pentámero de HLA como el descrito en el punto (16) anterior.

60

La presente invención proporciona péptidos antigénicos del cáncer derivados de WT1, polinucleótidos que codifican los mismos, inductores de CTLs que contienen los mismos, etcétera. El inductor de CTLs de la presente invención es útil como vacuna contra el cáncer. La vacuna contra el cáncer de la presente invención es aplicable a muchos pacientes con cáncer que son positivos para HLA-A26.

65

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica que muestra los resultados de experimentos en los cuales se examinó la actividad citotóxica de CTLs inducidos por la estimulación con un péptido de SEC ID N°: 3 de células diana T2 sometidas a un pulso (círculo relleno) o no sometidas a un pulso (círculo sin rellenar) con el péptido. En la figura, el eje vertical indica la actividad citotóxica específica (% de lisis específica) y el eje de abscisas la proporción E/T que es la proporción del número de células efectoras (E) respecto al número de células diana (T).

La Figura 2 es una gráfica que muestra los resultados de experimentos en los cuales se examinó la actividad citotóxica de CTLs inducidos por la estimulación con un péptido de SEC ID N°: 3 de la línea celular TF-1 (círculos rellenos), que es positiva para HLA-A*0201 y expresa WT1, o de la línea celular JY (círculos sin rellenar), que es positiva para HLA-A*0201 y que no expresa WT1. En la figura, el eje vertical indica la actividad citotóxica específica (% de lisis específica) y el eje de abscisas la proporción E/T.

La Figura 3 es una gráfica que muestra los resultados de experimentos en los cuales se examinó la actividad citotóxica de CTLs inducidos por la estimulación con un péptido de SEC ID N°: 2 de células diana B-LCL sometidas a un pulso (barras rellenas) o no sometidas a un pulso (barras sin rellenar) con el péptido. En la figura, el eje vertical indica la actividad citotóxica específica (% de lisis específica).

La Figura 4 es una gráfica que muestra los resultados de experimentos en los cuales se examinó la actividad citotóxica de CTLs inducidos por la estimulación con un péptido de SEC ID N°: 2, 8 ó 9 de células diana B-LCL sometidas a un pulso (barras rellenas) o no sometidas a un pulso (barras sin rellenar) con el péptido. En la figura, el eje vertical indica la actividad citotóxica específica (% de lisis específica).

Modo mejor de llevar a cabo la invención

Se describe un péptido que deriva de la secuencia de aminoácidos del WT1 humano mostrada en la SEC ID N°: 1 y que tiene actividad como péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26.

La secuencia de aminoácidos del WT1 humano mostrada en la SEC ID N°: 1 es una secuencia conocida (Cell, 60: 509, 1990, N° de Acceso de la base de datos del NCBI XP_034418 y N° de Acceso P19544). Dicha secuencia de aminoácidos del WT1 humano está mostrada en la SEC ID N°: 1. Como antígenos HLA-A26, se conocen HLA-A*2601, HLA-A*2602, HLA-A*2603, etcétera. La presente invención se refiere al antígeno HLA-A26 que es HLA-A*2601. En Japón, alrededor del 20% de la población comparte el antígeno HLA-A26 entre los antígenos HLA.

Se encontró por primera vez que la secuencia de aminoácidos de WT1 contiene porciones de péptidos antigénicos del cáncer capaces de unirse al antígeno HLA-A26 y de ser reconocidas por CTLs, lo cual dio lugar a la descripción de la presente invención. En el contexto de la presente invención, el término “que tiene (tener) actividad como péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26” significa que un péptido tiene actividad para unirse al antígeno HLA-A26 y ser reconocido por células T citotóxicas (CTLs), y es sinónimo de “que se une al antígeno HLA-A26 e induce CTLs (que tiene actividad inductora de CTLs)” o de “que se une al antígeno HLA-A26 y activa CTLs (que tiene actividad activadora de CTLs)”.

El péptido antigénico del cáncer como el reivindicado puede ser identificado sintetizando un péptido parcial (péptido candidato) que conste de 8-11 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1, y analizando si el péptido tiene o no actividad como péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26.

La síntesis de péptidos puede ser llevada a cabo según un método utilizado de manera general en el campo de la química de péptidos. Tal método puede ser encontrado en la literatura, incluyendo Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1996; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen, Inc., 1975; Peptide-Gosei no Kiso to Jikken, Maruzen, Inc., 1985; e Yakuhin no Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa-syoten, 1991.

Puede examinarse si un péptido candidato es o no el péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26 mediante un método descrito en, por ejemplo, Tissue Antigen 61: 136, 2003, o mediante un método descrito en los Ejemplos de trabajo posteriores. Puede examinarse también si un péptido candidato es o no un péptido con actividad como péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26 de manera similar.

Específicamente, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) son aisladas primeramente de un sujeto humano positivo para el antígeno HLA-A26 y cultivadas después de la adición de (del sometiendo a un pulso con) un péptido candidato. Después de ser cultivadas, el cultivo es estimulado repetidamente varias veces mediante la adición de un péptido cada pocos días con el fin de amplificar los CTLs específicos para el péptido. Posteriormente se detecta la reacción específica de dichos CTLs con el péptido midiendo citoquinas tales como IFN- γ producidas por los CTLs o la actividad citotóxica de los CTLs. La actividad citotóxica puede ser medida mediante, por ejemplo, el ensayo de liberación de ⁵¹Cr (Int. J. Cancer 58: p317, 1994) o un ensayo similar. Ejemplos de células diana utilizables en el ensayo incluyen células marcadas con ⁵¹Cr que sean positivas para WT1 y positivas para HLA-A26. Ejemplos específicos incluyen células marcadas con ⁵¹Cr que son obtenidas mediante la introducción de un gen que codifique

ES 2 341 785 T3

HLA-A26 (por ejemplo, N° de Acceso del Genbank D14350) en una línea celular de leucemia que sea positiva para WT1 y negativa para HLA-A26.

5 Cuando los resultados del ensayo anterior muestran que los CTLs destruyen las células diana o producen citoquinas, dicho péptido candidato es identificado como “un péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26” o “un péptido que tiene actividad como péptico antigénico del cáncer que se une a HLA-A26”.

10 La presente invención describe un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9. No existen limitaciones concernientes a la longitud de tal péptido, con la condición de que dicho péptido tenga la actividad de unirse al antígeno HLA-A26 y de ser reconocido por CTLs. Sin embargo, se sabe que un péptido (péptido antigénico del cáncer) con actividad para unirse a un antígeno HLA consta generalmente de 8 a 11 aminoácidos. Por consiguiente, la porción peptídica antigénica del cáncer del péptido según se describe en el contexto de la presente invención, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9, es un péptido que
15 un péptido antigénico del cáncer que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y, muy preferiblemente, un péptido antigénico del cáncer que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9.

20 Los péptidos descritos en el contexto de la presente invención pueden ser alterados según sea apropiado dentro de un rango en el cual se mantenga la actividad. Según se utiliza en la presente, la “alteración” de un residuo de aminoácido significa la sustitución, delección y/o adición de residuo(s) de aminoácidos (la adición incluye la adición de aminoácido(s) en el extremo N y/o C del péptido). Se prefiere la sustitución de un(os) residuo(s) de aminoácido(s). Cuando la alteración implica la sustitución de un(os) residuo(s) de aminoácido(s), cualquier número de residuos de aminoácidos en cualquier posición pueden ser sustituidos con la condición de que se conserve la actividad como
25 péptido antigénico del cáncer. Sin embargo, como un péptido que se une a un antígeno HLA tiene generalmente 8-11 aminoácidos de longitud aproximadamente, la alteración implica preferiblemente de uno a varios aminoácidos.

La presente invención describe también un péptido (denominado péptido epitópico) que comprende un péptido de la presente invención junto con un péptido cooperador u otro péptido antigénico del cáncer.

30 Recientemente, un péptido (“péptido epitópico”) compuesto por múltiples (plural) epítomos de CTLs (péptidos antigénicos) unidos entre sí ha demostrado tener una eficaz actividad inductora de CTLs. Por ejemplo, se ha descrito que un péptido (30-mero aproximadamente) en el cual epítomos de CTLs restringidos cada uno de ellos por HLA-A2-, -A3, -A11 o B53 originados a partir de la proteína antigénica del cáncer PSA son ligados entre sí, inducía *in vivo* CTLs específicos para los respectivos epítomos de CTLs (Journal of Immunology, 1998, 161: 3186-3194).

Además, se ha demostrado que un péptido (péptido epitópico) en el cual están ligados epítomo(s) de CTLs y epítomo(s) cooperador(es) induce eficazmente CTLs. En este contexto “epítomo cooperador” significa un péptido capaz de activar células T positivas para CD4 (Immunity., 1: 751, 1994), y ejemplos del mismo incluyen HBVc128-140
40 originario del virus de la hepatitis B, TT947-967 originario de la toxina tetánica, etc. Las células T CD4+ activadas por dicho epítomo cooperador ejercen varias actividades, incluyendo la inducción y el mantenimiento de CTLs, la diferenciación y la activación de efectores tales como macrófagos, etc., y por tanto son considerados importantes en la respuesta inmunológica antitumoral. Como ejemplo concreto de un péptido en el cual están unidos epítomo(s) cooperador(es) y epítomo(s) de CTLs, se ha informado que un ADN (minigen) que codifica un péptido compuesto por
45 péptidos antigénicos (6 péptidos) restringidos por HLA-A2 originarios del VHB, péptidos antigénicos (3 péptidos) restringidos por el HLA-A11 y un epítomo cooperador inducía *in vivo* de manera eficaz CTLs dirigidos hacia los epítomos respectivos (Journal of Immunology, 1999, 162: 3915-3925). En la práctica, un péptido en el cual están ligados un epítomo de CTLs (péptido antigénico tumoral correspondiente a la posición 280-288 del antígeno gp100 de melanoma) y un epítomo cooperador (epítomo cooperador T procedente de la toxina tetánica) ha sido sometido a
50 ensayos clínicos (Clinical Cancer Res., 2001, 7: 3012-3024).

Por consiguiente, los péptidos reivindicados incluyen también péptidos epitópicos en los cuales están ligados múltiples epítomos, incluyendo los péptidos de la presente invención anteriormente mencionados, y que tienen actividad inductora de CTLs.

55 Cuando el epítomo que va a ser ligado al péptido antigénico del cáncer según se describe en el contexto de la presente invención es un epítomo de CTLs (péptido antigénico del cáncer), ejemplos de epítomos de CTLs utilizables incluyen epítomos de CTLs derivados de WT1 capaces de unirse a HLA-A*02 01, -A*0204, -A*0205, -A*0206, -A*0207, -A11, -A24, -A31, -A*6801, -B7, -B8, -B*2705, -B37, -Cw*0401 o -Cw*0602 (Int. J. Hematol. 76: 127, 2002; Int. J. Hematol. 78: 56, 2003; WO 00/06602; WO 00/18795). Un número plural de estos epítomos de CTLs
60 pueden ser ligados entre sí y la longitud de un epítomo de CTLs puede ser de 8-14 aminoácidos aproximadamente sobre la base del análisis de péptidos antigénicos unidos a varias moléculas de HLA (Immunogenetics 41: 178, 1995).

65 Cuando el epítomo que va a ser ligado al péptido antigénico del cáncer según se describe en el contexto de la presente invención es un epítomo cooperador, ejemplos de epítomos cooperadores utilizables incluyen el HBVc128-140 anteriormente mencionado originario del virus de la hepatitis B, TT947-967 originario de la toxina tetánica, un epítomo cooperador derivado de WT1 (Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His, SEC

ES 2 341 785 T3

ID N°: 5), etcétera. El epítipo cooperador puede tener 13-30 aminoácidos aproximadamente, preferiblemente, 13-17 aminoácidos de longitud aproximadamente.

5 Específicamente, los péptidos epitópicos según se describen en el contexto de la presente invención son un péptido epitópico mostrado en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y un péptido cooperador.

10 Más específicamente, ejemplos incluyen un péptido epitópico que contiene un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 5; un péptido epitópico que contiene un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y un péptido cooperador originado de la toxina tetánica (por ejemplo, Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu, SEC ID N°: 6); y un péptido epitópico que contiene un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y un péptido (Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu, SEC ID N°: 7; *Clinical Cancer Res.*, 2001, 7: 3012-3024).

15 El péptido (péptido epitópico) en el cual están ligados múltiples epítipos puede ser preparado mediante un método habitual para la síntesis peptídica según se describió anteriormente. Es también obtenible mediante un método habitual para la síntesis de ADN e ingeniería genética sobre la base de la información sobre la secuencia de un polinucleótido que codifica un péptido epitópico en el cual están ligados múltiples epítipos. Específicamente, un péptido epitópico en el cual están ligados múltiples epítipos puede ser preparado insertando dicho polinucleótido en un vector de expresión conocido, transformando una célula huésped con el vector de expresión recombinante resultante, cultivando las células transformadas resultantes y recuperando del cultivo el péptido epitópico objetivo en el cual están ligados múltiples epítipos. Estos procesos pueden ser llevados a cabo de acuerdo con, por ejemplo, un método descrito en la literatura (*Molecular Cloning*, T. Maniatis y col., CSH Laboratory (1983), *DNA Cloning*; D.M. Glover, IRL PRESS (1985)) o con el método descrito en la presente posteriormente.

25 La actividad inductora de CTLs del péptido epitópico así producido en el cual están ligados múltiples epítipos puede ser examinada, por ejemplo, mediante sometimiento al ensayo de liberación de ⁵¹Cr anteriormente mencionado.

30 Los péptidos anteriormente descritos (incluyendo los péptidos epitópicos), según se describe en el contexto de la presente invención, pueden ser modificados en el grupo amino del aminoácido N-terminal y/o en el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal. De este modo, los péptidos en los cuales se ha modificado el residuo de aminoácido N-terminal y/o C-terminal entran dentro del ámbito del péptido descrito en el contexto de la presente invención.

35 Ejemplos de grupos para la modificación del grupo amino del aminoácido N-terminal incluyen de 1 a 3 grupos seleccionados de un grupo alquilo C₁₋₆, un grupo fenilo, un grupo cicloalquilo y un grupo acilo. Los grupos acilo incluyen un grupo alcanilo C₁₋₆, un grupo alcanilo C₁₋₆ sustituido con un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido con un grupo cicloalquilo C₅₋₇, un grupo alquil C₁₋₆ sulfonilo, un grupo fenil sulfonilo, un grupo alcoxicarbonilo C₂₋₆, un grupo alcoxicarbonilo sustituido con un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido con un grupo cicloalcoxi C₅₋₇, un grupo fenoxicarbonilo, etcétera.

45 Ejemplos de péptidos modificados en el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal incluyen ésteres y amidas. Los ésteres incluyen ésteres de alquilo C₁₋₆, ésteres de alquilo C₀₋₆ sustituidos con un grupo fenilo, ésteres de cicloalquilo C₅₋₇, etcétera. Las amidas incluyen específicamente amidas, amidas sustituidas con uno o dos grupos alquilo CC₁₋₆, amidas sustituidas con uno o dos grupos alquilo C₀₋₆ que están sustituidos con un grupo fenilo, amidas que forman un azacicloalcano de 5 a 7 miembros incluyendo el átomo de nitrógeno del grupo amida, etcétera.

50 La presente invención describe también un polinucleótido que codifica el péptido anteriormente mencionado. El polinucleótido que codifica un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención puede estar en forma de ADN o de ARN. Los polinucleótidos descritos en el contexto de la presente invención pueden ser fácilmente preparados sobre la base de la información acerca de la secuencia de aminoácidos del presente péptido o de la secuencia de polinucleótidos del ADN que codifica el mismo. Específicamente, la síntesis puede ser llevada a cabo utilizando el método habitual de síntesis de ADN o de amplificación por PCR. Se describe también un polinucleótido que codifica un péptido epitópico que comprende un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y un epítipo cooperador.

55 Un polinucleótido que codifica un péptido epitópico que comprende un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 5; un polinucleótido que codifica un péptido epitópico que comprende un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y un péptido cooperador originado de la toxina tetánica (por ejemplo, Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu, SEC ID N°: 6); y un polinucleótido que codifica un péptido epitópico que comprende un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 y 9 y un péptido (Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu, SEC ID N°: 7; *Clinical Cancer Res.*, 2001, 7: 3012-3024).

65 Un vector de expresión recombinante para expresar el péptido descrito en el contexto de la presente invención puede ser construido incorporando en un vector de expresión un polinucleótido preparado como anteriormente.

ES 2 341 785 T3

Un vector de expresión adecuado puede ser seleccionado dependiendo del huésped que va a ser utilizado, de los fines, etcétera, e incluye plásmidos, vectores fágicos, vectores víricos, etcétera.

Cuando el huésped es *Escherichia coli*, ejemplos del vector incluyen vectores plasmídicos tales como pUC118, pUC119, pBR322, pCR3, etcétera; y vectores fágicos tales como λ ZAPII, λ gt11, etcétera. Cuando el huésped es una levadura, ejemplos del vector incluyen pYES2, pYEUra3, etcétera. Cuando el huésped es una célula de insecto, ejemplos del vector incluyen pAcSGHisNT-A, etcétera. Cuando el huésped es una célula animal, ejemplos del vector incluyen vectores plasmídicos tales como pKCR, pCDM8, pGL2, pcDNA3.1, pRc/RSV, pRc/CMV, etcétera; y vectores víricos tales como un vector retrovírico, un vector adenovírico, un vector vírico adenoasociado, etcétera.

Los vectores de expresión anteriores pueden contener opcionalmente un(os) factor(es) tal(es) como un promotor capaz de inducir la expresión (promotor inductor de la expresión), un gen que codifica una secuencia señal, un gen marcador para la selección, un terminador, etcétera.

Además, el vector de expresión puede contener una secuencia adicional para expresar el péptido como una proteína de fusión con tiorredoxina, con una marca de His ("His tag"), con GST (glutathion S-transferasa) o similar, con el fin de facilitar el aislamiento y la purificación. Los vectores utilizables en tal caso incluyen vectores de la proteína de fusión GST que contienen un promotor apropiado (lac, tac, trc, trp, CMV, promotor temprano de SV40, etc.) que funciona en las células huésped, tal como pGEX4T; vectores que contienen una secuencia marca ("Tag") (Myc, His, etc.) tales como pcDNA3.1/Myc-His; y vectores capaces de expresar una proteína de fusión con tiorredoxina y la marca de His ("His tag") tales como pET32a.

Las células transformadas que contienen el vector según se describe en el contexto de la presente invención pueden ser preparadas transformando células huésped con un vector de expresión como el obtenido anteriormente.

Las células huésped utilizables en la presente incluyen *Escherichia coli*, levaduras, células de insecto y células animales. Ejemplos de *Escherichia coli* incluyen las cepas de *E. coli* K-12 tales como HB101, C600, JM109, DH5 α y AD494 (DE3). Ejemplos de levaduras incluyen *Saccharomyces cerevisiae*. Ejemplos de células animales incluyen células L929, BALB/c3T3, C127, CHO, COS, Vero y HeLa. Ejemplos de células de insecto incluyen sf9.

La introducción de un vector de expresión en las células huésped puede ser llevada a cabo utilizando un método convencional adecuado para las células huésped respectivas anteriores. Específicamente, la introducción puede ser realizada utilizando el método del fosfato de calcio, el método de DEAE-dextrano, el método de electroporación y un método que utilice lípidos para la transferencia génica (Lipofectamina, Lipofectina; Gibco-BRL). Las células transformadas que contienen el vector de expresión pueden ser seleccionadas cultivando las células huésped después de su introducción en un medio convencional que contenga un marcador para la selección.

El péptido según está descrito en el contexto de la presente invención puede ser producido cultivando las células transformadas bajo condiciones apropiadas (condiciones bajo las cuales pueden expresarse los péptidos). El péptido resultante puede ser posteriormente aislado y purificado según procedimientos bioquímicos estándar de purificación. Los procedimientos de purificación incluyen desplazamiento salino, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de absorción, cromatografía de afinidad, cromatografía de filtración en gel, etcétera. Cuando el polipéptido de la presente invención ha sido expresado como un péptido de fusión con tiorredoxina, con una marca de His ("His tag"), con GST, o similar, según se mencionó anteriormente, el péptido puede ser aislado y purificado mediante procedimientos de purificación apropiados utilizando las características de la proteína de fusión o de las marcas ("tags").

La presente invención describe un anticuerpo que se une específicamente a un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención. El anticuerpo según se describe en el contexto de la presente invención no está limitado a ninguna forma y puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal producido contra un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención como antígeno.

Según se mencionó anteriormente, no existe limitación en lo que respecta al anticuerpo según se describe en el contexto de la presente invención, con la condición de que se una específicamente a un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención. Ejemplos de anticuerpo describen aquéllos que se unen específicamente a un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9.

Los métodos de preparación de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y los anticuerpos de la presente invención pueden ser preparados mediante tales métodos convencionales (Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel y col. (1987) Publish. John Wiley and Sons, Sección 11.12-11.13. Antibodies: A Laboratory Manual, Lane, H.D. y col., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).

Específicamente, pueden prepararse anticuerpos inmunizando un animal no humano, tal como un conejo, con un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención como antígeno, y recuperando los anticuerpos del suero del animal inmunizado de manera convencional. Por otra parte, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales inmunizando un animal no humano tal como un ratón con un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención, sometiendo los esplenocitos resultantes a fusión celular con células de mieloma y recuperando los anticuerpos de las células híbridomas resultantes (Current Protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel y col. (1987) Publish. John Wiley and Sons, Sección 11.4-11.11).

Los anticuerpos frente al péptido descrito en el contexto de la presente invención pueden ser también producidos a la vez que se incrementa la respuesta inmunológica utilizando diferentes adyuvantes dependiendo del huésped. Ejemplos de adyuvantes incluyen los adyuvantes de Freund; geles minerales tales como hidróxido de aluminio; surfactantes tales como lisolecitina, poliol Pluronic, polianión, péptido, emulsión oleosa, hemocianina de la lapa ojo de cerradura y dinitrofenol; adyuvantes humanos tales como BCG (Bacilo de Calmette-Guerin) o *Corynebacterium*, etcétera.

Según se mencionó anteriormente, anticuerpos que reconocen un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención y anticuerpos que neutralizan la actividad del mismo pueden ser fácilmente preparados mediante la inmunización de un animal apropiadamente con un péptido de la presente invención de la manera convencional. Los anticuerpos pueden ser utilizados en cromatografía de afinidad, en métodos de diagnóstico inmunológicos, etcétera. El método de diagnóstico inmunológico puede ser seleccionado, según sea apropiado, de inmunotransferencia, radioinmunoensayo (RIA), ensayo sobre inmunoabsorbente con enzima unido (ELISA), un ensayo fluorescente o luminiscente, etcétera. El método de diagnóstico inmunológico es eficaz en el diagnóstico del cáncer acompañado por una expresión elevada de WT1, por ejemplo de cánceres de la sangre tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y de cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical y cáncer de ovario.

La presente invención proporciona una célula presentadora de antígeno que presenta un complejo entre un péptido de la presente invención y un antígeno HLA-A26.

Según se muestra en los ejemplos siguientes, la estimulación con un péptido como el reivindicado en el contexto de la presente invención inducía CTLs, lo cual indica que existían células presentadoras de antígeno que presentaban un complejo entre un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención y un antígeno HLA-A26 y que se inducían CTLs que reconocían específicamente dichas células presentadoras de antígeno. Tales células presentadoras de antígeno que presentan un complejo entre un péptido de la presente invención y un antígeno HLA-A26 son utilizadas eficazmente en terapia celular (terapia DC) según se describe en la presente posteriormente.

Las células presentadoras de antígeno de la presente invención incluyen cualquier célula que presente un complejo de un antígeno HLA-A26 y un péptido antigénico del cáncer de la presente invención, donde un complejo entre un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y un antígeno HLA-A26 es presentado sobre la superficie de células dendríticas.

Las células presentadoras de antígeno utilizadas en la terapia celular (terapia DC) pueden ser preparadas aislando células que tengan capacidad presentadora de antígeno de un paciente con cáncer, sometiendo las células *in vitro* a un pulso con un péptido como el reivindicado, o introduciendo en las células un polinucleótido o un vector de expresión que contenga el mismo según se describe en el contexto de la presente invención, y permitiendo que las células presenten el complejo entre un antígeno HLA-A26 y un péptido antigénico del cáncer como el reivindicado sobre la superficie celular. Las “células que tienen capacidad presentadora de antígeno” no están limitadas a células particulares y pueden ser cualquier célula que exprese un antígeno HLA-A26 capaz de presentar un péptido de la presente invención sobre la superficie celular; sin embargo, se prefieren las células dendríticas que se sabe que tienen una capacidad presentadora de antígeno especialmente elevada.

Además, la sustancia con la cual las células anteriores con capacidad presentadora de antígeno son sometidas a un pulso puede ser un péptido de la presente invención o un polinucleótido que codifique el péptido de la presente invención o un vector de expresión que contenga el mismo.

Las células presentadoras de antígeno como las reivindicadas pueden ser preparadas, por ejemplo, aislando células con capacidad presentadora de antígeno de un paciente con cáncer, sometiendo las células *in vitro* a un pulso con un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención (esto es, un péptido antigénico del cáncer que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9), produciendo de este modo un complejo entre un antígeno HLA-A26 y el péptido de la presente invención (Cancer Immunol. Immunother., 46: 82, 1998; J. Immunol., 158: p1796, 1997; Cancer Res., 59: p1184, 1999). Cuando se utilizan células dendríticas, las células presentadoras de antígeno de la presente invención pueden ser preparadas, por ejemplo, aislado linfocitos de la sangre periférica de un paciente con cáncer mediante el método del Ficoll, eliminando las células no adherentes, incubando las células adherentes en presencia de GM-CSF e IL-4 para inducir células dendríticas y sometiendo las células dendríticas a un pulso mediante incubación con un péptido de la presente invención.

En el caso en que las células presentadoras de antígeno de la presente invención sean preparadas mediante la introducción de un polinucleótido que codifique un péptido como el reivindicado (esto es, un polinucleótido que codifique un péptido epitópico que comprenda la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9) o un vector de expresión que contenga el mismo en las células anteriormente mencionadas con capacidad presentadora de antígeno, la preparación puede ser llevada a cabo consultando el método descrito en Cancer Res., 56: p5672, 1996 o en J. Immunol., 161: p5607, 1998, o similar, cuando el polinucleótido es ADN. La preparación de las células presentadoras de antígeno puede ser realizada utilizando ARN además de ADN de manera semejante, consultando J. Exp. Med., 184: p465, 1996, o similar.

ES 2 341 785 T3

La presente invención proporciona también CTLs que reconocen un complejo entre un péptido antigénico del cáncer de la presente invención y un antígeno HLA-A26.

5 Según se muestra en los ejemplos posteriores, la estimulación con un péptido como el reivindicado tuvo como resultado la actividad inductora de CTLs. Esto indica que existían células presentadoras de antígeno que presentaban un complejo entre un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención y un antígeno HLA-A26 y que se inducían CTLs que reconocían específicamente dichas células presentadoras de antígeno. Tales CTLs que reconocen específicamente un complejo entre un antígeno HLA-A26 y un péptido como el descrito en el contexto de la presente invención, pueden ser utilizadas eficazmente en inmunoterapia adoptiva según se describe en la presente posteriormente. Los CTLs de la presente invención pueden estar en cualquier forma, con la condición de que reconozcan específicamente un complejo de un péptido como el reivindicado con un antígeno HLA-A26, e incluyen CTLs monoclonales y una mezcla (población) de CTLs conteniendo diferentes tipos de clones. En particular, ejemplos incluyen CTLs que reconocen específicamente un complejo de un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 con un antígeno HLA-A26.

15 Los CTLs utilizados en la inmunoterapia adoptiva pueden ser preparados aislando linfocitos de la sangre periférica de un paciente, estimulando las células *in vitro* con un péptido como el reivindicado (esto es, un péptido antigénico del cáncer que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9), o con un polinucleótido que codifique un péptido como el reivindicado (esto es, un polinucleótido que codifique un péptido epitópico que comprenda la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9), o con un vector de expresión que contenga el mismo (Journal of Experimental Medicine, 1999, 190: 1669).

Los péptidos, vectores de expresión, células, células presentadoras de antígeno y CTLs anteriormente descritos, según se describen en el contexto de la presente invención, pueden ser utilizados como ingrediente activo de un inductor de CTLs, esto es, de una vacuna contra el cáncer, formulando los mismos de forma apropiada dependiendo de las sustancias respectivas, según se describe en la presente con más detalle posteriormente.

(1) Vacuna contra el cáncer que contiene como ingrediente activo un péptido de la presente invención

30 El péptido como el descrito en el contexto de la presente invención tiene capacidad inductora de CTLs y los CTLs así inducidos pueden ejercer la actividad anticancerosa a través de una acción citotóxica o de la producción de linfoquinas. El péptido como el descrito en el contexto de la presente invención puede ser utilizado por tanto como ingrediente activo de una vacuna contra el cáncer para el tratamiento o la prevención del cáncer. Así, la presente invención proporciona una vacuna contra el cáncer (composición farmacéutica como vacuna contra el cáncer) que contiene como ingrediente activo un péptido como el reivindicado. Cuando la vacuna contra el cáncer de la presente invención es administrada a un paciente positivo para HLA-A26 y positivo para WT1, el péptido (esto es, un péptido antigénico del cáncer que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9) es presentado al antígeno HLA-A26 de las células presentadoras de antígeno. Posteriormente, los CTLs que reconocen específicamente el complejo del antígeno HLA-A26 presentado pueden proliferar y destruir las células cancerosas, mediante lo cual se hace posible el tratamiento o la prevención del cáncer. La vacuna contra el cáncer de la presente invención puede ser utilizada en la prevención o el tratamiento del cáncer acompañado por un nivel de expresión elevado del gen WT1, por ejemplo de cánceres de la sangre tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y de cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical y cáncer de ovario.

Así, en otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de la vacuna contra el cáncer de la presente invención para ser utilizada en el tratamiento o la prevención del cáncer en un paciente positivo para HLA-A26 y positivo para WT1.

50 La vacuna contra el cáncer que contiene como ingrediente activo un péptido de la presente invención puede contener un único epítipo de CTLs (esto es, un péptido antigénico tumoral que consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9) o un péptido epitópico en el cual un péptido está ligado con otro(s) péptido(s) (epítipo de CTLs, epítipo cooperador, etc.) como ingrediente activo. Recientemente, se ha demostrado que un péptido epitópico en el cual están ligados múltiples epítipos de CTLs (péptidos antigénicos) tiene actividad para inducir *in vivo* eficazmente CTLs. Por ejemplo, se ha informado que un péptido epitópico 30-mero aproximadamente en el cual están ligados epítipos de CTLs (péptidos antigénicos) restringidos por HLA-A2, -A3, -A11 o B53 procedentes de la proteína antigénica del cáncer PSA, induce *in vivo* CTLs específicos para los epítipos de CTL respectivos (Journal of Immunology 1998, 161: 3186-3194). Se ha informado también que un péptido epitópico en el cual están ligados epítipo(s) de CTLs y epítipo(s) cooperador(es) puede inducir eficazmente CTLs. Cuando es administrado un péptido epitópico en estas formas, dicho péptido es incorporado a las células presentadoras de antígeno; los péptidos antigénicos respectivos generados por la degradación intracelular se unen a antígenos HLA para formar complejos; los complejos son presentados sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno a una elevada densidad; y CTLs específicos para los complejos proliferan eficazmente en el organismo y destruyen las células cancerosas. De esta forma, se lleva a cabo el tratamiento o la prevención del cáncer.

La vacuna contra el cáncer que contiene como ingrediente activo un péptido de la presente invención puede ser administrada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un adyuvante apropiado, o en forma de

partículas de tal manera que la inmunidad celular pueda ser establecida eficazmente. Como adyuvante, son aplicables los descritos en la literatura (Clin. Microbiol. Rev., 7: 277-289, 1994), etcétera. Ejemplos concretos incluyen componentes derivados de microorganismos, citoquinas, componentes derivados de plantas, componentes derivados de organismos marinos, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, surfactantes tales como lisolecitina y polioles
 5 Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas (preparaciones en emulsión), etcétera. Se contemplan también preparaciones de liposomas, preparaciones particuladas en las cuales el ingrediente está unido a esferas con un diámetro de varios μm , preparaciones en las cuales el ingrediente está unido a lípidos, etcétera.

La administración puede ser realizada, por ejemplo, intradérmicamente, subcutáneamente, intramuscularmente o
 10 intravenosamente. Aunque la dosificación del péptido de la presente invención en la formulación puede ser ajustada según sea apropiado dependiendo de la enfermedad que vaya a ser tratada, de la edad y el peso corporal del paciente, está normalmente en el rango de 0,0001 mg-1000 mg, preferiblemente 0,001 mg-1000 mg, más preferiblemente 0,1 mg-10 mg, que puede ser administrada preferiblemente desde una vez cada varios días hasta una vez cada varios meses.

15 (2) *Vacuna de ADN que comprende como ingrediente activo un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención*

No solamente el péptido de la presente invención anteriormente mencionado, sino también un vector de expresión
 20 conteniendo un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención, puede ser un ingrediente activo de la vacuna de ADN para el tratamiento o la prevención del cáncer. Por tanto, se describe una vacuna contra el cáncer (composición farmacéutica como vacuna contra el cáncer) que comprende como ingrediente activo un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica un péptido de la presente invención.

Recientemente, se ha demostrado que un polinucleótido que codifica un péptido epitópico en el cual están ligados
 25 múltiples (plural) epitopos de CTLs (péptidos antigénicos) o en el cual están ligados un(os) epitopo(s) de CTLs y un(os) epitopo(s) cooperador(es), tiene actividad inductora de CTLs *in vivo* eficaz. Por ejemplo, se ha descrito que un ADN (minigen) que codifica un péptido epitópico en el cual están ligados péptidos antigénicos (6 péptidos) restringidos por el HLA-A2 procedentes del VHB, péptidos antigénicos (3 péptidos) restringidos por el HLA-A11 y un
 30 epítipo cooperador, inducía eficazmente *in vivo* CTLs dirigidos hacia los epítipos respectivos (Journal of Immunology 1999, 3915-3925).

Por consiguiente, puede obtenerse un ingrediente activo de la vacuna contra el cáncer incorporando un polinucleó-
 35 tido que codifique un péptido epitópico como el reivindicado a un vector de expresión apropiado.

Cuando se administra un vector de expresión conteniendo un polinucleótido como el descrito en el contexto de la
 presente invención como ingrediente activo de una vacuna contra el cáncer (vacuna de ADN), pueden utilizarse los
 métodos siguientes.

40 Como método para introducir un polinucleótido como el descrito en el contexto de la presente invención en células, es aplicable cualquier medio, incluyendo los que utilizan vectores víricos u otros métodos (Nikkei-Science, Abril de 1994, 20-45; Gekkan-Yakuji, 36(1), 23-48 (1994); Jikken-Igaku-Zokan, 12(15), 1994, y las referencias citadas en los mismos).

Ejemplos de métodos que utilizan un vector vírico incluyen aquéllos en los cuales un ADN de la presente invención
 45 es incorporado a un virus de ADN o ARN tal como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus herpes, virus vaccinia, poxvirus, poliovirus o virus Sindbis y posteriormente introducido en las células. Sobre todo, se prefiere particularmente un método que utilice retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus vaccinia o similar.

Ejemplos de otros métodos incluyen un método en el cual un plásmido de expresión es inyectado directamen-
 50 te intramuscularmente (vacunación con ADN), el método de liposomas, el método de Lipofectina, microinyección, el método del fosfato de calcio y electroporación. Se prefiere el método de vacunación con ADN y el método de liposomas.

Con respecto al método para permitir que el polinucleótido descrito en el contexto de la presente invención actúe
 55 en la práctica como un medicamento, existe un método *in vivo* en el cual el polinucleótido es introducido directamente en el organismo y un método *ex vivo* en el cual el ADN es introducido extracorpóreamente en ciertas células extraídas de un humano y las células son reintroducidas en el organismo (Nikkei-Science, Abril de 1994, 20-45; Gekkan-Yakuji, 36(1), 23-48 (1994); Jikken-Igaku-Zokan, 12(15), 1994, y las referencias citadas en los mismos). El método *in vivo* es
 60 el más preferido.

En el caso del método *in vivo*, la administración puede ser realizada mediante cualquier vía apropiada dependiendo
 de la enfermedad y de los síntomas que van a ser tratados. Por ejemplo, puede ser administrado por vía intravenosa, intraarterial, subcutánea, intracutánea, intramuscular o similar. Cuando la administración se lleva a cabo mediante el
 65 método *in vivo*, la composición puede ser administrada en varias formas tales como en solución, aunque típicamente es formulada, por ejemplo, en una inyección que comprende como ingrediente activo un vector de expresión que contiene un polinucleótido de la presente invención. Si es necesario, la inyección puede contener vehículos convencionales. En cuanto a los liposomas o a liposomas fusionados a membranas (tales como liposomas-(HVJ) del virus Sendai)

ES 2 341 785 T3

que contienen un vector de expresión conteniendo un polinucleótido como el descrito en el contexto de la presente invención, pueden estar en forma de una formulación de liposomas tales como una suspensión, un fármaco congelado, un fármaco congelado concentrado por centrifugación, o similar.

5 Aunque el contenido de un vector de expresión que contiene un polinucleótido en una formulación puede ser ajustado según sea apropiado dependiendo de, por ejemplo, la enfermedad a tratar, la edad y el peso corporal del paciente, normalmente pueden administrarse 0,0001 mg-100 mg, preferiblemente 0,001 mg-10 mg, de un vector de expresión conteniendo un polinucleótido como el descrito en el contexto de la presente invención, desde una vez cada varios días hasta una vez cada varios meses.

10 Cuando el vector de expresión anteriormente mencionado que contiene un polinucleótido como el descrito en el contexto de la presente invención es administrado a un paciente con cáncer, un polipéptido correspondiente a dicho polinucleótido es expresado a niveles elevados en las células presentadoras de antígeno. Posteriormente, los péptidos antigénicos del cáncer generados por la degradación intracelular forman complejos con los antígenos HLA; los complejos son luego presentados sobre la superficie de las células presentadoras de antígeno a una densidad elevada; y CTLs que reconocen específicamente dichos complejos proliferan eficazmente en el organismo y destruyen las células cancerosas. De esta forma, se lleva a cabo el tratamiento o la prevención del cáncer. La vacuna contra el cáncer que comprende como ingrediente activo un vector de expresión conteniendo un polinucleótido como el descrito en el contexto de la presente invención, puede ser utilizada en la prevención o el tratamiento del cáncer acompañado por un nivel de expresión elevado del gen WT1, por ejemplo de cánceres de la sangre tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y de cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical y cáncer de ovario.

25 (3) *Vacuna contra el cáncer que contiene como ingrediente activo las células presentadoras de antígeno de la presente invención*

Se describe una vacuna contra el cáncer que contiene como ingrediente activo las células presentadoras de antígeno de la presente invención.

30 Recientemente, se ha descrito una terapia celular (terapia DC) que comprende el aislamiento de linfocitos de la sangre periférica de un paciente con cáncer, la inducción de células dendríticas a partir de los linfocitos, el sometimiento de las células dendríticas a un pulso con un péptido o similar *in vitro* y la reintroducción de las células presentadoras de antígeno resultantes en el paciente mediante inyección subcutánea o similar (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). Las células presentadoras de antígeno anteriormente descritas según se describen en el contexto de la presente invención, pueden ser utilizadas por tanto como ingrediente activo de una vacuna contra el cáncer para ser utilizada en la terapia celular.

40 La vacuna contra el cáncer que contiene como ingrediente activo las células presentadoras de antígeno descritas en el contexto de la presente invención contiene preferiblemente solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), medio o similar, para mantener de manera estable las células presentadoras de antígeno. Puede ser administrada, por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente o intradérmicamente. La dosis es similar a la descrita en las referencias citadas anteriormente.

45 Cuando la vacuna contra el cáncer anterior es reintroducida en el organismo de un paciente, se inducen CTLs específicos de manera eficaz en el organismo de un paciente positivo para HLA-A26 y positivo para WT1, por lo que puede llevarse a cabo el tratamiento o la prevención del cáncer. La vacuna contra el cáncer que contiene como ingrediente activo las células presentadoras de antígeno descritas en el contexto de la presente invención puede ser utilizada en la prevención o el tratamiento de un cáncer acompañado por un nivel de expresión elevado del gen WT1, por ejemplo de cánceres de la sangre tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y de cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical y cáncer de ovario.

55 (4) *Vacuna contra el cáncer que contiene como ingrediente activo CTLs de la presente invención*

Se describe una vacuna contra el cáncer (una composición farmacéutica como vacuna contra el cáncer) que contiene como ingrediente activo CTLs de la presente invención según se define en las reivindicaciones. Los CTLs de la presente invención pueden ser utilizados eficazmente en inmunoterapia adoptiva según se describe en la presente posteriormente.

60 En melanomas, se ha observado efecto terapéutico en inmunoterapia adoptiva en la cual se extraen de un paciente células T que se infiltran en el tumor y se cultivan *ex vivo* en grandes cantidades y posteriormente se devuelven al mismo paciente (J. Natl. Cancer Inst., 86: 1159, 1994). Además, en melanoma de ratón, se ha observado supresión de metástasis cuando se estimulan esplenocitos *in vitro* con el péptido antigénico del cáncer TRP-2 para amplificar CTLs específicos para el péptido antigénico del cáncer, y los CTLs son administrados a un ratón con un injerto de melanoma (J. Exp. Med., 185: 453, 1997). Esto fue el resultado de la proliferación *in vitro* de CTLs que reconocían

específicamente un complejo entre un antígeno HLA de las células presentadoras de antígeno y un péptido antigénico del cáncer. Por consiguiente, se cree que es eficaz un método terapéutico que comprende la estimulación *in vitro* de linfocitos de sangre periférica de un paciente con un péptido o con un polinucleótido o con un vector de expresión de la presente invención para hacer proliferar CTLs específicos contra el cáncer, y la reposición de los CTLs en el paciente.
 5 Por tanto, los CTLs según son definidos en las reivindicaciones pueden ser utilizados como ingrediente activo de una vacuna contra el cáncer en inmunoterapia adoptiva.

La vacuna contra el cáncer que contiene como ingrediente activo CTLs definidos en las reivindicaciones contiene preferiblemente solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), medio o similar, para
 10 mantener de manera estable los CTLs. Puede ser administrada, por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente o intradérmicamente. La dosis es similar a la descrita en las referencias citadas anteriormente.

Cuando la vacuna contra el cáncer es retornada a un paciente positivo para HLA-A26 y positivo para WT1, la acción citotóxica de los CTLs sobre las células cancerosas es incrementada en el organismo del paciente y las células cancerosas son destruidas. De esta forma, el cáncer puede ser tratado. La vacuna contra el cáncer que contiene como
 15 ingrediente activo los CTLs definidos en las reivindicaciones puede ser utilizada en la prevención o el tratamiento de un cáncer acompañado por un nivel de expresión elevado del gen WT1, por ejemplo de cánceres de la sangre tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y de cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de
 20 piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical y cáncer de ovario.

La presente invención proporciona también un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA que contiene un péptido antigénico del cáncer de la presente invención y un antígeno HLA-A26.

En la inmunoterapia contra el cáncer, el examen de la frecuencia o de la cantidad de células precursoras de CTLs dirigidas hacia un antígeno del cáncer (péptido antigénico del cáncer) en un paciente antes del tratamiento, o el examen de la frecuencia o de la cantidad de CTLs en un paciente durante el tratamiento con un antígeno del cáncer (péptido antigénico del cáncer), puede proporcionar una indicación significativa para la selección de pacientes altamente sensibles al antígeno del cáncer (péptido antigénico del cáncer), la monitorización de los efectos terapéuticos o la evaluación de la idoneidad del tratamiento. Un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA y un pentámero de HLA conteniendo cada uno de ellos un péptido antigénico tumoral junto con un antígeno HLA son útiles como reactivo para la detección de CTLs específicos para el antígeno (péptido antigénico), específicamente, para la medida de la frecuencia o de la cantidad de CTLs.
 30

Según se utiliza en la presente, el tetrámero de HLA se refiere a un tetrámero preparado biotinilando un complejo (monómero de HLA) obtenido por la asociación de la cadena α de un antígeno HLA y una β 2-microglobulina con un péptido (péptido antigénico) y permitiendo la unión a avidina para la tetramerización (Science, 279: 2103-2106 (1998); y Science, 274: 94-96 (1996)).
 35

El monómero de HLA es un monómero que es utilizado en la preparación del tetrámero de HLA anteriormente mencionado y es formado mediante la biotinilación de una asociación de la cadena α de un antígeno HLA, β 2-microglobulina y el péptido antigénico.
 40

El dímero de HLA es un dímero preparado fusionando la cadena α de un antígeno HLA e Ig (inmunoglobulina, por ejemplo IgG1) y uniendo la fusión resultante a β 2-microglobulina y al péptido antigénico (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6671-6675 (1993)). Los CTLs específicos para el péptido antigénico unidos al dímero de HLA pueden ser detectados, por ejemplo, permitiendo que un anticuerpo anti-IgG1 marcado se una a IgG1.
 45

El pentámero de HLA es una técnica desarrollada recientemente y se refiere a un pentámero en el cual cinco moléculas de un complejo que comprende un antígeno HLA y un péptido antigénico son polimerizadas a través del dominio de hélice enrollada ("coiled-coil"). Como el complejo antígeno HLA-péptido antigénico puede ser marcado con fluorescencia o similar, el análisis puede ser llevado a cabo mediante citometría de flujo o un método similar de manera análoga al del tetrámero de HLA (ver, <http://www.proimmune.co.uk/>).
 50

El monómero, el dímero, el tetrámero y el pentámero de HLA anteriormente mencionados están todos disponibles mediante producción de encargo en fabricantes tales como ProImmune o BD Biosciences. Actualmente, tetrámeros de HLA y similares, que contienen diferentes péptidos antigénicos, están disponibles comercialmente (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., etc.).
 55

Ejemplos del monómero, del dímero, del tetrámero y del pentámero de HLA de la presente invención incluyen, específicamente, monómeros, dímeros, tetrámeros y pentámeros de HLA que contienen cada uno de ellos un péptido con una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEC ID N°: 2, 8 ó 9 y un antígeno HLA-A26. Preferiblemente, en la detección de CTLs se utiliza un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA y, más preferiblemente, un tetrámero de HLA.
 60

El monómero de HLA, el tetrámero de HLA y el pentámero de HLA son preferiblemente marcados con fluorescencia con el fin de que los CTLs unidos puedan ser fácilmente seleccionados o detectados mediante una medida de detección conocida tal como citometría de flujo, microscopia de fluorescencia, etcétera. Ejemplos incluyen monóme-
 65

ES 2 341 785 T3

ros, tetrámeros y pentámeros de HLA marcados con ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína peridínil clorofila (PerCP), alofocianina (APC) o similar.

5 El antígeno HLA-A26 (cadena α del antígeno HLA-A26), que es un componente del monómero, del dímero, del tetrámero y del pentámero de HLA de la presente invención, puede ser clonado fácilmente mediante un método convencional tal como PCR sobre la base de la información sobre la secuencia de bases conocida del HLA-A26, etcétera, descrita en el N° de Acceso del GenBank D 14350.

10 La β 2-microglobulina, que es un componente del monómero, del dímero, del tetrámero y del pentámero de HLA de la presente invención procede preferiblemente de un humano. La β 2-microglobulina humana puede ser clonada fácilmente mediante un método convencional tal como PCR sobre la base de la información sobre la secuencia de bases conocida de la β 2-microglobulina humana descrita en el N° de Acceso del GenBank AB021288.

15 El proceso para la preparación del monómero, el dímero, el tetrámero y el pentámero de HLA es bien conocido a partir de las literaturas respectivas anteriormente mencionadas; sin embargo, la preparación se describirá en la presente a continuación brevemente en lo que se refiere al tetrámero de HLA.

20 En primer lugar, una célula huésped apropiada tal como *E. coli* o células de mamífero, capaz de expresar una proteína, es transformada con un vector de expresión de la cadena α de HLA-A26 y un vector de expresión de β 2-microglobulina y se permite la expresión. *E. coli* (por ejemplo, BL21) es utilizada preferiblemente en la presente. El complejo resultante de HLA-A26 monomérico y un péptido de la presente invención son posteriormente mezclados para formar un complejo HLA-péptido soluble. La secuencia C-terminal de la cadena α de HLA-A26 del complejo HLA-péptido resultante es biotinilada con el enzima BirA. Cuando un complejo HLA-péptido biotinilado y avidina marcada fluorescentemente son mezclados a una relación molar de 4:1, se forma un tetrámero de HLA. Se prefiere purificar la proteína resultante mediante filtración en gel o similar en cada una de las etapas anteriores.

El monómero, el dímero, el tetrámero y el pentámero de HLA descritos anteriormente son utilizados eficazmente como agentes de detección de CTLs que son específicos para péptidos antigénicos del cáncer que se unen a HLA-A26.

30 El agente detector de CTLs de la presente invención puede ser utilizado, por ejemplo, para los fines siguientes.

- 35 (1) Puede ser utilizado para examinar la frecuencia o la cantidad de precursores de CTLs dirigidos hacia un péptido antigénico del cáncer de la presente invención antes del tratamiento con el péptido antigénico del cáncer. Esto hace posible evaluar la sensibilidad de un paciente al péptido antigénico del cáncer.
- (2) Puede ser utilizado para examinar la frecuencia o la cantidad de CTLs en un paciente durante el tratamiento con un péptido antigénico del cáncer de la presente invención. Esto hace posible monitorizar los efectos terapéuticos, evaluar la idoneidad del tratamiento y confirmar que el tratamiento transcurre favorablemente, etcétera.

40 La detección de CTLs puede ser llevada a cabo, específicamente, aislando una muestra biológica (por ejemplo, PBMC) que contenga CTLs de un paciente, poniendo en contacto un tetrámero de HLA o similar de la presente invención con la muestra biológica y midiendo la frecuencia o la cantidad existente de CTLs específicos para el péptido de la presente invención unidos al tetrámero de HLA o similar mediante citometría de flujo, o similar.

Ejemplos

50 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes, pero el ámbito de la protección conferida está definido en las reivindicaciones.

Ejemplo 1

*Identificación de Péptidos Antigénicos que se Unen a HLA-A*0201*

55 Un péptido con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 3, que corresponde a la secuencia en posición 7-15 de la secuencia de aminoácidos del WT1 humano (Cell, 60: 509, 1990; SEC ID N°: 1), fue sintetizado mediante síntesis en fase sólida. Después de obtener el consentimiento informado, se extrajo sangre de sujetos sanos positivos para HLA-A*0201 y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) utilizando la solución de separación Ficoll-Hypaque. Líneas de células T positivas para HLA-A*0201, incapaces de presentar péptidos endógenos al HLA debido a un déficit en el gen TAP (J. Immunol., 150: 1763, 1993), fueron sometidas a un pulso con el péptido de la SEC ID N°: 3 a 20 μ M durante 2 horas, irradiadas posteriormente (7500 cGy) y co-cultivadas con los PBMCs en una proporción del número de células de 1:1. Como solución de cultivo, se utilizó un medio completo compuesto por un 45% de medio AIM-V, un 45% de medio RPMI 1640, un 10% de suero humano inactivado, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales MEM, 100 ng/ml de estreptomycin, 100 UI/ml de penicilina y 25 ng/ml de 2-mercaptoetanol. Siete días más tarde, se llevó a cabo una estimulación por segunda vez de manera similar y al día siguiente se añadieron a todo ello 25 UI/ml de IL-2 (Shionogi & Co., Ltd.). La estimulación se llevó a cabo cinco veces en total y las células efectoras obtenidas 5 días después de la última estimulación fueron utilizadas para medir la citotoxicidad.

ES 2 341 785 T3

La actividad citotóxica de los CTLs sobre las células diana fue medida mediante el ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Las células diana marcadas con ⁵¹Cr (1 x 10⁴ células/100 µl en total) fueron cocultivadas con números diferentes de células efectoras (100 µl) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Después de cultivar a 37°C durante 3-5 horas, la placa fue centrifugada para separar el sobrenadante (100 µl) que fue sometido a la medida de la radiación y. La citotoxicidad específica (% de lisis específica) fue calculada según sigue:

$$\% \text{ de lisis específica} = (\text{cpm de liberación experimental} - \text{cpm de liberación espontánea}) / (\text{cpm de liberación máxima} - \text{cpm de liberación espontánea}) \times 100$$

La “liberación espontánea” y la “liberación máxima” fueron medidas en el sobrenadante obtenido del cultivo de células diana y en el obtenido del cultivo de células diana tratadas con una solución de Triton X-100 al 1%, respectivamente. El test de diferencia significativa se llevó a cabo mediante el test t de Student. La actividad citotóxica fue medida utilizando como células diana células T2 sometidas a un pulso con el mismo péptido que el utilizado en la estimulación o células T2 no sometidas al pulso con el péptido. Los resultados están mostrados en la Fig. 1. Los CTLs inducidos por estimulación con células T2 sometidas a un pulso con el péptido de la SEC ID N°: 3 ejercían una actividad citotóxica más potente sobre las células T2 sometidas al pulso con el péptido que sobre las células T2 no sometidas al pulso con el péptido (p<0,05). Estos resultados demostraban que se habían inducido CTLs que reconocían específicamente el péptido de SEC ID N°: 3 derivado de WT1 a partir de PBMCs humanas positivas para HLA-A*0201 mediante estimulación con el péptido de SEC ID N°: 3.

Posteriormente, se examinó la actividad citotóxica de CTLs inducidos por el péptido de SEC ID N°: 3 en las líneas celulares TF-1 y JY, donde la línea celular TF-1 es positiva para HLA-A*0201 y expresa WT1 (J. Cell. Physiol., 140: 323, 1989), mientras que la línea celular JY es positiva para HLA-A*0201 pero no expresa WT1 (J. Biol. Chem., 252, 1997). Los resultados están mostrados en la Fig. 2. Los CTLs inducidos por estimulación con el péptido de SEC ID N°: 3 destruían las células TF-1 y no las células JY (p<0,05). Estos resultados demostraban que se producía un péptido de SEC ID N°: 3 a través del procesamiento de la proteína endógena WT1 expresada intracelularmente, presentada como antígeno junto con una molécula de HLA-A*02 01, y que era reconocido por los CTLs.

Ejemplo 2

Identificación de Péptidos Antigénicos que se Unen a HLA-A26 (1)

Se sintetizó mediante síntesis en estado sólido un péptido mostrado en la SEC ID N°: 2 que corresponde a la posición 368-376 de la secuencia de aminoácidos del WT1 humano (Cell, 60: 509, 1990, SEC ID N°: 1).

Después de obtener el consentimiento informado, se prepararon PBMCs de sujetos sanos positivos para HLA-A2 6 de manera similar a la del Ejemplo 1, y se estimularon mediante la adición del péptido de SEC ID N°: 2. Una semana más tarde, las PBMCs fueron sometidas a un pulso con el péptido de SEC ID N°: 2 y utilizadas como estimuladores en la estimulación. La estimulación se llevó a cabo una vez a la semana, 4 veces en total. Una semana después, células B (B-LCL) transformadas con el virus de EB fueron sometidas a un pulso con el péptido de SEC ID N°: 2 y utilizadas como estimuladores en la estimulación. Cinco días después de la estimulación final, se midió la actividad citotóxica mediante el ensayo de liberación de ⁵¹Cr de manera similar a la del Ejemplo 1, utilizando como células diana células B-LCL sometidas a un pulso con el péptido de SEC ID N°: 2 y células B-LCL no sometidas a un pulso con el péptido. Los resultados están mostrados en la Fig. 3. Los CTLs inducidos por estimulación con el péptido de SEC ID N°: 2 ejercían una actividad citotóxica más potente sobre las células B-LCL sometidas a un pulso con el péptido que sobre las células B-LCL no sometidas a un pulso con el péptido. Estos resultados demostraban que se inducían CTLs que reconocían específicamente el péptido de SEC ID N°: 2 derivado de WT1 a partir de PBMCs humanas positivas para HLA-A2 6 por estimulación con el péptido de SEC ID N°: 2.

Se sabe que el genotipo del sujeto sano positivo para HLA-A26 utilizado en la presente es HLA-A*2 601.

Ejemplo 3

Identificación de Péptidos Antigénicos que se Unen a HLA-A26 (2)

Se sintetizaron mediante síntesis en estado sólido los péptidos mostrados en las SEC ID N°s: 8, 9 y 2 que corresponden a las posiciones 152-160, 185-193 y 368-376, respectivamente, de la secuencia de aminoácidos del WT1 humano (Cell, 60: 509, 1990, SEC ID N°: 1).

Después de obtener el consentimiento informado, se prepararon PBMCs de un sujeto sano positivo para HLA-A2 6 de manera similar a la del Ejemplo 1 y se estimularon mediante la adición de un péptido de SEC ID N°: 8. Una semana después, las PBMCs fueron sometidas a un pulso con el péptido de SEC ID N°: 8 y se utilizaron como estimuladores en la estimulación. La estimulación se llevó a cabo una vez a la semana, 3 veces en total. Después de las 3 veces de estimulación, se enriquecieron las células CD8 positivas mediante un método de selección negativa. Posteriormente, se llevó a cabo la estimulación con el péptido de SEC ID N° 8 dos veces. Cinco días después de la estimulación

final, se midió la actividad citotóxica mediante el ensayo de liberación de ^{51}Cr de manera similar a la del Ejemplo 1, utilizando como células diana células B-LCL sometidas a un pulso con el péptido de SEC ID N°: 8 y células B-LCL no sometidas a un pulso con el péptido. Se llevaron a cabo experimentos de la misma manera que anteriormente utilizando un péptido de SEC ID N°: 9 y un péptido de SEC ID N°: 2. Los resultados están mostrados en la Fig. 4. Los CTLs inducidos por estimulación con el péptido de SEC ID N°: 8, con el péptido de SEC ID N°: 9 o con el péptido de SEC ID N°: 2, ejercían una actividad citotóxica más potente sobre las células B-LCL sometidas a un pulso con el péptido que sobre las células B-LCL no sometidas a un pulso con el péptido. Estos resultados demostraban que se inducían CTLs que reconocían específicamente el péptido derivado de WT1 de SEC ID N°: 8, 9 y 2 a partir de PBMCs humanas positivas para HLA-A26 por estimulación con el péptido de SEC ID N°: 8, 9 y 2, respectivamente.

Aplicabilidad industrial

Se describen en el contexto de la presente invención péptidos antigénicos del cáncer derivados de WT1, polinucleótidos que codifican los mismos, inductores de CTLs que contienen los mismos, etcétera. El inductor de CTLs, según se describe en el contexto de la presente invención, es útil como vacuna contra el cáncer. La vacuna contra el cáncer según se describe en el contexto de la presente invención es aplicable a muchos pacientes de cáncer que son positivos para HLA-A26 o HLA-A*0201.

Texto libre del listado de secuencias

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3 es un péptido sintético. En la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 4, el segundo aminoácido es leucina, metionina, valina, isoleucina o glutamina y el noveno aminoácido es valina o leucina.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 5 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 6 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 7 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 8 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 9 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 10 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 11 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 12 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 13 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 14 es un péptido sintético.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 15 es un péptido sintético.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un péptido de una secuencia de aminoácidos como la mostrada en cualquiera de las SEC ID N^{os}: 2, 8 y 9 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención del cáncer en un paciente positivo para HLA-A26.
- 10 2. La utilización de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica es una vacuna contra el cáncer.
- 15 3. Una composición farmacéutica que contiene un péptido de una secuencia de aminoácidos como la mostrada en cualquiera de las SEC ID N^{os}: 2, 8 y 9 para ser utilizada en un método de tratamiento o prevención del cáncer en un paciente positivo para HLA-A26.
- 20 4. La utilización de acuerdo con la reivindicación 3, en la que composición farmacéutica es utilizada como inductora de CTLs.
- 25 5. La utilización de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la composición farmacéutica es utilizada como vacuna contra el cáncer.
- 30 6. Una célula presentadora de antígeno sobre la cual se presenta un complejo entre un péptido descrito en la reivindicación 1 y un antígeno HLA-A26.
- 35 7. Un CTL que reconoce un complejo entre un péptido descrito en la reivindicación 1 y un antígeno HLA-A26.
- 40 8. Un monómero, dímero, tetrámero o pentámero de HLA que comprende un péptido descrito en la reivindicación 1 junto con un antígeno HLA-A26.
- 45 9. Un reactivo para la detección de CTLs específicos para un péptido antigénico del cáncer que se une a HLA-A26 derivado de WT1, donde el reactivo contiene como ingrediente un monómero, dímero, tetrámero o pentámero de HLA descrito en la reivindicación 8.
- 50
- 55
- 60
- 65

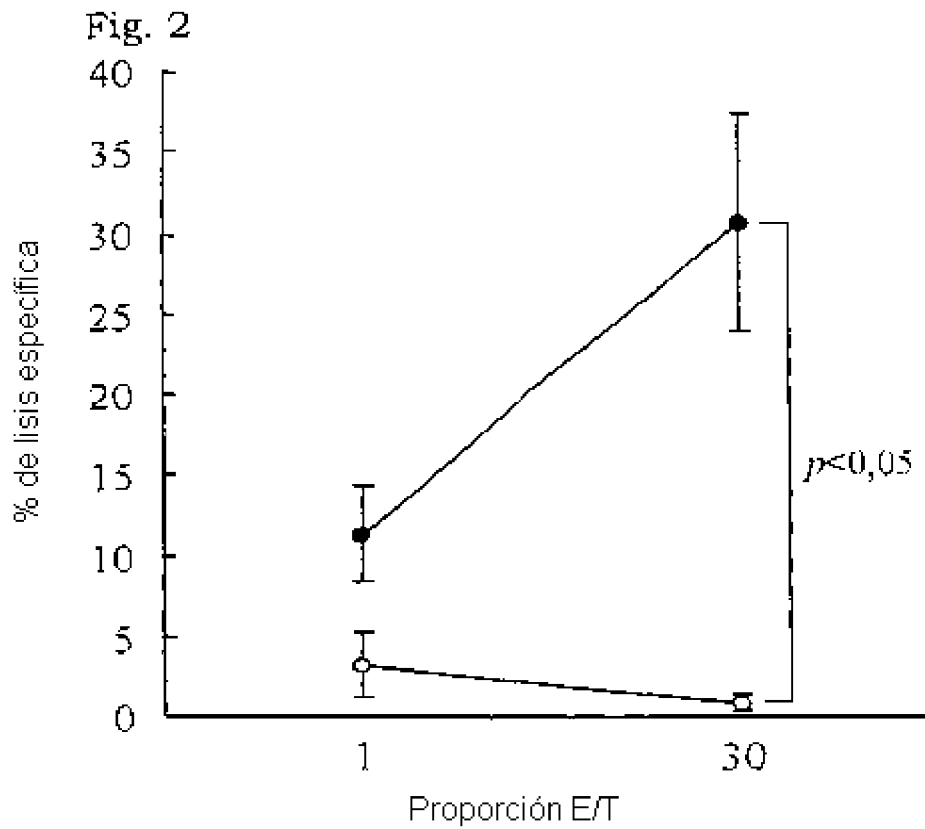
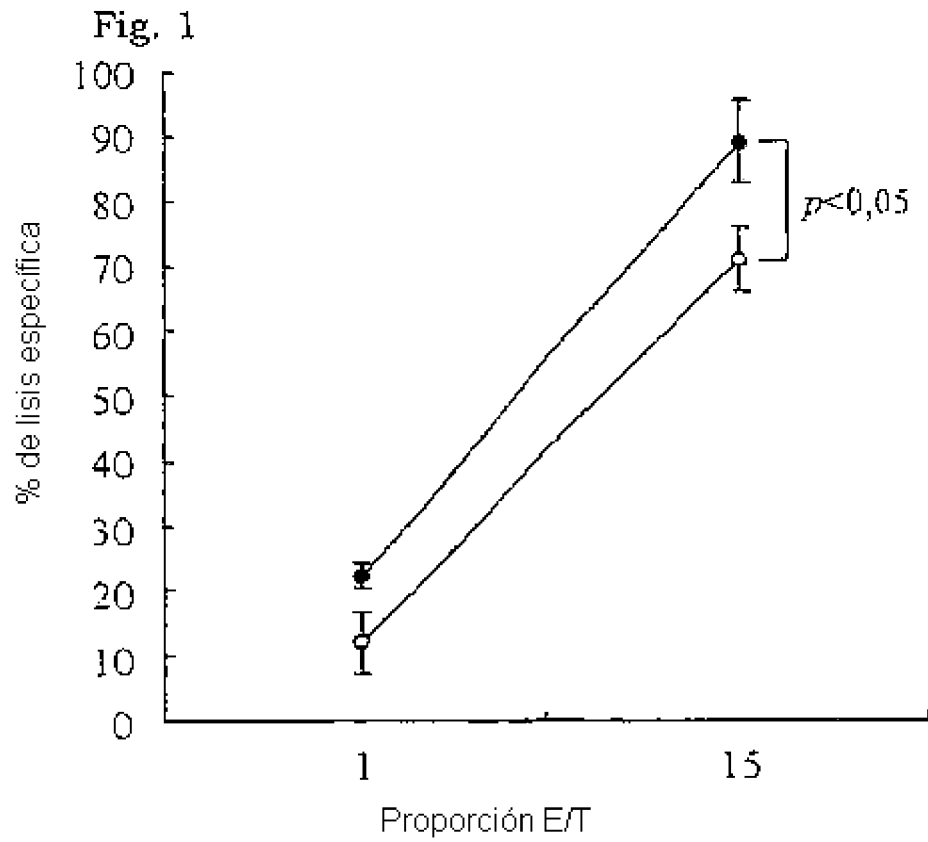


Fig. 3

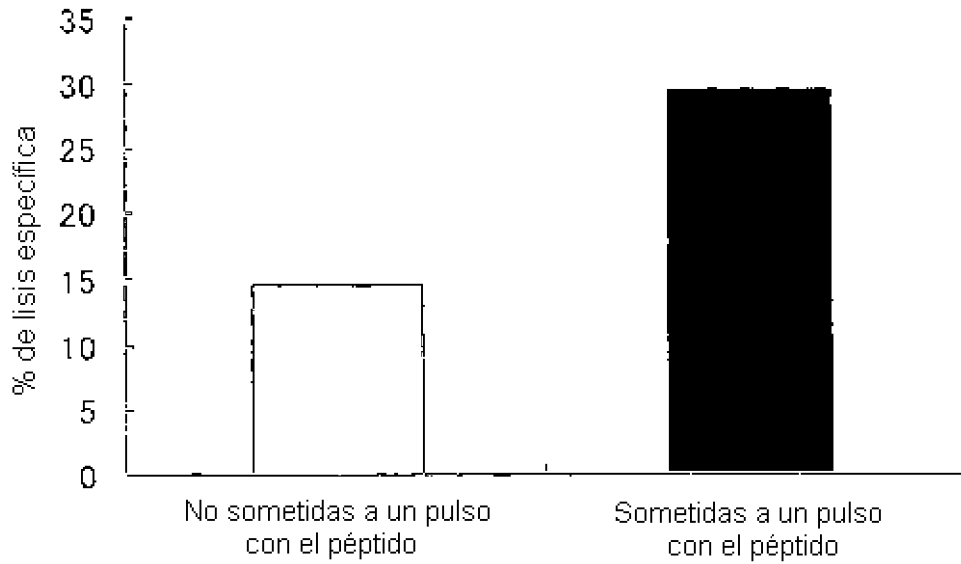
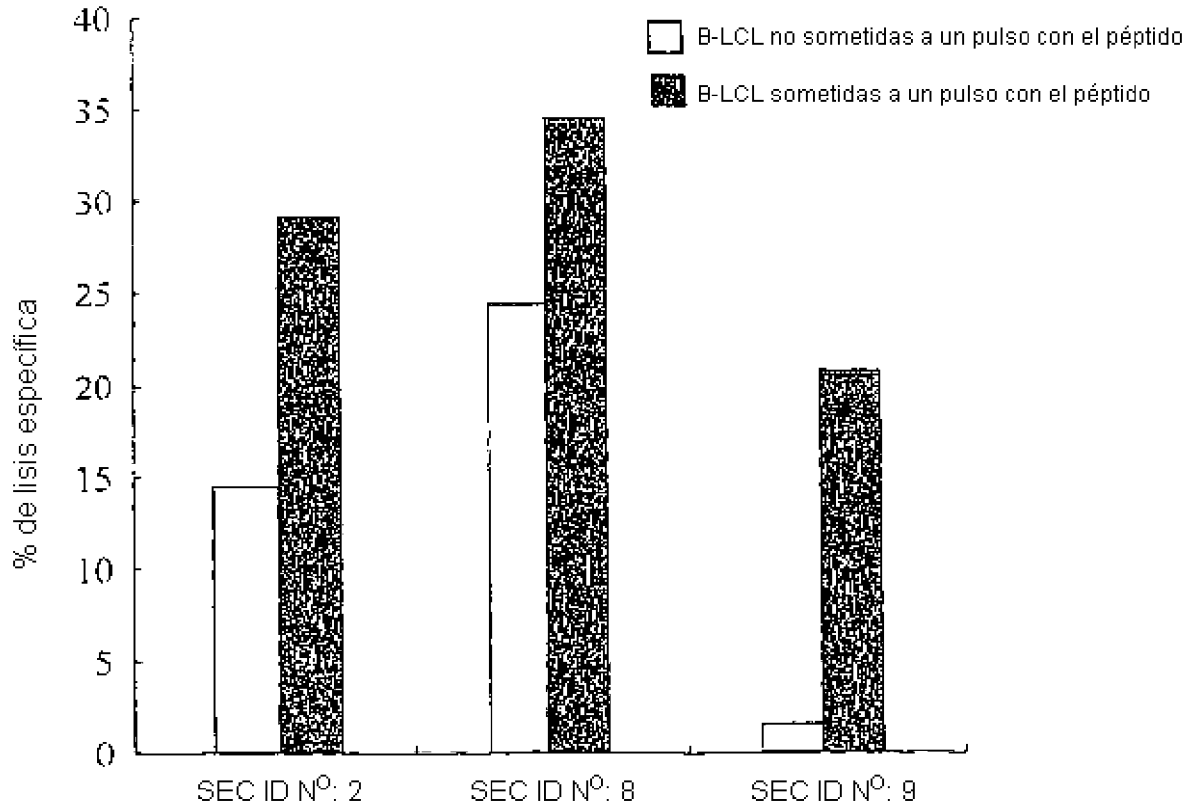


Fig. 4



ES 2 341 785 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sugiyama, Haruo
5 <120> Péptidos antigénicos del cáncer derivados de WT1
<130> 665070
<150> JP 2004-105219
<151> 31-03-2004
10 <160> 15
<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
15 <211> 449
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
20 <400> 1
Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15
25 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
20 25 30
30 Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
35 40 45
Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
50 55 60
35 Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
65 70 75 80
40 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
45 100 105 110
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
115 120 125
50

55

60

65

ES 2 341 785 T3

	Pro	Asn	Ala	Pro	Tyr	Leu	Pro	Ser	Cys	Leu	Glu	Ser	Gln	Pro	Ala	Ile
		130					135				140					
5	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
10					165					170					175	
	Lys	His	Glu	Asp	Pro	Met	Gly	Gln	Gln	Gly	Ser	Leu	Gly	Glu	Gln	Gln
				180					185					190		
15	Tyr	Ser	Val	Pro	Pro	Pro	Val	Tyr	Gly	Cys	His	Thr	Pro	Thr	Asn	Ser
			195					200					205			
	Cys	Thr	Gly	Ser	Gln	Ala	Leu	Leu	Leu	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asp
20		210					215					220				
	Asn	Leu	Tyr	Gln	Met	Thr	Ser	Gln	Leu	Glu	Cys	Met	Thr	Trp	Asn	Gln
25		225				230					235					240
	Met	Asn	Leu	Gly	Ala	Thr	Leu	Lys	Gly	Val	Ala	Ala	Gly	Ser	Ser	Ser
					245					250					255	
30	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
35			275					280					285			
	His	Thr	His	Gly	Val	Phe	Arg	Gly	Ile	Gln	Asp	Val	Arg	Arg	Val	Pro
		290					295					300				
40	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
45					325					330					335	
	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg	Lys	His	Thr	Gly	Glu	Lys	Pro
				340					345					350		
50	Tyr	Gln	Cys	Asn	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
55			370					375				380				
	Cys	Lys	Thr	Cys	Gln	Arg	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Asp	His	Leu	Lys	Thr
60		385				390					395					400

65

ES 2 341 785 T3

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
405 410 415
5 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
420 425 430
10 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
435 440 445
Leu

15 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 2
25 Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg
1 5

30 <210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 3
40 Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val
1 5

45 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Péptido sintético
<220>

55 <221> características_varias
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es Leu, Met, Val, Ile o Gln
<220>

60 <221> características_varias
<222> (9)..(9)
<223> Xaa es Val o Leu

65

ES 2 341 785 T3

<400> 4
Asp Xaa Asn Ala Leu Leu Pro Ala Xaa
1 5
5
<210> 5
<211> 16
<212> PRT
10 <213> Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
15
<400> 5
Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His
1 5 10 15
20
<210> 6
<211> 21
<212> PRT
25 <213> Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
30
<400> 6
Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg Val Pro Lys Val Ser
1 5 10 15
35 Ala Ser His Leu Glu
20
40 <210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial
45 <220>
<223> Péptido sintético
50
<400> 7
Ala Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Leu
1 5 10 15
55 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
60 <220>
<223> Péptido sintético
65

ES 2 341 785 T3

<400> 8
Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
1 5
5
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
10
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
15
<400> 9
Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln Tyr
1 5
20
<210> 10
<211> 9
<212> PRT
25
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
30
<400> 10
Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
1 5
35
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
40
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
45
<400> 11
Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg
1 5
50
<210> 12
<211> 10
<212> PRT
55
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido sintético
60
<400> 12
Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg
1 5 10
65
<210> 13
<211> 9

ES 2 341 785 T3

<212> PRT
<213> Artificial
<220>
5 <223> Péptido sintético

<400> 13
Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg
10 1 5

<210> 14
<210> 9
15 <211> 16
<212> PRT
<213> Artificial
20 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 14
25 Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu
1 5

<210> 15
30 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
35 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 15
40 Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
1 5

45

50

55

60

65