

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037547**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.12

(21) Номер заявки
201390509

(22) Дата подачи заявки
2011.10.04

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C12N 5/0784 (2010.01)
C12N 5/0786 (2010.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)

(54) СПОСОБ АКТИВАЦИИ ХЕЛПЕРНЫХ Т-КЛЕТОК

(31) **2010-225806**

(32) **2010.10.05**

(33) **JP**

(43) **2013.08.30**

(86) **PCT/JP2011/072874**

(87) **WO 2012/046730 2012.04.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ИНТЕРНЕШНЛ ИНСТИТЮТ ОФ
КЭНСЕР ИММУНОЛОДЖИ, ИНК.
(JP)**

(72) Изобретатель:
**Сугияма Харуо, Сого Синдзи, Сато
Масайоси, Китамото Рюки, Гото
Йосихиро (JP)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) MAY, R.J., et al., "Peptide epitopes from the Wilms' Tumor 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells" Clin Cancer Res., 2007, Vol.13, No.15, p.4547-4555

WO-A1-2008105462

FUJIKI, F., et al., "A WT1 Protein-derived, naturally processed 16 mer peptide, WT1₃₂₂, is a promiscuous helper peptide for induction of WT1-specific Th1-type CD4+ T cells", Microbiol. Immunol., 2008, Vol.52, p.591-600

LEHE, C., et al., "The Wilms' Tumor antigen is a novel target for human CD4+ regulatory T cells: Implications for immunotherapy", Cancer Res., Vol.68, 2008, p.6350-6359

WO-A1-2005045027

KNIGHTS, A.J., et al., "Prediction of an HLA-DR-binding peptide derived from Wilms' tumor 1 protein and demonstration of in vitro immunogenicity of WT1(1240138)-pulsed dendritic cells generated according to an optimized protocol", Cancer Immunol. Immunother., Vol.51, 2002, p.271-281

MULLER, L., et al., "Synthetic peptides derived from the Wilms' tumor 1 protein sensitize human T lymphocytes to recognize chronic myelogenous leukemia cells", Hematol.J., Vol. 4, 2003, p.57-66

WO-A1-2010123065

(57) Настоящее изобретение относится к способу активации хелперных Т-клеток, к фармацевтической композиции для активации хелперных Т-клеток, к антиген-презентирующей клетке, презентующей комплекс антигенного пептида, содержащего пептид WT1 и молекулу МНС класса II, к антиген-презентирующей клетке, которая распознает комплекс антигенного пептида, содержащего пептид WT1 и молекулу МНС класса II, к способу активации цитотоксических Т-клеток, к применению указанной фармацевтической композиции, к способу определения наличия или количества WT1-специфических хелперных Т-клеток у индивида.

B1

037547

**037547
B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу активации хелперных Т-клеток, который предусматривает стадию активации хелперных Т-клеток путем добавления пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам, где пептид WT1 способен связываться с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, композиции для этого, способу активации цитотоксических Т-клеток, индуктору активации цитотоксических Т-клеток (CTL), фармацевтической композиции для лечения и/или профилактики рака активирующими хелперными Т-клетками и/или цитотоксическими Т-клетками и т.п.

Уровень техники

Ген WT1 (ген опухоли Вильмса 1) идентифицировали как этиологический ген опухоли Вильмса, который является раком почки в детстве, и ген кодирует фактор транскрипции, имеющий структуру цинковых пальцев (непатентные документы 1 и 2). Последующие исследования показали, что указанный выше ген служит раковым геном в опухолях гемопоэтических органов или солидных типов рака (непатентные документы 3-6).

Было показано, что цитотоксические Т-клетки (CTL), специфические в отношении пептида, индуцируются стимуляцией мононуклеарных клеток периферической крови *in vitro* с использованием пептида, имеющего часть аминокислотной последовательности, кодирующей белок WT1, и CTL повреждают раковые клетки опухолей гемопоэтических органов или солидных типов рака, экспрессирующих эндогенно WT1. CTL узнают вышеуказанный пептид в форме комплекса, связанного с молекулой МНС класса I, и, следовательно, этот пептид различается в зависимости от подтипов МНС класса I (патентные документы 1-4 и непатентный документ 7).

С другой стороны, наличие хелперных Т-клеток, специфических в отношении ракового антигена, является важным для эффективного индуцирования CTL (непатентный документ 8). Хелперные Т-клетки индуцируются и активируются распознаванием комплекса молекулы МНС класса II с антигенным пептидом и антиген-презентирующими клетками. Активированные хелперные Т-клетки способствуют пролиферации, дифференцировке и созреванию В-клеток путем продукции цитокинов, таких как IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 или интерфероны. Поскольку такие хелперные Т-клетки имеют функцию активации иммунной системы стимуляцией пролиферации и активации В-клеток и Т-клеток, предполагается, что усиление функции хелперных Т-клеток посредством МНС-класса II-связывающего антигенного пептида в противораковой иммунотерапии является полезным для усиления действий противораковой вакцины (непатентный документ 9).

Недавно было показано, что случайный хелперный пептид, который может связывать многочисленные молекулы МНС класса II и активировать хелперные Т-клетки, присутствует среди конкретных пептидов, имеющих часть аминокислотной последовательности, кодирующей белок WT1 (далее также называемых пептидами WT1 в настоящем описании) (патентные документы 5 и 6). Однако было очень трудно подтвердить, воздействуют или нет пептиды WT1 на другие молекулы МНС класса II вследствие многих типов молекул МНС класса II.

Документы уровня техники

Патентные документы.

Патентный документ 1: международная публикация № WO 2003/106682.

Патентный документ 2: международная публикация № WO 2005/095598.

Патентный документ 3: международная публикация № WO 2007/097358.

Патентный документ 4: международная публикация № PCT/JP2007/074146.

Патентный документ 5: международная публикация № WO 2005/045027.

Патентный документ 6: международная публикация № WO 2008/105462.

Непатентные документы.

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

Непатентный документ 2: Call KM et al., Cell. 1990 Feb 9; 509-20.

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

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

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

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

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

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

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

Описание изобретения

Задачи, решаемые настоящим изобретением

Таким образом, задачей, которая должна быть решена благодаря настоящему изобретению, является-

ся способ активации хелперных Т-клеток, способ активации цитотоксических Т-клеток посредством применения конкретного пептида WT1 к широкому диапазону молекул МНС класса II-положительных индивидов, индуктора активации цитотоксических Т-клеток, фармацевтической композиции для лечения/профилактики рака и т.п.

Средства для решения этой задачи

В этих обстоятельствах авторы настоящего изобретения провели интенсивные исследования и обнаружили, что пептид, имеющий аминокислотную последовательность Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His, связывается с молекулой HLA-DRB1*0101, молекулой HLA-DRB1*0401, молекулой HLA-DRB1*0403, молекулой HLA-DRB1*0406, молекулой HLA-DRB1*0803, молекулой HLA-DRB1*0901, молекулой HLA-DRB1*1101, молекулой HLA-DRB3*0202, молекулой HLA-DRB4*0101, молекулой HLA-DRB1*1501, молекулой HLA-DRB1*0405, молекулой HLA-DRB1*1502, молекулой HLA-DPB1*0501, молекулой HLA-DPB1*0901, молекулой HLA-DPB1*0201 и молекулой HLA-DPB1*0301 и активирует хелперные Т-клетки и/или цитотоксические Т-клетки. Таким образом, настоящее изобретение было завершено.

Настоящее изобретение представляет следующее.

(1) Способ активации хелперных Т-клеток, который предусматривает стадию активации хелперных клеток путем добавления пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам, где пептид WT1 способен связываться с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

(2) Способ по (1), где пептид WT1 способен связываться по меньшей мере с двумя молекулами МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

(3) Способ по (1) или (2), где пептид WT1 дополнительно способен связываться с молекулой HLA-DRB1*0405, молекулой HLA-DRB1*1501, молекулой HLA-DRB1*1502, молекулой HLA-DPB1*0501 и/или молекулой HLA-DPB1*0901.

(4) Способ по любому из (1)-(3), где добавление пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам проводят путем добавления пептида WT1, полинуклеотида, кодирующего пептид WT1, вектора экспрессии, содержащего полипептид, или клеток, содержащих вектор экспрессии.

(5) Способ по любому из пп.(1)-(4), где пептидом WT1 является пептид, содержащий аминокислотную последовательность: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2), ее вариант или модификацию.

(6) Композиция пептида WT1 для активации хелперных Т-клеток путем добавления пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам, где пептид WT1 способен связываться с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

(7) Композиция по (6), где пептид WT1 способен связываться по меньшей мере с двумя молекулами МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 и молекулы HLA-DPB1*0301.

(8) Композиция по (6) или (7), где пептид WT1 дополнительно способен связываться с молекулой HLA-DRB1*0405, молекулой HLA-DRB1*1501, молекулой HLA-DRB1*1502, молекулой HLA-DRB1*0501 и/или молекулой HLA-DRB1*0901.

(9) Композиция по любому из (6)-(8), где это добавление пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам проводят путем добавления пептида WT1, полинуклеотида, кодирующего пептид WT1, вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, или клеток, содержащих вектор экспрессии.

(10) Композиция по любому из (6)-(9), где пептидом WT1 является пептид, содержащий аминокислотную последовательность Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2), ее вариант или модификацию.

(11) Антиген-презентирующие клетки, которые презентуют комплекс антигенного пептида, содержащего пептид WT1, с молекулой МНС класса II, где молекула МНС класса II является любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

(12) Хелперные Т-клетки, которые распознают комплекс антигенного пептида, содержащего пептид

WT1, с молекулой МНС класса II, где молекула МНС класса II является любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

(13) Цитотоксические Т-клетки, которые активируются хелперными Т-клетками, по п.11.

(14) Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики рака, содержащая в качестве активного ингредиента любую композицию по любому из (6)-(10), антиген-презентирующие клетки по (11), хелперные Т-клетки по (12) или цитотоксические Т-клетки по (13).

(15) Фармацевтическая композиция для активации цитотоксических Т-клеток, содержащая в качестве активного ингредиента любой пептид WT1, полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, или клетки, содержащие вектор экспрессии, которую вводят индивиду, имеющему любую молекулу МНС класса II из молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201, молекулы HLA-DPB1*0301, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202 или молекулы HLA-DRB4*0101.

(16) Антитело, специфически связывающееся с пептидом WT1, где пептид WT1 способен связываться с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

(17) Способ определения присутствия или количества WT1-специфических хелперных Т-клеток у индивида, положительного в отношении любой молекулы МНС класса II, из молекулы HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0403, HLA-DRB1*0406, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB3*0202, HLA-DRB4*0101, HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, причем способ включает стадии:

(а) стимуляция образца, полученного от индивида с использованием пептида WT1,

(б) определение присутствия или количества цитокинов или хелперных Т-клеток, где увеличение присутствия или количества цитокинов или хелперных Т-клеток показывает присутствие или количество WT1-специфических хелперных Т-клеток.

Результаты изобретения

Согласно настоящему изобретению способ активации хелперных Т-клеток, композицию для него, способ активации цитотоксических Т-клеток, композицию для него, индуктор активации цитотоксических Т-клеток, фармацевтическую композицию для лечения и/или профилактики рака активацией хелперных Т-клеток и цитотоксических Т-клеток и т.п. получают применением пептида WT1 к широкому диапазону индивидов, имеющих любую молекулу МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, делая возможным активацию хелперных Т-клеток и цитотоксических Т-клеток *in vivo* и *in vitro* у индивидов, имеющих такую молекулу МНС класса II, и лечение и профилактика рака и т.п.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлены результаты, полученные путем измерения количества IFN- γ после сокультивирования Т-клеток, индуцированных PBMC, полученными из донора 1 (HLA-DRB1*0406/1201-, DRB3*0101-, DRB*0103-положительного), с PBMC, полученными из различных доноров, импульсно обработанных WT1-332. На этой фигуре ордината обозначает количество IFN- γ (пг/мл) в жидкости супернатанта после сокультивирования. На этой фигуре абсцисса обозначает типы HLA-DRB1*, 3 и 4 молекулы которых являются положительными в различных донорах.

На фиг. 2 представлены результаты, полученные путем измерения количества IFN- γ после сокультивирования Т-клеток, индуцированных PBMC, полученными от донора 2 (HLA-DRB1*0901/1101-, DRB3*0202-, DRB4*0103-положительного), с PBMC, полученными из различных доноров, импульсно обработанных WT1-332. На этой фигуре ордината обозначает количество IFN- γ (пг/мл) в жидкости супернатанта после сокультивирования. Абсцисса обозначает типы HLA-DRB1*, 3 и 4 молекулы которых являются положительными в различных донорах.

На фиг. 3 показаны результаты, полученные путем измерения количества IFN- γ после сокультивирования Т-клеток, индуцированных PBMC, полученными от донора 3 (HLA-DRB1*0401/0405- и DRB4*0102/0103-положительного), с PBMC, полученными из различных доноров, импульсно обрабо-

танных WT1-332. На этой фигуре ордината обозначает количество IFN- γ (пг/мл) в жидкости супернатанта после сокультивирования. Абсцисса обозначает типы HLA-DRB1, и 4 молекулы которых являются положительными в различных донорах.

На фиг. 4 показаны результаты, полученные путем измерения количества IFN- γ после сокультивирования Т-клеток, индуцированных PBMC, полученными от донора 4 (HLA-DRB1*0901/1101-, DRB3*0202- и DRB4*0103-положительного), с PBMC, полученными из различных доноров, импульсно обработанных WT1-332. На этой фигуре ордината обозначает количество IFN- γ (пг/мл) в жидкости супернатанта после сокультивирования. Абсцисса обозначает типы HLA-DRB1*, 3 и 4 молекулы которых являются положительными в различных донорах.

На фиг. 5 показано, что мономерные белки HLA-класса II (DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*1501, DRB1*1502, DRB1*0803, DRB1*901 и DRB4*0101) были специфически ассоциированы с различными пептидами. На этой фигуре ордината обозначает степень смещения времени удерживания (минуты). Абсцисса обозначает типы мономерных белков HLA-класса II. Кроме того, столбцы диаграмм показывают типы добавленных пептидов (слева-направо, отрицательный контроль ($\square$), положительный контроль ($\blacksquare$) и WT1-332 (заштрихованный $\square$)).

На фиг. 6 показано, что WT1-332-специфические Th1 (соотношение CD4-положительные клетки/внутриклеточные IFN- γ -положительные клетки) увеличиваются зависимым от времени образом и значимо, когда Т-клетки, индуцируемые из PBMC, полученных из крови здоровых доноров (в целом 42 донора, имеющих по меньшей мере один из HLA-DRB1*1501, 1502, 0405, HLA-DPB1*0501 и 0901) стимулировались WT1-332. На этой фигуре ордината обозначает соотношение (%) число CD4-положительных клеток/число внутриклеточных IFN- γ -положительных клеток в живых клетках, а абсцисса обозначает дни культивирования (дни). Кроме того, символ " $\bullet$ " обозначает соотношение в образцах, индуцированных добавлением WT1-332 (группа индуцирования WT1-332) и символ " $\circ$ " обозначает соотношение в образцах, индуцированных добавлением растворителя (контроля) (группа индуцирования растворителем).

На фиг. 7 показано, что число WT1-332-специфических CTL-клеток (соотношение CD8-положительные клетки/IFN- γ -положительные клетки) увеличивается зависимым от времени образом и значимо, когда Т-клетки, индуцируемые из PBMC, полученных из крови здоровых доноров (в целом 42 доноров, имеющих по меньшей мере один из HLA-DRB1*1501, 1502, 0405, HLA-DRB1*0501 и 0901), стимулировались WT1-332. На этой фигуре ордината обозначает соотношение (%) число CD8-положительных клеток/число внутриклеточных IFN- γ -положительных клеток в живых клетках, а абсцисса обозначает дни культивирования (дни). Кроме того, символ " $\bullet$ " обозначает соотношение в образцах, индуцированных добавлением WT1-332 (группа индуцирования WT1-332) и символ " $\circ$ " обозначает долю в образцах, индуцированных добавлением растворителя (контроля) (группа индуцирования растворителем).

На фиг. 8 показана HLA-DR-рестриктивность 17 образцов (доноров 21-37), в которых индуцировались WT1-332-специфические Th1, на фиг. 6 и 7. В каждом образце WT1-332-специфическое продуцирование IFN- γ распознавалось, когда Т-клетки в день 14 после индукции добавлением WT1-332 стимулировались WT1-332, и продуцирование IFN- γ ингибировалось, когда клетки культивировали с добавлением антитела против HLA-DR. Это показывает, что эти Т-клетки, индуцированные WT1-332, являются HLA-DR-рестриктированными. На фигуре ордината обозначает число доноров (доноров 21-37), а абсцисса обозначает количество продуцированного IFN- γ (пг/мл). Кроме того, символ " $\blacksquare$ " обозначает количество IFN- γ , продуцируемое после стимуляции WT1-332, символ "заштрихованный $\square$ " обозначает количество IFN- γ , продуцированное после стимуляции WT1-332 + анти-HLA-DR-антитело, и символ " $\square$ " обозначает количество IFN- γ , продуцированное после стимуляции растворителем (контролем).

На фиг. 9 показано, что соотношение количества WT1-332-специфических Th1-клеток (CD4-положительные клетки/внутриклеточные IFN- γ -положительные клетки) увеличивается, когда Т-клетки в день 14 после индукции путем добавления WT1-332 стимулируются WT1-332 в каждом из 17 образцов (доноры 21-37), имеющих индуцированные HLA-DR-рестриктивные WT1-332-специфические Th1, на фиг. 6 и 7. На фигуре ордината обозначает количество доноров (доноров 21-37), а абсцисса обозначает соотношение (%) количество CD4-положительных клеток/число внутриклеточных IFN- γ -положительных клеток в живых клетках. Кроме того, символ " $\blacksquare$ " обозначает соотношение после стимуляции WT1-332, а символ " $\square$ " обозначает соотношение после стимуляции растворителем (контролем).

На фиг. 10 показано, что соотношение количества WT1-332-специфических CTL-клеток (соотношение CD8-положительные клетки/внутриклеточные IFN- γ -положительные клетки) увеличивается, когда Т-клетки на день 14 после индукции добавлением WT1-332 стимулируются WT1-332 в каждом из 17 образцов (доноров 21-37), имеющих индуцированные HLA-DR-рестриктивные WT1-332-специфические Th1, на фиг. 6 и 7. На фигуре ордината обозначает количество доноров (доноры 21-37), а абсцисса обозначает соотношение (%) количество CD8-положительных клеток/число внутриклеточных IFN- γ -положительных клеток в живых клетках. Также символ " $\blacksquare$ " обозначает соотношение после стимуляции

WT1-332, а символ "□" обозначает соотношение после стимуляции растворителем (контролем).

На фиг. 11 показана HLA-DR-рестриктивность 9 образцов (доноров 38-46), в которых индуцировались WT1-332-специфические Th1, на фиг. 6 и 7. В каждом образце WT1-332-специфическое продуцирование IFN-γ распознавалось, когда Т-клетки в день 14 после индукции добавлением WT1-332 стимулировались WT1-332, и продуцирование IFN-γ не ингибировалось, когда клетки культивировали с добавлением анти-HLA-DR-антитела, а также когда клетки культивировали с добавлением анти-HLA-DQ-антитела. Это показывает, что Т-клетки, индуцированные WT1-332, являются HLA-DP-рестриктивными. На фигуре ордината обозначает количество доноров (доноры 38-46), а абсцисса обозначает количество продуцированного IFN-γ (пг/мл). Кроме того, символ "■" обозначает количество IFN-γ, продуцированное после стимуляции WT1-332, символ "заштрихованный □" обозначает количество IFN-γ, продуцированное после стимуляции WT1-332 + анти-HLA-DR-антитела, и символ "прерывисто заштрихованный □" обозначает количество IFN-γ, продуцированное после стимуляции WT1-332 + анти-HLA-DQ-антитела, а символ "□" обозначает количество IFN-γ, продуцированное после стимуляции растворителем (контролем).

На фиг. 12 показано, что соотношение количества WT1-332-специфических Th1-клеток (CD4-положительные клетки/внутриклеточные IFN-γ-положительные клетки) увеличивается, когда Т-клетки в день 14 после индукции добавлением WT1-332 стимулируются WT1-332 в каждом из 9 образцов (доноров 38-46), имеющих индуцированные HLA-DP-рестриктивные WT1-332-специфические Th1, на фиг. 6 и 7. На этой фигуре, ордината обозначает количество доноров (доноров 38-46), а абсцисса обозначает соотношение (%): количество CD4-положительных клеток/количество внутриклеточных IFN-γ-положительных клеток в живых клетках. Кроме того, символ "■" обозначает соотношение после стимуляции WT1-332, а символ "□" обозначает соотношение после стимуляции растворителем (контролем).

На фиг. 13 показано, что это соотношение количества WT1-332-специфических CTL-клеток (CD8-положительные клетки/внутриклеточные IFN-γ-положительные клетки) увеличивается, когда Т-клетки в день 14 после индукции добавлением WT1-332 стимулируются WT1-332 в каждом из 9 образцов (доноров 38-46), имеющих HLA-DP-рестриктивные WT1-332-специфические Th1, индуцированные на фиг. 6 и 7. На фигуре, ордината обозначает количество доноров (доноров 38-46), а абсцисса обозначает соотношение (%): количество CD8-положительных клеток/количество внутриклеточных IFN-γ-положительных клеток в живых клетках. Кроме того, символ "■" обозначает соотношение после стимуляции WT1-332, а символ "□" обозначает соотношение после стимуляции растворителем (контролем).

Способы проведения изобретения

В одном из аспектов, изобретение относится к способу активации хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток, который предусматривает стадию активации хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток путем добавления пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам, где пептид WT1 способен связываться с молекулой МНС класса II. В настоящем изобретении стадия активации цитотоксических Т-клеток может проводиться прохождением через стадию активации хелперных Т-клеток. Кроме того, пептид WT1, используемый в настоящем изобретении, является пептидом, способным связываться с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301. Кроме того, пептид WT1, используемый в настоящем изобретении, может быть пептидом, имеющим способность связывания по меньшей мере с двумя или более молекулами МНС класса II из вышеописанных молекул МНС класса II. Кроме того, пептид WT1, используемый в настоящем изобретении, может иметь способность связываться с любой молекулой МНС класса II, например с молекулами HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP.

В настоящем изобретении пептид WT1 может быть пептидом, имеющим часть аминокислотной последовательности белка WT1 человека, изображенного в SEQ ID NO:1. Пептид по настоящему изобретению не имеет конкретного ограничения в его аминокислотной последовательности и длине, пока пептид имеет вышеуказанный признак. Однако слишком длинный пептид является чувствительным к действию протеазы, а слишком короткий пептид не может связываться с пептидом, занимающим углубленную лунку. Длина пептида в соответствии с настоящим изобретением является длиной предпочтительно из 10-25 аминокислот, более предпочтительно 15-21 аминокислот, наиболее предпочтительно 16-20 аминокислот, например 16, 17, 18 или 19 аминокислот. Конкретными примерами пептида по настоящему изобретению являются пептиды, содержащие аминокислотную последовательность: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

Кроме того, пептид WT1, используемый в настоящем изобретении, включает варианты вышеописанного пептида. Варианты могут содержать, например, пептид, выбранный из группы, состоящей из пептидов, имеющих аминокислотную последовательность, в которой несколько аминокислот, например

1-9, предпочтительно 1-5, 1-4, 1-3, более предпочтительно 1-2 аминокислоты, дополнительно предпочтительно одна аминокислота в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, являются замененными, делетированными или добавленными. Замена аминокислот в пептидах может проводиться в любых положениях и с любыми типами аминокислот, и предпочтительной является консервативная аминокислотная замена. Примеры консервативной аминокислотной замены включают замену остатка Glu остатком Asp, остатка Phe остатком Tyr, остатка Leu остатком Ile, остатка Ala остатком Ser, остатка His остатком Arg и т.п. Предпочтительно добавление или делетирование аминокислот может проводиться в N-конце и C-конце в пептидах, но может проводиться во внутренней последовательности. Предпочтительные конкретные примеры пептидов по настоящему изобретению являются пептиды, имеющие SEQ ID NO: 2. В этой связи любые из вышеупомянутых пептидов должны иметь способность связываться с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301 и должны активировать хелперные Т-клетки или цитотоксические Т-клетки (в настоящем изобретении называемые также CTL). В настоящей заявке вышеуказанный пептид WT1 также называют "WT1-332". Кроме того, молекулы МНС человека обычно называют HLA-молекулами, и, следовательно, МНС используется в настоящем изобретении в качестве синонима HLA.

Кроме того, пептиды по настоящему изобретению могут быть пептидами, полученными модификацией вышеуказанной аминокислотной последовательности. Аминокислотные остатки в вышеуказанной аминокислотной последовательности могут быть модифицированы известным способом. Такой модификацией может быть, например, эстерификация, алкилирование, галогенирование, фосфорилирование и т.п. на функциональной группе в боковой цепи аминокислотного остатка. Кроме того, можно связывать различные вещества с N-концом и/или C-концом пептида, содержащего указанную выше аминокислотную последовательность. Например, аминокислота, пептид, его аналог и т.п. могут быть связаны с этим пептидом. Например, может быть добавлена гистидиновая метка или может быть образован слитый белок вместе с таким белком как тиоредоксин. Альтернативно детектируемая метка может быть связана с пептидом WT1. В случае когда эти вещества связаны с пептидом по настоящему изобретению, они могут быть обработаны, например, ферментом *in vivo* и т.п. или таким способом как внутриклеточный процессинг, для конечного генерирования пептида, состоящего из вышеуказанной аминокислотной последовательности, которая презентуется на клеточной поверхности в виде комплекса с молекулой МНС класса II, с получением посредством этого индукционного действия хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток. Эти вещества могут быть веществами, регулирующими растворимость пептида в соответствии с настоящим изобретением, веществами, улучшающими стабильность пептида, например, устойчивость к протеазам, веществами, позволяющими специфическую доставку пептида по настоящему изобретению, например, к конкретным тканям или органам, или веществами, имеющими усиленное действие эффективности поглощения антиген-презентирующих клеток или другое действие. Кроме того, эти вещества могут быть веществами, увеличивающими способность индуцировать CTL, например хелперными пептидами, другими, чем пептид по настоящему изобретению.

Пептид WT1, используемый в настоящем изобретении, может быть синтезирован способом, обычно используемым в данной области, или его модифицированным способом. Такой способ синтеза описан, например, 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 Medicine (continuation), Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten Co., 1991 и т.п. Кроме того, пептиды, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены способом генетической инженерии на основе информации нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид. Такой способ генетической инженерии хорошо известен специалистам в данной области. Такой способ может выполняться в соответствии со способами, описанными в литературе (Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983); DNA Cloning, DM, Glover, IRL PRESS (1985)).

Настоящее изобретение относится также к полинуклеотидной последовательности, кодирующей пептид WT1, описанный выше. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая пептид WT1, может быть ДНК-последовательностью или РНК-последовательностью. В настоящем изобретении такая полинуклеотидная последовательность может быть использована вместо пептида WT1. Такая полинуклеотидная последовательность может быть использована интегрированием в подходящий вектор. Вектор включает плазмиды, фаговые векторы, вирусные векторы и т.п., например pUC118, pUC119, pBR322, pCR3, pYES2, pYEUra3, pPCR, pCDM8, pGL2, pcDNA3.1, pRc/RSV, pRc/CMV, pAcSGHisNT-A, λ ZAPII, λ gt11 и т.п. Вектор может содержать, если необходимо, такие факторы как индуцирующий экспрессию промотор, ген, кодирующий сигнальную последовательность, маркерный ген для селекции и терминатор. Способ введения этих генов в клетки или живые организмы, способ экспрессии их и т.п. известны специалистам в данной области.

Антиген-презентирующие клетки, используемые в настоящем изобретении, являются клетками, которые могут презентировать антигенный пептид, содержащий вышеописанный пептид WT1, вместе с молекулой МНС класса II в хелперные Т-клетки, и обозначают, например, дендритные клетки, мононуклеарные клетки периферической крови и т.п. Таким образом, индивиды, от которых получают антиген-презентирующие клетки, используемые в настоящем изобретении, должны иметь ту же самую молекулу, что и молекула МНС класса II, с которой может связываться добавляемый пептид WT1 (например, любые одну или несколько молекул МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекул HLA-DPB1*0201, молекулы HLA-DPB1*0301 и т.д.).

В настоящем изобретении добавление пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам может проводиться непосредственно путем добавления пептида WT1 или опосредованно путем добавления полинуклеотида, кодирующего пептид WT1, или вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, или путем добавления клеток, содержащих вектор экспрессии. Описанное выше добавление может проводиться способом, известным в данной области. Вышеупомянутый полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, и клетки, содержащие вектор экспрессии, могут быть получены способом, хорошо известным специалистам в данной области. Конкретно полинуклеотид, используемый в данной области, может быть определен на основе аминокислотной последовательности вышеупомянутого пептида WT1 (например, аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 2). Вышеупомянутый полинуклеотид может быть получен, например, синтезом ДНК или РНК, ПЦР-способом и т.п. Кроме того, типы векторов экспрессии, содержащих вышеупомянутый полинуклеотид, последовательности, содержащиеся в дополнение к вышеупомянутой полинуклеотидной последовательности и т.п., могут быть выбраны должным образом в зависимости от целей, типов и т.п. хозяев, в которые вводят векторы экспрессии. Векторы экспрессии включают плазмиды, фаговые векторы, вирусные векторы и т.п. Клетки, содержащие вектор экспрессии, могут быть получены, например, трансформацией клеток-хозяев. Клетки-хозяева включают клетки *Escherichia coli*, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки животных и т.п. Способом трансформации клеток-хозяев может быть общепринятый способ, и может быть использован, например, кальций-фосфатный способ, DEAE-декстран способ, способ электропорации и липид для переноса гена.

Обычно хелперные Т-клетки активируются, когда комплекс TCR-CD3 на поверхности Т-клеток распознает антигенный пептид посредством молекулы МНС класса II на поверхности антиген-презентирующих клеток, и интегрин на Т-клеточной поверхности стимулируется лигандом интегрина на поверхности антиген-презентирующих клеток. Активация хелперных Т-клеток в настоящем описании включает не только активацию хелперных Т-клеток, но также индуцирование и пролиферацию хелперных Т-клеток. Хелперные Т-клетки, активируемые в настоящем изобретении, могут быть также недифференцированными Т-клетками (например, наивными Т-клетками) и т.п. Активированные хелперные Т-клетки имеют функцию, которая активирует иммунную систему стимуляцией индукции, пролиферации и активации В-клеток и цитотоксических Т-клеток. Таким образом, способ по настоящему изобретению может быть использован в качестве адъювантной (вспомогательной) терапии для лечения злокачественного новообразования и т.п. Хелперные Т-клетки, активированные *in vitro* способом по настоящему изобретению, могут быть также использованы для лечения или профилактики рака и т.п., или в качестве адъювантного (вспомогательного) средства для этого. Активация хелперных Т-клеток может оцениваться, например, измерением продуцирования или секреции цитокинов, таких как интерфероны (например, интерферон- γ и т.п.) и интерлейкины.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции для активации хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток путем добавления пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам. В настоящем изобретении активация цитотоксических Т-клеток может проводиться прохождением через активацию хелперных Т-клеток. Хотя пептид WT1, полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, вектор, содержащий полинуклеотид, и клетки, содержащие вектор, могут быть иллюстрированы в композиции по настоящему изобретению, могут быть использованы любые молекулы, при условии, что они являются факторами, способными презентировать пептид WT1 в качестве антигенного пептида на поверхности антиген-презентирующих клеток. Эти факторы могут быть получены способом, хорошо известным специалистам в данной области, как описано выше.

Пептид WT1, используемый в настоящем изобретении, способен связываться с любой из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, как описано выше. Также пептид WT1, используемый в настоящем изобретении, может быть также способен связываться по меньшей мере с одной или несколь-

кими молекулами МНС класса II указанных выше молекул МНС класса II. Кроме того, пептид WT1, используемый в настоящем изобретении, может быть также способен связываться с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DR, HLA-DQ или HLA-DP.

При введении композиции по настоящему изобретению индивиду, имеющему любую одну или несколько молекул МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, иммунная система активируется активацией хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток у индивида. Ген WT1 также высоко экспрессируется в различных злокачественных новообразованиях и опухолях, например в злокачественном заболевании кроветворной системы (гемобластозе), таком как лейкоз, миелодиспластический синдром, множественная миелома и злокачественная лимфома, а также в солидных раках, таких как рак желудка, рак пищеварительного тракта, рак легкого, рак молочной железы, рак половых клеток, рак печени, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак матки, рак шейки матки и рак яичника, и, следовательно, композиция по настоящему изобретению может быть использована в качестве адъювантного средства для лечения или профилактики рака. Альтернативно хелперные Т-клетки, цитотоксические Т-клетки и т.п., которые активируются с использованием композиции по настоящему изобретению, могут быть использованы, например, в качестве адъювантного средства для лечения вышеупомянутых типов рака.

Кроме вышеупомянутых пептида WT1, полинуклеотида, кодирующего пептид WT1, вектора, содержащего полинуклеотид, и клеток, содержащих вектор, композиция по настоящему изобретению может содержать, например, носитель, эксципиент, добавку и т.п. Вышеупомянутый пептид WT1 и т.п., содержащиеся в композиции по настоящему изобретению, активируют хелперные Т-клетки и/или цитотоксические Т-клетки WT1-пептид-специфическим образом, и, следовательно, композиции могут содержать известный МНС-класс I-рестриктивный пептид WT1 или могут применяться вместе с таким пептидом.

Способ применения композиции по настоящему изобретению может быть выбран должным образом в зависимости от таких условий как желаемая степень активации хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток и состояние антиген-презентирующих клеток. Способ применения включает, например, введение индивиду посредством интродермального введения, подкожного введения, внутримышечного введения, внутривенного введения, трансназального введения, перорального введения и т.п., или добавление в культуральную жидкость антиген-презентирующих клеток, но без ограничения ими. Количество вышеуказанного пептида WT1 и т.п., содержащегося в композиции по настоящему изобретению, форма композиции, частота применения композиции и т.п. могут быть выбраны должным образом в зависимости от таких условий как желаемая степень активации хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток и состояние антиген-презентирующих клеток.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики рака у индивида, предусматривающему стадию активации хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток путем добавления пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам, где пептид WT1 способен связываться с молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301. Способ по настоящему изобретению активирует иммунную систему у индивида посредством активирования хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток, с лечением или профилактикой посредством этого рака у индивида. В способе по настоящему изобретению стадия активации цитотоксических Т-клеток может проводиться прохождением через стадию активации хелперных Т-клеток. Добавление пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам может проводиться непосредственно путем добавления пептида WT1 или опосредованно добавлением полинуклеотида, кодирующего пептид WT1, или вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, или добавлением клеток, содержащих вектор экспрессии. Вышеуказанный полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, вектора экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, и клетки, содержащие вектор экспрессии, могут быть получены способом, хорошо известным специалистам в данной области, как описано выше. Индивиды, в отношении которых может быть применен способ по настоящему изобретению, являются индивидами, положительными в отношении любой молекулы МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301. Типы рака, в отношении которых может быть применено настоящее изобретение, могут

быть любыми типами рака и включают, например, опухоли гемопоэтических органов, такие как лейкоз, миелодиспластический синдром, множественная миелома и злокачественная лимфома, а также солидные раки, такие как рак желудка, рак пищеварительного тракта, рак легкого, рак молочной железы, рак половых клеток, рак печени, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак матки, рак шейки матки и рак яичника. Способ по настоящему изобретению может быть также использован вместе со способом лечения или профилактики рака с использованием рестриктированного в отношении молекулы МНС класса I пептида WT1 или его фармацевтической композиции.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к применению пептида WT1 для приготовления вышеуказанной композиции, полинуклеотида, кодирующего пептид WT1, вектора, содержащего полинуклеотид, и клеток, содержащих вектор.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему вышеуказанный пептид WT1, полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, вектор, содержащий полинуклеотид, или клетки, содержащие вектор, для активации хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток путем добавления пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам, где пептид WT1 способен связываться с любой молекулой МНС класса II из HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301. Предпочтительно набор используют в вышеуказанном способе для активации хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток. Набор по настоящему изобретению может содержать, например, средство для получения антиген-презентирующих клеток, средство для оценки активности хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток и т.п., наряду с пептидом WT1. Обычно набор сопровождается инструкцией по применению. Можно эффективно активировать хелперные Т-клетки или цитотоксические Т-клетки с использованием набора по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антиген-презентирующим клеткам, которые презентруют комплекс антигенного пептида, содержащего пептид WT1, с молекулой МНС класса II. В этом случае молекула МНС класса II может быть любой молекулой из HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, или может быть по меньшей мере двумя или более молекулами вышеуказанных молекул МНС класса II. Антиген-презентирующие клетки по настоящему изобретению могут быть получены способом, известным специалистам в данной области. Например, они могут быть получены выделением клеток, имеющих антиген-презентирующую способность, из пациента, страдающего злокачественным новообразованием, и затем импульсной обработкой выделенных клеток вышеупомянутым пептидом WT1 (например, пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2), или полинуклеотидом, кодирующим пептид WT1, или введением вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид в клетки, позволяя тем самым комплексу антигенного пептида, содержащему пептид WT1 с молекулой МНС класса II, присутствовать на поверхности клеток (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). В настоящем описании изобретения клетки, имеющие антиген-презентирующую способность, не ограничиваются, пока они экспрессируют молекулу МНС класса II, способную презентировать пептид WT1 на поверхности клеток, и предпочтительными являются мононуклеарные клетки периферической крови или дендритные клетки, имеющие высокую антиген-презентирующую способность. Присутствие антиген-презентирующих клеток по настоящему изобретению подтверждается также увеличением активности цитотоксических Т-клеток, которое подтверждается увеличением количества интерферона- γ , как показано в примерах. Антиген-презентирующие клетки по настоящему изобретению эффективно используются в клеточной терапии (например, терапии с дендритными клетками) в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к хелперным Т-клеткам, которые распознают комплекс антигенного пептида, содержащего пептид WT1, с молекулой МНС класса II. В этом случае молекула МНС класса II может быть любой молекулой из молекулы HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301 или может быть по меньшей мере двумя или более молекулами из вышеуказанных молекул МНС класса II. Хелперные Т-клетки по настоящему изобретению включают, например, клетки, распознающие комплекс антигенного пептида, содержащего пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, мо-

лекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301. Т-хелперные клетки по настоящему изобретению могут быть легко приготовлены и получены специалистами в данной области способом, известным в данной области (Iwata, M. et al., Eur. J. Immunol. 26, 2081 (1996)).

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к цитотоксическим Т-клеткам, которые активируются хелперными Т-клетками, распознающими комплекс антигенного пептида, содержащего пептид WT1, с молекулой МНС класса II. Цитотоксические Т-клетки по настоящему изобретению включают, например, клетки, активированные хелперными Т-клетками, распознающими комплекс антигенного пептида, содержащего пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301. Цитотоксические Т-клетки по настоящему изобретению могут быть легко получены квалифицированными в данной области специалистами с использованием известного способа. Например, их получают выделением лимфоцитов периферической крови от пациента и стимулированием их *in vitro* пептидом (например, пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2), полинуклеотидом, кодирующим пептид или вектором экспрессии, содержащим полинуклеотид (Journal of Experimental Medicine 1999, 190: 1669). Полученные таким образом цитотоксические Т-клетки могут быть использованы в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака и т.п. В "Примерах" по настоящему изобретению активность индукции цитотоксических клеток распознавали введением WT1-332 в образец, полученный от индивида, имеющего определенную молекулу МНС класса. Это показывает, что антиген-презентирующие клетки, которые презентуют комплекс антигенного пептида, содержащего пептид WT1, с молекулой МНС класса II, присутствуют в мононуклеарных клетках периферической крови, и показывает присутствие антиген-презентирующих клеток, которые презентуют комплекс, хелперных Т-клеток, которые специфически распознают их, и цитотоксических Т-клеток, индуцируемых хелперными Т-клетками.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к тетрамеру HLA, имеющему вышеуказанный антигенный пептид, содержащий пептид WT1 и молекулу МНС класса II. Молекула МНС класса II может быть любой молекулой из молекулы HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, или может быть двумя или более молекулами вышеуказанных молекул МНС класса II. В настоящем описании изобретения тетрамер HLA обозначает тетрамеризованный продукт, который получен биотинилированием комплекса (мономера HLA), полученного связыванием белка HLA с пептидом, и затем связыванием этого биотинилированного продукта с авидином. HLA-тетрамеры, содержащие различные антигенные пептиды, являются коммерчески доступными, и можно легко приготовить тетрамер HLA по настоящему изобретению (Science 279: 2103-2106 (1998), Science 274: 94-96 (1996)). Тетрамер по настоящему изобретению является предпочтительно меченым флуоресценцией, так что связанные хелперные Т-клетки и цитотоксические Т-клетки по настоящему изобретению могут быть легко отобраны или детектированы известным способом детектирования, таким как проточная цитометрия и флуоресцентный микроскоп. Тетрамер HLA в настоящем изобретении не ограничивается тетрамером, и можно также использовать мультимер, такой как пентамер и дендример, в случае необходимости. В настоящем описании изобретения мультимер означает мультимерный продукт, который получен связыванием двух или более комплексов (мономеров HLA), полученных ассоциацией белка HLA с пептидом с использованием известного способа.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для активации хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток, которая содержит в качестве активного ингредиента любые из вышеупомянутых композиций, антиген-презентирующих клеток, хелперных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток или тетрамера. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать в качестве активного ингредиента любые один или несколько из вышеупомянутых композиций, антиген-презентирующих клеток, хелперных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток или тетрамера. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть использована для лечения или профилактики злокачественного новообразования. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может применяться к различным типам рака и опухолям, экспрессирующим WT1, например к опухолям гемопоэтических органов, таким как лейкоз, миелодиспластический синдром, множественная миелома и злокачественная лимфома, а также солидным типам рака, таким как рак желудка, рак пищева-

рительного тракта, рак легкого, рак молочной железы, рак половых клеток, рак печени, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак матки, рак шейки матки и рак яичника. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть также использована для введения индивиду, имеющему молекулу МНС класса II, такую как молекула HLA-DRB1*0101, молекула HLA-DRB1*0401, молекула HLA-DRB1*0403, молекула HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекула HLA-DRB1*1101, молекула HLA-DRB3*0202, молекула HLA-DRB4*0101, молекула HLA-DRB1*1501, молекула HLA-DRB1*0405, молекула HLA-DRB1*1502, молекула HLA-DPB1*0501, молекула HLA-DPB1*0901, молекула HLA-DPB1*0201 или молекула HLA-DPB1*0301. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть использована вместе с другим способом для лечения или профилактики рака или фармацевтической композицией для этого. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать активирующее средство, пролиферирующее средство, индуцирующее средство и т.п. хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток или может содержать известный МНС класса I-рестриктированный пептид WT1.

Кроме активного ингредиента, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать, например, носитель, эксципиенты и т.п. Способ введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть выбран должным образом в зависимости от условий, таких как тип заболевания, состояние индивидов и участок-мишень. Способ включает, например, интрадермальное введение, подкожное введение, внутримышечное введение, внутривенное введение, трансназальное введение, пероральное введение и т.п., но не ограничивается ими. Количество вышеуказанного активного ингредиента, содержащееся в этой фармацевтической композиции по настоящему изобретению, лекарственная форма этой композиции, частота введения этой композиции и т.п. могут быть выбраны должным образом в зависимости от таких условий как тип заболевания, состояние индивидов, участок-мишень и т.п.

Еще в одном из аспектов настоящее изобретение относится к способам лечения или профилактики рака, которые включают стадию введения любой из вышеуказанных композиций, антиген-презентирующих клеток, хелперных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток или тетрамера индивиду в эффективном количестве, где индивид имеет любую молекулу МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301. Типами злокачественных новообразований, которые могут лечиться или предотвращаться способом по настоящему изобретению, являются различные типы злокачественных новообразований и опухолей, экспрессирующих WT1, например опухоли гемопоэтических органов, таких как лейкоз, миелодиспластический синдром, множественная миелома и злокачественная лимфома, а также солидные типы рака, такие как рак желудка, рак пищеварительного тракта, рак легкого, рак молочной железы, рак половых клеток, рак печени, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак матки, рак шейки матки и рак яичника. Способ по настоящему изобретению может быть использован вместе с другим способом лечения или профилактики рака с использованием рестриктированного молекулой МНС класса I пептида WT1.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к применению любых из вышеупомянутых композиций, антиген-презентирующих клеток, хелперных Т-клеток, цитотоксических Т-клеток или тетрамера для получения вышеуказанной фармацевтической композиции.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу, которое специфически связывается с вышеуказанным пептидом WT1 или полинуклеотидом, кодирующим пептид WT1 (далее, антитело называют также антителом против WT1). Антитело по настоящему изобретению может быть либо поликлональным антителом, либо моноклональным антителом. Конкретно может быть упомянуто антитело, которое специфически связывается с пептидом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и т.п. Способ получения такого антитела уже известен, и антитело по настоящему изобретению может быть получено также в соответствии с таким общепринятым способом (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). Например, животное (не человек), такое как домашний кролик, иммунизируют с использованием пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, в качестве иммуногена, и поликлональное антитело может быть получено из сыворотки животного общепринятым способом. С другой стороны, в случае моноклонального антитела животное (не человека), такое как мышь, иммунизируют с использованием пептида, используемого в настоящем изобретении (пептида, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2), и полученные клетки селезенки и клетки миеломы сливают для получения гибридомных клеток, из которых может быть получено моноклональное антитело (Current protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., (ed.), 1987, John Wiley and Sons (pub.)/ Section 11.4-11.11). Получение антитела против WT1 по настоящему изобретению может также проводиться реиммунизацией иммунологической реакции с использованием различных адъювантов в зависимости от хозяина. Такие

адъюванты включают минеральный гель (например, адъювант Фрейнда, гидроксид алюминия и т.д.), поверхностно-активное вещество, адъювант человека и т.п. Антитело против WT1 по настоящему изобретению может быть использовано для аффинной хроматографии, иммунологической диагностики и т.п. Способ иммунологической диагностики может быть выбран должным образом из иммуноблоттинга, радиоиммуноанализа (RIA), твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), флуоресцентного или люминесцентного измерения и т.п.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу определения присутствия или количества пептида WT1 у индивида, положительного в отношении любой молекулы МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, причем способ предусматривает стадии:

- (a) реакция образца, полученного от индивида, с вышеуказанным анти-WT1-антителом, и затем
- (b) определение присутствия или количества вышеуказанного анти-WT1-антитела, содержащегося в образце.

Образец, полученный от индивида, имеющего любую молекулу МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, или молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, могут быть использованы в качестве образца, используемого в вышеуказанной стадии (a). Образцы, используемые на вышеуказанной стадии (a), включают, например, жидкость и ткани тела, такие как кровь и лимфоциты. Специалисты в данной области могут должным образом получать образцы, приводить их в реакцию с антителом и проводить другие процедуры с использованием известного способа. Стадия (b) в настоящем изобретении включает, например, определение локализации, участка, количества и т.п. вышеуказанного антитела против WT1, и, следовательно, настоящее изобретение может быть использовано для диагностики, прогноза и т.п. рака. Вышеупомянутые антитела против WT1 могут быть мечеными. В качестве метки могут быть использованы такие метки как флуоресцентная метка и радиоактивная метка. Вследствие мечения становится возможным простое и быстрое проведение определения присутствия или количества пептида WT1.

Еще в одном из аспектов настоящее изобретение относится к набору для определения присутствия или количества пептида WT1, который содержит вышеуказанное анти-WT1-антитело в качестве основного компонента. Набор по настоящему изобретению может содержать, например, средство для получения анти-WT1-антитела и средство для оценивания антитела против WT1 и т.п., наряду с вышеуказанным антителом против WT1. Обычно набор сопровождается инструкцией по применению. С использованием набора по настоящему изобретению становится возможным простое и быстрое определение присутствия или количества пептида WT1 в вышеуказанном способе определения присутствия и количества пептида WT1.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу определения присутствия или количества WT1-специфических хелперных Т-клеток или WT1-специфических цитотоксических Т-клеток у индивида, положительного в отношении любой молекулы МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, способ предусматривает стадии:

- (a) стимуляция образца, полученного от индивида с использованием пептида WT1, и
- (b) определение присутствия или количества цитокинов, хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток, где увеличение присутствия или количества цитокинов, хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток показывает присутствие или количество WT1-специфических хелперных Т-клеток или WT1-специфических цитотоксических Т-клеток.

Образцами в настоящем изобретении могут быть любые образцы, пока они содержат антиген-презентирующие клетки и включают, например, мононуклеарные клетки периферической крови, инвазивные лимфоциты, опухолевые клетки, клетки в асцитной жидкости, клетки в плевральном выпоте, клетки в цереброспинальной жидкости, клетки костного мозга, клетки лимфатических узлов и т.п. Образец, используемый в настоящем изобретении, может быть получен от здоровых доноров или от пациентов, больных раком. С использованием клеток, полученных от здоровых доноров, становится, например, возможной диагностика, поражены ли эти доноры раком или имеют ли эти доноры предрасположение к раку или другим состояниям. С использованием клеток, полученных, например, от пациентов, страдающих раком, становится возможным прогнозирование, имеет ли иммунотерапия WT1 действие у раковых пациентов или других состояниях. В способе по настоящему изобретению полученные образцы могут

культивироваться перед стимуляцией или после стимуляции пептидом WT1, и условия культуры могут быть определены должным образом специалистами в данной области. Стимуляция этих клеток пептидом WT1 может проводиться с использованием известного способа, такого как электропорация, и может проводиться либо *in vitro*, либо *in vivo*. Продуцирование цитокина, присутствие реакции хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток, количество продуцированного цитокина или количества прореагировавших хелперных Т-клеток или цитотоксических Т-клеток могут быть определены известным способом.

Еще в одном аспекте настоящее изобретение относится к набору для определения присутствия или количества пептида WT1, который содержит вышеуказанный пептид WT1 в качестве основного компонента. Набор по настоящему изобретению может содержать, например, средство для получения образцов, средство для оценивания, такое как цитокины и т.п., наряду с вышеуказанным пептидом. Обычно набор сопровождается инструкцией. С использованием набора по настоящему изобретению становится возможным простое и быстрое определение присутствия или количества пептида WT1 в вышеупомянутом способе для определения присутствия или количества пептида WT1.

Настоящее изобретение будет также описано подробно и конкретно при помощи примеров, но они не должны пониматься как ограничение настоящего изобретения.

Пример 1.

1. Индукция хелперных Т-клеток WT1-332-специфического Типа I.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из периферической крови здоровых доноров крови (донор 1: HLA-DRB1*0406/1201-, DRB3*0101- и DRB4*0103-положительный, донор 2: HLA-DRB1*0901/1101-, DRB3*0202- и DRB4*0103-положительный, донор 3: HLA-DRB1*0401/0405- и DRB4*0102/0103-положительный, донор 4: HLA-DRB1*0901/1101-, DRB3*0202- и DRB4*0103-положительный). Разделенные PBMC ($1,5 \times 10^7$ клеток) суспендировали в среде, состоящей из 45% RPMI-1640 (Sigma), 45% AIM-V (Invitrogen) и 10% сыворотки АВ типа человека (MP Biomedicals), и высевали на 24-луночный планшет при $1,5 \times 10^6$ клеток на лунку (день 0). В лунки, засеянные PBMC, добавляли WT1-332 (пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2) в концентрации 10 мкг/мл и IL-7 (PeproTech) в концентрации 10 нг/мл и клетки культивировали при 37°C при 5% CO₂ в течение одной недели. Часть выделенных PBMC консервировали замораживанием (лиофилизацией) для антиген-презентирующих клеток в случае повторной стимуляции.

Спустя одну неделю (в день 7) проводили повторную стимуляцию. Сначала консервированные замораживанием PBMC оттаивали, импульсно обрабатывали 10 мкг/мл WT1-332, обрабатывали 50 мкг/мл митомицина С (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd) и высевали на новый 24-луночный планшет при $1,0 \times 10^6$ - $1,6 \times 10^6$ клетках на лунку. Затем клетки, культивированные в течение одной недели, извлекали и высевали на лунки, засеянные антиген-презентирующими клетками при $1,0 \times 10^6$ - $1,6 \times 10^6$ клетках на лунку. Наконец, в каждую лунку добавляли IL-7 в концентрации 10 нг/мл и клетки культивировали при 37°C при 5% CO₂. Спустя 2 дня (в день 9) половинное количество культуральной жидкости в каждой лунке осторожно удаляли и вместо этого в каждую лунку добавляли среду, содержащую 40 Е/мл IL-2 (PeproTech) и культивирование продолжали. После этого процедуру замены половинного количества культуральной жидкости проводили каждый второй день с использованием среды, содержащей 20 Е/мл IL-2, и клетки должным образом извлекали между 14-м и 21-м днями и использовали для экспериментов.

2. Получение антиген-презентирующих клеток, используемых в эксперименте для определения рестриктивного аллеля PBMC выделяли из периферической крови здоровых доноров крови (донор 5: HLA-DRB1*0406/1201-, DRB3*0101- и DRB4*0103-положительный, донор 6: HLA-DRB1*0403/1405-, DRB3*0202- и DRB4*0103-положительный, донор 7: HLA-DRB1*0403/1201-, DRB3*0101- и DRB4*0103-положительный, донор 8: HLA-DRB1*0101/0901- и DRB4*0103-положительный, донор 9: HLA-DRB1*1401/1406- и DRB3*0202-положительный, донор 10: HLA-DRB1*0803/0901- и DRB4*0103-положительный, донор 11: HLA-DRB1*1101/1502- и DRB3*0202-положительный, донор 12: HLA-DRB1*0405/1406-, DRB3*0202- и DRB4*0103-положительный, донор 13: HLA-DRB1*0401/0405- и DRB4*0102/0103-положительный, донор 14: HLA-DRB1*0401/1502- и DRB4*0102-положительный, донор 15: HLA-DRB1*0101/0405- и DRB4*0103-положительный, донор 16: HLA-DRB1*0901/1501- и DRB4*0103-положительный, донор 17: HLA-DRB1*0405/1501 и DRB4*0103-положительный, донор 18: HLA-DRB1*1401/1502- и DRB3*0202-положительный, донор 19: HLA-DRB1*1403/1502- и DRB3*0101-положительный, донор 20: HLA-DRB1*0803/1302- и DRB3*0301-положительный) и использовали в качестве антиген-презентирующих клеток, используемых в экспериментах для определения рестриктивного аллеля. PBMC каждого донора консервировали замораживанием при -80°C до использования.

3. Измерение IFN-γ (ингибирование реакции в присутствии анти-HLA-DR-антитела Т-клетки, индуцированные из PBMC доноров 1-4, культивировали в течение 24 ч в отсутствие WT1-332, в присутствии 10 мкг/мл WT1-332 и в присутствии 10 мкг/мл WT1-332 и 10 мкг/мл анти-HLA-DR-антитела (BD Co)). После этого культивирования количество IFN-γ в супернатанте определяли количественно при помощи ELISA (Bd Co.). В результате было показано, что все индуцированные Т-клетки узнают WT1-332 и продуцируют IFN-γ и что эта реакция является рестриктивной в отношении HLA-DR-молекулы.

4. Измерение IFN- γ (определение рестриктивного аллеля) Т-клетки, индуцированные из PBMC доноров 1-4, реагировали с каждым из подходящих антиген-презентирующих клеток, импульсно обработанных WT1-332, и определяли рестриктивный аллель Т-клеток.

(4-1) Т-клетки, полученные от донора 1.

Т-клетки, индуцированные из PBMC донора 1, сокультивировали в течение 24 ч с антиген-презентирующими клетками, полученными от доноров 5, 6, 7, 8 и 9, которые импульсно обрабатывали 10 мкг/мл WT1-332. После сокультивирования количество IFN- γ в супернатанте определяли количественно при помощи ELISA. Результаты показаны на фиг. 1. Т-клетки, полученные от донора 1, продуцировали IFN- γ при сокультивировании с HLA-DR4 (DRB1*0403, 0406)-положительными антиген-презентирующими клетками, что показало, что этим рестриктивным аллелем был HLA-DRB1*0406. Показано также, что HLA-DRB1*0403 может презентировать WT1-332 и стимулировать Т-клетки.

(4-2) Т-клетки, полученные от донора 2.

Т-клетки, индуцированные из PBMC донора 2, сокультивировали в течение 24 ч с антиген-презентирующими клетками, полученными из доноров 10, 11, 12 и 9, которые импульсно обрабатывали 10 мкг/мл WT1-332. После сокультивирования количество IFN- γ в супернатанте определяли количественно при помощи ELISA. Результаты показаны на фиг. 2. Т-клетки, полученные из донора 2, продуцировали IFN- γ при сокультивировании с HLA-DRB3*0202-положительными антиген-презентирующими клетками, что показало, что этим рестриктивным аллелем был HLA-DRB3*0202.

(4-3) Т-клетки полученные от донора 3.

Т-клетки, индуцированные из PBMC донора 3, сокультивировали в течение 24 ч с антиген-презентирующими клетками, полученными от доноров 13, 14, 15 и 10, которые импульсно обрабатывали 10 мкг/мл WT1-332. После сокультивирования количество IFN- γ в супернатанте определяли количественно при помощи ELISA. Эти результаты показаны на фиг. 3. Т-клетки, полученные из донора 3, продуцировали IFN- γ при сокультивировании с HLA-DR4 (DRB1*0401, 0405)-положительными антиген-презентирующими клетками, что показало, что как HLA-DRB1*0401, так и 0405 могут презентировать WT1-332 и стимулировать Т-клетки.

(4-4) Т-клетки, полученные от донора 4.

Т-клетки, индуцированные из PBMC донора 4, сокультивировали в течение 24 ч с антиген-презентирующими клетками, полученными от доноров 16, 11, 17, 18, 19 и 20, которые импульсно обрабатывали 10 мкг/мл WT1-332. После сокультивирования количество IFN- γ в супернатанте определяли количественно при помощи ELISA. Эти результаты показаны на фиг. 4. Т-клетки, полученные из донора 4, продуцировали IFN- γ при сокультивировании с HLA-DRB3*1101-положительными антиген-презентирующими клетками, что показало, что рестриктивным аллелем был HLA-DRB1*1101.

Пример 2.

Затем для оценки активности связывания WT1-332 с молекулами MHC класса II проводили тест укладки (фолдинга) 7 типов мономерных белков HLA класса II (DRB1*1501, 0101, 0405, 0803, 0901, 1502 или DRB4*0101) с WT1-332 с использованием жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC). Вкратце, готовили реакционный раствор для укладки смешиванием мономерного белка HLA класса II, пептида (пептида, связывающегося с каждым белком (положительный контроль), пептида, не связывающегося с каждым белком (отрицательный контроль) и WT1-332) и буфера для укладки. После реакции раствора при 37°C время удерживания анализировали при помощи HPLC. Укладку с WT1-332 оценивали с использованием смещения времени удерживания вследствие связывания мономерного белка HLA класса II с пептидом. Используемые реагенты в этом тесте показаны в следующей таблице.

Таблица 1. Реагенты, используемые в тесте

	Поставщик
Superdex 200	GE Healthcare Sciences
Буфер для укладки	MBL
Буфер для уравнивания	MBL
Пептид положительного контроля: PVSKMRMATPLLMQA (SEQ ID NO:3)	MBL
Пептид отрицательного контроля: KAERADLLAYLKQATA (SEQ ID NO:4)	MBL

Получение мономерных белков HLA класса II.

Мономерные белки HLA класса II, которые были законсервированы замораживанием при -80°C, оттаивали на льду. Оттаянные мономерные белки HLA класса II корректировали с использованием буфера для разведения таким образом, что они содержали количество 0,05 мг (1×10^{-9} моль) в 83 мкл.

Получение растворов пептидов.

Около 1 мг каждого пептида взвешивали с использованием электронных весов, переносили в стеклянный флакон и растворяли в ДМСО с получением концентрации 20 мг/мл.

Расчет количества раствора пептида в 50-кратном молярном количестве.

Количество пептида, которое является 50-кратным молярным количеством относительно мономерного белка HLA класса II, рассчитывали с использованием следующей формулы расчета.

Количество требуемого пептида: 1×10^{-9} моль $\times 50 = 5 \times 10^{-8}$ моль (количество требуемого пептида).

$5 \times 10^{-8} \times (\text{молекулярная масса пептида}) \times 1000 = (\text{количество требуемого пептида, мг})$.

$(\text{Количество требуемого пептида}) / [\text{чистота пептида} / 100] = (\text{количество добавленного пептида, мг})$.

$[(\text{Количество добавленного пептида}) / 20 \text{ мг/мл}] \times 1000 = (\text{количество добавленного раствора пептида, мкл})$.

Расчет количества добавленного буфера для укладки.

Что касается буфера для укладки, добавляли 10% количество смешанного раствора мономерного белка HLA класса II и пептида. Количество добавленного буфера для укладки рассчитывали с использованием следующего вычислительного уравнения.

$[83 \text{ мкл (Количество мономерного белка HLA класса II)} + (\text{количество раствора пептида в 50-кратном молярном количестве})] \times 0,1 = \text{количество добавленного буфера для укладки}$.

Анализ укладки с использованием HPLC.

В стеклянный флакон, загруженный мономерным белком HLA класса II, добавляли раствор пептида и буфер для укладки в рассчитанном количестве, и этой смеси давали стоять при 37°C в течение ночи. HPLC (Waters 2695 Separation Module) запускали и колонку Superdex 200 уравнивали буфером для уравнивания. Ко всем образцам добавляли 300 мкл уравнивающего буфера, хорошо перемешивали, и использовали часть 100 мкл смеси в качестве инъекционного объема образца для расчета времени удерживания. Время удерживания было равно 50 мин. Критерием в отношении укладки мономерного белка HLA класса II является смещение времени удерживания не менее 0,1 мин в сравнении с контролем (только растворителем). В результате было обнаружено, что степень смещения времени удерживания увеличивалась не менее чем на 0,1 мин в 7 типах тестируемых мономерных белков HLA класса II (DRB1*1501, 0101, 0405, 0803, 0901, 1502 или DRB4*0101), фиг. 5, посредством чего стало ясным, что WT1-332 специфически связывается с этими белками и может презентироваться в качестве антигена.

Пример 3.

Индукция WT1-332-специфических Т-клеток.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из периферической крови здоровых доноров крови (в целом 42 донора, имеющих по меньшей мере один из HLA-DRB1*1501, 1502, 0405, HLA-DPB1*0501 и 0901). Выделенные PBMC делили на порции $1,2 \times 10^7$ клеток, суспендировали в среде, состоящей из 45% RPMI-1640 (Sigma), 45% AIM-V (Invitrogen) и 10% сыворотки АВ типа человека (MP Biomedicals) и высевали на 24-луночный планшет при $1,5 \times 10^6$ клеток на лунку (в день 0). В лунки, засеянные PBMC, добавляли WT1-332 в концентрации 20 мкг/мл и IL-7 (PeproTech) в концентрации 10 нг/мл и клетки культивировали при 37°C при 5% CO₂ в течение одной недели. Группу, в которой добавляли растворитель (10 mM уксусную кислоту) вместо WT1-332 в конечной концентрации 10 мкМ (группа индукции растворителем), устанавливали в качестве контрольной группы. Часть отделенных PBMC консервировали замораживанием для антиген-презентирующих клеток при повторной стимуляции.

Спустя одну неделю (на 7-й день) проводили повторную стимуляцию. Сначала консервированные замораживанием PBMC оттаивали, импульсно обрабатывали 20 мкг/мл WT1-332, или растворителем 10 мкМ уксусной кислоты, обрабатывали 50 мкг/мл митомицина С (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd) и высевали на новый 24-луночный планшет при $1,0 \times 10^6$ - $1,6 \times 10^6$ клетках на лунку. Затем клетки, культивированные в течение одной недели, извлекали и высевали на лунки, засеянные антиген-презентирующими клетками при $1,0 \times 10^6$ - $1,6 \times 10^6$ клеток на лунку. Наконец, в каждую лунку добавляли IL-7 в концентрации 10 нг/мл, и эти клетки культивировали при 37°C при 5% CO₂. Спустя 2 дня (в день 9) половинное количество культуральной жидкости в каждой лунке осторожно удаляли и вместо этого в каждую лунку добавляли среду, содержащую 40 Е/мл IL-2 (PeproTech), и культивирование продолжали. После этого процедуру замены половинного количества культуральной жидкости проводили каждый второй день с использованием среды, содержащей 20 Е/мл IL-2.

Клетки извлекали в день 0, на 7-й день и на 14 день и использовали в экспериментах для измерения IFN-γ.

Измерение IFN-γ (внутриклеточное окрашивание цитокина (ICS)).

Повторную стимуляцию антигена проводили посевом PBMC в день 0 после получения и живые клетки извлекали в день 7 и в день 14 из группы индукции WT1-332 и группы индукции растворителем на 96-луночном U-донном планшете и добавлением WT1-332-содержащей среды в конечной концентрации 20 мкг/мл. Содержащую растворитель среду добавляли в конечной концентрации 10 мкМ в качестве контроля. После культивирования клеток при 37°C при 5% CO₂ в течение 4 ч добавляли Брефелдин А (BioLegend) и культивирование продолжали далее. Спустя 6 ч от начала культивирования клетки извле-

кали и окрашивали PE-меченым антителом против CD4 человека и FITC-меченым антителом против CD8 человека. Окрашивание внутриклеточного IFN- γ проводили с использованием набора BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permiabilization (Becton Dickinson) и PerCP/Cy5.5-меченого антитела против IFN- γ человека. Для анализа использовали EPICS-XL MCL (Beckman Coulter). Результаты показаны на фиг. 6 и 7. На основании фиг. 6 было подтверждено, что, в группе индукции WT1-332, WT1-332-специфические Th1 заметно и зависимым от времени образом увеличивались между 7-м днем и 14-м днем. Это увеличение было значимым относительно группы индукции растворителем ($P < 0,0001$). На основании фиг. 7 было подтверждено, что, в группе индукции WT1-332, WT1-332-специфические CTL зависимым от времени образом увеличивались между 7-м днем и 14-м днем, и это увеличение было значимым относительно группы индукции растворителем ($P < 0,0001$).

Измерение IFN- γ (ингибирование реакции в присутствии анти-HLA-DR-антитела и анти-HLA-DQ-антитела).

На 14-й день Т-клетки, индуцированные из PBMC доноров 21-37, культивировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкМ растворителя, в присутствии 20 мкг/мл WT1-332 и в присутствии 20 мкг/мл WT1-332 и 10 мкг/мл анти-HLA-DR-антитела (L243 [G46-6] BD Co.). После культивирования количество IFN- γ в супернатанте определяли с помощью ELISA (BD Co.). Результаты показаны на фиг. 8. В образцах от доноров 21-37 показано, что индуцированные Т-клетки распознают WT1-332 и продуцируют IFN- γ и что эта реакция является HLA-DR-молекула-рестриктированной.

Кроме того, на 14-й день Т-клетки, индуцированные из PBMC доноров 38-46, культивировали в течение 24 ч в присутствии 10 мкМ растворителя, в присутствии 20 мкг/мл WT1-332 и в присутствии 20 мкг/мл WT1-332 и 10 мкг/мл анти-HLA-DR-антитела (L243[G46-6], BD Co.) или 10 мкг/мл анти-HLA-DQ (SPVL3, BC Co.). После культивирования количество IFN- γ в супернатанте определяли количественно при помощи ELISA (BD Co.). Результаты показаны на фиг. 11. В образцах от доноров 38-46 эти индуцированные Т-клетки распознавали WT1-332 и продуцировали IFN- γ , и реакция не ингибировалась анти-HLA-DR-антителом и анти-HLA-DQ-антителом. Как видно из этих фактов, WT1-332-индуцированные Т-клетки, полученные от доноров 38-46, являются HLA-DP-молекула-рестриктированными.

Индукция WT1-332-специфических Т-клеток (родство с Новым Аллелем).

В отношении каждого из 17 образцов (доноров 21-37), которые были HLA-DR-рестриктированными и индуцировали WT1-332-специфические Th1, в результатах с использованием здоровых доноров крови (в целом 42 донора, имеющих по меньшей мере один из HLA-DRB1*1501, 1502, 0405, HLA-DPB1*0501 и 0901) на фиг. 6 и 7, результат на 14-й день показан на фиг. 9 и 10. Кроме того, тип HLA класса II (тип HLA-DRB1 аллеля и HLA-DPB1 аллеля) каждого из 17 образцов (доноров 21-37) показан в следующей табл. 2. В этой связи DRB3*0202 находится в неустойчивой связи с DRB1*1101, DRB1*1401 и DRB1*1405 (аллель DRB1, обозначенный символом "Δ" в этой таблице) и DRB4*0101 находится в неустойчивой связи с DRB1*0403, DRB1*0405 и DRB1*0901 (аллель DRB1, обозначенный символом "▲" в таблице).

В таблице, аллели, обозначенные жирными буквами курсивом, представляют новый совместимый аллель HLA-DRB1.

Таблица 2

Номер донора	Тип HLA класса II			
	аллель DRB1		аллель DPB1	
21	0901▲	1401Δ	0501	0501
22	0101	0901▲	0402	0501
23	0401	0405▲	0501	0501
24	0406▲	1501	0201	0501
25	1401Δ	1502	0201	0901
26	0901▲	1101Δ	0501	0501
27	1101Δ	1502	0401	0901
28	0803	0901▲	0201	0501
29	1401Δ	1502	0501	0901
30	0405▲	1501	0501	0501
31	0405▲	1405Δ	0501	0501
32	0403▲	1501	0402	0501
33	0101	0405▲	0402	0501
34	1403	1501	0201	0501
35	1202	1501	0201	0501
36	0405▲	0406▲	0201	0501
37	0101	1501	0402	0501

Из фиг. 9, 10 и табл. 2 видно, что индукция WT1-332-специфических Th1 и WT1-332-специфических CTL узнавалась в клетках, имеющих эти HLA-DR-аллели.

Кроме того, в отношении каждого из 9 образцов (доноров 38-46), которые были HLA-DP-рестриктивными и имели индуцированные WT1-332-специфические Th1, в результатах с использованием здоровых доноров крови (в целом 42 донора, имеющих по меньшей мере один из HLA-DRB1*1501,

1502, 0405, HLA-DPB1*0501 и 0901) на фиг. 6 и 7, результат в день 14 показан на фиг. 12 и 13. Кроме того, тип HLA класса II (тип аллеля HLA-DRB1 и аллеля HLA-DPB1) каждого из 9 образцов (доноров 38-46) показан в следующей табл. 3. В этой таблице, символ "*" обозначает совместимые аллели HLA-DPB1, известные ранее.

Таблица 3

Номер донора	Тип HLA класса II			
	аллель DRB1		аллель DPB1	
38	0901	1401	0501*	0501*
39	1201	1201	0201	0501*
40	1502	1502	0901*	0901*
41	0401	1502	0201	0901*
42	1501	1502	0201	0901*
43	0405	0901	0201	0301
44	1501	1502	0501*	0901*
45	0405	1406	0201	0501*
46	1302	1502	0201	0901*

Из фиг. 12, 13 и табл. 3 видно, что индукция WT1-332-специфических Th1 и WT1-332-специфических CTL узнавалась в клетках, имеющих эти HLA-DP-аллели.

Промышленная применимость

Настоящее изобретение относится к способу активации хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток с использованием пептида WT1, способного связываться с любой молекулой MHC класса II из молекулы HLA-DRB1*0101, молекулы HLA-DRB1*0401, молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB1*0901, молекулы HLA-DRB1*1101, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DRB1*1501, молекулы HLA-DRB1*0405, молекулы HLA-DRB1*1502, молекулы HLA-DPB1*0501, молекулы HLA-DPB1*0901, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301, и композиции для этого, фармацевтической композиции для лечения и/или профилактики злокачественного новообразования активацией хелперных Т-клеток и/или цитотоксических Т-клеток и т.п. Таким образом, настоящее изобретение применимо в области фармацевтических препаратов и т.п., например в областях развития и получения профилактических или лечебных средств для различных опухолей гемопозитических органов и солидного рака, высоко экспрессирующих ген WT1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ активации хелперных Т-клеток, который включает стадию активации хелперных Т-клеток путем добавления пептида WT1 (белок 1 опухоли Вильмса) к антиген-презентирующим клеткам,

где добавление пептида WT1 к антиген-презентирующим клеткам проводят добавлением пептида WT1, полинуклеотида, кодирующего пептид WT1, вектора экспрессии, содержащего полипептид, или клеток, содержащих вектор экспрессии, пациенту или в образец, взятый у пациента,

где пептид WT1 способен связываться с любой молекулой MHC класса II из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301,

где пептид WT1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His),

где указанный пациент имеет любую молекулу HLA, выбранную из группы, состоящей молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

2. Способ по п.1, где пептид WT1 способен связываться по меньшей мере с двумя молекулами MHC класса II из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

3. Фармацевтическая композиция для активации хелперных Т-клеток с любой молекулой MHC класса II, выбранной из группы, состоящей из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301,

указанная композиция содержит пептид WT1, полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, или клетки, содержащие вектор экспрессии, и носитель или вспомогательное вещество,

где пептид WT1 способен связываться с любой молекулой MHC класса II из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, мо-

лекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301,

где пептид WT1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His).

4. Композиция по п.3, где пептид WT1 способен связываться по меньшей мере с двумя молекулами МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

5. Антиген-презентирующая клетка, презентующая комплекс антигенного пептида, содержащего пептид WT1 и молекулу МНС класса II,

где молекула МНС класса II представляет собой любую молекулу МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301,

где пептид WT1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His),

где антиген-презентирующая клетка взята у положительного по HLA-DRB1*0403 пациента, положительного по HLA-DRB1*0406 пациента, положительного по HLA-DRB1*0803 пациента, положительного по HLA-DRB3*0202 пациента, положительного по HLA-DRB4*0101 пациента, положительного по HLA-DPB1*0201 пациента или положительного по HLA-DPB1*0301 пациента.

6. Хелперная Т-клетка, которая распознает комплекс антигенного пептида, содержащего пептид WT1 и молекулу МНС класса II,

где молекула МНС класса II представляет собой любую молекулу МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301,

где пептид WT1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His),

где хелперная Т-клетка получена у положительного по HLA-DRB1*0403 пациента, положительного по HLA-DRB1*0406 пациента, положительного по HLA-DRB1*0803 пациента, положительного по HLA-DRB3*0202 пациента, положительного по HLA-DRB4*0101 пациента, положительного по HLA-DPB1*0201 пациента или положительного по HLA-DPB1*0301 пациента.

7. Способ активации цитотоксических Т-клеток, включающий активацию цитотоксических Т-клеток хелперными Т-клетками по п.6,

где цитотоксические Т-клетки содержат любую молекулу МНС класса II, выбранную из группы, состоящей из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.

8. Применение фармацевтической композиции по п.3 или 4 для лечения злокачественного новообразования.

9. Применение фармацевтической композиции по п.3 или 4 для активации цитотоксических Т-клеток.

10. Способ определения наличия или количества WT1-специфических хелперных Т-клеток у индивида, положительного по любой молекуле МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0403, HLA-DRB1*0406, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB3*0202, HLA-DRB4*0101, HLA-DPB1*0201 или HLA-DPB1*0301,

где способ включает стадии:

(а) стимуляция образца, содержащего антиген-презентирующие клетки, полученного у индивида, использующего пептид WT1,

(b) определение наличия или количества цитокинов или хелперных Т-клеток,

где увеличение количества цитокинов или хелперных Т-клеток указывает на наличие или указывает количество WT1-специфических хелперных Т-клеток,

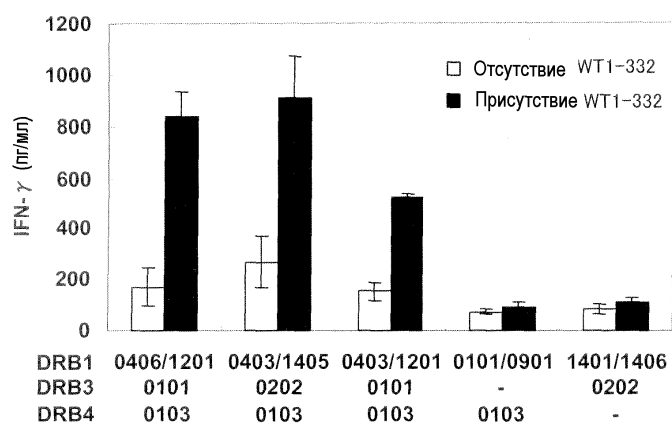
где пептид WT1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His).

11. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественного новообразования у пациента, имеющего молекулу МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301,

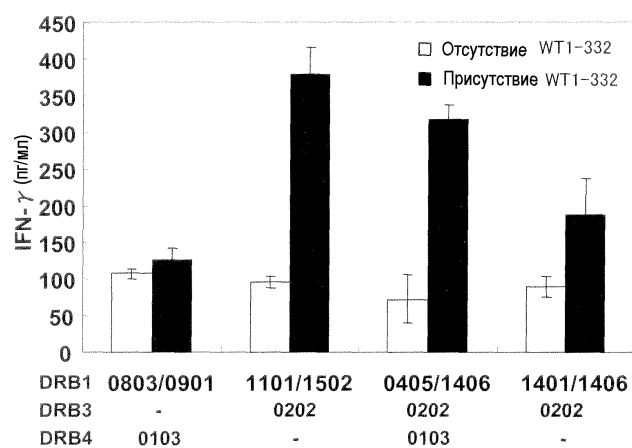
где композиция содержит пептид WT1, полинуклеотид, кодирующий пептид WT1, вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, или клетки, содержащие вектор экспрессии, и носитель или вспомогательное вещество,

где пептид WT1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His),

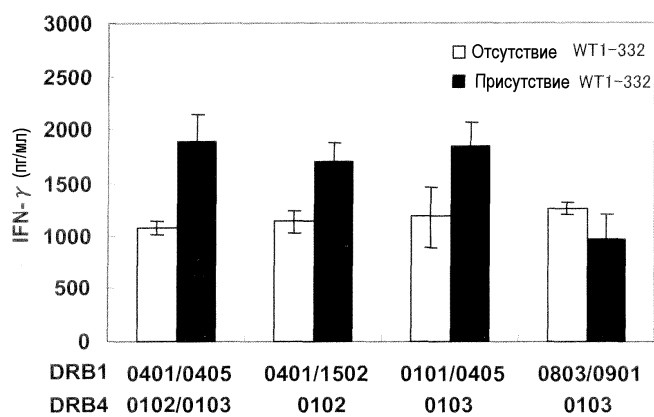
где пептид WT1 способен связываться с любой молекулой МНС класса II из молекулы HLA-DRB1*0403, молекулы HLA-DRB1*0406, молекулы HLA-DRB1*0803, молекулы HLA-DRB3*0202, молекулы HLA-DRB4*0101, молекулы HLA-DPB1*0201 или молекулы HLA-DPB1*0301.



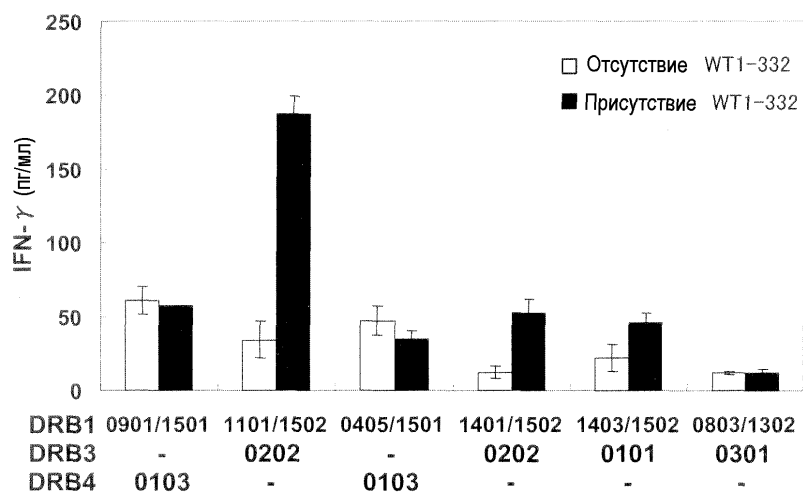
Фиг. 1



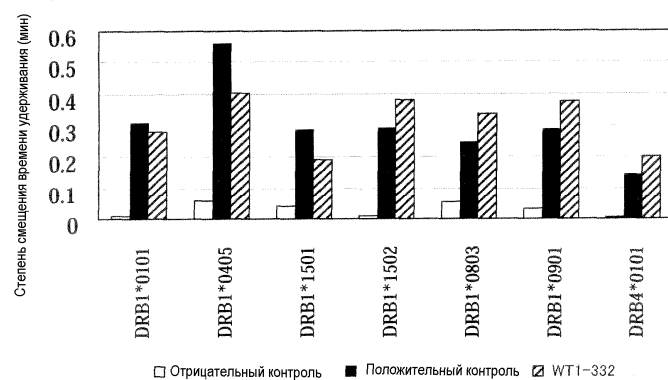
Фиг. 2



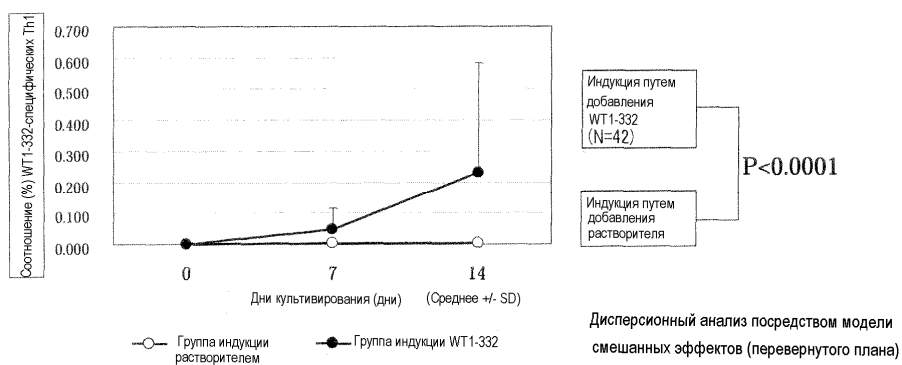
Фиг. 3



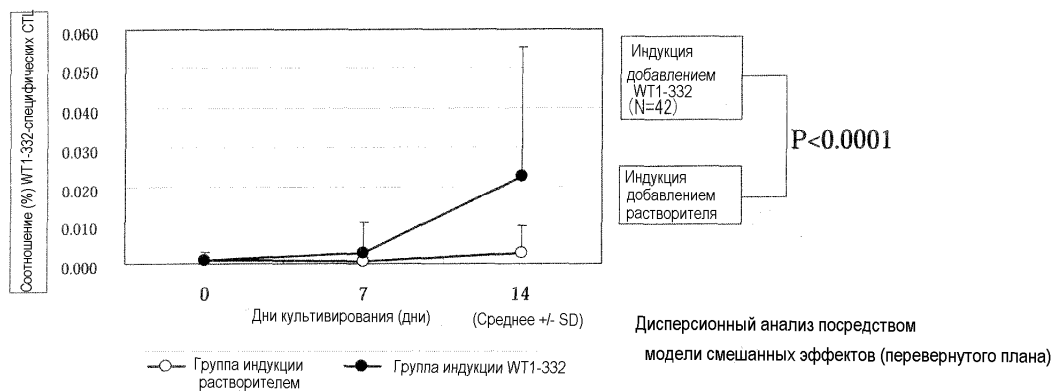
Фиг. 4



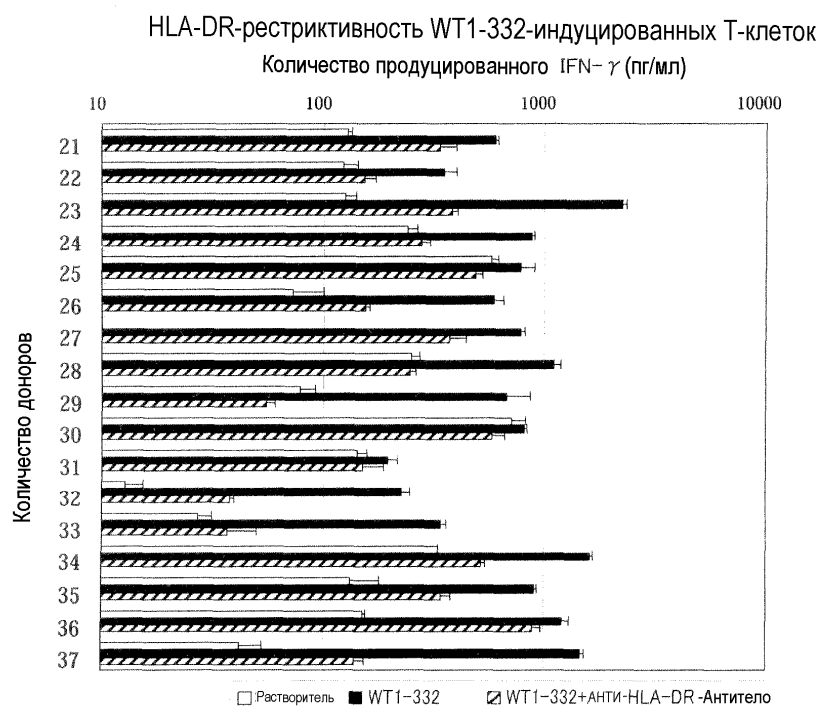
Фиг. 5



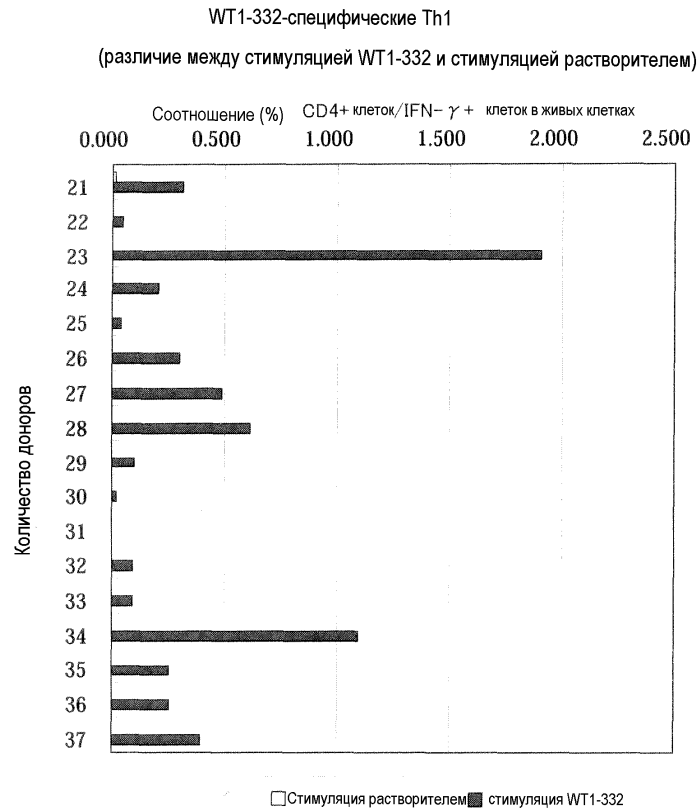
Фиг. 6



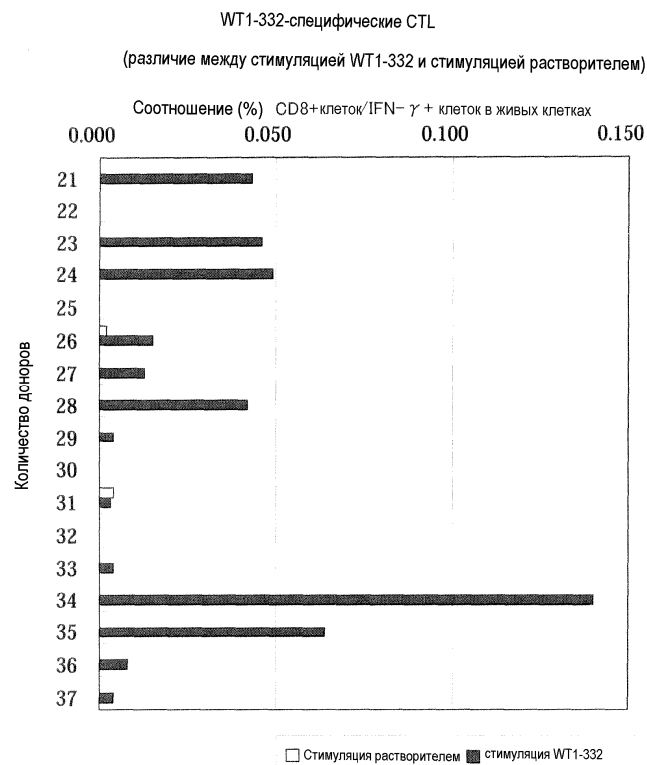
Фиг. 7



Фиг. 8

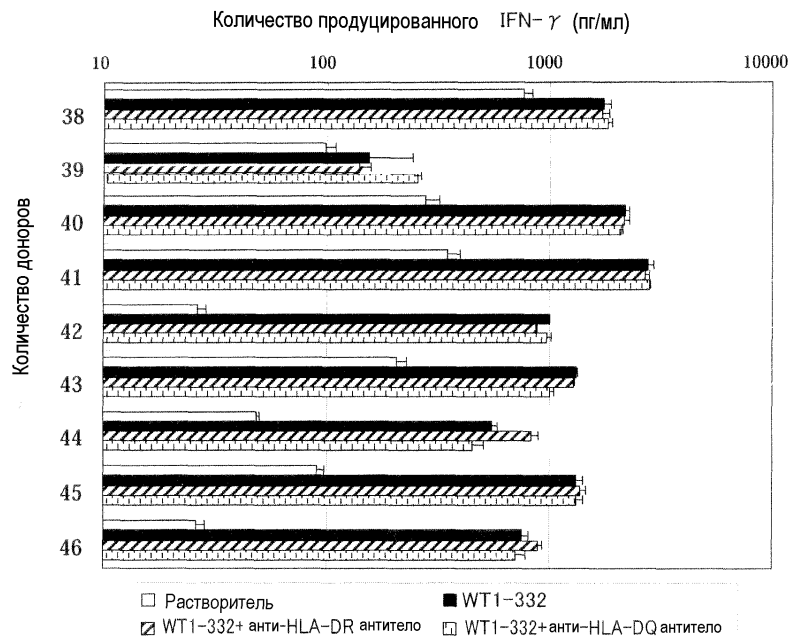


Фиг. 9

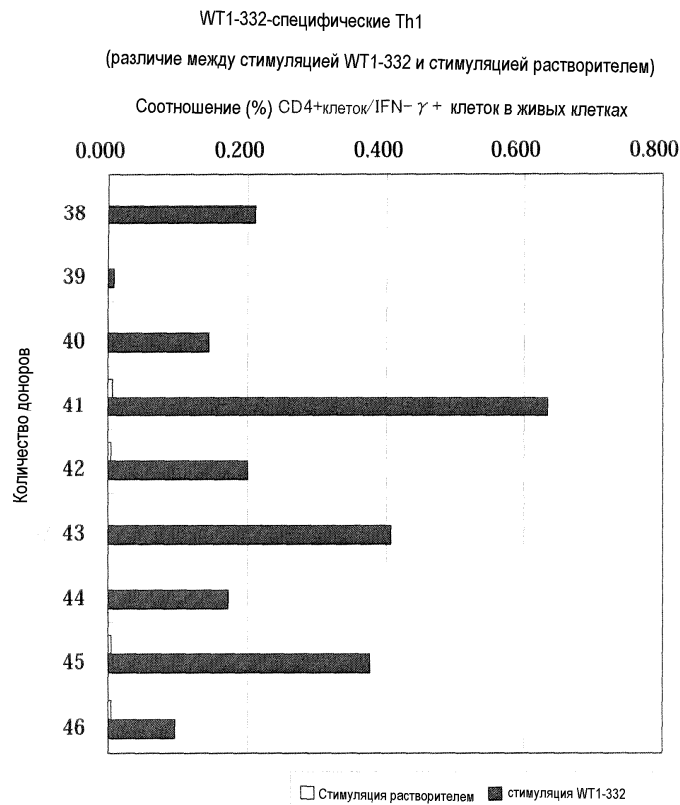


Фиг. 10

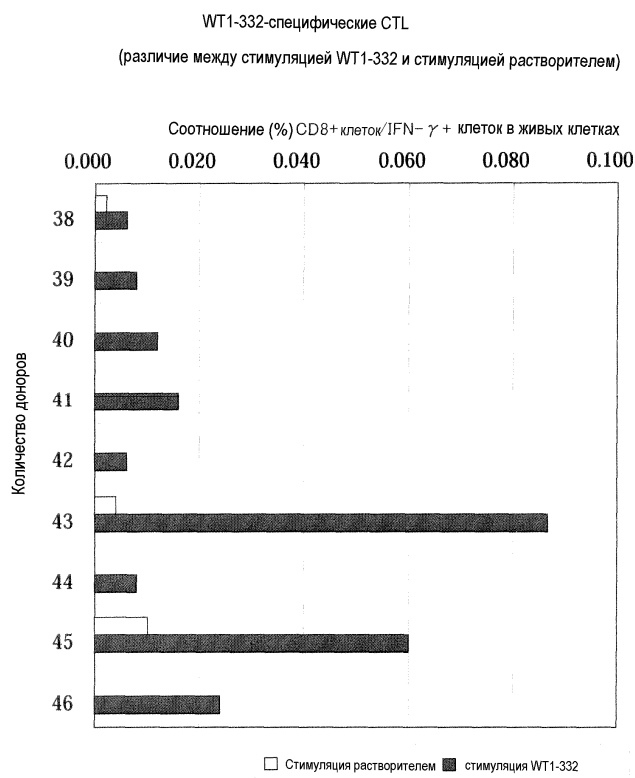
HLA-DR-рестриктивность WT1-332-индуцированных Т-клеток



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2