



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101608** (13) **C2**  
(51) МПК (2013.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

**A61P 43/00**

**C07K 14/82** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12Q 1/02** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2009 09812**

(22) Дата подання заявки: **27.02.2008**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на винахід: **25.04.2013**

(31) Номер попередньої  
заявки відповідно до  
Паризької конвенції: **2007-047317**

(32) Дата подання  
попередньої заявки  
відповідно до  
Паризької конвенції: **27.02.2007**

(33) Код держави-учасниці  
Паризької конвенції,  
до якої подано  
попередню заявку: **JP**

(41) Публікація відомостей  
про заявку: **25.12.2009, Бюл.№ 24**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.04.2013, Бюл.№ 8**

(86) Номер та дата  
подання міжнародної  
заявки, поданої  
відповідно до  
Договору РСТ **PCT/JP2008/053417,  
27.02.2008**

(72) Винахідник(и):  
**Сугіяма Харуо (JP)**

(73) Власник(и):  
**ІНТЕРНЕТІНЛ ІНСТІТЮТ ОФ КЕНСЕР  
ІММУНОЛОДЖИ, ІНК.,**  
13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka, 5640053,  
Japan (JP)

(74) Представник:  
**Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.  
№115**

(56) Перелік документів, взятих до уваги  
експертизою:  
FUJIKI F. ET AL.: "A WT1 protein-derived,  
naturally processed 16-mer peptide,  
WT1(332), is a promiscuous helper peptide for  
induction of WT1-specific Th1-type CD4(+) T  
cells" MICROBIOL. IMMUNOL., vol. 52, no.  
12, December 2008, pages 591-600.  
SOTIRIADOU R. ET AL.: 'Peptide HER2 (776-  
788) represents a naturally processed broad  
MHC class II-restricted T cell epitope' BR. J.  
CANCER vol. 85, no. 10, 2001, pages 1527 -  
1534.  
HURAL J.A. ET AL.: 'Identification of naturally  
processed CD4 T cell epitopes from the  
prostate-specific antigen kallikrein 4 using  
peptide-based in vitro stimulation' J.  
IMMUNOL. vol. 169, no. 1, 2002, pages 557 -  
565.  
WO 2005045027 A1, 19.05.2005.  
EP 1696027 A1, 30.08.2006.  
US 2006121046 A1, 08.06.2006.

UA 101608 C2

## (54) СПОСІБ АКТИВАЦІЇ ХЕЛПЕРНИХ Т-КЛІТИН

(57) Реферат:

Винахід належить до способу активації хелперних Т-клітин, який включає стадію додання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин і, за допомогою цього, активації хелперних Т-клітин, де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома молекулами, вибраними з

групи: HLA-DRBP1\*1501, HLA-DPB1\*0901 і HLA-DPB1\*0501. Також винахід належить до способу лікування і/або профілактики раку шляхом активації хелперних Т-клітин.

## Галузь техніки

Даний винахід стосується способу активації хелперних Т-клітин, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин і, за допомогою цього, активації хелперних Т-клітин, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501, і композиції для цього, фармацевтичної композиції для лікування і/або профілактики раку шляхом активації хелперних Т-клітин і до них подібних.

## Попередній рівень техніки

Ген WT1 (ген пухлини Вільмса 1) був ідентифікований як ген, відповідальний за пухлину Вільмса, яка являє собою нирковий рак у дітей (непатентні документи 1 і 2). WT1 являє собою транскрипційний фактор, що має цинкову пальцеву структуру. На початку, ген WT1 вважали геном, що придушує пухлину. Однак подальші стадії (непатентні документи 3, 4, 5 і 6) показали, що ген WT1 швидше функціонує як онкоген в гематопоетичних пухлинах і солідних формах раку.

Було показано, що Т-лімфоцити, специфічні для пептиду WT1 (CTL), можуть бути індуковані стимуляцією *in vitro* мононуклеарних клітин периферичної крові пептидом WT1, і такий CTL ушкоджує ракові клітини, такі як гематопоетичні пухлинні клітини і клітини солідного раку, які ендогенно експресують WT1. CTL розпізнає пептид WT1 у вигляді форми комплексу, в якому пептид WT1 зв'язується з молекулою класу I MHC (головного комплексу тканинної сумісності). Тому, такий пептид WT1 відрізняється в залежності від підтипів класу I MHC (патентний документ 1, непатентний документ 7 і патентні документи 2, 3 і 4).

Існування хелперних Т-клітин, специфічних для ракового антигена, важливе для ефективної індукції CTL (непатентний документ 8). Хелперні Т-клітини індукуються і активуються шляхом розпізнавання комплексу молекули класу II MHC і антигенного пептиду на антиген-презентуючих клітинах. Активовані хелперні Т-клітини продукують цитокін, такий як IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, або інтерферон для сприяння росту, диференціації або дозріванню В-клітини. Активовані хелперні Т-клітини виконують функцію сприяння росту, диференціації або дозріванню інших субпопуляцій Т-клітин (наприклад, клітини Tc і TD). Таким чином, Т-клітини несуть функцію активації імунної системи сприянням росту або активації В-клітин або Т-клітин. Тому, вважається корисним посилення функції хелперних Т-клітин за допомогою антигенного пептиду, зв'язуючого клас II MHC (хелперного пептиду) при імунотерапії раку, для збільшення ефекту протиракової вакцини (непатентний документ 9). До теперішнього часу, тільки пептид, що зв'язується з молекулою HLA-DRB1\*0401 (непатентний документ 10), пептид, що зв'язується з молекулою HLA-DRB1\*0405, і пептид, що зв'язується з молекулою HLA-DRB1\*1502 (патентний документ 5), були виявлені як хелперні пептиди. Тому, є потреба у виявленні пептидів, кожний з яких зв'язується з молекулою HLA-DRB1\*1501, HLA-DPB1\*0901 або HLA-DPB1\*0501.

Крім того, було показано, що серед хелперних пептидов, є перспективний хелперний пептид, який може зв'язуватися з множиною молекул класу II MHC і індукувати хелперні Т-клітини (непатентні документи 11 і 12). Однак було дуже важко ідентифікувати перспективний хелперний пептид, який зв'язується з трьома або більше типами молекул класу II MHC, і надає достатній ефект.

Патентний документ 1: WO 2003/106682

Патентний документ 2: WO 2005/095598

Патентний документ 3: WO 2007/097358

Патентний документ 4: міжнародна заявка на патент № PCT/JP2007/074146

Патентний документ 5: WO 2005/045027

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Непатентний документ 10: Knights AJ et al., Cancer Immunol Immunother. 2002 Jul;51(5):271-81.

Непатентний документ 11: Sotiriadou R et al., Br J Cancer. 2001 Nov 16;85(10):1527-34.

Непатентний документ 12: Hural JA et al., J Immunol. 2002 Jul 1;169(1):557-65

## Опис винаходу

Проблеми, що підлягають вирішенню за допомогою винаходу

Проблеми, що вирішуються винаходом, являють собою: надання способу активації хелперних Т-клітин пептидом WT1, який здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DPB1\*0901 або молекулою HLA-DPB1\*0501, і композиції для досягнення цього, а також фармацевтичної композиції для лікування і/або профілактики раку шляхом активації хелперних Т-клітин і тому подібного.

Засоби для розв'язання вказаних проблем

Внаслідок інтенсивних досліджень в зв'язку з описаною вище ситуацією, заявник виявив, що серед пептидів WT1, які зв'язуються з молекулою HLA-DRB1\*0405 і молекулою HLA-DRB1\*1502, пептид WT1, що має амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His, також зв'язується з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DPB1\*0901 і молекулою HLA-DPB1\*0501. Таким чином, був створений даний винахід.

Даний винахід надає:

(1) спосіб активації хелперних Т-клітин, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини і, за допомогою цього, активацію хелперних Т-клітин, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501;

(2) спосіб за п. (1), де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501;

(3) спосіб за п. (1) або (2), де пептид WT1, крім того, здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*0405 і/або молекулою HLA-DRB1\*1502;

(4) спосіб за будь-яким з пп. (1)-(3), де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DPB1\*0901, молекулою HLA-DPB1\*0501, молекулою HLA-DRB1\*0405 і молекулою HLA-DRB1\*1502;

(5) спосіб за будь-яким з пп. (1)-(4), де пептид WT1 являє собою пептид, що містить амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2);

(6) спосіб за будь-яким з пп. (1)-(5), де додання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин здійснюється доданням пептиду WT1, доданням вектора експресії, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, або доданням клітин, що включають вектор експресії;

(7) композиція для активації хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, що містять пептид WT1, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501;

(8) спосіб лікування або профілактики раку у суб'єкта, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин і, за допомогою цього, активацію хелперних Т-клітин, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501;

(9) фармацевтична композиція для лікування або профілактики раку активацією хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, що містять пептид WT1, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501;

(10) антитіло, що специфічно зв'язується з пептидом WT1, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501;

(11) спосіб визначення присутності або кількості пептиду WT1 у будь-якого з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкту, що включає:

(a) взаємодію анти-WT1 антитіла із зразком від суб'єкта; і

(b) визначення присутності або кількості анти-WT1 антитіла, що специфічно зв'язується з пептидом WT1, що міститься в зразку;

(12) спосіб лікування або профілактики раку, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин і, за допомогою цього, активацію хелперних Т-клітин, і введення суб'єкту активованих хелперних Т-клітин, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DPB1\*0901 або молекулою HLA-DPB1\*0501;

(13) фармацевтична композиція для лікування або профілактики раку, що містить хелперні Т-клітини, активована доданням пептиду WT1, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501;

(14) спосіб визначення присутності або кількості WT1-специфічних хелперних Т-клітин у будь-якого з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкту, що включає:

(a) взаємодію комплексу пептиду WT1 антитіла і молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501 із зразком від суб'єкта; і

(b) визначення присутності або кількості хелперних Т-клітин, що розпізнає комплекс, що міститься в зразку; і

5 (15) спосіб визначення присутності або кількості WT1-специфічних хелперних Т-клітин у HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного, HLA-DPB1\*0501-позитивного, HLA-DRB1\*0405-позитивного або HLA-DRB1\*1502-позитивного суб'єкта, що включає:

(a) стимуляцію мононуклеарних клітин периферичної крові, інвазивних лімфоцитів, пухлинних клітин, клітин в асцитичній рідині, клітин в плевральній рідині, клітин в спинномозковій рідині, клітин кісткового мозку або клітин лімфовузлів пептидом WT1; і

10 (b) визначення продукції цитокіну або реакції хелперних Т-клітин, де присутність або збільшення кількості продукованого цитокіну або реакції хелперних Т-клітин вказує на присутність або кількість WT1-специфічних хелперних Т-клітин.

Ефекти винаходу

15 Даний винахід надає спосіб активації хелперних Т-клітин пептидом WT1, який зв'язується з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DPB1\*0901, молекулою HLA-DPB1\*0501; молекулою HLA-DRB1\*0405 і молекулою HLA-DRB1\*1502, і композицію для цього, а також фармацевтичну композицію для лікування і/або профілактики раку активацією хелперних Т-клітин і тому подібне. Тому можна активувати in vivo і in vitro хелперні Т-клітини у суб'єкта, що

20 має будь-яку з таких молекул II класу МНС, для лікування і профілактики раку. У зв'язку з тим, що 90% населення Японії охоплене п'ятьма типами підкласів II класу МНС, хелперні Т-клітини можуть активуватися для лікування і/або профілактики раку у дуже широкого діапазону суб'єктів.

Короткий опис фігур

25 На фіг. 1 показаний графік, який представляє кількість IFN- $\gamma$ , що продукується клітинами TA28.1. На кресленні подовжня вісь представляє концентрацію IFN- $\gamma$  (пкг/мл). Графіки відповідають «випадку культивування мононуклеарних клітин периферичної крові від HLA-DRB1\*1501-позитивного суб'єкта за відсутності пептиду WT1», «випадку культивування клітин TA28.1 в присутності пептиду WT1 (чорні стовпчики)», «випадку культивування мононуклеарних

30 клітин периферичної крові від HLA-DRB1\*1501-позитивного суб'єкта за відсутності пептиду WT1», «випадку культивування мононуклеарних клітин периферичної крові від HLA-DRB1\*1501-негативного суб'єкта в присутності пептиду WT1», відповідно, починаючи зліва. На фіг. 2 показаний графік, що представляє кількості IFN- $\gamma$ , IL-4 і IL-10, що продукуються клітинами TA28.1. На кресленні подовжня вісь представляє концентрацію (пкг/мл). Графіки

35 відповідають величинам IFN- $\gamma$ , IL-4 і IL-10, починаючи зліва. На фіг. 3 показаний графік, що представляє кількості IFN- $\gamma$ , IL-4 і IL-10, що продукуються клітинами E15.2. На кресленні подовжня вісь представляє концентрацію (пкг/мл). Графіки відповідають величинам IFN- $\gamma$ , IL-4 і IL-10, починаючи зліва.

40 На фіг. 4 представлена продукція IFN- $\gamma$  і IL-17 HLA-DPB1\*0501/\*0501-позитивними мононуклеарними клітинами. На кресленні горизонтальна вісь представляє IFN- $\gamma$ , а подовжня вісь представляє IL-17. На фіг. 4a представлені клітини без стимуляції пептидом WT1, а на фіг. 4b представлені клітини, стимульовані пептидом WT1.

45 На фіг. 5 показаний графік, який представляє ріст Т-клітин TA28.1. На кресленні подовжня вісь представляє імп./хв. ( $\times 10^4$ ). Графіки відповідають «випадку спільного культивування клітин TA28.1 з мононуклеарними клітинами периферичної крові без пульсуючого впливу пептидом WT1», «випадку спільного культивування клітин TA28.1 з мононуклеарними клітинами периферичної крові з пульсуючим впливом пептидом WT1 (чорні стовпчики)», «випадку культивування клітин TA28.1 з мононуклеарними клітинами периферичної крові при пульсуючому впливі пептидом WT1 в присутності антитіла проти I класу МНС», «випадку спільного культивування клітин TA28.1 з мононуклеарними клітинами периферичної крові з пульсуючим впливом пептидом WT1 в присутності анти-HLA-DR антитіла (заштриховані стовпчики)», «випадку спільного культивування клітин TA28.1 з мононуклеарними клітинами периферичної крові з пульсуючим впливом пептидом WT1 в присутності анти-HLA-DQ антитіла», «випадку спільного культивування клітин TA28.1 з мононуклеарними клітинами периферичної крові з пульсуючим впливом пептидом WT1 в присутності анти-HLA-DP антитіла», починаючи зліва.

50 На фіг. 6 показаний графік, який представляє ріст Т-клітин E15.2. На кресленні подовжня вісь представляє імп./хв. ( $\times 10^4$ ). Графіки відповідають «випадку спільного культивування клітин E15.2 з мононуклеарними клітинами периферичної крові від HLA-DPB1\*0901-позитивного суб'єкта без пульсуючого впливу пептидом WT1», «випадку спільного культивування клітин

E15.2 з моноклеарними клітинами периферичної крові від HLA-DPB1\*0901-позитивного суб'єкта з пульсуючим впливом пептидом WT1 (чорні стовчики)», «випадку спільного культивування клітин E15.2 з моноклеарними клітинами периферичної крові від HLA-DPB1\*0901-негативного суб'єкта без пульсуючого впливу пептидом WT1», «випадку спільного культивування клітин E15.2 з моноклеарними клітинами периферичної крові від HLA-DPB1\*0901-негативного суб'єкта з пульсуючим впливом пептидом WT1», починаючи зліва.

На фіг. 7 показаний графік, який представляє ріст Т-клітин E15.2. На кресленні подовжня вісь представляє імп./хв. Графіки відповідають «випадку спільного культивування клітин E15.2 з моноклеарними клітинами периферичної крові без пульсуючого впливу пептидом WT1», «випадку спільного культивування клітин E15.2 з моноклеарними клітинами периферичної крові з пульсуючим впливом пептидом WT1 в присутності антитіла проти I класу MHC», «випадку спільного культивування клітин E15.2 з моноклеарними клітинами периферичної крові з пульсуючим впливом пептидом WT1 в присутності анти-HLA-DR антитіла», «випадку спільного культивування клітин E15.2 з моноклеарними клітинами периферичної крові з пульсуючим впливом пептидом WT1 в присутності анти-HLA-DQ антитіла», і «випадку спільного культивування клітин E15.2 з моноклеарними клітинами периферичної крові з пульсуючим впливом пептидом WT1 в присутності анти-HLA-DP антитіла (заштриховані стовчики)», починаючи зліва.

На фіг. 8 показаний графік, що представляє ріст HLA-DPB1\*0501/\*0501-позитивних моноклеарних клітин. На кресленні горизонтальна вісь представляє імп./хв. Графіки відповідають зліва направо «випадку без стимуляції пептидом WT1» і «випадку зі стимуляцією пептидом WT1».

На фіг. 9 представлено, що ріст HLA-DPB1\*0501/\*0501-позитивних моноклеарних клітин придушується анти-HLA-DP антитілами. На кресленні горизонтальна вісь представляє імп./хв. Графіки відповідають зліва направо «випадку без стимуляції пептидом WT1», «випадку зі стимуляцією контрольним пептидом з ВІЛ», «випадку зі стимуляцією пептидом WT1», «випадку зі стимуляцією пептидом WT1 в присутності анти-HLA-DR антитіла», «випадку зі стимуляцією пептидом WT1 в присутності анти-HLA-DQ антитіла» і «випадку зі стимуляцією пептидом WT1 в присутності анти-HLA-DR антитіла».

На фіг. 10 показаний графік, який представляє ріст Т-клітин E15.2 у випадках використання різної концентрації пептиду WT1. На кресленні подовжня вісь відповідає імп./хв. ( $\times 10^4$ ), а горизонтальна вісь представляє концентрацію пептиду WT1.

Переважає спосіб здійснення винаходу

В одному аспекті, даний винахід стосується способу активації хелперних Т-клітин, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин і, за допомогою цього, активації хелперних Т-клітин, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. У даному винаході, пептид WT1 стосується пептиду, що складається з частини амінокислотної послідовності людського білка WT1, показаного в SEQ ID NO: 1, пептиду, який має заміщення, модифікацію або делецію однієї або декількох амінокислот в амінокислотній послідовності і здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501, або пептид, в якому різні речовини, такі як амінокислота, пептид або його аналог можуть бути приєднані на N-кінці і/або C-кінці пептиду. Речовина може бути перероблена, наприклад, ферментом в живому організмі за допомогою процесу, такого як внутрішньоклітинна переробка, і, нарешті, пептид WT1 стає формою, яка може зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. Речовина може являти собою речовину, яка модулює розчинність пептиду WT1 за даним винаходом або збільшує його стійкість (резистентність до протеази і т.д.). Альтернативно, вона може являти собою речовину, яка специфічно доставляє пептид WT1 за даним винаходом, наприклад, до даної тканини або органу, або збільшує ефективність захоплення антиген-презентуючими клітинами або тому подібне. Альтернативно, вона може являти собою пептид WT1, який обмежується тим же типом молекули I класу MHC, що і у суб'єкта, від якого одержані антиген-презентуючі клітини.

Пептид WT1 за даним винаходом здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. Таким чином, пептид WT1 може являти собою пептид, який здатний зв'язуватися щонайменше з двома з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501, або пептид, який здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501 і/або молекулою HLA-DPB1\*0901 і/або молекулою HLA-DPB1\*0501, і молекулою II класу HLA, відмінною від них, наприклад, пептид, який здатний

зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DRB1\*0405 і/або молекулою HLA-DRB1\*1502, пептид, який здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DPB1\*0901, молекулою HLA-DRB1\*0405 і/або молекулою HLA-DRB1\*0502, пептид, який здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DRB1\*0405 і/або молекулою HLA-DRB1\*1502, або пептид, який здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DPB1\*0901, молекулою HLA-DPB1\*0501, молекулою HLA-DRB1\*0405 і/або молекулою HLA-DRB1\*1502. У зв'язку з тим, що пептид WT1, що має амінокислотну послідовність: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2) здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DPB1\*0901 і молекулою HLA-DPB1\*0501, молекулою HLA-DRB1\*0405 і молекулою HLA-DRB1\*1502, переважний пептид WT1, що має таку амінокислотну послідовність. Загалом, пептид, зв'язуючий II клас MHC. Тому, пептид WT1 переважно має амінокислотну послідовність, що складається з 10-25 амінокислот.

Пептид WT1 за даним винаходом може бути синтезований способами, загалом що використовуються в даній галузі, або їх модифікаціями. Такі способи описані, наприклад, в Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide-Gosei, Maruzen Co., Ltd., 1975; Peptide-Gosei No Kiso To Jikken, Maruzen Co., Ltd., 1985; i Iyakuin No Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide-Gosei, Hirokawa - Book store, 1991.

Пептид WT1 за даним винаходом може бути також одержаний з використанням методик генетичної інженерії, основаних на відомостях про нуклеотидну послідовність, яка кодує пептид WT1. Такі методики генетичної інженерії добре відомі фахівцям в даній галузі.

Антиген-презентуючі клітини належать до клітин, таких як дендритні клітини, які можуть представляти пептид WT1 разом з молекулою II класу MHC хелперних Т-клітин або до них подібних. Таким чином, суб'єкт, в якого одержані антиген-презентуючі клітини, повинен мати такий же підклас II класу MHC (наприклад, HLA-DRB1\*1501, HLA-DPB1\*0901, HLA-DPB1\*0501, HLA-DRB1\*0405 або HLA-DRB1\*1502), як той, з яким зв'язується доданий пептид WT1.

Загалом, хелперні Т-клітини активуються розпізнаванням пептиду антигену за допомогою молекули II класу MHC на поверхні антиген-презентуючих клітин комплексом TCR-CD3 на поверхні Е-клітин, і стимуляції інтегрину на поверхні Т-клітин лігандом інтегрину на поверхні антиген-презентуючих клітин. У даному винаході, активація хелперних Т-клітин охоплює не тільки активацію хелперних Т-клітин, але також індукцію і ріст хелперних Т-клітин. Як описано вище, активовані хелперні Т-клітини виконують функцію активації імунної системи збільшенням індукції, росту або активації В-клітин або Т-клітин. Таким чином, спосіб активації хелперних Т-клітин за даним винаходом може використовуватися як ад'ювантна терапія при лікуванні раку або подібних до нього захворювань. Альтернативно, хелперні Т-клітини, активовані *in vitro* з використанням способу за даним винаходом, можуть використовуватися для лікування або профілактики раку або подібного до нього захворювання, або можуть використовуватися як ад'ювантна терапія при них. Активацію хелперних Т-клітин можна визначити вимірюванням кількості продукованого або секретованого цитокіну, такого як інтерферон і інтерлейкін, і до них подібних.

Додання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин може здійснюватися безпосередньо доданням пептиду WT1, або непрямо доданням вектора експресії, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, або доданням клітин, що містять вектор експресії. Вектор експресії, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, і клітини, що містять вектор експресії, можуть бути одержані способом, добре відомим фахівцям в даній галузі.

В іншому аспекті, даний винахід стосується композиції для активації хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, що містять пептид WT1, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. Коли композиція за даним винаходом вводиться DRB1\*1501, HLA-DPB1\*0901 або HLA-DPB1\*0501-позитивному суб'єкту, імунна система у суб'єкта активується шляхом активації хелперних Т-клітин у суб'єкта. Ген WT1 експресований на високих рівнях при різних формах раку і пухлин, включаючи гемопоетичні пухлини, такі як лейкоз, мієлодиспластичний синдром, множинна мієлома або злоякісна лімфома, і солідні форми раку, такі як рак шлунку, рак ободової кишки, рак легенів, рак молочної залози, зародковий клітинний рак, рак печінки, рак шкіри, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак матки, рак шийки матки або рак яєчників. Тому, композицію за даним винаходом можна використати як ад'ювантну терапію при лікуванні або профілактиці раку. Альтернативно, хелперні Т-клітини, активовані з використанням композиції за даним винаходом, можна використати, наприклад, як ад'ювант при лікуванні раку.

Як описано вище, пептид WT1 за даним винаходом може являти собою пептид, який здатний зв'язуватися щонайменше з двома з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-

DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501, або пептид, який здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501 і/або молекулою HLA-DPB1\*0901 і/або молекулою HLA-DPB1\*0501, і молекулою II класу МНС, відмінною від них. Таким чином, поки антиген-презентуючі клітини одержані у суб'єкта, позитивного по підкласу II класу МНС, з яким може зв'язуватися пептид WT1 за даним винаходом, може бути одержаний ефект активації хелперних Т-клітин композиції за даним винаходом.

Композиція за даним винаходом може містити, в доповнення до пептиду WT1, наприклад, носій, ексципієнт, добавку або подібний інгредієнт. У зв'язку з тим, що пептид WT1, що міститься в композиції за даним винаходом, активує хелперний пептид специфічно для пептиду WT1, композиція може містити пептид WT1, обмежений I класом МНС, або може використовуватися з цим пептидом.

Спосіб застосування композиції за даним винаходом може бути відповідним чином вибраний, в залежності від таких умов як бажана активація хелперних Т-клітин, стан антиген-презентуючої клітини. Приклади таких способів включають без обмеження внутрішньошкірне введення, підшкірне введення, внутрішньом'язове введення, внутрішньовенне введення, інтраназальне введення і пероральне введення, додання до культурального середовища антиген-презентуючої клітини. Кількість пептиду WT1, що міститься в композиції за даним винаходом, а також форма, кількість разів застосування композиції за даним винаходом і тому подібне, можна відповідним чином вибрати, в залежності від таких умов як бажана активація хелперних Т-клітин, стан антиген-презентуючої клітини.

У ще одному аспекті, даний винахід стосується композиції для активації хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, що містять вектор експресії, що включає полінуклеотид, що кодує пептид WT1, клітин, що містять вектор експресії, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. Вектор експресії, що включає полінуклеотид, що кодує пептид WT1, і клітини, що містять вектор експресії, описані вище.

В іншому аспекті, даний винахід стосується застосування вектора експресії, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, і клітин, що містять вектор експресії, для одержання композиції.

У ще одному аспекті, даний винахід стосується набору для активації хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, що містить пептид WT1, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. Переважно, набір застосовується в способі активації хелперних Т-клітин. Набір за даним винаходом може містити, в доповнення до пептиду WT1, наприклад, засіб для одержання антиген-презентуючих клітин, засіб для визначення активності хелперних Т-клітин або подібне до них. Загалом, до набору прикладене керівництво по застосуванню. Шляхом застосування набору за даним винаходом, можна ефективно індукувати хелперні Т-клітини.

В іншому аспекті, даний винахід стосується набору для активації хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин, що містять вектор експресії, включаючи полінуклеотид, що кодує пептид WT1, або клітини, що містять вектор експресії, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.

В іншому аспекті, даний винахід стосується способу лікування або профілактики раку у суб'єкта, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин і, за допомогою цього, активацію хелперних Т-клітин, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. Спосіб за даним винаходом являє собою спосіб, при якому імунна система у суб'єкта активується активацією хелперних Т-клітин і відбувається лікування або запобігання раку у суб'єкта. Додання пептиду WT1 до антиген-презентуючих клітин може здійснюватися безпосередньо доданням пептиду WT1, або непрямо доданням вектора експресії, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, або доданням клітин, що містять вектор експресії.

Як описано вище, хелперні Т-клітини розпізнають комплекс будь-якої з молекул II класу МНС, зокрема, молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501 і пептиду WT1. Тому, суб'єкт являє собою суб'єкта, що має молекулу II класу МНС, з якою зв'язується пептид WT1, наприклад, HLA-DRB1\*1501-позитивний, HLA-DPB1\*0901-позитивний або HLA-DPB1\*0501-позитивний суб'єкти. Як описано вище, пептид WT1 за даним винаходом може являти собою пептид, який здатний зв'язуватися щонайменше з двома з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501, або пептид, який здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501 і/або молекулою HLA-DPB1\*0901 і/або



молекулою HLA-DPB1\*0501, і молекулою II класу HLA, відмінною від них. Отже, в такому випадку, можна лікувати або запобігти раку у суб'єкта, позитивного по підкласу II класу МНС, з яким може зв'язуватися пептид WT1 за даним винаходом. Рак, що підлягає лікуванню або профілактиці, може являти собою будь-який рак, і його приклади включають гематопоеетичні пухлини, такі як лейкоз, мієлодиспластичний синдром, множинну мієлому або злоякісну лімфому, і солідні форми раку, такі як рак шлунку, рак ободової кишки, рак легенів, рак молочної залози, зародишевоклітинний рак, рак печінки, рак шкіри, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак матки, рак шийки матки або рак яєчників. Крім того, спосіб за даним винаходом можна застосовувати зі способом лікування або профілактики раку пептидом WT1, обмеженим I класом МНС, або фармацевтичної композиції для нього.

В іншому аспекті, даний винахід стосується фармацевтичної композиції для лікування або профілактики раку у суб'єкта активацією хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини, що містить пептид WT1, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. Ген WT1 експресований на високих рівнях при різних формах раку і пухлин, включаючи гематопоеетичні пухлини, такі як лейкоз, мієлодиспластичний синдром, множинну мієлому або злоякісну лімфому, і солідні форми раку, такі як рак шлунку, рак ободової кишки, рак легенів, рак молочної залози, зародишевоклітинний рак, рак печінки, рак шкіри, рак сечового міхура, рак передміхурової залози, рак матки, рак шийки матки або рак яєчників. Тому, фармацевтичну композицію за даним винаходом можна використати для лікування або профілактики раку.

Як описано вище, пептид WT1 за даним винаходом може являти собою пептид, який здатний зв'язуватися щонайменше з двома з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501, або пептид, який здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501 і/або молекулою HLA-DPB1\*0901 і/або молекулою HLA-DPB1\*0501, і молекулою II класу HLA, відмінною від них. Таким чином, поки антиген-презентуючі клітини одержані від суб'єкта, позитивного по підкласу II класу МНС, з яким може зв'язуватися пептид WT1 за даним винаходом, фармацевтична композиція за даним винаходом може застосовуватися для лікування або профілактики раку.

Коли фармацевтична композиція за даним винаходом вводиться, наприклад, HLA-DRB1\*1501-позитивному, HLA-DPB1\*0901-позитивному і HLA-DPB1\*0501-позитивному суб'єкту, імунна система може активуватися активацією хелперних Т-клітин пептидом WT1, що міститься в фармацевтичній композиції, за допомогою цього, здійснюючи лікування або профілактику раку. Таким чином, фармацевтична композиція за даним винаходом може застосовуватися разом зі способом лікування або профілактики раку або з іншою фармацевтичною композицією, призначеною для того ж.

Фармацевтична композиція за даним винаходом може містити, на додаток до пептиду WT1 як активного інгредієнта, наприклад, носій, ексципієнт або до них подібні інгредієнти. Пептид WT1, що міститься в фармацевтичній композиції за даним винаходом, зв'язується з молекулою II класу МНС на поверхні антиген-презентуючої клітини і активує хелперні Т-клітини. Тому, фармацевтична композиція за даним винаходом може, крім того, містити активатор, фактор росту, індуктор хелперних Т-клітин або до них подібних, або може містити пептид WT1, обмежений I класом МНС.

Спосіб введення фармацевтичної композиції за даним винаходом може бути відповідним чином вибраний, в залежності від таких умов як тип захворювання, стан суб'єкта або ділянка-мішень. Приклади таких способів включають без обмеження внутрішньошкірне введення, підшкірне введення, внутрішньом'язове введення, внутрішньовенне введення, інтраназальне введення і пероральне введення. Кількість пептиду, що міститься в фармацевтичній композиції за даним винаходом, а також в лікарській формі, кількість разів введення і тому подібне фармацевтичної композиції за даним винаходом може бути відповідним чином підібрано, в залежності від таких умов як тип захворювання, стан суб'єкта або ділянка-мішень. Одна доза пептиду звичайно складає від 0,0001 мг до 1000 мг, переважно, від 0,001 мг до 1000 мг.

У ще одному аспекті, даний винахід стосується фармацевтичної композиції для лікування або профілактики раку у суб'єкта шляхом активації хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини, що містить вектор експресії, що містить полінуклеотид, який кодує пептид WT1, або клітину, що містить вектор експресії, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.

У ще одному аспекті, даний винахід стосується застосування пептиду WT1, вектора експресії, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, або клітину, що містить вектор експресії, для одержання фармацевтичної композиції.

У ще одному аспекті, даний винахід стосується антитіла, що специфічно зв'язується з пептидом WT1, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. Антитіло за даним винаходом може бути одержане засобом або способом, відомим фахівцеві в даній галузі. Антитіло за даним винаходом може застосовуватися для діагностики різних форм раку, їх прогнозу або тому подібного.

У ще одному аспекті, даний винахід стосується способу визначення присутності або кількості пептиду WT1 у HLA-DRB1\*1501-позитивному, HLA-DPB1\*0901-позитивному або HLA-DPB1\*0501-позитивному суб'єкті, що включає:

(а) взаємодію анти-WT1 антитіла із зразком від суб'єкта; і

(б) визначення присутності або кількості анти-WT1 антитіла, що специфічно зв'язується з пептидом WT1, що міститься в зразку. Наприклад, можна діагностувати рак, його прогноз або тому подібне шляхом інкубації анти-WT1 антитіла із зразком від HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного або HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкту, або введення анти-WT1 антитіла HLA-DRB1\*1501-позитивному, HLA-DPB1\*0901-позитивному або HLA-DPB1\*0501-позитивному суб'єкту, і визначення, наприклад, їх положення, ділянки або кількості. Анти-WT1 антитіло за даним винаходом стосується антитіла, яке специфічно розпізнає пептид WT1 за даним винаходом. Анти-WT1 антитіло може являти собою моноклональне антитіло або поліклональне антитіло. Анти-WT1 антитіло може бути міченим. Як мітка, може використовуватися відома мітка, така як флуоресцентна мітка або радіоактивна мітка. Присутність або кількість пептиду WT1 можна легко і швидко визначити його міченням.

В іншому аспекті, даний винахід стосується набору для визначення присутності або кількості пептиду WT1, що містить анти-WT1 антитіло як істотний компонент.

Крім того, при визначенні присутності або кількості пептиду WT1, коли пептид WT1 здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*0405 і/або молекулою HLA-DRB1\*1502, можна визначити присутність або кількість пептиду WT1 у суб'єкта з таким підкласом II класу MHC.

В іншому аспекті, даний винахід стосується фармацевтичної композиції для лікування або профілактики раку, що містить хелперні Т-клітини, активовані пептидом WT1, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501. Лікування або профілактика раку здійснюється індукцією, ростом або активацією В-клітин або Т-клітин активованими хелперними Т-клітинами. Таким чином, фармацевтична композиція за даним винаходом в даному аспекті може використовуватися разом з іншим способом лікування або профілактики раку або з фармацевтичною композицією, призначеною для того ж. Активація хелперних Т-клітин пептидом WT1 охоплює не тільки пряму активацію пептидом WT1, але також непряму активацію вектором експресії, що містить полінуклеотид, що кодує пептид WT1, або клітину, що містить вектор експресії.

Фармацевтична композиція за даним винаходом може містити, на додаток до активованих хелперних клітин як активний інгредієнт, наприклад, носій, ексципієнт або до них подібні. Спосіб введення фармацевтичної композиції за даним винаходом можна відповідним чином вибрати, в залежності від таких умов як тип захворювання, стан суб'єкта або ділянка-мішень. Приклади таких способів включають, без обмеження, внутрішньошкірне введення, підшкірне введення, внутрішньом'язове введення, внутрішньовенне введення, інтраназальне введення і пероральне введення. Кількість хелперних Т-клітин, що містяться в фармацевтичній композиції за даним винаходом, а також в лікарській формі, кількість разів введення і тому подібне, фармацевтичної композиції за даним винаходом, можна відповідним чином вибрати, в залежності від таких умов як тип захворювання, стан суб'єкта або ділянка-мішень.

В іншому аспекті, даний винахід стосується способу лікування або профілактики раку у суб'єкта, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини і, за допомогою цього, активацію хелперних Т-клітин, і введення активованих Т-клітин суб'єкту, де пептид WT1 здатний зв'язуватися з будь-якою з молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.

В іншому аспекті, даний винахід стосується застосування пептиду WT1 для одержання фармацевтичної композиції, що містить активовані Т-клітини.

В іншому аспекті, даний винахід стосується способу визначення присутності або кількості WT1-специфічних хелперних Т-клітин у будь-якого з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкта, що включає:

(а) взаємодію комплексу пептиду WT1 антитіла і молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501 із зразком від суб'єкта; і

(б) визначення присутності або кількості хелперних Т-клітин, що розпізнає комплекс, що міститься в зразку. Зразок від суб'єкта може являти собою будь-який, поки є можливість того,

що він містить лімфоцит. Приклади зразків включають таку біологічну рідину як кров або лімфу і тканину. Комплекс пептиду WT1 антитіла і молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501 може бути одержаний, наприклад, у вигляді тетрамера або пентамера з використанням способу, відомому фахівцеві в даній галузі, такому як біотин-стрептавідиновий спосіб. Присутність або кількість хелперних Т-клітин, що розпізнають такий комплекс, може бути виміряна з використанням способу, відомого фахівцеві в даній галузі. У даному аспекті даного винаходу, комплекс може бути міченим. Як мітка, може використовуватися відома мітка, така як флуоресцентна мітка або радіоактивна мітка. Присутність або кількість пептиду WT1 можна легко і швидко визначити його міченням. Спосіб за даним винаходом в даному аспекті може використовуватися для діагностики раку, його прогнозу або тому подібного.

Таким чином, даний винахід також надає композицію для визначення присутності або кількості хелперних Т-клітин у будь-якого з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкту, що містить комплекс пептиду WT1 антитіла і молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501.

Крім того, даний винахід надає набір для визначення присутності або кількості хелперних Т-клітин у будь-якого з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкту, що містить комплекс пептиду WT1 антитіла і молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501.

Крім того, при визначенні присутності або кількості хелперних Т-клітин, коли пептид WT1 здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*0405 і/або молекулою HLA-DRB1\*1502 при визначенні присутності або кількості хелперних Т-клітин, можна визначити присутність або кількість хелперних клітин у суб'єкта з таким підкласом II класу МНС. У такому випадку, використовується комплекс пептиду WT1 і молекули II класу МНС, з якою зв'язується пептид WT1.

У ще одному аспекті, даний винахід стосується способу одержання хелперних Т-клітин з використанням комплексу пептиду WT1 і молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501, що включає:

(а) взаємодію зразка з комплексом; і

(б) одержання хелперних Т-клітин, що розпізнають комплекс, що міститься в зразку. Комплекс описаний вище. Зразок може являти собою будь-який зразок, поки є можливість того, що він містить лімфоцит. Приклади зразків включають зразок від суб'єкта, такий як кров і клітинна культура. Хелперні Т-клітини, що розпізнають комплекс, можуть бути одержані з використанням способу, відомого фахівцеві в даній галузі, такого як FACS і MACS. Даний винахід забезпечує можливість культивування одержаних хелперних Т-клітин і використання їх для лікування або профілактики різних форм раку.

Таким чином, даний винахід також стосується хелперних Т-клітин, які можуть бути одержані способом одержання хелперних Т-клітин з використанням комплексу пептиду WT1 і молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501.

Крім того, даний винахід стосується набору для одержання хелперних Т-клітин, що містить комплекс пептиду WT1 і молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501.

Крім того, при одержанні хелперних Т-клітин, коли пептид WT1 здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*0405 і/або молекулою HLA-DRB1\*1502, можна отримати хелперні Т-клітини, що розпізнають комплекс такого підкласу II класу МНС і пептиду WT1. У такому випадку, використовується комплекс пептиду WT1 і молекули II класу МНС, з якою він зв'язується.

В іншому аспекті, даний винахід стосується способу визначення присутності або кількості WT1-специфічних хелперних Т-клітин у будь-якого з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкту, що включає:

(а) стимуляцію мононуклеарних клітин периферичної крові, інвазивних лімфоцитів, пухлинних клітин, клітин в асцитичній рідині, клітин в плевральній рідині, клітин в спинномозковій рідині, клітини кісткового мозку або клітини лімфовузлів пептидом WT1; і

(б) визначення продукції цитокіну або реакції хелперних Т-клітин,

де присутність або збільшення кількості цитокіну або реакції хелперних Т-клітин вказує на присутність або кількість WT1-специфічних хелперних Т-клітин, що розпізнають комплекс, що міститься в зразку. Клітини, такі як мононуклеарні клітини периферичної крові, інвазивні лімфоцити, пухлинні клітини, клітини в асцитичній рідині, клітини в плевральній рідині, клітини в спинномозковій рідині, клітини кісткового мозку або клітини лімфовузлів, що використовуються в способі за даним винаходом, можуть бути одержані у здорового суб'єкта або пацієнта, що

страждає від раку. Шляхом використання клітин від здорового суб'єкта, можна визначити, чи страждає пацієнт від раку чи ні, чи має суб'єкт схильність до нього чи ні, і тому подібне. Шляхом використання клітин від пацієнта, що страждає від раку, можна прогнозувати, чи надасть ефект імунотерапія із застосуванням WT1 у пацієнта, що страждає від раку, або тому подібного, чи ні.

5 Симуляція клітин пептидом WT1 може здійснюватися *in vitro* або *in vivo*. У зв'язку з легкістю, переважна стимуляція *in vitro*. Присутність продукції цитокінів або реакції хелперних Т-клітин, або кількість продукованих цитокінів або реакції хелперних Т-клітин може визначатися відомим способом.

10 Наступні приклади більш детально ілюструють даний винахід, але їх не треба розглядати як такі, що обмежують його об'єм.

#### Приклади

##### 1. Одержання антиген-презентуючих клітин

Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) виділяли з периферичної крові, яку брали у здорового донора (HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного або HLA-DPB1\*0501-позитивного). PBMC висівали в 6-ямковий пластиковий планшет при щільності  $1 \times 10^7$  клітин/ямка в 1% сироватці AB (Nabi, Miami, FL), середовищі X-VIVO 15 (Cambrex) і культивували протягом 2 годин. Після культивування, суспендовані клітини видаляли, і прилипли клітини, що залишилися, культивували в 1000 Мод./мл (PeproTech), 1000 Мод./мл GM-CSF (PeproTech), 1% сироватці AB і середовищі X-VIVO 15. На 2-й і 4-й день, середовище міняли і додавали IL-4 і GM-CSF. На 6-й день до зрілих антиген-презентуючих клітин додавали 100 Мод./мл TNF- $\alpha$ .

##### 2. Індукція специфічних для пептиду WT1 CD4-позитивних Т-клітин

CD4-позитивні Т-клітини були виділені з крові, одержаної від того ж донора, з використанням RosetteSep для розділення CD4 позитивних Е-клітин (StemCell). CD4-позитивні Т клітини ( $3 \times 10^6$  клітин) були додані до кожної ямки 24-ямкового планшету. Вони були стимульовані аутологічними антиген-презентуючими клітинами ( $3 \times 10^5$  клітин), з ін'єкцією 20 мкг/мл пептиду WT1 (SEQ ID No: 2), і піддані опроміненню дозою в 25 Грей. На наступний день після стимуляції додавали 20 Од./мл IL-2. Аналогічно, стимульовані CD4-позитивні Т-клітини зазнавали стимулювання ін'єкцією 20 мкг/мл пептиду WT1 кожний подальший тиждень. Крім того, в кожний подальший день після другої стимуляції, проводили заміну середовища на середовище, яке містило IL-2. CD4-позитивні Т-клітини, індуковані за рахунок трикратної стимуляції (HLA-DRB1\*1501 і HLA-DPB1\*0901-позитивні Т-клітини, позначені відповідно як клітини TA28.1 і клітини E15.2), використовувалися для подальших експериментів.

##### 3. Вимірювання IFN- $\gamma$

35 Клітини TA28.1 і мононуклеарні клітини периферичної крові від суб'єкта, у якого були одержані клітини TA28.1, культивували в присутності 20 мкг/мл пептиду WT1 мкг/мл протягом 24 годин. Після культивування, кількість IFN- $\gamma$  в супернатанті визначали з використанням набору ELISA (імуноферментного аналізу). Як контроль, використали мононуклеарні клітини периферичної крові від HLA-DRB1\*1501-негативного суб'єкта. Результати показані на фіг. 1. Було підтверджено, що клітини TA28.1 розпізнають пептид WT1 специфічно для молекули HLA-DRB1\*1501 для збільшення продукованої кількості IFN- $\gamma$  (тобто активації).

40 Крім того, при використанні набору ELISA було підтверджено, що клітини TA28.1 і E15.2 не продукують IL-4 і IL-10. Результати показані на фіг. 2 і 3. Було підтверджено, що клітини TA28.1 і E15.2 являють собою клітини Th1.

45 HLA-DPB1\*0501/\*0501-позитивні мононуклеарні клітини використали для виконання наступних експериментів. Клітини суспендували в середовищі X-VIVO (1% сироватка AB) і додавали 20 мкг/мл пептиду WT1, 10 мкг/мл Брефелдіну А і 0,5 мкг/мл CD28/49d. Їх інкубували при 37°C і 5% CO<sub>2</sub> протягом 4 годин. Як контроль використали клітини, інкубовані без додання пептиду WT1. Після промивання буфером, додавали анти-CD3- $\alpha$ PE антитіло і анти-CD4-APC антитіло, і їх інкубували при 4°C протягом 30 хвилин. Після промивання буфером, клітини фіксували і пермеабілізували з використанням BD Cytfix/CytoPerm (4°C, 20 хвилин). Після промивання пермеабілізаційно/промивним буфером BD, додавали анти-INF- $\gamma$ -FITC (BD, клон: B27) і анти-IL-PE (eBioscience, клон: eBio64DEC17), і їх інкубували при 4°C протягом 30 хвилин. Після промивання буфером, клітини аналізували лазерним сортувальником клітин по інтенсивності їх флуоресценції FACS Aria. Результати показані на фіг. 4. Було підтверджено, що HLA-DPB1\*0501-позитивні мононуклеарні клітини ростуть і продукують IFN- $\gamma$  і IL-17.

##### 4. Аналіз росту

60 Аналіз росту виконували способом включення [<sup>3</sup>H]-тимідину. Клітини TA28.1 ( $3 \times 10^4$ ) і мононуклеарні клітини периферичної крові (HLA-DRB1\*1501-позитивні;  $1 \times 10^5$  клітин), які були піддані пульсуючій обробці пептидом WT1 і опроміненню, культивували в 96-ямковому

планшеті. Після культивування протягом 80 годин, додавали 37 кБк/лунка [<sup>3</sup>H]-тимідину (Amersham Biosciences). Їх інкубували протягом ще 16 годин і вимірювали, використовуючи β-сцинтиляційний лічильник. Дані вимірювань представляли у вигляді імпульсів/хвилини (імп./хв.). Як контроль, використали мононуклеарні клітини периферичної крові без пульсуючої обробки. Крім того, для підтвердження того, що сигнал активації специфічний для молекули HLA-DRB1\*1501, використали антитіло проти I класу MHC, анти-HLA-DR антитіло, анти-HLA-DQ антитіло і анти-HLA-DP антитіло. Результати показані на фіг. 5. Було підтверджено, що клітини TA28.1 були активовані сигналом через пептид WT1 і HLA-DRB1\*1501 і виявили ріст. Крім того, було підтверджено, що ріст був специфічним для HLA-DRB1\*1501, тому що вона придушувалася анти-HLA-DR антитілом.

Аналогічним чином, клітини E15.2 використали для виконання аналізу росту. Як додатковий контроль, використали мононуклеарні клітини периферичної крові від HLA-DPB1\*0901-негативного суб'єкта. Результати показані на фіг. 6 і 7. Було підтверджене, що клітини E15.2 були активовані сигналом через пептид WT1 і HLA-DPB1\*0901 і виявили ріст. Крім того, було підтверджено, що ріст був специфічним для HLA-DPB1\*0901, тому що вона придушувалася анти-HLA-DP антитілом.

Крім того, HLA-DPB1\*0501/\*0501-позитивні мононуклеарні клітини використали для виконання аналізу росту. Як контроль, також використали мононуклеарні клітини периферичної крові від HLA-DPB1\*0501-негативного суб'єкту. Результати показані на фіг. 8 і 9. Було підтверджено, що HLA-DPB1\*0501/\*0501-позитивні мононуклеарні клітини були активовані сигналом через пептид WT1 і HLA-DPB1\*0501 і виявили ріст. Крім того, було підтверджено, що ріст був специфічним для HLA-DPB1\*0501, тому що вона придушувалася анти-HLA-DP антитілом.

Крім того, аналіз росту клітин E15.2 був виконаний з різними концентраціями пептиду WT1. Концентрація використаного пептиду WT1 становила 0,08, 0,4, 2, 10, 50, 100 або 150 мкг/мл. Результати показані на фіг. 10. Було підтверджено, що пептиди WT1 стимулюють ріст Т-клітин E15.2 залежним від концентрації чином.

#### Промислова застосовність

Даний винахід надає спосіб активації хелперних Т-клітин пептидом WT1, який здатний зв'язуватися з молекулою HLA-DRB1\*1501, молекулою HLA-DPB1\*0901 і молекулою HLA-DPB1\*0501, і композицію для цього, а також фармацевтичну композицію для лікування і/або профілактики раку шляхом активації хелперних Т-клітин і до них подібних. Тому, даний винахід може використовуватися в галузях медицини і подібних галузях, наприклад, в галузях розробки і одержання фармацевтичної композиції для профілактики або лікування різних гематопоетичних пухлин і солідних форм раку, які на високому рівні експресують ген WT1.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.

<120> СПОСІБ АКТИВАЦІЇ ХЕЛПЕРНИХ Т-КЛІТИН І КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЗАСТОСУВАННЯ В ДАНОМУ СПОСОБІ

<130> 668070

<150> JP 2007-047317

<151> 2007-02-27

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
 210 215 220  
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
 225 230 235 240  
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
 245 250 255  
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu  
 260 265 270  
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile  
 275 280 285  
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro  
 290 295 300  
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
 305 310 315 320  
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys  
 325 330 335  
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro  
 340 345 350  
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp  
 355 360 365  
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln  
 370 375 380  
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
 385 390 395 400  
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
 405 410 415  
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
 420 425 430  
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala  
 435 440 445

Leu

<210> 2  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб активації хелперних Т-клітин, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини і, за допомогою цього, активацію хелперних Т-клітин, де пептид WT1 являє собою пептид, вибраний з (1)-(3):
  - (1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),
  - (2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і
  - (3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше, і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.
2. Спосіб за п. 1, де додання пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини здійснюється доданням пептиду WT1, доданням вектора експресії, що містить полінуклеотид, який кодує пептид WT1, або доданням клітин, що включають вектор експресії.
3. Композиція для активації хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини, що містить пептид WT1, де пептид WT1 являє собою пептид, вибраний з (1) - (3):
  - (1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),
  - (2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і
  - (3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше, і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.
4. Спосіб лікування або профілактики раку у суб'єкта, який є будь-яким з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкта, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини і, за допомогою цього, активацію хелперних Т-клітин, де пептид WT1 являє собою пептид, вибраний з (1)-(3):
  - (1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),
  - (2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і
  - (3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше, і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.
5. Фармацевтична композиція для лікування або профілактики раку у суб'єкта, який є будь-яким з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкта, активацією хелперних Т-клітин доданням пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини, що містить пептид WT1, де пептид WT1 являє собою пептид, вибраний з (1)-(3):
  - (1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),
  - (2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і
  - (3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше, і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.
6. Антитіло, що специфічно зв'язується з пептидом WT1, де пептид WT1 являє собою пептид, вибраний з (1)-(3):
  - (1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),
  - (2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і
  - (3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше,



і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.

7. Спосіб визначення присутності або кількості пептиду WT1 у будь-якого з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкта, де пептид

WT1 являє собою пептид, вибраний з (1)-(3):

(1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met

His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),

(2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і

(3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше, і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501,

і спосіб включає:

(а) взаємодію анти-WT1 антитіла, яке специфічно зв'язується з пептидом WT1, із зразком від суб'єкта, який є будь-яким з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкта, і

(б) визначення присутності або кількості анти-WT1 антитіла, що специфічно зв'язується з пептидом WT1, що міститься в зразку.

8. Спосіб лікування або профілактики раку, що включає додання пептиду WT1 до антиген-презентуючої клітини і, за допомогою цього, активацію хелперних Т-клітин, і введення суб'єкту, який є будь-яким з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкта, активованих хелперних Т-клітин, де пептид WT1 являє собою пептид, вибраний з (1)-(3):

(1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),

(2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і

(3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше,

і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.

9. Фармацевтична композиція для лікування або профілактики раку у суб'єкта, який є будь-яким з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкта, що містить хелперні Т-клітини, активована додаванням пептиду WT1, де пептид WT1 являє собою пептид, вибраний з (1)-(3):

(1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),

(2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і

(3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше,

і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501.

10. Спосіб визначення присутності або кількості WT1-специфічних хелперних Т-клітин у суб'єкта, який є будь-яким з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DPB1\*0501-позитивного суб'єкта, що включає:

(а) взаємодію комплексу пептиду WT1 і молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 або молекули HLA-DPB1\*0501 із зразком від суб'єкта; де пептид WT1 являє собою пептид, вибраний з (1)-(3):

(1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),

(2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і

(3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше,

і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501, і

(б) визначення присутності або кількості хелперних Т-клітин, що розпізнають комплекс, який міститься в зразку.

11. Спосіб визначення присутності або кількості WT1-специфічних хелперних Т-клітин у суб'єкта, який є будь-яким з HLA-DRB1\*1501-позитивного, HLA-DPB1\*0901-позитивного і HLA-DRB1\*0501-позитивного суб'єкта, що включає:

5 (а) стимуляцію мононуклеарних клітин периферичної крові, інвазивних лімфоцитів, пухлинних клітин, клітин в асцитичній рідині, клітин в плевральній рідині, клітин в спинномозковій рідині, клітин кісткового мозку або клітин лімфовузлів пептидом WT1, де пептид WT1 являє собою пептид, вибраний з (1)-(3):

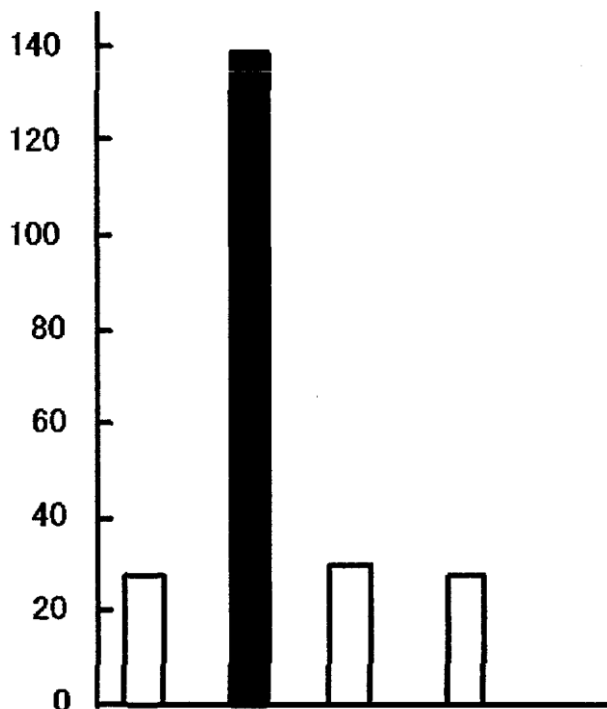
(1) пептиду, що містить амінокислотну послідовність Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO:2),

10 (2) пептиду за (1), де амінокислотна послідовність SEQ ID NO:2 має заміщення, модифікації або делеції від однієї до декількох амінокислот, і

(3) пептиду за (1) або (2), де пептид має амінокислотну послідовність, яка складається з 25 амінокислот або менше,

15 і де пептид WT1 здатний зв'язуватися щонайменше з двома з: молекули HLA-DRB1\*1501, молекули HLA-DPB1\*0901 і молекули HLA-DPB1\*0501, і

(b) визначення продукції цитокіну або реакції хелперних Т-клітин, де присутність або збільшення кількості продукованого цитокіну або реакції хелперних Т-клітин вказує на присутність або кількість WT1-специфічних хелперних Т-клітин.



Фіг. 1

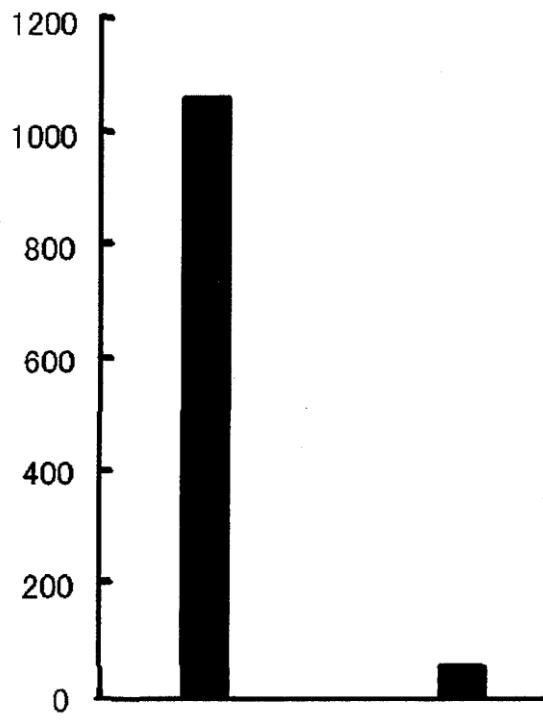


Fig. 2

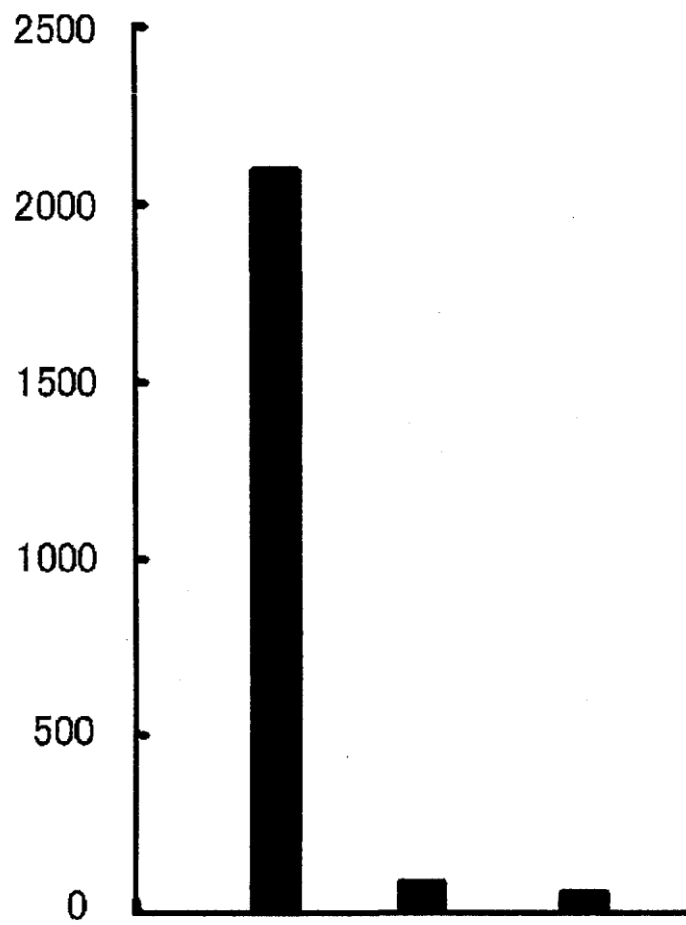


Fig. 3

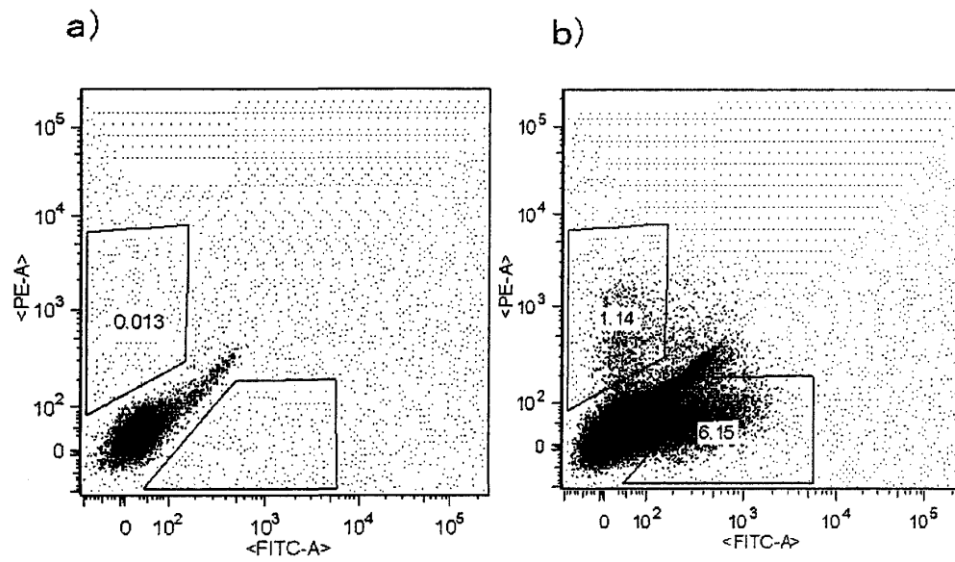


Fig. 4

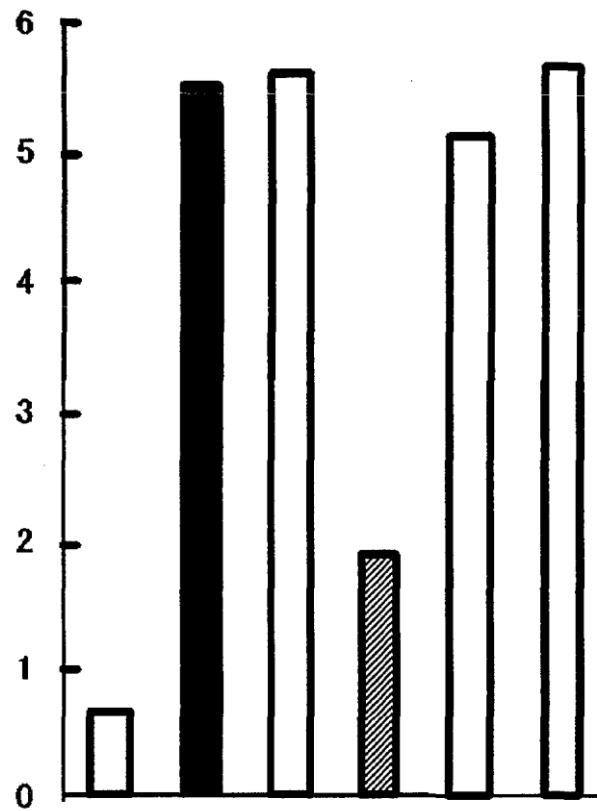


Fig. 5

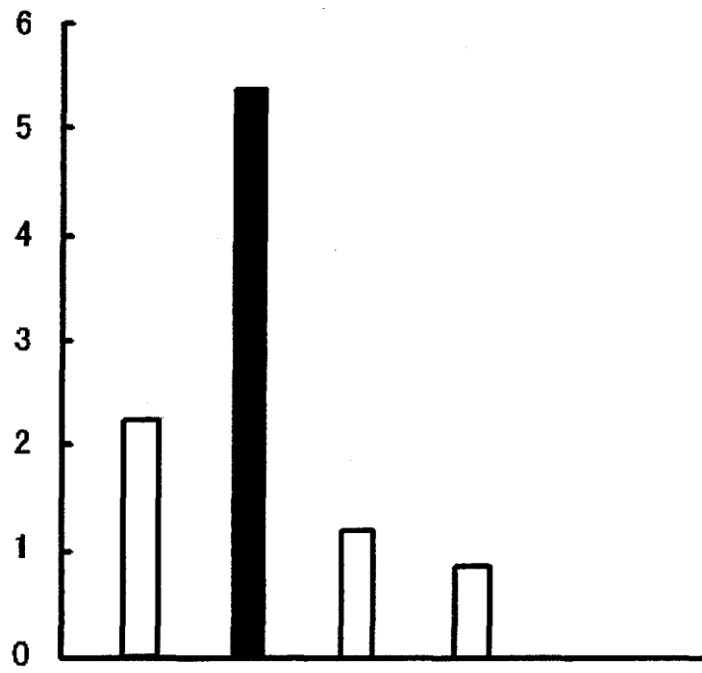


Fig. 6

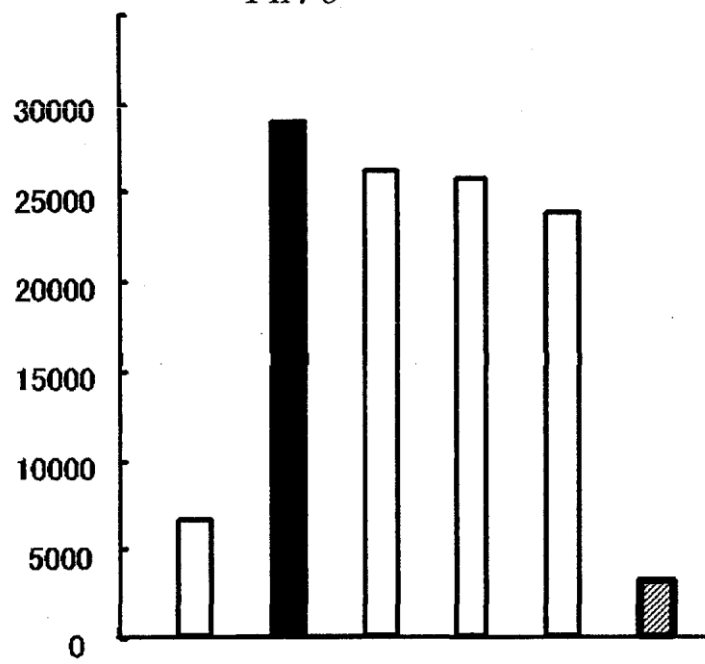


Fig. 7

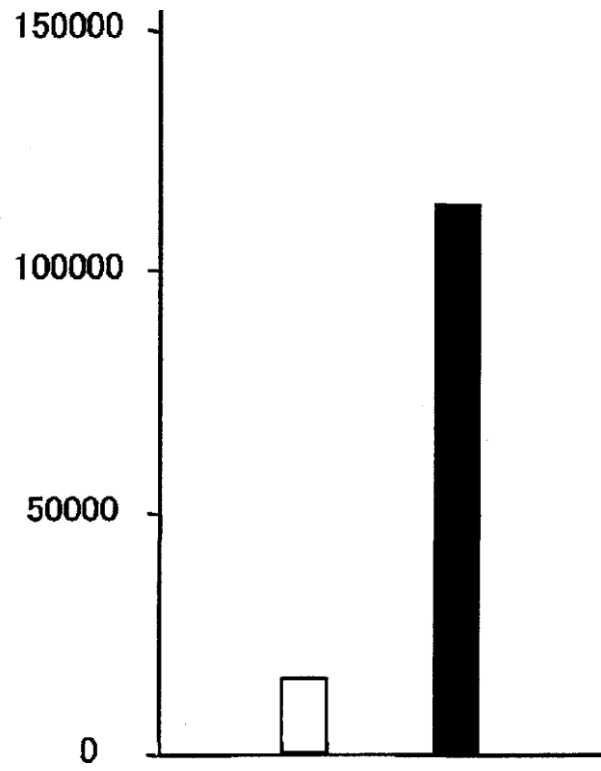


Fig. 8

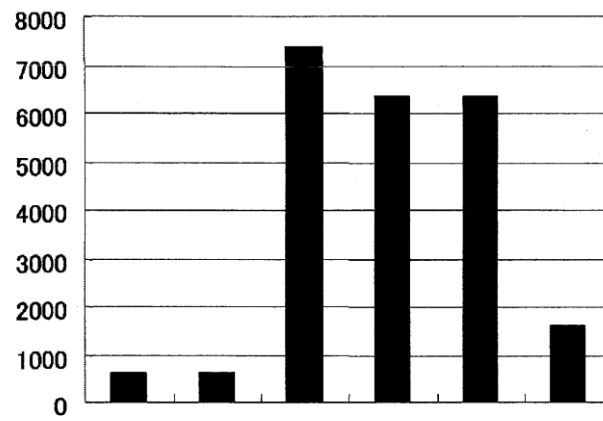
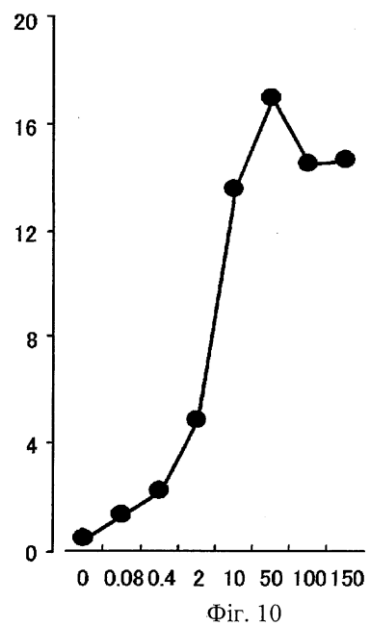


Fig. 9




---

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

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