



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118962** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

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

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 07132**
(22) Дата подання заявки: **16.12.2013**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.04.2019**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **2012-274494**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **17.12.2012**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **JP**
(41) Публікація відомостей про заявку: **10.09.2015, Бюл.№ 17**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.04.2019, Бюл.№ 7**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/JP2013/083580, 16.12.2013**
(72) Винахідник(и):
Кубо Хіросі (JP),
Сого Сіндзі (JP),
Сугіяма Харуо (JP)
(73) Власник(и):
ОЦУКА ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.,
9, Kanda-Tsukasa-machi 2-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo 1018535, Japan (JP),
ІНТЕРНЕТІВНІ ІНСТІТУТ ОФ КЕНСЕР
ІММУНОЛОДЖИ, ІНК.,
13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka 564-0053,
Japan (JP)
(74) Представник:
Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.
№115

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 2010247556 A1, 30.09.2010
EP 2626418 A1, 14.08.2013
WO 2012046730 A1, 12.04.2012
WO 2010123065 A1, 28.10.2010
WO 2008105462 A1, 04.09.2008
WO 2005045027 A1, 19.05.2005
WO 2008081701 A1, 10.07.2008
WO 2007097358 A1, 30.08.2007
WO 2005095598 A1, 13.10.2005
WO 03106682 A1, 24.12.2003
FUJIKI F. et al. A WT1 protein-derived, naturally processed 16-mer peptide, WT1(332), is a promiscuous helper peptide for induction of WT1-specific Th1-type CD4(+) T cells. Microbiology and immunology, Center for academic publications Japan, JP, 2008, Vol. 52, no. 12, P. 591 – 600
HARUO SUGIYAMA WT1 peptide gan Men'eki Ryoho", Biotherapy, 2007, Vol. 21, no. 5, P. 299 – 306
FUMIHIRO FUJIKI et al. WT1 tokuiteki CD 4+ helper T saibo o HLA-classII kosokusei ni Yudo Dekiru WT1 Peptide no Dotei to sono Yuyosei no Kento. Proceedings of the japanese society for immunology, 2005, vol. 35, P. 187
FUMIHIRO FUJIKI et al. WT1 Tokuiteki CD 4 Helper T Saibo o Yudo Dekiru HLAclassII Kosokusei WT1 Peptide no Dotei. Proceedir of the japanese society for immunology, 2004, Vol. 34, P. 210
HARUO SUGIYAMA WT1-targeting cancer vaccine. Japanese journal of clinical medicine, 2012, Vol. 70, no. 12, P. 2105 – 2113

UA 118962 C2

- (56) OKA Y. et al. Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene (WT1) product. *Immunogenetics*, 2000, Vol. 51, no. 2, P 99 – 107
- ATSUSHI IRIE et al. HLA-DR4 Kosokusei CD 4+Tt Saibo ni Kogen Teiji Kino o Yusuru HLA-DR4 transgenic mouse no Juritsu. Japanese society for histocompatibility and immunogenetics, 2012, Vol. 19, no. 2, P. 94
- HAN F. et al. HLA-DQ association and allel-competition in Chinese narcolepsy. *Tissue antigens*, 2012, Vol. 80, no. 4, P. 328 – 335
- MEGIORNI F. et al. LA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of biomedical science*, 2012, Vol. 19, no. 1, P. 88
- YANG K.L. et al. An HLA-A*02:01-B*13:01-DRB1*14:01:03 haplotype conserved in Taiwan ese and a possible close relationship between DRB1* 14:01:03 and DRB1*14:54. *International journal of immunogenetics*, 2010, Vol. 38, no. 1, P. 69 – 71
- HOUSE K.D. et al. 23-OR:The search for a missing HLA-DRB1*09 allele. *Human immunology*, 2012, Vol. 73, P. 20
- BARDI M.S. et al. HLA-A, B and DRB1 allele and haplotype frequencies in volunteer bone marrow donors from the north of Parana State. *Rev. bras. hematol. Hemoter.*, 2012, Vol. 34, no. 1, P. 25 – 30
- GAO F.G. et al. Antigen-specific CD 4+ T- Cell help Is required to activate a memory CD 8+ T Cell to a Fully functional tumor killer cell. *Cancer research*, 2002, Vol. 62, no. 22, P. 6438 - 6441

(54) СПОСІБ АКТИВАЦІЇ ХЕЛПЕРНОЇ Т-КЛІТИНИ

(57) Реферат:

Винахід належить до способу активації хелперних Т-клітин, який включає стадію активації хелперних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антигенпрезентуючих клітин, де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01.

Галузь техніки

[0001]

Даний винахід стосується способу активації Т-клітин, який включає стадію активації хелперних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, їх композиції, способу активації цитотоксичних Т-клітин, індуктора активації цитотоксичних Т-клітин (CTL), фармацевтичної композиції для лікування і/або запобігання злоякісному новоутворенню шляхом активації хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин, і так далі. Дана заявка заявляє пріоритет відносно японської патентної заявки № 2012-274494 від 17 грудня 2012 року, повний зміст якої включений в даний документ посиланням.

Рівень техніки

[0002]

Ген WT1 (ген 1 пухлини Вільмса) ідентифікували як ген, що викликає пухлину Вільмса, яка являє собою злоякісне новоутворення нирок у дітей, і цей ген кодує транскрипційний чинник, що містить структуру цинкового пальця (непатентні документи 1 і 2, включені в даний документ посиланням). Подальші дослідження продемонстрували, що вищеописаний ген служить як пухлинний ген в пухлинах гематопоетичних органів або в солідних пухлинах (непатентні документи 3-6, включені в даний документ посиланням).

[0003]

Було продемонстровано, що цитотоксичні Т-клітини (CTL), специфічні до пептиду, індукуються шляхом стимулювання мононуклеарів периферичної крові *in vitro* з використанням пептиду, що містить частину амінокислотної послідовності, що кодує білок WT1, і ці CTL ушкоджують пухлинні клітини пухлин гематопоетичних органів або солідних пухлин, які експресують WT1 ендогенно. CTL розпізнають вищеописаний пептид у формі комплексу, пов'язаного з молекулою МНС класу I, і таким чином, пептид відрізняється залежно від підтипів МНС класу I (патентні документи 1-4 і непатентний документ 7, включені в даний документ посиланням).

[0004]

З іншого боку, присутність хелперних Т-клітин, специфічних до пухлинного антигену, є важливою для ефективного індуктування CTL (непатентний документ 8, включений в даний документ посиланням). Хелперні Т-клітини індукуються і активуються шляхом розпізнавання комплексу молекули МНС класу II з антигенним пептидом на антиген-презентуючих клітинах. Активовані хелперні Т-клітини допомагають проліферації, диференціюванню і дозріванню В-клітин шляхом продукування цитокінів, таких, як IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, або інтерферонів. Оскільки такі хелперні Т-клітини мають функцію активації імунної системи шляхом стимулювання проліферації і активації В-клітин і Т-клітин, передбачається, що корисне посилення функції хелперних Т-клітин за допомогою антигенного пептиду, що зв'язує молекули МНС класу II, в протипухлинній імунотерапії для посилення ефектів протипухлинної вакцини (непатентний документ 9, включений в даний документ посиланням).

[0005]

Нещодавно було продемонстровано, що випадковий хелперний пептид, який може зв'язуватися з множиною молекул МНС класу II і активувати хелперні Т-клітини, присутній серед конкретних пептидів, що містять частину амінокислотної послідовності, що кодує білок WT1 (далі також позначаються в даному описі як пептиди WT1) (патентні документи 5 і 6, включені в даний документ посиланням). Однак дуже важко підтвердити, здійснюють чи ні пептиди WT1 ефекти відносно інших молекул МНС класу II через множину типів молекул МНС класу II.

Документи попереднього рівня техніки

Патентні документи

Патентний документ 1: міжнародна публікація № WO 2003/106682.

Патентний документ 2: міжнародна публікація № WO 2005/095598.

Патентний документ 3: міжнародна публікація № WO 2007/097358.

Патентний документ 4: міжнародна публікація № PCT/JP2007/074146.

Патентний документ 5: міжнародна публікація № WO 2005/045027.

Патентний документ 6: міжнародна публікація № WO 2008/105462.

Непатентні документи

[0007]

Непатентний документ 1: Daniel A. Haber et al., Cell. 1990 Jun 29; 61 (7): 1257-69.

Непатентний документ 2: Call KM et al., Cell. 1990 Feb 9; 60 (3): 509-20.

Непатентний документ 3: Menke AL et al., Int Rev Cytol. 1998; 181: 151-212. Review.

Непатентний документ 4: Yamagami T et al., Blood. 1996 Apr 1; 87 (7): 2878-84.

Непатентний документ 5: Inoue DO et al., Blood. 1998 Apr 15; 91 (8): 2969-76.

Непатентний документ 6: Tsuboi A et al., Leuk Res. 1999 May; 23 (5): 499-505.

5 Непатентний документ 7: Oka Y et al., Immunogenetics. 2000 Feb; 51 (2): 99-107.

Непатентний документ 8: Gao FG et al., Cancer Res. 2002 Nov 15; 62 (22): 6438-41

Непатентний документ 9: Zeng G, J Immunother. 2001 May; 24(3): 195-204.

Суть винаходу

Проблеми, що вирішуються винаходом

10 [0008]

Відповідно, задачею, яку вирішують за допомогою даного винаходу, є пропозиція способу активації хелперних Т-клітин, способу активації цитотоксичних Т-клітин шляхом застосування конкретного пептиду WT1 до широкого спектра суб'єктів, позитивних по молекулі МНС класу II, пропозиція індуктора активації цитотоксичних Т-клітин, пропозиція фармацевтичної композиції для лікування/запобігання злоякісного новоутворення і так далі.

15

Засоби вирішення проблем

[0009]

За таких обставин автори даного винаходу проводили інтенсивні дослідження і виявили, що пептид, який містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His, зв'язується з молекулою HLA-DRB1*08:02, молекулою HLA-DRB1*13:02, молекулою HLA-DRB1*14:03, молекулою HLA-DRB1*14:05, молекулою HLA-DQB1*03:02 і молекулою HLA-DQB1*Q4:01 і активує хелперні Т-клітини і/або цитотоксичні Т-клітини. Таким чином, даний винахід був завершений.

20

[0010]

25

У даному винаході пропонується:

(1) спосіб активації хелперних Т-клітин, який включає стадію активації хелперних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

30

(2) спосіб за пунктом (1), де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з щонайменше двома молекулами МНС класу II, вибраними з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

35

(3) спосіб за пунктом (1) або (2), де пептид WT1 додатково має здатність зв'язуватися з молекулами МНС класу II, вибраними з молекули HLA-DRB1*01:01, молекули HLA-DRB1*04:01, молекули HLA-DRB1*04:03, молекули HLA-DRB1*04:05, молекули HLA-DRB1*04:06, молекули HLA-DRB1*08:03, молекули HLA-DRB1*09:01, молекули HLA-5 DRB1*11:01, молекули HLA-DRB1*15:01, молекули HLA-DRB1*15:02, молекули HLA-DRB3*02:02, молекули HLA-DRB4*01:01, молекули HLA-DPB1*02:01, молекули HLA-DPB1*03:01, молекули HLA-DPB1*05:01 і молекули HLA-DPB1*09:01;

40

(4) спосіб за будь-яким із пунктів (1)-(3), де додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин проводять шляхом додавання пептиду WT1, полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, або клітин, що містять експресуючий вектор;

45

(5) спосіб за будь-яким із пунктів (1)-(4), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2), її варіант або модифікацію;

(6) композиція, що містить пептид WT1, для активації хелперних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

50

(7) композиція за пунктом (6), де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з щонайменше двома молекулами МНС класу II, вибраними з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

55

(8) композиція за пунктом (6) або (7), де пептид WT1 додатково має здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*01:01, молекули HLA-DRB1*04:01, молекули HLA-DRB1*04:03, молекули HLA-DRB1*04:05, молекули HLA-DRB1*04:06, молекули

60

HLA-DRB1*08:03, молекули HLA-DRB1*09:01, молекули HLA-5 DRB1*11:01, молекули HLA-DRB1*15:01, молекули HLA-DRB1*15:02, молекули HLA-DRB3*02:02, молекули HLA-DRB4*01:01, молекули HLA-DPB1*02:01, молекули HLA-DPB1*03:01, молекули HLA-DPB1*05:01 і молекули HLA-DPB1*09:01;

5 (9) композиція за будь-яким із пунктів (6)-(8), де додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин проводять шляхом додавання пептиду WT1, полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, або клітин, що містять експресуючий вектор;

10 (10) композиція за будь-яким із пунктів (6)-(9), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2), її варіант або модифікацію;

(11) антиген-презентуючі клітини, які презентують комплекс антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою MHC класу II, де молекула MHC класу II являє собою молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

20 (12) хелперні Т-клітини, які розпізнають комплекс антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою MHC класу II, де молекула MHC класу II являє собою молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(13) цитотоксичні Т-клітини, які активуються хелперними Т-клітинами за пунктом (11);

25 (14) фармацевтична композиція для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню, що включає як активний інгредієнт будь-яку з композицій за будь-яким із пунктів (6)-(10), антиген-презентуючі клітини за пунктом (11), хелперні Т-клітини за пунктом (12), або цитотоксичні Т-клітини за пунктом (13);

30 (15) фармацевтична композиція для активації цитотоксичних Т-клітин, що включає як активний інгредієнт будь-який з наступних компонентів: пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, або клітини, що містять експресуючий вектор, і яку вводять суб'єкту, що має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

35 (16) антитіло, що специфічно зв'язується з пептидом WT1, де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з молекулою MHC класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(17) Спосіб визначення присутності або кількості WT1-специфічних хелперних Т-клітин у суб'єкта, позитивного відносно молекули MHC класу II, вибраної з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, причому спосіб включає стадії:

40 (а) стимулювання зразка, отриманого від суб'єкта, з використанням пептиду WT1, і

(б) визначення присутності або кількості цитокінів або хелперних Т-клітин, де підвищення присутності або кількості цитокінів або хелперних Т-клітин демонструє присутність або кількість WT1-специфічних хелперних Т-клітин.

Ефекти винаходу

45 [0011]

Згідно з даним винаходом спосіб активації хелперних Т-клітин, їх композиція, спосіб активації цитотоксичних Т-клітин, їх композиція, індуктор активації цитотоксичних Т-клітин, фармацевтична композиція для лікування і/або запобігання злоякісному новоутворенню за допомогою активації хелперних Т-клітин і цитотоксичних Т-клітин і так далі отримують шляхом застосування пептиду WT1 до суб'єкта, що має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, даючи таким чином можливість активації хелперних Т-клітин і цитотоксичних Т-клітин in vivo і in vitro у суб'єктів, що мають таку молекулу MHC класу II, і можливість лікування і запобігання злоякісному новоутворенню і так далі.

Короткий опис креслень

[0012]

60 На фіг. 1 представлена HLA-рестрикція клону R82-1. Горизонтальна вісь представляє кількість продукування IFN-γ (пг/мл) при додаванні WT1-332 (чорний стовпчик) або розчинника (білий стовпчик). Вертикальна вісь представляє типи антиген-презентуючих B-LCL клітин. Дані

представляють середнє значення $\pm SD$ (стандартне відхилення) (триразові повтори). \$: Дані включають екстрапольовані значення.

На фіг. 2 представлена HLA-рестрикція клону R132-1. Горизонтальна вісь представляє кількість продукування IFN- γ (пг/мл) при додаванні WT1-332 (чорний стовпчик) або розчинника (білий стовпчик). Вертикальна вісь представляє типи антиген-презентуючих B-LCL клітин. Дані представляють середнє значення $\pm SD$ (трикратні повтори). \$: Дані включають екстрапольовані значення.

На фіг. 3 представлена HLA-рестрикція клону R143-1. Горизонтальна вісь представляє кількість продукування IFN- γ (пг/мл) при додаванні WT1-332 (чорний стовпчик) або розчинника (білий стовпчик). Вертикальна вісь представляє типи антиген-презентуючих B-LCL клітин. Дані представляють середнє значення $\pm SD$ (трикратні повтори). \$: Дані включають екстрапольовані значення.

На фіг. 4 представлена HLA-рестрикція клону R145-2. Горизонтальна вісь представляє кількість продукування IFN- γ (пг/мл) при додаванні WT1-332 (чорний стовпчик) або розчинника (білий стовпчик). Вертикальна вісь представляє типи антиген-презентуючих B-LCL клітин. Дані представляють середнє значення $\pm SD$ (трикратні повтори). \$: Дані включають екстрапольовані значення.

На фіг. 5 представлена HLA-рестрикція клону Q32-1. Горизонтальна вісь представляє кількість продукування IFN- γ (пг/мл) при додаванні WT1-332 (чорний стовпчик) або розчинника (білий стовпчик). Вертикальна вісь представляє типи антиген-презентуючих B-LCL клітин. Дані представляють середнє значення $\pm SD$ (трикратні повтори). \$: Дані включають екстрапольовані значення.

На фіг. 6 представлена HLA-рестрикція клону Q41-1. Горизонтальна вісь представляє кількість продукування IFN- γ (пг/мл) при додаванні WT1-332 (чорний стовпчик) або розчинника (білий стовпчик). Вертикальна вісь представляє типи антиген-презентуючих B-LCL клітин. Дані представляють середнє значення $\pm SD$ (трикратні повтори). \$: Дані включають екстрапольовані значення.

Способи здійснення винаходу

[0013]

У одному аспекті в даному винаході пропонується спосіб активації хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин, який включає стадію активації хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з молекулою MHC класу II. У даному винаході стадія активації цитотоксичних Т-клітин може проводитися шляхом пасивування через стадію активації хелперних Т-клітин. Крім того, пептид WT1, що використовується в даному винаході, являє собою пептид, що має здатність зв'язуватися з молекулою MHC класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01. Крім того, пептид WT1, що використовується в даному винаході, може являти собою пептид, що має здатність зв'язуватися з щонайменше двома або більше молекулами MHC класу II з вищеописаних молекул MHC класу II. Крім того, пептид WT1, що використовується в даному винаході, може мати здатність зв'язуватися з молекулою MHC класу II, наприклад, з молекулами HLA-DR, HLA-DQ і HLA-DP.

[0014]

У даному винаході пептид WT1 може являти собою пептид, що містить амінокислотну послідовність білка WT1, представлений в SEQ ID NO:1. Пептид згідно з даним винаходом не має конкретного обмеження по своїй амінокислотній послідовності і по розміру за умови, що пептид має вищеописану властивість. Однак дуже довгий пептид чутливий до дії протеаз, а дуже короткий пептид не може зв'язуватися з пристосованим для пептиду поглибленням. Розмір пептиду згідно з даним винаходом являє собою один з наступних: переважно 10-25 амінокислот, більш переважно 15-21 амінокислота, ще більш переважно 16-20 амінокислот, наприклад 16 амінокислот, 17 амінокислот, 18 амінокислот або 19 амінокислот. Конкретні приклади пептиду згідно з даним винаходом являють собою пептиди, що містять амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2).

[0015]

Крім того, пептид WT1, що використовується в даному винаході, включає варіанти вищеописаного пептиду. Варіанти можуть містити, наприклад, пептид, вибраний з групи, що складається з пептидів, які мають амінокислотну послідовність, в якій декілька амінокислот, наприклад, 1-9, переважно 1-5, 1-4, 1-3, більш переважно 1-2 амінокислоти, ще більш переважно одна амінокислота в амінокислотній послідовності, представлений в SEQ ID NO:2, замінена, делетована або вставлена. Заміна амінокислот в пептидах може проводитися в будь-

яких положеннях і з будь-якими типами амінокислот, і переважна консервативна амінокислотна заміна. Приклади консервативних амінокислотних замін включають заміну залишку Glu на залишок Asp, залишок Phe на залишок Tyr, залишок Leu на залишок Ile, залишок Ala на залишок Ser, залишок His на залишок Arg і так далі. Переважно вставка або делеція амінокислот може проводитися на N-кінці або на C-кінці пептидів, але може здійснюватися і у внутрішній послідовності. Переважні конкретні приклади пептидів згідно з даним винаходом являють собою такі, які містять SEQ ID NO:2. У зв'язку з цим будь-який з вищеописаних пептидів повинен мати здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB 1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, і повинні активувати хелперні Т-клітини або цитотоксичні Т-клітини (в даному документі також позначаються як CTL). Крім того, людські молекули МНС, як правило, позначаються як молекули HLA, і, таким чином, МНС використовується як синонім HLA в даному описі.

[0016]

Крім того, пептиди згідно з даним винаходом можуть являти собою такі, які отримані за допомогою модифікації вищеописаної амінокислотної послідовності. Амінокислотні залишки у вищеописаній амінокислотній послідовності можуть бути модифіковані за допомогою відомого методу. Така модифікація може являти собою, наприклад, етерифікацію, алкілування, галогенування, фосфорилювання і тому подібне в функціональній групі бічного ланцюга амінокислотного залишку. Крім того, можливо зв'язування різних речовин з N-кінцем і/або C-кінцем пептиду, що містить вищеописану амінокислотну послідовність. Наприклад, амінокислота, пептид, їх аналог і тому подібне можуть бути зв'язані з пептидом. Наприклад, може бути вставлений гістидиновий фрагмент або може бути утворений химерний білок разом з таким білком, як тіоредоксин. Альтернативно, з пептидом WT1 може бути зв'язана детектована мітка. У випадку зв'язування даних речовин з пептидом згідно з даним винаходом вони можуть бути оброблені, наприклад, *in vivo* за допомогою ферменту і тому подібне або за допомогою процесу, такого, як внутрішньоклітинне процесування до кінцевого отримання пептиду, що складається з вищеописаної амінокислотної послідовності, який презентований на клітинній поверхні у вигляді комплексу з молекулою МНС класу II, який в результаті здатний отримувати індукційний ефект хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин. Ці речовини можуть являти собою такі, які регулюють розчинність пептиду згідно з даним винаходом, які поліпшують стабільність пептиду, як, наприклад, стійкість до протеаз, яка дає можливість специфічної доставки пептиду за даним винаходом, наприклад, в дану тканину або до органа, або такі, які мають посилюючу дію підвищення ефективності антиген-презентуючих клітин або які мають іншу дію. Крім того, ці речовини можуть являти собою такі, які підвищують здатність індукування CTL, наприклад, хелперні пептиди, відмінні від пептиду згідно з даним винаходом.

[0017]

Пептид WT1, що використовується в даному винаході, може бути синтезований з використанням методу, що звичайно використовується в даній галузі, або за допомогою такого модифікованого методу. Такий метод синтезу розкритий, наприклад, в Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1975; Basis and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1985; Development of Medicines (continuation), Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten Co., 1991, і так далі (ці посилання включені в даний документ посиланням). Крім того, пептид, що використовується в даному винаході, може бути отриманий з використанням методів генетичної інженерії на основі інформації нуклеотидної послідовності, що кодує пептид. Такий метод генетичної інженерії добре відомий фахівцям в даній галузі. Такий метод може проводитися згідно з методами, такими як описані в наступних публікаціях (Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983); DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)) (ці посилання включені в даний документ посиланням).

[0018]

Крім того, даний винахід стосується полінуклеотидної послідовності, що кодує пептид WT1, описаний вище. Полінуклеотидна послідовність, що кодує пептид WT1, може являти собою ДНК-послідовність або РНК-послідовність. У даному винаході така полінуклеотидна послідовність може використовуватися замість пептиду WT1. Така полінуклеотидна послідовність може використовуватися шляхом інтегрування у придатний вектор. Вектор включає плазмідні, фагові вектори, вірусні вектори і тому подібні, наприклад, pUC118, pUC119, pBR322, pCR3, pYES2, pYEUra3, pKCR, pCDM8, pGL2, pcDNA3.1, pRc/RSV, pRc/CMV, pAcSGHisNT-A, λZAPII, λgt11 і тому подібні. Вектор за необхідності може містити чинники, такі, як промотор з індукованою експресією, ген, що кодує сигнальну послідовність, маркерний ген

для селекції і термінатор. Метод введення цих генів в клітини або в живі організми, метод їх експресії і тому подібні методи добре відомі фахівцям в даній галузі.

[0019]

Антиген-презентуючі клітини, що використовуються в даному винаході, являють собою такі, які можуть презентувати антигенний пептид, що містить вищеописаний пептид WT1, разом з молекулою МНС класу II хелперним Т-клітинам, і належать, наприклад, до дендритних клітин, моноклеарів периферичної крові і тому подібне. Відповідно, суб'єкти, з яких були виділені антиген-презентуючі клітини, що використовуються в даному винаході, повинні мати таку ж молекулу МНС класу II, з якою може зв'язуватися доданий пептид WT1 (наприклад, будь-яка одна або декілька молекул МНС класу II, вибраних з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01).

[0020]

У даному винаході додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин може проводитися прямо шляхом додавання пептиду WT1 або непрямо шляхом додавання полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, або експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, або шляхом додавання клітин, що містять експресуючий вектор. Конкретно, додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин може проводитися шляхом контакту антиген-презентуючих клітин з пептидом WT1, або шляхом введення в антиген-презентуючі клітини полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, або експресуючого вектора, що містить полінуклеотид. Вищеописане додавання може проводитися за допомогою методу, відомого в даній галузі. Вищеописаний полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, і клітини, що містять експресуючий вектор, можуть бути отримані за допомогою методу, добре відомого фахівцям в даній галузі. Конкретно, полінуклеотид, що використовується в даному винаході, може визначатися на основі амінокислотної послідовності вищеописаного пептиду WT1 (наприклад, амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:2). Вищеописаний полінуклеотид може бути отриманий, наприклад, з допомогою ДНК- або РНК-синтезу, ПЛР-методу і тому подібних. Крім того, типи експресуючих векторів, що містять вищеописаний полінуклеотид, послідовності, що містяться додатково до вищеописаної полінуклеотидної послідовності і тому подібні послідовності можуть бути вибрані придатним способом залежно від цілей, типів і тому подібних ознак хазяїнів, в які вводять експресуючі вектори. Експресуючі вектори включають плазмідні, фагові вектори, вірусні вектори і тому подібне. Клітини, що містять експресуючі вектори, можуть бути отримані, наприклад, за допомогою трансформації клітин-хазяїнів. Клітини-хазяїни включають клітини *Escherichia coli*, дріжджові клітини, клітини комах, тваринні клітини і тому подібні. Метод трансформації клітин-хазяїнів може являти собою стандартний метод, і можливе використання, наприклад, кальцій-фосфатного методу, DEAE-декстранового методу, методу електропорації і ліпідів для перенесення генів.

[0021]

Взагалі, хелперні Т-клітини активуються, коли комплекс TCR-CD3 на Т-клітинній поверхні розпізнає антигенний пептид через молекулу МНС класу II на поверхні антиген-презентуючих клітин, і інтегрин на Т-клітинній поверхні стимулюється з допомогою інтегринового ліганду на поверхні антиген-презентуючих клітин. Активація хелперних Т-клітин в даному описі включає не тільки активацію хелперних Т-клітин, а також індукування і проліферацію хелперних Т-клітин. Крім того, хелперні Т-клітини, активовані в даному винаході, можуть являти собою не диференційовані Т-клітини (наприклад, наївні Т-клітини) і тому подібні. Активовані хелперні Т-клітини мають функцію, яка активує імунну систему шляхом стимулювання індукування, проліферації і активації В-клітин і цитотоксичних Т-клітин. Відповідно, метод за даним винаходом може використовуватися як суміжна терапія для лікування злоякісного новоутворення і тому подібних. Крім того, хелперні Т-клітини, активовані *in vitro* з використанням способу за даним винаходом, можуть використовуватися для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню і тому подібних, або як суміжний агент. Активація хелперних Т-клітин можна оцінити, наприклад, шляхом вимірювання продукування або секреції цитокінів, таких, як інтерферони (наприклад, інтерферон-γ і т. д.) і інтерлейкіни.

[0022]

В іншому аспекті в даному винаході пропонується композиція для активації хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин. У даному винаході активація цитотоксичних Т-клітин може проводитися шляхом пасивування через активацію хелперних Т-клітин. Хоча, пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, вектор, що містить полінуклеотид, і клітини, що містять вектор, можуть бути

наведені як приклад в композиції за даним винаходом, будь-які молекули можуть використовуватися за умови, що вони являють собою чинники, здатні презентувати пептид WT1 як антиген пептиду на поверхні антиген-презентуючих клітин. Ці чинники можуть бути отримані за допомогою методу, добре відомого фахівцям в даній галузі, як описано вище.

5 [0023]

Пептид WT1, що використовується в даному винаході, має здатність зв'язуватися з будь-якою з наступних молекул: з молекулою HLA-DRB1*08:02, молекулою HLA-DRB1*13:02, молекулою HLA-DRB1*14:03, молекулою HLA-DRB1*14:05, молекулою HLA-DQB1*03:02 і з молекулою HLA-DQB1*04:01, як описано вище. Крім того, пептид WT1, що використовується в даному винаході, може мати здатність зв'язуватися з щонайменше двома або більше молекулами MHC класу II з вищеописаних молекул MHC класу II. Крім того, пептид WT1, що використовується в даному винаході, може мати здатність зв'язуватися з будь-якою молекулою MHC класу II, вибраною з молекул HLA-DR, HLA-DQ або HLA-DP.

[0024]

15 Коли композиція за даним винаходом вводиться суб'єкту, що має будь-яку одну або більше молекул MHC класу II, вибраних з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, то імунна система суб'єкта активується шляхом активації хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин. Крім того, ген WT1 має високий рівень експресії в різних зл�якісних новоутвореннях і пухлинах, наприклад, в гемобластозах, таких, як лейкоз, мієлодиспластичний синдром, множинна мієлома і зл�якісна лімфома, а також в солідних пухлинах, таких, як рак шлунка, колоректальний рак, рак легені, рак молочної залози, герміногенний рак, рак печінки, рак шкіри, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак матки, рак шийки матки і рак яєчників, і, таким чином, композиція за даним винаходом може використовуватися як суміжний агент для лікування або запобігання зл�якісному новоутворенню. Альтернативно, хелперні Т-клітини, цитотоксичні Т-клітини і тому подібні, які активуються з використанням композиції за даним винаходом, можуть використовуватися як суміжний агент для лікування вищеописаних зл�якісних новоутворень.

[0025]

30 Додатково до вищеописаного пептиду WT1, полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, вектору, що містить полінуклеотид, і клітин, що містять вектор, композиція за даним винаходом може містити, наприклад, носій, ексципієнт і добавку і тому подібне. Вищеописаний пептид WT1 і тому подібне, що містяться в композиції за даним винаходом, активують хелперні Т-клітини і/або цитотоксичні Т-клітини в манері, специфічній до пептиду WT1, і, таким чином, композиція може містити відомий пептид WT1, рестрикований по молекулі MHC класу I, або може застосовуватися разом з таким пептидом.

[0026]

40 Спосіб застосування композиції за даним винаходом може бути вибраний придатним способом залежно від умов, таких, як цільовий ступінь активації хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин і стан антиген-презентуючих клітин. Заявлений спосіб включає, наприклад, введення суб'єкту за допомогою внутрішньошкірного введення, підшкірного введення, внутрішньом'язового введення, внутрішньовенного введення, трансназального введення, перорального введення і тому подібних або шляхом додавання до культуральної рідини антиген-презентуючих клітин, але не обмежуючись цим. Кількість вищеописаного пептиду WT1 і тому подібних в композиції за даним винаходом, форма композиції, частота застосування композиції і тому подібне можуть бути вибрані придатним способом залежно від умов, таких, як цільовий ступінь активації хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин і стан антиген-презентуючих клітин.

[0027]

50 Ще в одному аспекті в даному винаході пропонується спосіб лікування або запобігання зл�якісному новоутворенню у суб'єкта, де спосіб включає стадію активації хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з молекулою MHC класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01. Спосіб за даним винаходом активує імунну систему у суб'єкта шляхом активації хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин, таким чином, виліковуючи або запобігаючи зл�якісному новоутворенню у суб'єкта. У способі за даним винаходом стадія активації цитотоксичних Т-клітин може проводитися шляхом пасивування через стадію активації хелперних Т-клітин. Додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин може проводитися прямо шляхом додавання

пептиду WT1 або непрямо шляхом додавання полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, або експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, або шляхом додавання клітин, що містять експресуючий вектор. Вищеописаний полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, і клітини, що містять експресуючий вектор, можуть бути отримані за допомогою методу, добре відомого фахівцям в даній галузі, як описано вище. Суб'єкти, до яких може застосовуватися спосіб за даним винаходом, являють собою суб'єктів, позитивних відносно молекули МНС класу II, вибраної з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01. Злоякісні новоутворення, до яких може застосовуватися даний винахід, можуть являти собою будь-які злоякісні новоутворення і включають, наприклад, пухлини гематопоетичних органів, такі, як лейкоз, мієлодиспластичний синдром, множинна мієлома і злоякісна лімфома, а також солідні пухлини, такі, як рак шлунка, рак кишечника, рак легені, рак молочної залози, герміногенний рак, рак печінки, рак шкіри, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак матки, рак шийки матки і рак яєчників. Крім того, спосіб за даним винаходом може використовуватися разом з методом лікування або запобігання злоякісному новоутворенню з використанням пептиду WT1, рестриктивного по молекулі МНС класу I, або його фармацевтичної композиції.

[0028]

Ще в одному аспекті в даному винаході пропонується застосування пептиду WT1 для отримання вищеописаної композиції, полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, вектора, що містить полінуклеотид, і клітин, що містять вектор.

[0029]

Ще в одному аспекті даний винахід стосується набору реагентів, що містить вищеописаний пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, вектор, що містить полінуклеотид, або клітини, що містять вектор, для активації хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, де пептид WT1 має здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01. Переважно набір реагентів використовується у вищеописаному способі для активації хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин. Набір реагентів за даним винаходом може містити, наприклад, засоби отримання антиген-презентуючих клітин, засоби оцінки активації хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин і тому подібне, додатково до пептиду WT1. Взагалі, до набору реагентів додається інструкція із застосування. Можливо ефективна активація хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин із використанням набору реагентів за даним винаходом.

[0030]

У іншому аспекті в даному винаході пропонуються антиген-презентуючі клітини, які презентують комплекс антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою МНС класу II. У цьому випадку, молекула МНС класу II може являти собою будь-яку молекулу, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, або може являти собою щонайменше дві або більше молекул з вищеописаних молекул МНС класу II. Антиген-презентуючі клітини за даним винаходом можуть бути отримані за допомогою методу, відомого фахівцям в даній галузі. Наприклад, вони можуть бути отримані шляхом виділення клітин, що мають антиген-презентуючу здатність, з пацієнта з онкологічним захворюванням, і потім шляхом стимулювання виділених клітин із використанням пептиду WT1 (наприклад, пептиду, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:2) або з використанням полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, або шляхом введення експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, в клітини, даючи таким чином можливість презентування комплексу антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою МНС класу II, на клітинній поверхні (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) (ці посилання включені в даний документ за допомогою посилання). У даному описі клітини, що мають антиген-презентуючу здатність, нічим не обмежуються за умови, що вони експресують молекулу МНС класу II, здатну презентувати пептид WT1 на клітинній поверхні, при цьому переважні мононуклеари периферичної крові або дендритні клітини, що мають антиген-презентуючу здатність. Крім того, присутність антиген-презентуючих клітин за даним винаходом підтверджується підвищенням активності цитотоксичних Т-клітин, яка підтверджується підвищенням кількості інтерферону- γ , як представлено в прикладах. Антиген-презентуючі клітини за даним винаходом ефективно використовуються в клітинній терапії (наприклад,

клітинна терапія з використанням дендритних клітин) як активний інгредієнт фармацевтичної композиції.

[0031]

Ще в одному аспекті в даному винаході пропонуються хелперні Т-клітини, які розпізнають комплекс антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою МНС класу II. У цьому випадку, молекула МНС класу II може являти собою будь-яку молекулу, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04, або може являти собою щонайменше дві або більше молекул з вищеописаних молекул МНС класу II. Хелперні Т-клітини за даним винаходом включають, наприклад, такі клітини, які розпізнають комплекс антигенного пептиду, що містить пептид, що складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:2, з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01. Хелперні Т-клітини за даним винаходом можуть бути легко приготовані і отримані фахівцями в даній галузі з використанням методу, відомого в даній галузі (Iwata, M. et al., Eur. J. Immunol, 26, 2081 (1996)) (посилання включене в даний документ за допомогою посилання).

[0032]

Ще в одному аспекті в даному винаході пропонуються цитотоксичні Т-клітини, які активуються хелперними Т-клітинами, що розпізнають комплекс антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою МНС класу II. Цитотоксичні Т-клітини за даним винаходом включають, наприклад, такі клітини, які активуються хелперними Т-клітинами, що розпізнають комплекс антигенного пептиду, що містить пептид, що складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:2, з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01. Цитотоксичні Т-клітини за даним винаходом можуть бути легко приготовані і отримані фахівцями в даній галузі з використанням методу, відомого в даній галузі. Наприклад, їх отримують шляхом виділення лімфоцитів периферичної крові з пацієнта і шляхом їх стимулювання *in vitro* за допомогою пептиду (наприклад, пептиду, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:2), полінуклеотиду, що кодує пептид, або експресуючого вектора, що містить полінуклеотид (Journal of Experimental Medicine 1999, 190:1669) (посилання включене в даний документ посиланням). Цитотоксичні Т-клітини таким чином можуть використовуватися як активний інгредієнт фармацевтичної композиції для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню і так далі.

[0033]

Ще в одному аспекті в даному винаході пропонується тетрамер HLA, що містить вищеописаний антигенний пептид WT1 і молекулу МНС класу II. Молекула МНС класу II може являти собою будь-яку молекулу, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, або може являти собою щонайменше дві або більше молекул з вищеописаних молекул МНС класу II. У даному описі тетрамер HLA означає тетрамеризований продукт, який отримують шляхом біотинілювання комплексу (HLA-мономер), отриманого шляхом асоціації білка HLA з пептидом і потім шляхом зв'язування біотинільованого продукту з авідіном. HLA-тетрамери, що містять різні антигенні пептиди, комерційно доступні, і можна легко отримати HLA-тетрамер за даним винаходом (Science 279: 2103-2106 (1998), Science 274: 94-96 (1996)) (посилання включене в даний документ за допомогою посилання). Тетрамер за даним винаходом переважно мітять з допомогою флуоресценції так, щоб зв'язані хелперні Т-клітини і цитотоксичні Т-клітини за даним винаходом можна було легко селектувати і детектувати, як, наприклад, з допомогою проточної цитометрії і флуоресцентної мікроскопії. HLA-тетрамер в даному винаході не обмежується тетрамером, і також можливо за необхідності використанням мультимера, такого, як пентамер і дендример. У даному описі мультимер означає мультимеризований продукт, який отримують шляхом зв'язування двох або більше комплексів (HLA-мономери), отриманих шляхом асоціації білка HLA з пептидом з використанням відомого методу.

[0034]

У іншому аспекті в даному винаході пропонується фармацевтична композиція для активації хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин, яка містить як активний інгредієнт будь-яку з вищезазначених композицій, антиген-презентуючі клітини, хелперні Т-клітини, цитотоксичні Т-клітини або тетрамер. Фармацевтична композиція за даним винаходом може містити як

активний інгредієнт будь-яку одну або більше з вищезазначених композицій, антиген-презентуючі клітини, хелперні Т-клітини, цитотоксичні Т-клітини або тетрамер. Фармацевтична композиція за даним винаходом може використовуватися для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню. Фармацевтична композиція за даним винаходом може застосовуватися до різних злоякісних новоутворень і пухлин, які експресують WT1, до таких, як, наприклад, пухлини гематопоетичних органів, такі, як лейкоз, мієлодиспластичний синдром, множинна мієлома і злоякісна лімфома, а також солідні пухлини, такі, як рак шлунка, рак кишечника, рак легені, рак молочної залози, герміногенний рак, рак печінки, рак шкіри, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак матки, рак шийки матки і рак яєчників. Крім того, фармацевтична композиція за даним винаходом може використовуватися для введення суб'єкту, що має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01. Фармацевтична композиція за даним винаходом може використовуватися разом з іншим методом лікування або запобігання злоякісному новоутворенню або з його фармацевтичною композицією. Крім того, фармацевтична композиція за даним винаходом може містити агент активації, агент проліферації, агент індукції і тому подібне хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин або може містити відомий пептид WT1, рестриктивний по молекулі MHC класу I.

[0035]

Додатково до активного інгредієнта фармацевтична композиція за даним винаходом може містити, наприклад, носій, ексципієнт і тому подібне. Метод введення фармацевтичної композиції за даним винаходом може бути вибраний придатним способом залежно від умов, таких, як тип захворювання, стан суб'єктів і сайт направленої впливу. Спосіб включає, наприклад, внутрішньошкірне введення, підшкірне введення, внутрішньом'язове введення, внутрішньовенне введення, трансназальне введення, пероральне введення і тому подібні, але не обмежується цим. Кількість вищеописаного активного інгредієнта, що міститься в фармацевтичній композиції за даним винаходом, дозована форма композиції, частота введення композиції і тому подібне можуть бути вибрані придатним способом залежно від умов, таких, як тип захворювання, стан суб'єкта, сайт направленої впливу і тому подібне.

[0036]

Ще в одному аспекті в даному винаході пропонується спосіб лікування або запобігання злоякісному новоутворенню, який включає стадію введення суб'єкту будь-якої з вищезазначених композицій, антиген-презентуючих клітин, хелперних Т-клітин, цитотоксичних Т-клітин або тетрамера в ефективній кількості, де суб'єкт має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01. Злоякісні новоутворення, які можуть піддаватися лікуванню або запобігатися за допомогою способу за даним винаходом, являють собою різні злоякісні новоутворення і пухлини, які експресують WT1, такі, як, наприклад, пухлини гематопоетичних органів, такі, як лейкоз, мієлодиспластичний синдром, множинна мієлома і злоякісна лімфома, а також солідні пухлини, такі, як рак шлунка, рак кишечника, рак легені, рак молочної залози, герміногенний рак, рак печінки, рак шкіри, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак матки, рак шийки матки і рак яєчників. Спосіб за даним винаходом може використовуватися разом з іншим методом для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню з використанням відомого пептиду WT1, рестриктивного по молекулі MHC класу I.

[0037]

Ще в одному аспекті в даному винаході пропонується застосування будь-якого з вищеописаних композицій, антиген-презентуючих клітин, хелперних Т-клітин, цитотоксичних Т-клітин або тетрамера для приготування вищеописаної фармацевтичної композиції.

[0038]

У одному аспекті даний винахід стосується антитіла, яке зв'язується з вищеописаним пептидом WT1 або з поліпептидом, що кодує пептид WT1 (далі антитіло також означається як антитіло до WT1). Антитіло за даним винаходом може бути або поліклональним антитілом, або моноклональним антитілом. Конкретно, антитіло, яке специфічно зв'язується з пептидом, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:2, і йому подібні також можуть бути згадані. Метод отримання такого антитіла вже відомий, і антитіло за даним винаходом також може бути отримане згідно з таким стандартним методом (Current protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (ed.), 1987, John Wiley and Sons (pub.), Section 11.12-11.13, Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D. et al. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (pub.), New York, 1989) (ці посилання включені в даний документ за допомогою посилання). Наприклад, тварина,

відмінна від людини, така, як домашній кролик, може бути імунізована з використанням пептиду, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:2, як імуноген, і поліклональне антитіло може бути отримане з сироватки тварини за допомогою стандартного методу. З іншого боку, у випадку моноклонального антитіла, тварину, відмінну від людини, таку, як миша, імунізують з використанням пептиду, що використовується в даному винаході (пептид, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:2), і отримані в результаті клітини селезінки і клітини мієломи зливають з отриманням гібридомних клітин, з яких може бути отримане моноклональне антитіло (Current protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (ed.), 1987, John Wiley and Sons (pub.), Section 11.4-11.11) (посилання включене в даний документ за допомогою посилання). Крім того, отримання антитіла до WT1 за даним винаходом може проводитися шляхом стимулювання імунологічної реакції з використанням різних ад'ювантів залежно від хазяїна. Такі ад'юванти включають мінеральний гель (наприклад, ад'ювант Фрейнда, гідроксид алюмінію і т. д.), поверхнево-активну речовину, людський ад'ювант і тому подібні. Антитіло до WT1 за даним винаходом може використовуватися для афінної хроматографії, імунологічної діагностики і тому подібного. Метод імунологічної діагностики може бути вибраний придатним способом на основі імуноблотингу, радіоімуноаналізу (RIA), твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA), вимірювання флуоресценції або люмінесценції і тому подібних.

[0039]

У іншому аспекті в даному винаході пропонується спосіб визначення присутності або кількості пептиду WT1 у суб'єкта, позитивного відносно молекули MHC класу II, вибраної з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, причому спосіб включає стадії:

(a) реакції зразка, отриманого від суб'єкта, з вищеописаним антитілом до WT1, і потім

(b) визначення присутності або кількості вищеописаного антитіла до WT1, що міститься в зразку.

Зразок, отриманий від суб'єкта, що має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, може використовуватися як зразок, використаний вище на стадії (a). Зразки, які використовуються вище в стадії (a), включають, наприклад, рідину організму і тканини, такі, як кров і лімфоцити. Фахівці в даній галузі можуть придатним способом отримати зразки, поставити їх реакцію з антитілом і провести інші процедури з використанням відомих методів. Стадія (b) в даному винаході включає, наприклад, визначення локалізації, сайту, кількості і тому подібне вищеописаного антитіла до WT1, і таким чином даний винахід може використовуватися для діагностики, прогнозування злоякісного новоутворення і тому подібне. Вищеописане антитіло до WT1 може бути міченим. Як мітка можуть використовуватися відомі мітки, такі, як флуоресцентна мітка і радіоактивна мітка. З допомогою мічення стає можливим швидко і просто провести визначення присутності або кількості пептиду WT1.

[0040]

Ще в одному аспекті даний винахід стосується набору реагентів для визначення присутності або кількості пептиду WT1, що містить вищеописане антитіло до WT1 як основну складову. Набір реагентів за даним винаходом може містити, наприклад, засоби для отримання антитіла до WT1 і засоби для оцінки антитіла до WT1 і тому подібне додатково до вищеописаного антитіла до WT1. Взагалі, до набору реагентів додається інструкція із застосування. З використанням набору реагентів за даним винаходом стає можливим швидко і просто визначити присутність або кількість пептиду WT1 у вищеописаному методі визначення присутності або кількості пептиду WT1.

[0041]

Ще в одному аспекті в даному винаході пропонується спосіб визначення присутності або кількості WT1-специфічних хелперних Т-клітин або WT1-специфічних цитотоксичних Т-клітин у суб'єкта, позитивного відносно молекули MHC класу II, вибраної з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, причому спосіб включає стадії:

(a) стимулювання зразка, отриманого від суб'єкта, з використанням пептиду WT1, і

(b) визначення присутності або кількості цитокінів, хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин, де підвищення присутності або кількості цитокінів, хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин демонструє присутність або кількість WT1-специфічних хелперних Т-клітин або WT1-специфічних цитотоксичних Т-клітин.

Зразки в даному винаході можуть являти собою будь-які зразки за умови, що вони будуть містити антиген-презентуючі клітини, і включають, наприклад, мононуклеари периферичної крові, інвазивні лімфоцити, пухлинні клітини, клітини в асцитній рідині, клітини в плевральному випоті, клітини в спинномозковій рідині, клітини кісткового мозку, клітини лімфатичних вузлів і тому подібні. Зразки, що використовуються в даному винаході, можуть бути виділені зі здорових донорів або з пацієнтів з онкологічними захворюваннями. З використанням клітин, виділених зі здорових донорів, наприклад, стає можливим діагностика того, чи є у донорів злоякісне новоутворення або чи схильні донори до цього або до інших патологічних станів. З використанням цих клітин, виділених з пацієнтів з онкологічними захворюваннями, наприклад, стає можливим прогнозування того, чи буде імунотерапія з WT1 мати ефект на пацієнтів з онкологічними захворюваннями або на пацієнтів з іншими патологічними станами. У способі за даним винаходом отримані зразки можуть культивуватися до і після стимулювання з використанням пептиду WT1, і умови культивування можуть визначити фахівці в даній галузі. Стимулювання цих клітин за допомогою пептиду WT1 може проводитися з використанням відомого методу, такого, як електропорація, і може проводитися *in vitro* або *in vivo*. Продуктування цитокінів, присутність реакції хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин, кількість продукovanого цитокіну або кількість хелперних Т-клітин або цитотоксичних Т-клітин, які прореагували, може визначатися за допомогою відомого методу.

[0042]

Ще в одному аспекті даний винахід стосується набору реагентів для визначення присутності або кількості пептиду WT1, що містить вищеописаний пептид WT1 як основний компонент. Набір реагентів за даним винаходом може містити, наприклад, засоби отримання зразків, засоби оцінки, такі, як цитокіни, додатково до вищеописаного пептиду WT1. Взагалі, до набору реагентів додається інструкція із застосування. З використанням набору реагентів за даним винаходом стає можливим швидко і просто визначити присутність або кількість пептиду WT1 у вищеописаному методі визначення присутності або кількості пептиду WT1.

[0043]

У даному винаході також пропонується:

композиція, яка містить пептид WT1, для активації хелперних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, де хелперні Т-клітини розпізнають комплекс пептиду WT1 і молекули MHC класу II, вибраної з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, і фармацевтична композиція для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню, яка включає композицію як активний інгредієнт;

фармацевтична композиція для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню, що містить як активний інгредієнт будь-який з наступних: пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, або клітини, що містять експресуючий вектор, і яку вводять суб'єкту, що має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01; і спосіб активації хелперних Т-клітин, який включає стадію активації хелперних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, де хелперні Т-клітини розпізнають комплекс пептиду WT1 і молекули MHC класу II, вибраної з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01.

[0044]

У даному винаході також пропонується наступне:

(1) композиція для активації хелперних Т-клітин, яка містить пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, або клітини, що містять експресуючий вектор, де хелперні Т-клітини розпізнають комплекс пептиду WT1 і молекули MHC класу II, вибраної з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(2) композиція для активації цитотоксичних Т-клітин, яка включає пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, або клітини, що містять експресуючий вектор, де композицію вводять суб'єкту, що має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(3) композиція для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню, яка містить пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, або клітини, що містять експресуючий вектор, де композицію вводять суб'єкту, що має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(4) композиція за будь-яким із пунктів (1)-(3), яка містить пептид WT1;

(5) композиція за будь-яким із пунктів (1)-(4), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2), її варіант або модифікацію;

(6) композиція за пунктом (5), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2);

(7) антиген-презентуючі клітини, які презентують комплекс антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою MHC класу II, де молекула MHC класу II являє собою молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(8) антиген-презентуючі клітини за пунктом (7), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2), її варіант або модифікацію;

(9) антиген-презентуючі клітини за пунктом (8), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2);

(10) хелперні Т-клітини, які розпізнають комплекс антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою MHC класу II, де молекула MHC класу II являє собою молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(11) хелперні Т-клітини за пунктом (10), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2), її варіант або модифікацію;

(12) хелперні Т-клітини за пунктом (11), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2);

(13) цитотоксичні Т-клітини, які активуються хелперними Т-клітинами за пунктом (12);

(14) фармацевтична композиція для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню, що містить як активний інгредієнт будь-які з антиген-презентуючих клітин за будь-яким із пунктів (7)-(9), хелперні Т-клітини за будь-яким із пунктів (10)-(12) або цитотоксичні Т-клітини за пунктом (13).

[0045]

У даному винаході також пропонується наступне:

(1) спосіб активації хелперних Т-клітин, який включає стадію активації хелперних Т-клітин шляхом додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, де хелперні Т-клітини розпізнають комплекс пептиду WT1 і молекули MHC класу II, вибраної з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(2) спосіб за пунктом (1), де додавання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин проводиться шляхом контакту антиген-презентуючих клітин з пептидом WT1, або шляхом введення в антиген-презентуючі клітини полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, або експресуючого вектора, що містить полінуклеотид;

(3) спосіб активації цитотоксичних Т-клітин, який включає введення пептиду WT1, полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, або клітин, що містять експресуючий вектор, суб'єкту, що має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(4) спосіб лікування або запобігання злоякісному новоутворенню, який включає введення пептиду WT1, полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, або клітин, що містять експресуючий вектор, суб'єкту, що має молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

(5) спосіб за будь-яким із пунктів (1)-(4), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2), її варіант або модифікацію;

5 (6) спосіб за пунктом (5), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2).
[0046]

У даному винаході також пропонується наступне:

10 (1) застосування пептиду WT1, полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, або клітин, що містять експресуючий вектор, де хелперні Т-клітини розпізнають комплекс пептиду WT1 і молекули МНС класу II, вибраної з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

15 (2) застосування пептиду WT1, полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, або клітин, що містять експресуючий вектор, для отримання лікарського засобу для активації цитотоксичних Т-клітин, де лікарський засіб вводять суб'єкту, що має молекулу МНС класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

20 (3) застосування пептиду WT1, полінуклеотиду, що кодує пептид WT1, експресуючого вектора, що містить полінуклеотид, або клітин, що містять експресуючий вектор, для отримання лікарського засобу для лікування або запобігання злоякісному новоутворенню, де лікарський засіб вводять суб'єкту, що має молекулу МНС класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01;

25 (4) застосування за будь-яким із пунктів (1)-(3) для отримання лікарського засобу, що містить пептид WT1;

(5) застосування за будь-яким із пунктів (1)-(4), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2), її варіант або модифікацію;

30 (6) застосування за пунктом (5), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2).
[0047]

35 Даний винахід тепер буде описаний більш детально і конкретно за допомогою прикладів, але їх не треба розглядати як обмеження даного винаходу.

ПРИКЛАДИ

[0048]

Приклад 1: Створення клональних клітин Th1, специфічних до пептиду WT1 (SEQ ID NO: 2)

40 Клональні клітини Th1, специфічні до пептиду WT1 (SEQ ID NO: 2) (далі позначається як WT1-332), (далі позначаються як "клональні клітини Th1") створювали, як описано нижче.

[0049]

(1) Матеріали експерименту

Основні матеріали, що використовуються, вказані нижче.

Сполука, що тестується

45

Таблиця 1

Назва сполуки	Номер партії	Постачальник
WT1-332*	100521	American Peptide Company, Inc.

Умови зберігання: морозильник, встановлений на -30°C.

*WT1-332: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

[0050]

50 Отримання сполуки, що тестується

WT1-332 розчиняли в 10 мМ оцтовій кислоті до концентрації 20 мг/мл. Розчин стерилізували за допомогою фільтрації і зберігали в морозильнику з температурою, встановленою на -30°C.

[0051]

Мононуклеари периферичної крові (PBMC) використали як клітини-фідери

55

1) Назва клітини: PBMC.

2) Джерело: периферична кров дорослих здорових людей-донорів.

Після здійснення зв'язуваної анонімізації і отримання інформованої згоди під контролем менеджера по персональній інформації у донорів проводили забирання крові і проводили експериментальні маніпуляції.

3) Умови зразка: будь-який з фідерів відрізняється від зразка для клонування.

4) Забирання крові: 40 мл гепаринізованої периферичної крові.

[0052]

Клітинна лінія B-LCL як клітини-фідери

5) Назва клітин: клітинна лінія B-LCL.

6) Джерело: периферична кров людини.

7) Постачальник: клітинний банк RIKEN або IHWG.

[0053]

Групи

Таблиця 2

№ групи	Агент	Вимірювання	Ямка*
1	розчинник	ICS або продуктивність IFN-γ (пг/мл)	1 або 3
2	WT1-332		

*Після внутрішньоклітинного забарвлювання цитокінів (ICS) і клонування проводили перший тест ELISA в кожній ямці.

[0054]

Реактиви

Серед реагентів, що використовуються в тесті, особливо важливі перераховані нижче.

Таблиця 3

Назва	Каталожний номер	Постачальник
OptEIA набір ELISA (людський IFN-γ)	555142	BD Biosciences
BD OptEIA набір реагентів B	550534	BD Biosciences
Фітогеммаглютинін (PHA)	30852801	remel.
MACS CD4 Мікросфери	120-000-440	Milteny Biotec

Приготування культурального середовища

Людську сироватку АВ і ембріональну бичачу сироватку (FBS) використали після інактивації і фільтрації через фільтр 0,2 мкм. Для розділення PBMC, клітинної культури B-LCL і іншої культури, відповідно, використали гепарин у вигляді двадцяти од./мл HBSS, 10% FBS/RPMI-1640 (100 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину), і 10% AIM-V, що містить людську сироватку АВ, (Invitrogen). Клітинну культуру вели в інкубаторі 37°C-5% CO₂ для кожного середовища.

[0056]

(2) Експериментальні методи

Отримання PBMC

PBMC отримували з допомогою центрифугування в градієнті густини з периферичної крові здорових добровольців, і частину PBMC використали для індукування WT1-332-специфічних Т-клітин. Клітини, що залишилися, піддавали кріоконсервації в клітинному банку (Juji Field Inc.) і використали як клітини-фідери або антиген-презентуючі клітини для повторного стимулювання.

[0057]

Індукування WT1-332-специфічної Т-клітини

Отримані таким чином PBMC висівали на 24-ямкові планшети в кількості $1,5 \times 10^6$ клітин на ямку в 10 ямок і додавали WT1-332 до кінцевої концентрації 20 мкг/мл і IL-7 до кінцевої концентрації 10 нг/мл і починали культивування (день 0, сумарний об'єм середовища: 2 мл на ямку).

Через 1 тиждень клітини повторно стимулювали. Спочатку PBMC, доведені до густини 3×10^6 клітин на ямку або менше, культивували протягом 2 годин разом з WT1-332 з кінцевою концентрацією 20 мкг/мл, і додатково культивували протягом 45 хв. разом з мітоміцином С (MMC) (кінцева концентрація — 50 мкг/мл), і потім після промивання з допомогою AIM-V клітини використали як антиген-презентуючі клітини. Потім, після того, як культивовані PBMC збирали і прикріплені клітини видаляли, клітини, що залишилися, висівали в кількості $1,15-1,43 \times 10^6$ клітин на ямку і знову культивували з такою ж кількістю WT1/MMC-оброблених антиген-презентуючих

клітин з додаванням IL-7 до кінцевої концентрації 10 нг/мл (день 7). Через два дні половину середовища міняли на середовище, що містить 40 од./мл IL-2, і клітини додатково культивували протягом одного тижня доти, поки середовище не міняли на середовище, що містить 20 од./мл IL-2, кожний подальший день.

5 [0058]

Внутрішньоклітинне забарвлювання цитокінів (ICS)

На день 14 культивовані клітини збирали і висівали на 96-ямковий круглодонний планшет з густиною 2×10^5 клітин на ямку в дві ямки і потім культивували протягом 4 годин з додаванням 20 мкг/мл WT1-332 в одну ямку і з додаванням розчинника в іншу ямку і додатково культивували
10 протягом 2 годин разом з 1× Брефелдіна (кінцева концентрація). Клітини збирали, додавали PE-мічене антитіло проти людського CD4 і FITC-мічене антитіло проти людського CD8 і інкубували протягом 15 хвилин при 4°C. Після промивання з використанням Забарвлюючого Буфера до клітин додавали Cytofix Cytoperm Fix/Perm, і обробляли протягом 20 хвилин при 4°C. Після промивання з використанням Perm./промивального буфера до клітин додавали PerCP-мічене
15 антитіло проти людського IFN-γ і інкубували протягом 30 хвилин при 4°C. Клітини промивали з допомогою Perm./промивального буфера і аналізували з допомогою FACS.

[0059]

Розмороження, висівання і субкультивування клітин B-LCL як клітин-фідерів

20 Кріоконсервовані клітини розморожували і починали культивувати з густиною 3×10^5 клітин на ямку і потім субкультивували до субконфлуентного стану. Отримані таким чином клітини B-LCL використовували як клітини-фідери для стимулювання РНА.

[0060]

Виділення CD4⁺-клітин з допомогою MACS

25 Згідно з протоколом рекомендацій виробника CD4⁺-клітини виділяли за допомогою позитивної селекції з клітин, що культивуються, з використанням мікросфер MACS.

[0061]

Клонування і ампліфікація WT1-332-специфічних Th1-клітин за допомогою лімітуючого розведення

30 Клітини-фідери B-LCL і PBMC (3×10^6 /мл або менше) обробляли з використанням розчину мітоміцину C (кінцева концентрація — 50 мкг/мл) протягом 45 хвилин в CO₂-інкубаторі. Після промивання з допомогою AIM-V, два типи клітин B-LCL і два типи PBMC, 4 типи клітин загалом змішували (кінцева концентрація: $2,5 \times 10^5$ клітин/мл для PBMC і $2,5 \times 10^4$ клітин на ямку для B-LCL клітин/мл). Набір сумішей отримували згідно з кількістю зразків, які необхідно клонувати, і РНА додавали до кінцевої концентрації 200 нг/мл з отриманням РНА-вмісної рідкої суміші
35 клітин-фідерів.

Потім із фракціонованих CD4⁺-клітинних зразків вибирали зразки, що демонструють високе співвідношення клітин CD4⁺ IFN-γ⁺ в ICS, і концентрацію CD4⁺-клітин доводили до 10 клітин/мл за допомогою РНА-вмісної рідкої суміші клітин-фідерів, отриманих таким чином, і клітини висівали на 96-ямковий планшет в кількості 100 мкл на ямку (сумарна кількість PBMC: 5×10^4
40 клітин на ямку; клітини B-LCL: 5×10^3 клітин на ямку; РНА: 200 нг/мл; CD4⁺-клітин: одна клітина/мл) і починали культивувати. Через п'ять днів додавали однакову кількість 80 од./мл IL-2-вмісного середовища до культурального середовища, і після цього міняли половину середовища на 80 од./мл IL-2-вмісного середовища кожний день. У процесі культивування клітини в ямці, що демонструє очевидну ампліфікацію, розсівали на 48-ямковий планшет і
45 продовжували культивування.

На день 10 після початку клонування і після нього з інтервалом в 14 днів застосовували РНА-стимулювання для ампліфікації, як описано вище, за винятком того, що культуральний планшет, сумарну кількість PBMC, сумарну кількість клітин B-LCL, кінцеву концентрацію РНА і кількість клональних клітин Th1 для ампліфікації міняли для 24-ямкового планшета, 1×10^6 клітин
50 на ямку, $1,0 \times 10^5$ клітин на ямку, 50 нг/мл, і 2×10^5 клітин на ямку або менше, відповідно. Крім того, додавали IL-2 на день 3 після початку культивування, і концентрацію IL-2 середовища, яке буде додане, доводили до 200 од./мл.

[0062]

Пептидне стимулювання клональних клітин Th1

55 Для контролю антигенної реактивності клональних клітин Th1, які клонували і ампліфікували, зібрані клональні клітини Th1 висівали на 96-ямкові круглодонні планшети в одну ямку або в три ямки. До ямки додавали 10 мкМ оцтової кислоти або 20 (мкг/мл пептиду і починали культивування (сумарна кількість середовища: 200 мкл на ямку). Надосадові рідини клітинних культур збирали приблизно через 24 години.

60 [0063]

ELISA

Концентрацію IFN- γ в кожній культурі вимірювали після розведення надосадової рідини в 4 рази з використанням аналітичного розріджувача (Becton Dickinson). Концентрацію IFN- γ вимірювали з використанням BD OptEIA ELISA-набору (людський IFN- γ , Becton Dickinson) згідно з інструкціями виробника за винятком того, що антитіло розводили в 500 разів, інтервал калібрувальної кривої змінювали до 18,75-1200 пг/мл, і час хромогенної реакції змінювали на 5 хвилин. Крім того, значення екстраполяції використали при вимірюванні значення, що перевищує інтервал вимірювань, і виміряне значення вважали як 0, коли поглинання складало менш ніж 0.

[0064]

Отримання стокового клітинного банку клональних клітин Th1

Клональні клітини Th1, з яких підтверджували антигенну реактивність, піддавали кріоконсервації і використали як стокові клітинні банки.

[0065]

Оцінка

Для оцінки того, чи значно індукуються WT1-332-специфічні Th1-клітини в CD4⁺, клітини культивували протягом 14 днів при умовах стимулу WT1-332, розраховували процент WT1-332-специфічних Th1-клітин (%) і процент WT1-332-неспецифічних Th1-клітин (%) згідно з наступною формулою.

WT1-332-специфічні Th1-клітини (%)

= кількість CD4⁺, внутрішньоклітинний IFN- γ ⁺ клітини з WT1-332-стимулюванням/сумарна кількість життєздатних клітин \times

кількість CD4⁺-клітин після фракціонування/кількість CD4⁺-клітин до фракціонування $\times 100$

WT1-332-неспецифічні Th1-клітини (%)

= кількість CD4⁺, внутрішньоклітинний IFN- γ ⁺ клітини з АсОН-стимулюванням/сумарна кількість життєздатних клітин $\times 100$

\times кількість CD4⁺-клітин після фракціонування/кількість CD4⁺-клітин до фракціонування $\times 100$

Клонування проводили в 6-7 зразках, для яких значення, отримане шляхом віднімання проценту WT1-332-неспецифічних Th1 з проценту WT1-332-неспецифічних Th1, було високим.

Концентрацію IFN- γ надосадової рідини культури кожної групи вимірювали з допомогою ELISA, і коли продуктивність IFN- γ при додаванні WT1-332 була вищою, ніж при додаванні розчинника 500 пг/мл або більше і в 1,2 рази або більше, то вважали, що групи зберігають антигенну реактивність, і їх використали в подальших експериментах.

[0066]

(3) Результати

Створювали різні клональні клітини Th1. Це підтверджували в результаті типування, що деякі з отриманих клонів мали нові рестриковані алелі. Результати представлені в таблиці 4. В прикладі 2 з використанням цих клонів визначали, чи може WT1-332 активувати Th1-клітини в манері рестрикції відносно специфічних HLA-типів.

Таблиця 4

Клон ID	Назва клону	HLA Тип					
		DRBI		DPB1		DQB I	
КлонR82-1	#147-2F1	08:02	14:03	02:01	02:01	03:01	03:02
КлонR132-1	#144-2D7	01:01	13:02	04:01	04:02	H3	H3
КлонR143-1	#61-3F9	14:03	15:02	02:01	03:01	H3	H3
КлонR145-2	#77-3H6	04:05	14:05	05:01	05:01	H3	H3
КлонQ32-1	#147-206	8:02	14:03	02:01	02:01	03:01	03:02
КлонQ41-1	#106-11H11	04:05	15:01	05:01	05:01	04:01	06:02

*Підкреслення демонструє нові рестриковані алелі.

*H3 означає, що HLA-типування не здійснювали для HLA-типу.

[0067]

Приклад 2: Визначення рестрикованого алеля створеної WT1-332-специфічної клональної клітини Th1

З використанням WT1-332-специфічних клональних клітин Th1, створених в прикладі 1 (позначаються далі як "клональні клітини Th1"), визначали, чи може WT1-332 активувати Th1-

клітини в манері рестрикції відносно специфічних HLA-типів, і підтверджували рестриковані алелі.

[0068]

(1) Сполука, що тестується

5

Клітинна лінія B-LCL

Таблиця 5-1

Антиген-презентуючі клітини B-LCL для аналізу рестрикції DRB1*08:02

Ознака HLA	B-LCL	HLA-тип							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3, 4, 5	
DRB1*08:02 (+)	HEV#0052	08:02	14:03	05:01	05:01	03:02	03:01	чистий	B3*01:01
DRB1*08:02 (+)	HEV#0324	08:02	15:02	04:02	09:01	04:02	06:01	чистий	B5*01:02
DRB1*08:02 (-)	HEV#0042	04:05	13:01	05:01	05:01	04:01	06:03	B4*01:03	B3*01:01
DRB1*08:02 (-)	HEV#0238	04:06	12:01	05:01	02:01	03:01	03:02	B3*02:02	B4*01:03
DRB1*08:02 (-)	HEV#0013	04:05	11:01	02:01	05:01	03:01	04:01	B4*01:03	B3*02:02
DRB1*08:02 (-)	HEV#0057	09:01	09:01	02:01	09:01	03:03	03:03	B4*01:03	B4*01:03

Таблиця 5-2

Антиген-презентуючі клітини B-LCL для аналізу рестрикції DRB1*13:02

Ознака HLA	B-LCL	HLA-тип							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3, 4, 5	
DRB1*13:02 (-)	HEV#0201	01:01	04:05	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	чистий
DRB1*13:02 (-)	HEV#0073	01:01	09:01	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	чистий
DRB1*13:02 (-)	HEV#0271	09:01	09:01	04:02	05:01	03:03	03:03	B4*01:03	B4*01:03
DRB1*08:02 (-)	1333-8272	08:01	10:01	04:01	02:01	04:02	05:01	чистий	чистий
DRB1*13:02 (+)	HEV#0046	04:01	13:02	04:01	05:01	03:01	06:04	B4*01:02	B3*01:01
DRB1*13:02 (-)	HEV#0038	04:01	12:02	04:01	05:01	03:01	03:01	B4*01:02	B3*01:01
DRB1*13:02 (-)	HEV#0110	04:01	04:03	02:01	05:01	03:01	03:02	B4*01:03	B4*01:02
DRB1*13:02 (-)	HEV#0024	04:10	12:02	13:01	05:01	03:01	04:02	B4*01:03	B3*03:01
DRB1*13:02 (-)	HEV#0342	09:01	08:03	14:01	05:01	03:01	03:03	B4*01:03	чистий

Таблиця 5-3

Антиген-презентуючі клітини B-LCL для аналізу рестрикції DRB1*14:03

Ознака HLA	B-LCL	HLA-тип							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3, 4, 5	
DRB1*14:03 (+)	HEV#0052	08:02	14:03	05:01	05:01	03:02	03:01	чистий	B3*01:01
DRB1*14:03 (-)	HEV#0324	08:02	15:02	04:02	09:01	04:02	06:01	чистий	B5*01:02
DRB1*14:03 (-)	HEV#0042	04:05	13:01	05:01	05:01	04:01	06:03	B4*01:03	B3*01:01
DRB1*14:03 (-)	HEV#0238	04:06	12:01	05:01	02:01	03:01	03:02	B3*02:02	B4*01:03
DRB1*14:03 (-)	HEV#0035	04:05	15:05	05:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02
DRB1*14:03 (-)	HEV#0012	04:05	08:03	05:01	05:01	04:01	06:01	B4*01:03	чистий
DRB1*14:03 (-)	HEV#0057	09:01	09:01	02:01	09:01	03:03	03:03	B4*01:03	B4*01:03
DRB1*14:03 (-)	HEV#0013	04:05	11:01	02:01	05:01	03:01	04:01	B4*01:03	B3*02:02
DRB1*14:03 (-)	HEV#0342	09:01	08:03	14:01	05:01	03:01	03:03	B4*01:03	чистий
DRB1*14:03 (-)	HEV#0050	04:05	15:02	03:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02

Таблиця 5-4

Антиген-презентуючі клітини B-LCL для аналізу рестрикції DRB1*14:05

Ознака HLA	B-LCL	HLA-тип							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3, 4, 5	
DRB1*14:05 (-)	HEV#0201	01:01	04:05	05:01	03:03	03:03	05:01	B4*01:03	чистий
DRB1*14:05 (-)	HEV#0073	01:01	09:01	05:01	03:03	03:03	05:01	B4*01:03	чистий
DRB1*14:05 (+)	IXH5	09:01	14:05	05:01	05:03	05:03	03:03	B3*02:02	B4*01:03
DRB1*14:05 (-)	HEV#0271	09:01	09:01	04:02	03:03	03:03	03:03	B4*01:03	B4*01:03
DRB1*14:05 (-)	HEV#0058	14:06	13:02	05:01	03:01	03:01	06:04	B3*03:01	B3*02:02
DRB1*14:05 (-)	HEV#0055	08:03	14:01	05:01	05:03	05:03	06:01	B3*02:02	чистий
DRB1*14:05 (-)	HEV#0035	04:05	15:02	09:01	04:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02
DRB1*14:05 (-)	HEV#0050	04:05	15:02	03:01	04:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02

Таблиця 5-5

Антиген-презентуючі клітини B-LCL для аналізу рестрикції DQB1*03:02

Ознака HLA	B-LCL	HLA-тип							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3, 4, 5	
DQB1*03:02 (+)	HEV#0052	08:02	14:03	05:01	05:01	03:02	03:01	чистий	B3*01:01
DQB1*03:02 (-)	HEV#0324	08:02	15:02	04:02	09:01	04:02	06:01	чистий	B5*01:02
DQB1*03:02 (-)	HEV#0238	04:06	12:01	05:01	02:01	03:01	03:02	B3*02:02	B4*01:03
DQB1*03:02 (-)	HEV#0042	04:05	13:01	05:01	05:01	04:01	06:02	B4*01:03	B3*01:01
DQB1*03:02 (-)	HEV#0013	04:05	11:01	05:01	05:01	03:01	04:01	B4*01:03	B3*02:02

Таблиця 5-6

Антиген-презентуючі клітини B-LCL для аналізу рестрикції DQB1*04:01

Ознака HLA	B-LCL	HLA-тип							
		DRB1		DPB1		DQB1		DRB3, 4, 5	
DQB1*04:01 (-)	HEV#0201	01:01	04:05	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	чистий
DQB1*04:01 (-)	HEV#0073	01:01	09:01	04:02	05:01	03:03	05:01	B4*01:03	чистий
DQB1*04:01 (+)	HEV#0174	04:05	15:01	05:01	05:01	04:01	06:02	B4*01:03	B5*01:01
DQB1*04:01 (+)	HEV#0013	04:05	11:01	02:01	05:01	03:01	04:01	B4*01:03	B3*02:02
DQB1*04:01 (+)	HEV#0035	04:05	15:02	05:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02
DQB1*04:01 (+)	HEV#0050	04:05	15:02	03:01	09:01	04:01	06:01	B4*01:03	B5*01:02

5 (2) Експериментальний метод

Отримання середовища

Людську сироватку АВ і FBS використали після інактивації і фільтрації через фільтр 0,2 мкм. Для розділення PBMC, клітинної культури B-LCL і іншої культури, відповідно, використали гепарин у вигляді двадцяти од./мл HBSS, RPMI-1640-вмісню 10 % FBS і 1 % P/S (100 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину), і 10 % AIM-V (Invitrogen)-вмісню людську сироватку. Клітинну культуру вели в інкубаторі 37°C-5 % CO₂ для кожного середовища.

[0070]

Експериментальний метод

HLA-рестрикцію клональних клітин Th1 визначали з використанням WT1-332-стимульованих клітин B-LCL, що містять придатний алель, як антиген-презентуючих клітин і вимірювали кількість продукowanego IFN-γ.

Конкретно, клональні клітини Th1 культивували при умовах РНА-стимулу з використанням клітин-фідерів B-LCL і ксеногенних PBMC, отриманих з периферичної крові як клітин-фідерів. Потім клітини B-LCL, оброблені з використанням WT1-332 або розчинника, використали як антиген-презентуючі клітини і культивували із зібраними клональними клітинами Th1. Вимірювали кількість продукowanego IFN-γ для визначення того, чи присутній WT1-332-специфічний антигенний стимул. На основі типів HLA класу II кожного Th1-клону клітини B-LCL,

що мають деякі інші типи HLA, використали як антиген-презентуючі клітини, і таким чином визначали рестрикцію HLA класу II Th1-клону.

[0071]

Розмороження і висівання клітин B-LCL як клітин-фідерів

5 Кріоконсервовані клітини розморожували в день 0 і починали культивувати в кількості 1×10^5 клітин на ямку. Клітини збирали на 3 день і використали як клітини-фідери для РНА-стимулювання.

[0072]

Отримання PBMC

10 PBMC готували з допомогою центрифугування в градієнті густини з периферичної крові здорових добровольців на день 2. Після підрахунку кількості клітин клітинні осадки збирали і ресуспендували в банкері клітин (Mitsubishi Chemical Medience Corporation), і потім розподіляли в кріопробірку для кріоконсервації в морозильнику при -80°C . В момент РНА-стимулювання кріоконсервовані клітини розморожували і отримували як клітини-фідери PBMC.

15 [0073]

Розмороження і висівання клональних клітин Th1

На день 2 кріоконсервовані клітини розморожували і починали культивувати з густини 2×10^5 клітин на ямку або менше в середовищі, що містить 20 од./мл IL-2. Клітини збирали на 3 день і використали як клональні клітини Th1 для РНА-стимулювання.

20 [0074]

РНА-стимулювання клональних клітин Th1

На 3 день клітини-фідери B-LCL і PBMC обробляли з використанням розчину мітоміцину C (кінцева концентрація = 50 мкг/мл) протягом 45 хвилин в CO_2 -інкубаторі. Після промивання з допомогою AIM-V два типи клітин PBMC і два типи B-LCL, 4 типи клітин загалом змішували (кінцева концентрація: 1×10^6 клітин/мл для PBMC і 1×10^5 клітин на ямку для B-LCL клітин/мл). Набір сумішей отримували згідно з кількістю клональних клітин Th1, які необхідно висівати, і РНА додавали до кінцевої концентрації 100 нг/мл з отриманням РНА-вмісної рідкої суміші клітин-фідерів. Потім культивовані клональні клітини Th1 висівали на 24-ямкові планшети в кількості 0,5 мл на ямку (клітинна концентрація — $4,0 \times 10^5$ клітин/мл), і потім додавали РНА-вмісну рідку суміш клітин-фідерів в кількості 0,5 мл на ямку і клітини культивували. На день 6 додавали однакову кількість 200 од./мл IL-2-вмісного середовища до культурального середовища, і на день 8, день 10, день 12 і на день 14 міняли половину середовища на 40 од./мл IL-2-вмісного середовища. На 15 день клітини використали для аналізу рестрикції. Коли клітини досягали конфлуентного стану в процесі культивування, клітини субкультивували з використанням 20 од./мл IL-2-вмісного середовища.

35 [0075]

Розмороження і висівання клітин B-LCL як антиген-презентуючих клітин для аналізу рестрикції

40 На день 11 кріоконсервовані клітини розморожували і починали культивувати в кількості 1×10^5 клітин на ямку. Клітини збирали на день 15 і використали для аналізу рестрикції.

[0076]

Аналіз рестрикції

45 Клональні клітини Th1 збирали на день 15 і висівали на круглодонні 96-ямкові планшети згідно з кількістю зібраних клітин з густиною $1-2,5 \times 10^4$ клітин/100 мкл на ямку в 3 ямки. Клітини B-LCL як антиген-презентуючі, доведені до 1×10^6 клітин/мл, розподіляли в дві конічні пробірки в 4-7 мл, і до однієї додавали оцтову кислоту до кінцевої концентрації 10 мкМ, а до іншої додавали WT1-332 до кінцевої концентрації 20 мкг/мл. Через 2 години культивування клітини промивали з використанням AIM-V і додавали в 96-ямкові планшети, в які висівали клональні клітини Th1 в кількості $2,5 \times 10^4$ клітин/100 мкл на ямку і потім культивували протягом 16 годин або більше. Для підтвердження реактивності WT1-332 ямки, до яких додавали WT1-332 або розчинник замість клітин B-LCL, готували на тому ж планшеті.

50 [0077]

ELISA

55 Концентрацію IFN- γ в кожній надосадовій рідині клітинної культури вимірювали після її розведення в 100 разів з допомогою аналітичного розріджувача (Becton Dickinson). Концентрацію IFN- γ вимірювали з використанням BD OptEIA ELISA-набору (людський IFN- γ , Becton Dickinson) згідно з інструкціями виробника за винятком того, що інтервал калібрувальної кривої змінювали до 5-640 пг/мл, і час хромогенної реакції змінювали на 10 хвилин. Крім того, значення екстраполяції використали при вимірюванні значення, що перевищує інтервал вимірювань, і виміряне значення вважали як 0, коли поглинання складало менш ніж 0.

60

[0078]

Оцінка

Кількість IFN-γ в кожній надосадовій рідині клітинної культури.

[0079]

5 (3) Результати

(i) Аналіз HLA-рестрикції Th1-клональної клітини клону R82-1 (DRB1*08:02/14:03, DPB1*02:01, DQB1*03:01/03:02)

10 Продукування IFN-γ в клон R82-1 детектували за допомогою стимуляції з WT1-332-стимульованих DRB1*08:02(+) B-LCL (HEV#0052 і HEV#0324) (фіг. 1). Тому клон R82-1 був показаний як такий, що є WT1-332-специфічним HLA-DRB1*08:02-рестрикованим Th1 клоном.

[0080]

(ii) Аналіз HLA-рестрикції Th1 клональної клітини клону R132-1 (DRB1*01:01/13:02, DPB1*04:01/04:02)

15 IFN-γ вироблення клону R132-1 детектували шляхом стимуляції з WT1-332-стимульованими DRB1*13:02(+) B-LCL (HEV#0046) (фіг. 2). Отже, клон R132-1 був показаний як такий, що є WT1-332-специфічним HLA-DRB1*13:02-рестрикованим Th1 клоном.

[0081]

(iii) Аналіз HLA-рестрикції Th1 клональної клітини клону R143-1 (DRB1*14:03/15:02, DPB1*02:01/03:01)

20 Продукування IFN-γ в клон R143-1 детектували шляхом стимуляції з WT1-332-стимульованими DRB1*14:03 (+) B-LCL (HEV#0052) (фіг. 3). Отже, клон R132-1 був показаний як такий, що є WT1-332-специфічним HLA-DRB1*14:03-рестрикованим Th1 клоном.

[0082]

25 (iv) Аналіз HLA-рестрикції Th1 клональної клітини клону R145-2 (DRB1*04:05/14:05, DPB1*05:01)

Продукування IFN-γ в клон R145-2 детектували шляхом стимуляції з WT1-332-стимульованими DRB1*14:05(+) B-LCL (ISH5) (фіг. 4). Отже, клон R145-2 був показаний як такий, що є WT1-332-специфічним HLA-DRB1*14:05-рестрикованим Th1 клоном.

[0083]

30 (v) Аналіз HLA-рестрикції клональної клітини Th1 клону Q32-1 (DRB1*08:02/14:03, DPB1*02:01, DQB1*03:01/03:02)

Продукування IFN-γ в клон Q32-1 детектували за допомогою стимуляції з WT1-332-стимульованих DQB1*03:02(+) B-LCL (HEV#0052 і HEV#0238) (фіг. 5). Отже, клон Q32-1 був показаний як такий, що є WT1-332-специфічним HLA-DQB1*03:02-рестрикованим Th1 клоном.

35 (vi) Аналіз HLA-рестрикції клональної клітини Th1 клону Q41-1 (DRB1*04:05/15:01, DPB1*05:01, DQB1*04:01/06:02)

40 Продукування IFN-γ в клон Q41-1 детектували стимуляцією різними антиген-презентуючими клітинами, стимульованими WT1-332 (HEV#0174, HEV#0013, HEV#0035 і HEV#0050), але не з WT1-332-стимульованими HEV#0201 і HEV#0073 (фіг. 6). DQB1*04:01 експресувалися тільки в HEV#0174, HEV#0013, HEV#0035 і HEV#0050. Отже, клон Q41-1 був показаний як такий, що є WT1-332-специфічним DQB1*04:01-рестрикованим Th1 клоном.

Промислова застосовність

[0085]

45 У даному винаході пропонується спосіб активації хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин за допомогою WT1-пептиду, що має здатність зв'язувати молекулу МНС класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, і їх композицій; фармацевтична композиція для лікування і/або запобігання злоякісному новоутворенню шляхом активації хелперних Т-клітин і/або цитотоксичних Т-клітин, і тому подібне. Таким чином, даний

50 винахід застосовний в галузі фармацевтичних засобів і т. п., наприклад, в галузі розробки і виробництва профілактичних або лікарських засобів для різних пухлин гематопоетичних органів і солідних пухлин, які експресують ген WT1.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.
 Osaka University

<120> СПОСІБ АКТИВАЦІЇ ХЕЛПЕРНОЇ Т-КЛІТИНИ

<130> 671805

<150> JP 2012-274494
 <151> 2012-12-17

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

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

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
 20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
 35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
 85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
 100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
 115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
 165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445

Leu

<210> 2
 <211> 16
 <212> Білок
 <213> Штучний
 <220>
 <223> Синтетичний пептид
 <400> 2

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Композиція для використання в активації хелперних Т-клітин у суб'єкта, де вказана композиція включає пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор,
 - а) пептид довжиною 16-21 амінокислот, який містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); або
 - б) пептид згідно з (а), в якому амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 2 має заміну, делецію або вставку однієї амінокислоти і має здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, де пептид WT1 являє собою:
2. Композиція для використання в активації цитотоксичних Т-клітин у суб'єкта, де вказана композиція включає пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, або клітини, що містять експресуючий вектор, де вказану композицію вводять суб'єкту, що має молекулу МНС класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, де пептид WT1 являє собою: (а) пептид довжиною 16-21 амінокислот, який містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); або
- б) пептид згідно з (а), в якому амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 2 має заміну, делецію або вставку однієї амінокислоти і має здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01; і, де вказані хелперні Т-клітини належать суб'єкту, вибраному з суб'єкта, позитивного по молекулі HLA-DRB1*08:02, суб'єкта, позитивного по молекулі HLA-DRB1*13:02, суб'єкта, позитивного по молекулі HLA-DRB1*14:03, суб'єкта, позитивного по молекулі HLA-DRB1*14:05, суб'єкта, позитивного по молекулі HLA-DQB1*03:02, і суб'єкта, позитивного по молекулі HLA-DQB1*04:01.
3. Композиція для використання в лікуванні або запобіганні злоякісному новоутворенню у суб'єкта, де вказана композиція містить пептид WT1, полінуклеотид, що кодує пептид WT1, експресуючий вектор, що містить полінуклеотид, або клітини, що містять експресуючий вектор, де композицію вводять суб'єкту, що має молекулу МНС класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, де пептид WT1 являє собою:
 - а) пептид довжиною 16-21 амінокислот, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); або
 - б) пептид згідно з (а), в якому амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 2 має заміну, делецію або вставку однієї амінокислоти і має здатність зв'язуватися з молекулою МНС класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01.
4. Композиція за будь-яким із пп. 1-3, яка **відрізняється** тим, що вказана композиція містить пептид WT1.
5. Композиція за будь-яким із пп. 1-4, в якій пептид WT1 являє собою пептид, що складається по суті з амінокислотної послідовності: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).
6. Антигенпрезентуючі клітини, які презентують комплекс антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою МНС класу II, де молекула МНС класу II являє собою молекулу МНС класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, де пептид WT1 являє собою:
 - а) пептид довжиною 16-21 амінокислот, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2), або

(b) пептид згідно з (a), в якому амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 2 має заміну, делецію або вставку однієї амінокислоти і має здатність зв'язуватися з молекулою MHC класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01.

5 7. Антигенпрезентуючі клітини за п. 6, де пептид WT1 являє собою пептид, який складається по суті з амінокислотної послідовності: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

8. Хелперні Т-клітини, які розпізнають комплекс антигенного пептиду, що містить пептид WT1, з молекулою MHC класу II, де молекула MHC класу II являє собою молекулу MHC класу II, вибрану з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01, і, де пептид WT1 являє собою:

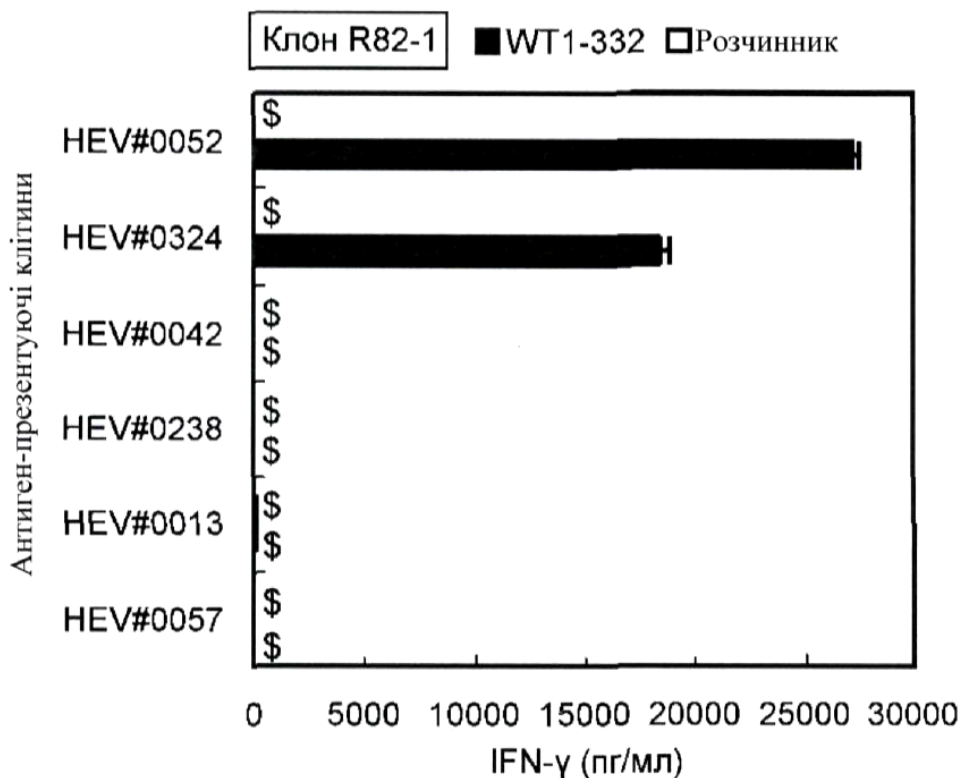
(a) пептид довжиною 16-21 амінокислот, що містить амінокислотну послідовність; Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2); або

15 (b) пептид згідно з (a), в якому амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 2 має заміну, делецію або вставку однієї амінокислоти і має здатність зв'язуватися з молекулою MHC класу II, вибраною з молекули HLA-DRB1*08:02, молекули HLA-DRB1*13:02, молекули HLA-DRB1*14:03, молекули HLA-DRB1*14:05, молекули HLA-DQB1*03:02 і молекули HLA-DQB1*04:01.

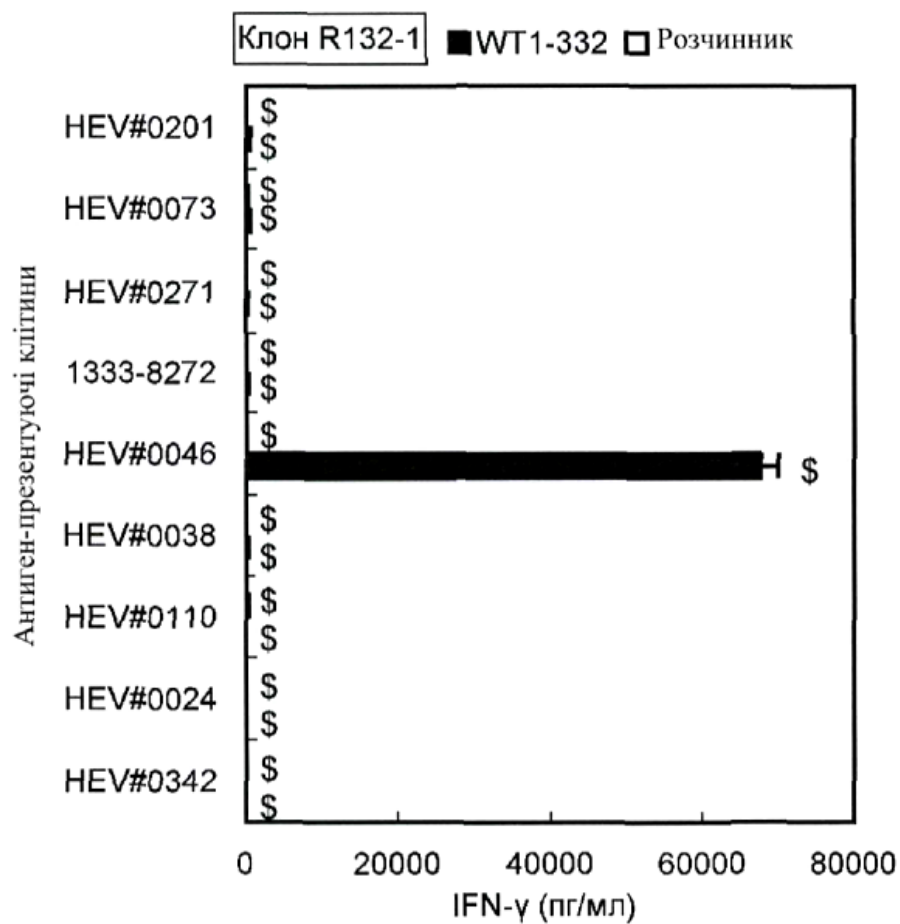
20 9. Хелперні Т-клітини за п. 8, де пептид WT1 являє собою пептид, який складається по суті з амінокислотної послідовності: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

10. Цитотоксичні Т-клітини, які активуються хелперними Т-клітинами за п. 9.

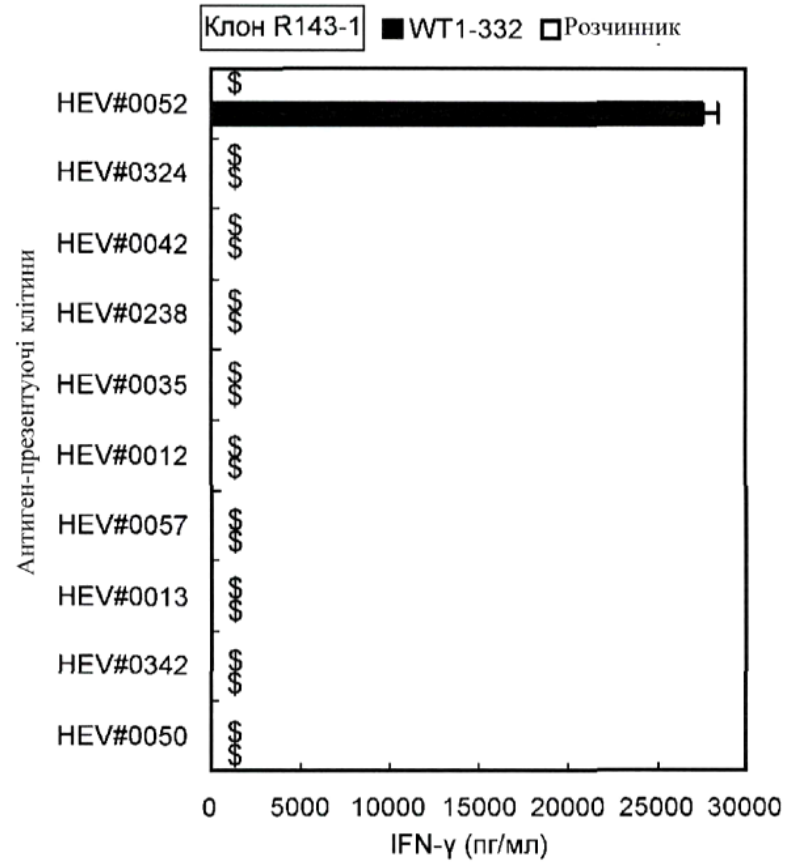
25 11. Фармацевтична композиція для використання в лікуванні або запобіганні злоякісному новоутворенню у суб'єкта, яка містить як активний інгредієнт будь-який компонент з антигенпрезентуючих клітин за п. 6 або 7, хелперних Т-клітин за п. 8 або 9, або цитотоксичних Т-клітин за п. 10.



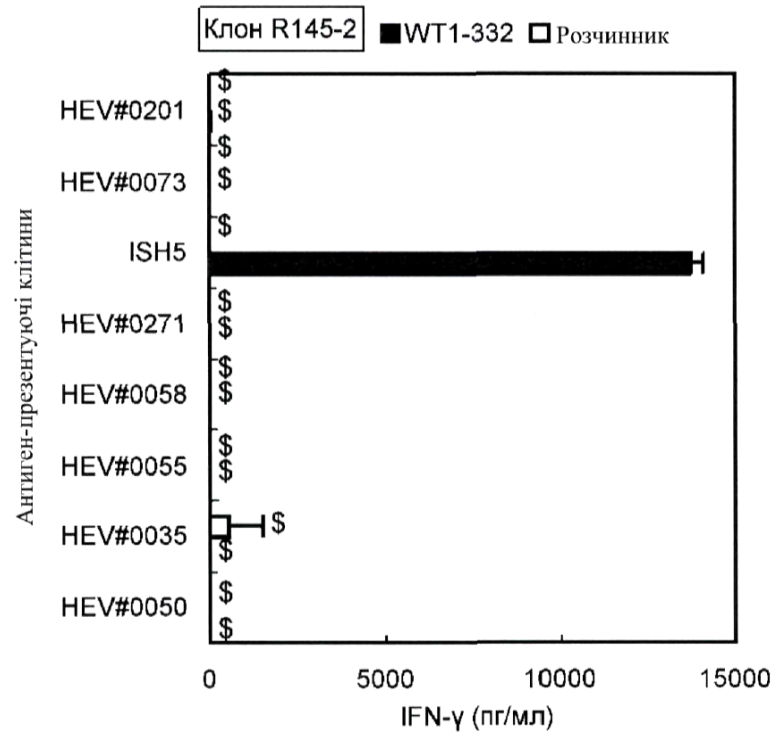
Фіг. 1



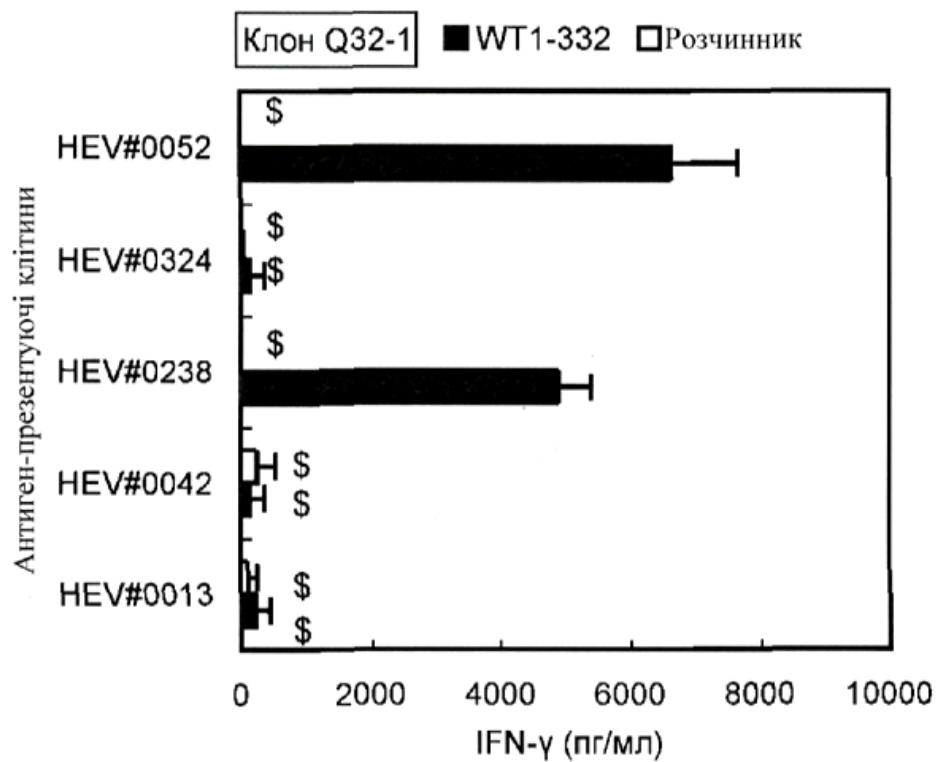
Фіг. 2



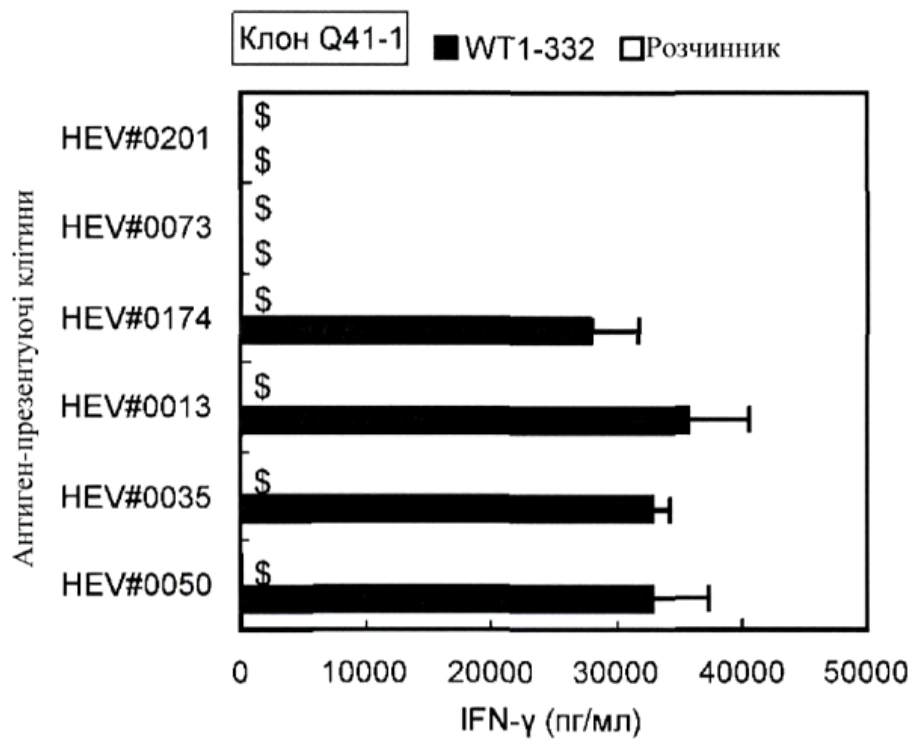
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фіг. 6

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601