



INPI
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0208183-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0208183-0

(22) Data do Depósito: 22/03/2002

(43) Data da Publicação do Pedido: 10/10/2002

(51) Classificação Internacional: C07K 14/47; A61K 39/00; A61P 35/00

(30) Prioridade Unionista: JP 2001-83250 de 22/03/2001

(54) Título: PEPTÍDEO ANTÍGENO DE CÂNCER MODIFICADO POR WT1 E VACINAS PARA CÂNCER

(73) Titular: INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC., Sociedade Japonesa. Endereço: 13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka-fu, JAPÃO(JP)

(72) Inventor: HARUO SUGIYAMA

Código de Controle: 51EC3FC33F49800E 2CC70B9D548CE18F

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 28/08/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 28/08/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PEPTÍ-
DEO ANTÍGENO DE CÂNCER MODIFICADO POR WT1 E VACINAS
PARA CÂNCER"**.

Campo Técnico

[001] A presente invenção refere-se a um antígeno de câncer baseado no produto de gene WT1 supressor de tumor de Wilm. Este antígeno de câncer é útil como uma vacina anticâncer contra cânceres do sangue tais como leucemia, síndrome mielodisplástica, mieloma múltiplo e linfoma maligno, cânceres sólidos tais como câncer gástrico, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de célula germinal, câncer de fígado, câncer de pele, câncer de vesícula, câncer de próstata, câncer uterino, carcinoma cervical e câncer de ovário, bem como qualquer câncer que expressa WT1.

Descrição da Técnica Relacionada

[002] O mecanismo imunológico para eliminar objetos estranhos ao corpo geralmente consiste em imunidade humoral, na qual estão envolvidos macrófagos que funcionam como células apresentadoras de antígenos que reconhecem um antígeno, células T auxiliares que ativam outras células T reconhecendo antígenos apresentados por ditos macrófagos e produzindo várias linfocinas, e linfócitos B que diferenciam em célula produtoras de anticorpo devido à ação de ditas linfocinas; e, imunidade celular, pela qual células T assassinas (células T citotóxicas (CTL)), as quais diferenciaram-se como um resultado de serem apresentadas com um antígeno, atacam e destroem células alvos.

[003] Presentemente, imunidade a câncer é pensada principalmente ser o resultado de imunidade celular envolvendo células T assassinas. Em imunidade a câncer afetada por células T assassinas, células T precursoras, as quais reconheceram antígeno de câncer apresentados na forma de um complexo de classe I de complexo de

maior histocompatibilidade (MHC) (antígeno de classe I de MHC, também referido como antígeno de HLA no caso de seres humanos) e antígeno de câncer, se diferenciam e proliferam, e as células T assassinas resultantes que foram formadas atacam e destroem as células de câncer. Nesta hora, as células de câncer apresentam um complexo de antígeno de classe I de MHC e antígeno de câncer em sua superfície celular, e isto é objetivado pelas células T assassinas (Cur. Opin. Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin. Immunol. 5, 719, 1993; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995).

[004] O antígeno de câncer antes mencionado apresentado por antígeno de classe I de MHC nas células de câncer servindo como as células alvo é pensado ser um peptídeo composto de aproximadamente 8-12 aminoácidos formados como um resultado de proteína de antígeno sintetizada dentro de células de câncer sendo processadas por protease intracelular (Cur. Opin. Immunol., 5, 709, 1993; Cur. Opin. Immunol. 5, 719, 1995; Cell, 82, 13, 1995; Immunol. Rev., 146, 167, 1995).

[005] Presentemente, embora pesquisas fossem conduzidas a proteínas de antígenos para vários cânceres, poucos foram verificados serem antígenos específicos a câncer.

[006] O gene WT1 supressor de tumor de tumor de Wilms (gene WT1) foi isolados de cromossomo 11p13 como um dos genes causadores de tumor de Wilms baseado em análise da síndrome de WAGR que ocorre como uma complicação de tumor de Wilms, aniridia, anormalidades urogenitais, retardamento mental e assim por diante (Gessler, M., e outros, Nature, Vol. 343, p.774-778 (1990)). Seu DNA genômico é aproximadamente 50 kb e é composto e 10 éxons, enquanto seu cDNA é aproximadamente 3 kb. A sequência de aminoácido estimada de cDNA é como mostrada em SEQ ID NO: 1 (Mol. Cell. Biol., 11, 1707, 1991).

[007] O gene WT1 é expresso com alta frequência em leucemia humana, e quando células de leucemia são tratadas com oligômero de anti-sentido de WT1, o crescimento das células é inibido (Publicação de Patente Não-Examinada Japonesa Nº 9-104627). Assim, gene WT1 pensado a agir para promover o crescimento de células de leucemia. Além do mais, WT1 é também altamente expresso em cânceres sólidos tais como câncer gástrico, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de célula germinal, câncer de fígado, câncer de pele, câncer de vesícula, câncer de próstata, câncer uterino, carcinoma cervical e câncer de ovário (Pedido Patente Japonesa Nº 9-191635), e o gene WT1 foi demonstrado a ser um novo marcador de tumor em leucemia e cânceres sólidos.

[008] Diversos peptídeos de antígeno específicos a câncer consistindo em uma porção do produto de expressão de gene WT1 são descritos em WO 00/06602, um peptídeo particularmente promissor é designado como D^b, e a sequência de aminoácido seguinte: Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2) (referido como "peptídeo selvagem de WT1" na presente invenção) é descrita a isso.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[009] Assim, um objetivo da presente invenção é fornecer um peptídeo que é promissor como uma vacina para câncer e o qual tem uma atividade maior do que peptídeos de antígeno específicos a câncer previamente conhecidos.

[0010] Como um resultado de forma mais séria conduzir vários estudos para resolverem os problemas acima, os inventores da presente invenção descobriram que um peptídeo (referido como "peptídeo modificado por WT1") tendo uma sequência de aminoácido na qual o segundo aminoácido Met da sequência de aminoácido conhecido antes mencionada (SEQ ID NO: 2) é mudado a Tyr, isto é Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3), tem maior atividade, desse mo-

do levando a término da presente invenção.

[0011] Assim, a presente invenção fornece um peptídeo (peptídeo modificado por WT1) consistindo em 9-30 aminoácidos e compreendendo a sequência de aminoácido seguinte: Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3). Este peptídeo é preferivelmente um polipeptídeo consistindo em 9-12 aminoácidos e compreendendo a sequência de aminoácido indicada em SEQ ID NO: 3 e, mais preferivelmente, um peptídeo consistindo na sequência de aminoácido indicada em SEQ ID NO: 3.

[0012] Além do mais, a presente invenção fornece uma vacina para câncer tendo como seu ingrediente ativo o peptídeo modificado por WT1 antes mencionado.

[0013] Além do mais, a presente invenção também fornece uma vacina de DNA contra câncer tendo como seu ingrediente ativo DNA codificando o peptídeo antes mencionado.

[0014] Além disso, a presente invenção fornece células apresentando antígeno as quais apresentaram um complexo de antígeno de HLA (antígeno de classe I de MHC) e o peptídeo antes mencionado.

[0015] Além do mais, a presente invenção também fornece células T citotóxicas que reconhecem um complexo de antígeno de HLA e o peptídeo antes mencionado.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0016] Fig. 1 é um gráfico mostrando os efeitos assassinos da célula (atividade citolítica específica) em células alvo de C1R2402 (T), ou pulsadas ou não-pulsadas com peptídeo, por células efetadoras (E) estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 (SEQ ID NO: 2) ou o peptídeo modificado por WT1 da presente invenção (SEQ ID NO: 3). No gráfico, os círculos negros indicam o efeito citolítico em células alvo de C1R2404 pulsadas com peptídeo selvagem por células efetadoras estimuladas com peptídeo modificado de WT1, os quadrados negros

indicam o efeito citolítico em células alvo de C1R2404 pulsadas com peptídeo selvagem por células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1, os círculos brancos indicam o efeito citolítico em células alvo de C1R2402 não-pulsadas com peptídeo selvagem por células efetadoras estimuladas com peptídeo modificado por WT1, e os quadrados brancos indicam o efeito citolítico em células alvo de C1R2402 não-pulsadas com peptídeo selvagem por células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1.

[0017] Fig. 2 é um gráfico mostrando a atividade citolítica em células de leucemia aguda endogenamente expressando antígeno de WT1 ou em células de leucemia mielocítica aguda não expressando antígeno de WT1 por células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 ou o peptídeo modificado por WT1 da presente invenção.

[0018] Fig. 3 é um gráfico mostrando os efeitos assassinos da célula (atividade citolítica específica) em células alvo de C1R2402, ou pulsadas ou não-pulsadas com peptídeo, por células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 ou o peptídeo modificado por WT1 da presente invenção. No gráfico, os círculos negros indicam o efeito citolítico em células de C1R2404 pulsadas com peptídeo selvagem por células efetadoras estimuladas com peptídeo modificado de WT1, os quadrados negros indicam o efeito citolítico em células alvo de C1R2402 pulsadas com peptídeo selvagem por células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1, os círculos brancos indicam o efeito citolítico em células alvo de C1R2402 não-pulsadas com peptídeo selvagem por células efetadoras estimuladas com peptídeo modificado por WT1, e os quadrados brancos indicam o efeito citolítico em células alvo de C1R2402 não-pulsadas com peptídeo selvagem por células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1.

[0019] Fig. 4 é um gráfico mostrando a atividade citolítica em li-

nhagens de célula de câncer de pulmão endogenamente expressando WT1 ou não por células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 ou o peptídeo modificado por WT1 da presente invenção.

[0020] Fig. 5 é um gráfico mostrando os efeitos inibidores de anticorpo de classe I de anti-HLA, anticorpo de classe II de anti-HLA e anticorpo de anti-CD8 nos efeitos assassinos de célula (atividade citolítica específica) em células alvo C1R2402 pulsadas com peptídeo selvagem por células efetadoras estimuladas por peptídeo selvagem de WT1 ou o peptídeo modificado por WT1 da presente invenção.

DESCRIÇÃO DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

[0021] O peptídeo da presente invenção é um peptídeo consistindo em 9-30 aminoácidos que compreende a sequência de aminoácido consistindo nos 9 aminoácidos mostrados em SEQ ID NO: 3. Além do mais, do ponto de vista de ser apresentado aglutinando a antígeno de HLA, o peptídeo é preferivelmente um peptídeo consistindo em 9-12 aminoácidos que compreende a sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 3 e, mais preferivelmente, é um peptídeo tendo regras (motivos) na sequência de peptídeo de antígeno apresentada aglutinando a antígeno de HLA naquela hora (J. Immunol., 152, p. 3913, 1994; Immunogenetics, 41, p. 178, 1995; J. Immunol., 155, p. 4307, 1994; J. Immunol., 155, p. 4749, 1995). Além do mais, o peptídeo é mais preferivelmente um peptídeo consistindo em uma sequência de aminoácido dos 9 aminoácidos mostrados em SEQ ID NO: 3.

[0022] Além do mais, o "peptídeo compreendendo a sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 3" antes mencionado é especificamente, por exemplo, um peptídeo compreendendo a sequência de aminoácido mostrada em SEQ ID NO: 3 e estendendo na direção da terminação N e/ou a direção da terminação C da posição aplicável em WT1 (SEQ ID NO: 1) (nos. de posição 235-243) ou da posição correspondente em WT1 humano (Nº de Acesso de Base de Dados NCBI

XP012009), que tem atividade como um peptídeo de antígeno de câncer.

[0023] Um exemplo de um método para medir a atividade do peptídeo de antígeno de câncer da presente invenção é o método descrito em J. Immunol., 154, p. 2257, 1995. O seguinte fornece uma explicação de um esboço deste método usando o caso do tipo de HLA sendo HLA-A24 como um exemplo. Primeiro, linfócitos sanguíneos periféricos são isolados a partir de uma pessoa positiva a antígeno de HLA-A24. A seguir, estimulando os linfócitos sanguíneos periféricos adicionando o peptídeo da presente invenção *in vitro*, CTL (células T citotóxicas) são induzidas onde especificamente reconhecem o complexo do peptídeo da presente invenção e HLA-A24 apresentado pelas células apresentadoras de antígeno.

[0024] Esta indução de CTL pode ser investigada por, por exemplo, medindo as quantidades de várias citocinas (por exemplo, IFN- γ) produzidas pelas CTL reagindo com o complexo de peptídeo de antígeno e HLA-A24. Além disso, indução de CTL pode também ser investigada por um método no qual a citotoxicidade das CTL é medida com respeito a células apresentadoras de peptídeo de antígeno rotuladas com ^{51}Cr ou Európio (^{51}Cr Release Assay, Int. J. Câncer, 58, p. 317, 1994; Europium Release Assay, J. Immunol., 154, p. 3991, 1995). Além do mais, indução de CTL pode também ser investigada referindo-se aos exemplos descritos posteriormente.

[0025] A presente invenção também refere-se a uma vacina para câncer que tem o antígeno antes mencionado como seu ingrediente ativo. Esta vacina pode ser usada para a prevenção ou tratamento de cânceres do sangue tais como leucemia, síndrome mielodisplástica, mieloma múltiplo e linfoma maligno, bem como cânceres sólidos tais como câncer gástrico, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de célula germinal, câncer de fígado, câncer de pele,

câncer de bexiga, câncer de próstata, câncer de uterino, carcinoma cervical e câncer de ovário. Em particular, esta vacina pode ser aplicada a pacientes positivos para HLA-A24. Esta vacina pode ser administrada oralmente ou parenteralmente por exemplo, por administração intraperitoneal, subcutânea, intracutânea, intramuscular, intravenosa ou intranasal.

[0026] Além do mais, administração da vacina da presente invenção pode também ser realizada por um método no qual monócitos são coletados do sangue periférico de um paciente, células dendríticas são extraídas dos monócitos, as células dendríticas são pulsadas com o peptídeo da presente invenção e então retornadas ao paciente por administração subcutânea e assim por diante.

[0027] Este método é referido como citoterapia ou terapia de célula dendrítica (DC), e a seção intitulada "Células Apresentadoras de Antígenos" descrita posteriormente deveria ser referida a maiores detalhes.

[0028] A vacina, além do peptídeo administrado como o ingrediente ativo antes mencionado, pode também conter veículos farmacêuticamente permitidos tais como um adjuvante adequado (Clin-Microbiol. Rev., 7, 277-289, 1994), exemplos dos quais incluem um gel mineral como hidróxido de alumínio, um tensoativo tipo lecitina de fósforo e um poliol plurônico, um poliânion, um peptídeo e uma emulsão oleosa. Alternativamente, a vacina pode conter outros agregados misturados em lipossomas ou combinados em polissacarídeo ou na vacina. A dosagem é tipicamente 0,1 µg/kg a 1 mg/kg por dia.

[0029] Na presente invenção, DNA que codifica a vacina de polipeptídeo antes mencionada pode também ser usado como uma vacina (vacina de DNA). Isto é, após inserir ácidos nucleicos, e preferivelmente DNA, que contém ácidos nucleicos que codificam o peptídeo modificado por WT1 da presente invenção em um vetor adequado, e preferi-

velmente um vetor de expressão, imunidade a câncer pode ser conferida administrando o vetor a um animal. WO 00/6602 ou J. Immunol., 160, p. 1717, 1998 e assim por diante deveria ser referido pela técnica específica usada para esta vacina de DNA.

[0030] Além disso, a presente invenção refere-se a células apresentadoras de antígeno nas quais um complexo de antígeno de HLA e o peptídeo antes mencionado é apresentado. Neste exemplo, embora atividade de morte de célula potente é observada devido à estimulação com o peptídeo da presente invenção, este é um resultado da presença de células apresentadoras de antígeno, nas quais um complexo do peptídeo da presente invenção e antígeno de HLA (antígeno de HLA-A24) é apresentado, dentro de monócitos sanguíneos periféricos, e da indução de CTL (células T citotóxicas) que especificamente reconhecem estas células apresentadoras de antígenos. Estas células apresentadoras de antígenos, nas quais um complexo de antígeno de HLA e o peptídeo da presente invenção é apresentado, são usadas eficazmente em citoterapia (terapia de DC) como descrita abaixo.

[0031] As células apresentadoras de antígenos usadas em citoterapia são produzidas isolando células tendo a capacidade para apresentar antígeno a partir de pacientes de tumor, pulsando estas células com peptídeo da presente invenção fora do corpo, e provocando um complexo de antígeno de HLA e o peptídeo da presente invenção a ser apresentada na superfície das células. Aqui, embora não exista nenhuma restrição particular nas "células tendo a capacidade para apresentar antígeno" fornecidas, elas são células que expressam antígeno de HLA capaz de apresentar o peptídeo da presente invenção na superfície das células, células dendríticas são preferíveis já que elas são consideradas a terem alta capacidade apresentadora de antígeno.

[0032] Além disso, o peptídeo da presente invenção que é usado para pulsar as células antes mencionadas tendo a capacidade para

apresentar antígeno pode não estar somente na forma de um peptídeo, mas de preferência pode também estar na forma de DNA ou RNA que codifica dito peptídeo.

[0033] Um método específico para preparar as células apresentadoras de antígenos da presente invenção pode ser referido a isso, por exemplo, Cancer Immunol. Immunother., 46, 82, 1998, J. Immunol., 158, p. 1796, 1997 e Cancer Res., 59, p. 1184, 1999. No caso de usar células dendríticas, linfócitos são isolados a partir do sangue periférico de uns pacientes de tumores usando o método de Fycoll, e após subsequentemente remover as células não aderidas, células dendríticas são derivadas das células aderidas cultivando na presença de GM-CSF e IL-4, após a qual as células apresentadoras de antígenos da presente invenção podem ser preparadas pulsando as células dendríticas cultivando com o peptídeo da presente invenção.

[0034] Além disso, o caso de preparar as células apresentadoras de antígenos da presente invenção inserindo DNA ou RNA codificando o peptídeo da presente invenção nas células antes mencionadas tendo a capacidade para apresentar antígeno, inserção pode ser realizada referindo, por exemplo, Cancer Res., 56, p. 5672, 1996 ou J. Immunol., 161, p. 5607, 1998 no caso de DNA, ou referindo a J. Exp. Med., 184, p. 465, 1996 no caso de RNA.

[0035] Estas células apresentadoras de antígenos podem ser usadas como o ingrediente ativo de um agente terapêutico de tumor. Em qual tempo, a fim de manter a estabilidade das células apresentadoras de antígenos, o agente de tratamento preferivelmente compreende solução salina fisiológica, solução salina tamponada por fosfato (PBS) ou meio e assim por diante. Exemplos de métodos de administração incluem administração intravenosa, administração subcutânea e administração intracutânea. Além do mais, a presente invenção também refere-se a células T citotóxicas (CTL) que reconhecem um complexo

de antígeno de HLA e o peptídeo antes mencionado. As CTL da presente invenção podem ser eficazmente usadas na imunoterapia adotiva descrita abaixo.

[0036] Isto é, no caso de mieloma, imunoterapia adotiva foi reconhecida a ser terapeuticamente eficaz cultivando um grande número das células T do paciente que invadiram o tumor *in vitro*, e então retornando-as ao paciente, (J. Natl. Cancer Inst., 86, 1159, 1994). Além disso, no caso de melanoma de camundongo, inibição de metástase foi observada estimulando células do baço *in vitro* com peptídeo de antígeno de tumor TRP-2, permitindo CTL específicas a proliferarem no peptídeo do antígeno de tumor, e então administrando ditas CTL a camundongos transplantados com melanoma (J. Exp. Med., 185, 453, 1997). Isto é baseado no resultado de permitir CTL proliferarem *in vitro* onde especificamente reconhecem um complexo do antígeno de HLA de células apresentadoras de antígenos e peptídeo antígeno de tumor. Assim, um método de tratamento no qual linfócitos sanguíneos periféricos do paciente são estimulados *in vitro* usando o peptídeo da presente invenção a aumentarem CTL específicas a tumor seguido por retornando estas células ao paciente é pensado ser útil.

[0037] Neste método, as CTL da presente invenção podem ser usadas como o ingrediente ativo de um agente terapêutico de tumor. Naquele momento, a fim de manter a estabilidade do CTL, o agente terapêutico preferivelmente compreende solução salina fisiológica, solução salina tamponada por fosfato (PBS) ou meio e assim por diante. Exemplos de métodos de administração incluem administração intravenosa, administração subcutânea e administração intracutânea.

[0038] Os exemplos seguintes servem para esclarecer a utilidade do peptídeo da presente invenção como um antígeno de câncer e vacina para câncer.

Exemplo 1

[0039] Células mononucleares sanguíneas periféricas foram isoladas a partir de doadores positivos a HLA-A*2402 e distribuídas entre as cavidades de uma placa de 24 cavidades em 2×10^6 células/cavidade seguido pela adição de peptídeo selvagem de WT1 ou peptídeo modificado por WT1 a uma concentração de $20 \mu\text{M}$ e cultivando por 1 semana. O meio usado nesta hora consistiu de 45% de RPMI, 45% de AIV, 10% de FCS 1x aminoácidos não-essenciais e SM/PCG. Seguindo o cultivo antes mencionado, as células foram ajustadas a 2×10^6 células/cavidade e usadas como células respondedoras.

[0040] Por outro lado, outras células mononucleares sanguíneas periféricas foram similarmente isoladas a partir dos mesmos doadores positivos a HLA-A*2402 e então pulsadas por peptídeo cultivando por 4 dias com um dos peptídeo antes mencionado a $20 \mu\text{M}$. Após então irradiar a 30 Gy, as células foram ajustadas a 4×10^6 células/cavidade e usadas como células estimuladoras.

[0041] As células respondedoras e células estimuladoras preparadas no modo descrito acima foram então misturadas e então cultivadas por 1 semana permitindo a adição de IL-2 a 50 U/ml. Como um resultado, o estado das células resultantes foi como mostrado na tabela seguinte.

Tabela 1

Peptídeo	Nº de células	CD4	CD8
Peptídeo selvagem de WT1	$2,4 \times 10^6/\text{cavidade}$	5%	35%
Peptídeo modificado por WT1	$3,0 \times 10^6/\text{cavidade}$	18%	38%

[0042] A seguir, um ensaio de morte foi realizado de acordo com método de liberação de ^{51}Cr (J. Immunol., 164, 1873, 2000). Células de C1R2402 e células de C1R2402 pulsadas com os peptídeos antes mencionados foram usadas para as células alvos. Células estimuladas

por peptídeo selvagem de WT1 ou peptídeo modificado por WT1 como previamente descritas (células efetadoras (E)) foram então permitidas a atuarem em cada uma destas células alvo (T) em uma razão E:T de 1, 5 de 20, seguido por medição de quebra celular. Aqueles resultados são mostrados em figura 1. Como é claro a partir deste gráfico, células estimuladas com peptídeo modificado por WT1 exibiram uma atividade de morte celular mais potente do que células estimuladas com peptídeo selvagem de WT1.

Exemplo 2

[0043] A atividade de morte celular de células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 ou peptídeo modificado por WT1 em células de leucemia que endogenamente expressam antígeno de WT1 foi testada de acordo com o método de liberação de ^{51}Cr . Células de WT1+/A*2402+ (células de leucemia de paciente AML N° 1), células de WT1-/A*2402+ (células de leucemia de paciente AML N° 2), células de WT1+/A*2402- (células de leucemia de paciente AML N° 3) e células de WT1-/A*2402- (células de leucemia de paciente AML N° 4) foram usadas para as células alvo.

[0044] As células efetadoras (E) preparadas em Exemplo 1 e as células alvo antes mencionadas (T) foram misturadas em uma razão de E:T de 20:1 e cultivadas por 4 horas seguido por medição do grau de quebra celular. Aqueles resultados são mostrados em figura 2.

[0045] Conforme é claro a partir deste gráfico, embora ambas as células estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 ou peptídeo modificado por WT1 demonstraram atividade citotóxica nas células de WT1+/A*2402+ o nível daquela atividade foi maior para o peptídeo modificado por WT1.

Exemplo 3

[0046] O mesmo experimento como Exemplo 1 foi realizado usando células efetadoras preparadas a partir de células mononucleares

sanguíneas periféricas de diferentes doadores saudáveis positivos a HLA-A*2402. Aqueles resultados são mostrados em figura 3.

[0047] Como é claro a partir deste gráfico, similar a Exemplo 1, células estimuladas com peptídeo modificado por WT1 exibiram uma atividade citotóxica mais potente do que células estimuladas com peptídeo selvagem de WT1.

Exemplo 4

[0048] A atividade citotóxica de células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 ou peptídeo modificado por WT1 foi testada em uma linhagem de célula de câncer associada com câncer de pulmão que endogenamente expressa antígeno de WT1 (células alvo) usando o método de liberação de ^{51}Cr . Células de RERF-LCAI (WT1+/A*2402+), LC1sq (WT1+/A*2402+), 11-18 (WT1-/A*2402+) e LK87 WT1+/A*2402-) foram usadas para as células alvo.

[0049] Células efetadoras (E) preparadas do mesmo modo como Exemplo 1 e as células alvo antes mencionadas (T) rotuladas com ^{51}Cr foram cultivadas por 4 horas em uma razão de E:T de 20:1 do mesmo modo como Exemplo 2 seguido por medição do grau de quebra celular. Aqueles resultados são mostrados em figura 4.

[0050] Como é claro a partir deste gráfico, embora ambas as células estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 ou peptídeo modificado por WT1 demonstraram atividade citotóxica somente nas células de WT1+/A*2402+, o nível daquela atividade foi maior para o peptídeo modificado por WT1.

Exemplo 5

[0051] Células efetadoras estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 ou peptídeo modificado por WT1 foram confirmadas a serem células assassinas positivas a CD-8 que aglutinam a classe I de HLA por um ensaio de bloqueio usando anticorpo. Os anticorpos usados consistiram em anticorpo de classe I de anti-HLA, anticorpo de classe

II de anti-HLA e anticorpo anti-CD8. Células efetadoras (E) preparadas do mesmo modo como Exemplo 1 e células alvo (T) na forma de células de C1R2402 ou células de C1R2402 pulsadas com peptídeo selvagem de WT1, ambas rotuladas com ^{51}Cr , foram misturadas com anticorpo em uma razão de E:T de 20:1 e então cultivadas por 4 horas seguido por medição do grau de quebra celular de acordo com o método de liberação de ^{51}Cr . Aqueles resultados são mostrados em figura 5.

[0052] Como é claro a partir deste gráfico, atividade citotóxica foi bloqueada por anticorpo de classe I de anti-HLA e anticorpo anti-CD8 para ambas as células estimuladas com peptídeo selvagem de WT1 ou peptídeo modificado por WT1, indicando que as células que exibiram atividade citotóxica são células assassinas positivas a CD-8 que aglutinam a classe I de HLA.

Exemplo 6

[0053] A afinidade de aglutinação de peptídeo modificado por WT1 e peptídeo selvagem de WT1 a HLA-A*2402 foi investigado. Após tratar células de C1RA2404 por 1 minuto com uma solução tampão (131 mM de ácido cítrico, 66 mM de fosfato de sódio, 290 m de osmol, pH 3,3), as células foram neutralizadas adicionando meio de DMEM compreendendo albumina de soro bovino 0,5%. Após lavar as células com o meio, elas foram suspensas em uma concentração de 2×10^6 células/ml em meio de DMEM contendo 200 nM β 2-microglobulina (Sigma) e albumina de soro bovino 0,5%. 15 μl da suspensão celular foram misturadas com 50 μl do meio compreendendo várias concentrações de peptídeo de WT1 seguido incubando por 4 horas à temperatura ambiente. Após lavar as células, elas foram manchadas com anticorpo monoclonal a HLA-A24 rotulado com FITC (nome do clone: 7A12), e a quantidade de HLA-A24 expressa foi analisada com um sistema de FACS de citômetro de fluxo. Um procedimento similar foi executado no

peptídeo de antígeno de melanoma pmel 15, o qual foi descrito a aglutinar a HLA-A*2402 (Ala Tyr Gly Leu Asp Phe Tyr Ile Leu) (SEQ ID NO: 4) (J. Immunol., 154, 5994, 1995), e usando isto como um padrão, as constantes de dissociação (kd) dos peptídeos de WT1 foram calculados de acordo com o método descrito na literatura (Immunogenetics, 51, 816, 2000). Estes resultados são mostrados em Tabela 2.

Tabela 2

Peptídeo	Constante de Dissociação Kd (M)
Peptídeo selvagem de WT1	$1,82 \times 10^{-5}$
Peptídeo modificado por WT1	$6,40 \times 10^{-7}$

[0054] Conforme está claro a partir desta tabela, peptídeo modificado por WT1 demonstrou afinidade de aglutinação mais forte para HLA-A*2402 do que o peptídeo selvagem de WT1.

[0055] Na base dos resultados antes mencionados, o peptídeo da presente invenção provou inquestionavelmente funcionar como um antígeno de câncer, e provocar a indução e proliferação de células T assassinas (células T citotóxicas de célula de câncer) contra células de câncer. Assim, o peptídeo de antígeno de câncer da presente invenção é útil como uma vacina a câncer contra leucemia e cânceres sólidos acompanhando uma expressão crescente do gene WT1.

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo antígeno de câncer, caracterizado pelo fato de que consiste em 9-30 aminoácidos e compreende a seguinte sequência de aminoácidos: Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3).

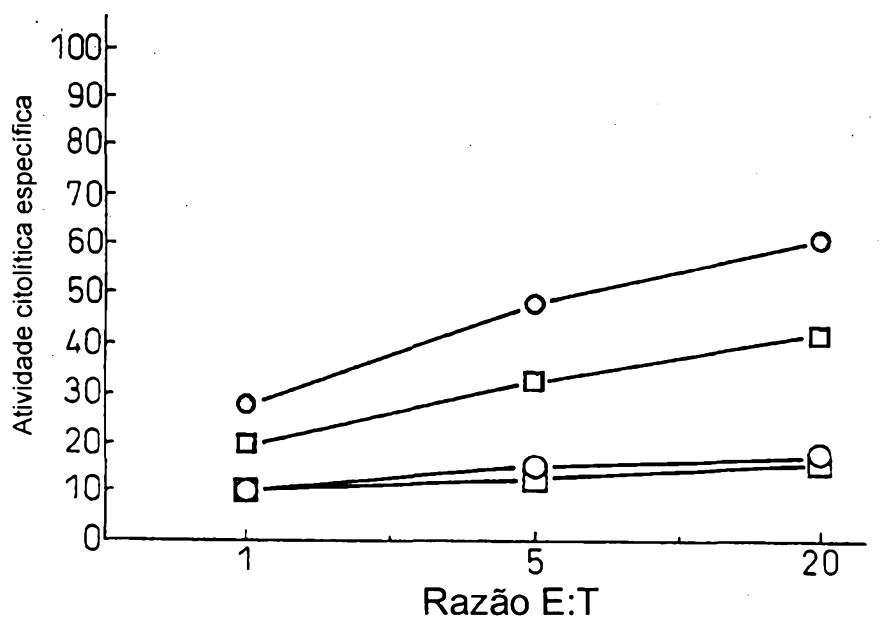
2. Peptídeo de antígeno de câncer de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que consiste em 9-12 aminoácidos e compreende a sequência de aminoácido indicada em SEQ ID NO: 3.

3. Peptídeo de antígeno de câncer de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que consiste na seguinte sequência de aminoácidos: Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3).

4. Vacina para câncer, caracterizada pelo fato de que tem como seu ingrediente ativo um peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Vacina de DNA contra câncer, caracterizada pelo fato de que tem como seu ingrediente ativo DNA que codifica um peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

Fig.1



- { Células efetuadas estimuladas com células alvo de C1R2402 de peptídeo modificado por Wt1 pulsadas com peptídeo selvagem
- { Células efetuadas estimuladas com células alvo de C1R2402 de peptídeo selvagem de Wt1 pulsadas com peptídeo selvagem
- { Células efetuadas estimuladas com células alvo de C1R2402 de peptídeo modificado por Wt1 não pulsadas com peptídeo
- { Células efetuadas estimuladas com células alvo de C1R2402 de peptídeo selvagem de Wt1 não pulsadas com peptídeo

Fig.2

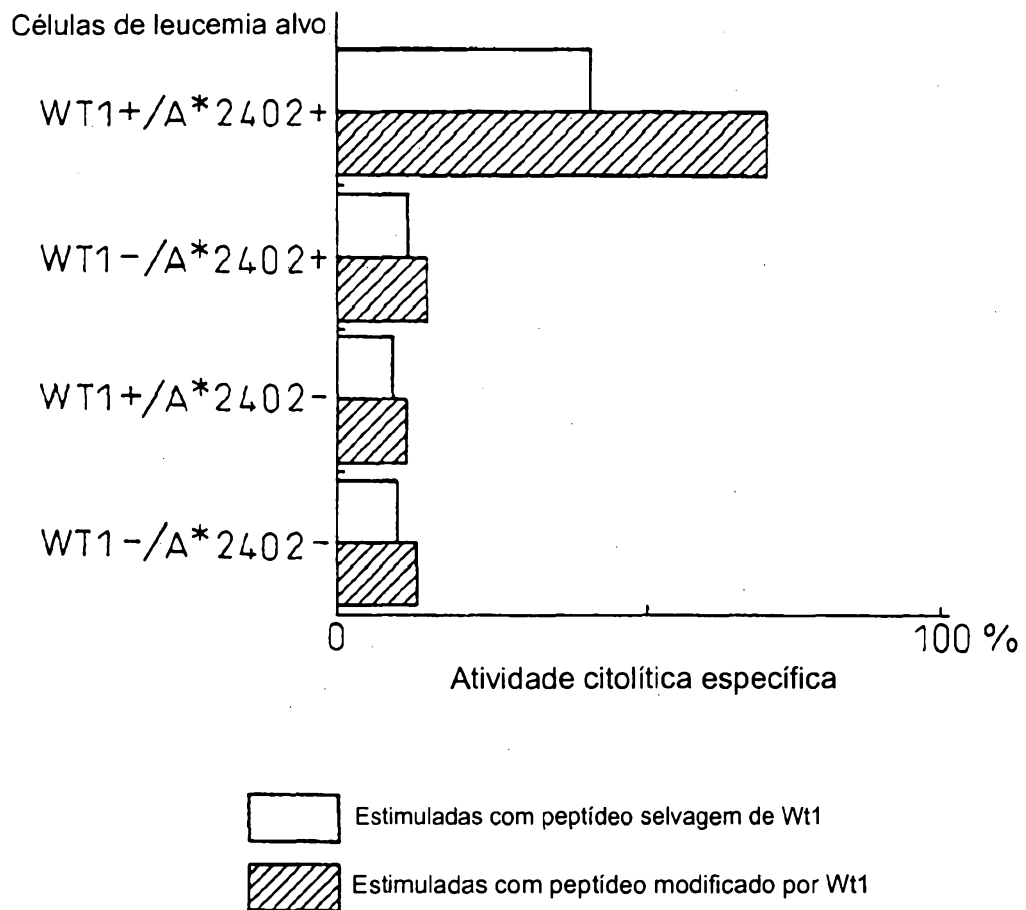
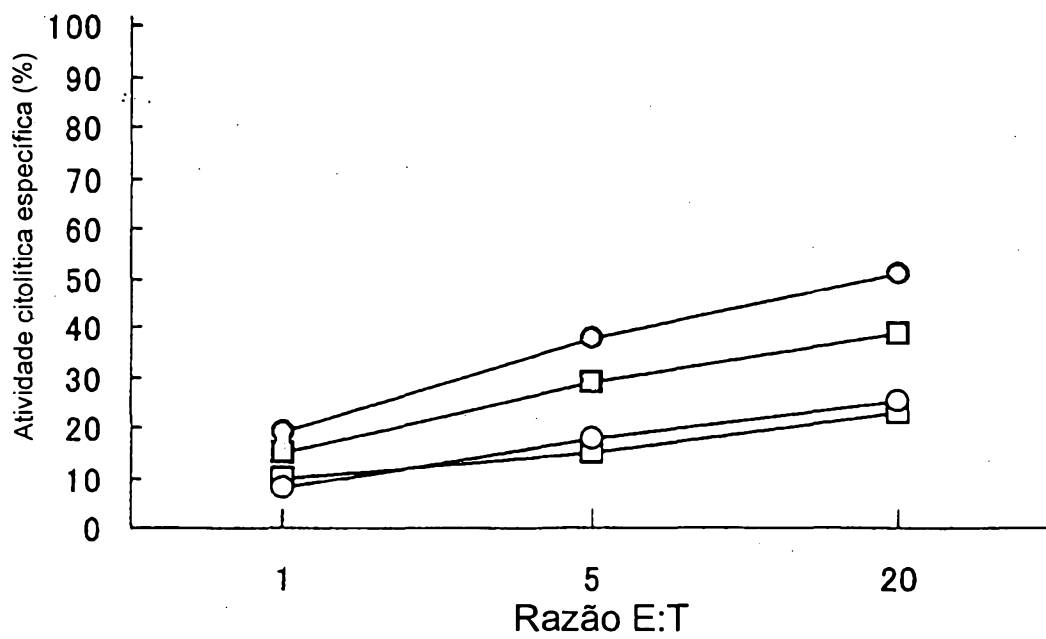


Fig.3



- — [Células efetuadas estimuladas com células alvo de C1R2402 de peptídeo modificado por Wt1 pulsadas com peptídeo selvagem
- — [Células efetuadas estimuladas com células alvo de C1R2402 de peptídeo selvagem de Wt1 pulsadas com peptídeo selvagem
- — [Células efetuadas estimuladas com células alvo de C1R2402 de peptídeo modificado por Wt1 não pulsadas com peptídeo
- — [Células efetuadas estimuladas com células alvo de C1R2402 de peptídeo selvagem de Wt1 não pulsadas com peptídeo

Fig.4

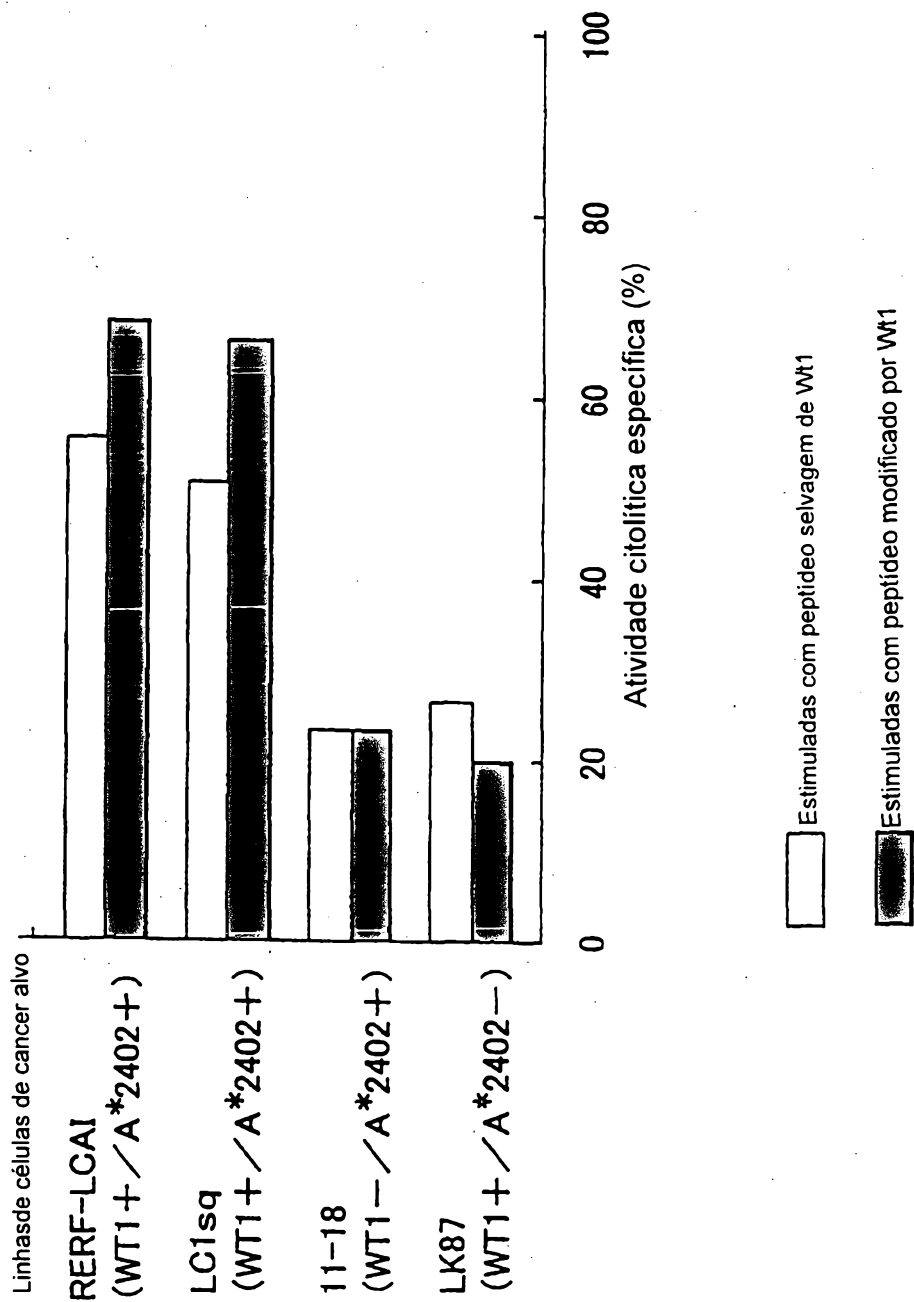


Fig.5

