

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0713731-1 A2**

(22) Data de Depósito: 15/06/2007
(43) Data da Publicação: 30/10/2012
(RPI 2182)



* B R P I 0 7 1 3 7 3 1 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/47
A61K 38/00
A61K 39/00
A61P 35/00
C07K 16/18
C12N 5/06

(54) Título: PEPTÍDEO, AGENTE INDUTOR DE IMUNIDADE DIRECIONADO CONTRA CÂNCERES, MEDICAMENTO PARA TRATAR E/OU PREVENIR TUMORES, AGENTE PARA INDUZIR CÉLULAS, ANTICORPO E CÉLULA

(30) Prioridade Unionista: 16/06/2006 JP 2006-167724

(73) Titular(es): Kumamoto University, Onco Therapy Science, Inc.

(72) Inventor(es): Shuichi Nakatsuru, Yasuharu Nishimura, Yoshiaki Ikuta

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007062117 de 15/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/145318de 21/12/2007

(57) Resumo: CADEIRA DOBRÁVEL. A presente invenção refere-se a uma cadeira dobrável (10) com uma armação de cadeira (12), na qual uma parte de assento (14) é pivotável em torno de um eixo de dobrar (16) entre uma posição de repouso dobrada para o alto e uma posição de assento dobrada para frente. A parte de assento (14) disposta na armação de cadeira (12) apresenta um quadro de metal (28) ininterrupto do lado superior com duas partes de quadro (30) laterais curvadas em forma de bengala, voltadas uma para a outra e uma parte de quadro de união (32) unindo no lado inferior ambas as partes de quadro (30). Das duas partes de quadro (30) em forma de bengala projetam-se lateralmente para fora estabilizadores axiais (24) determinam o eixo de dobrar (16). Os pinos de batente (26) determinam em conjunto com furos oblongos (22) em forma de arco, que são executados em elementos de guarnição (18) da armação de cadeira (12), a posição de repouso e a posição de assento da parte de assento (14).

“PEPTÍDEO, AGENTE INDUTOR DE IMUNIDADE DIRECIONADO CONTRA CÂNCERES, MEDICAMENTO PARA TRATAR E/OU PREVENIR TUMORES, AGENTE PARA INDUZIR CÉLULAS, ANTICORPO E CÉLULA”

5 CAMPO TÉCNICO

A presente invenção se refere a peptídeos novos que são eficazes como uma vacina para cânceres expressando muito SPARC, tais como câncer de estômago, câncer pancreático ou melanoma maligno (melanoma) e medicamentos compreendendo os peptídeos anteriormente mencionados usados para tratar e/ou prever tumores.

TÉCNICA ANTERIOR

Em comparação com países ocidentais, a morbidez de câncer de estômago é alta em países asiáticos, tais como Japão e China. Como resultado da difusão das verificações médicas, o uso difundido de endoscópios digestivos, e o desenvolvimento de técnicas de inspeção, tornou-se possível detectar câncer de estômago num estágio inicial, e desta forma, a quantidade de pacientes que sofrem deste câncer tem diminuído. No entanto, o câncer de estômago ainda é a segunda maior causa de morte devido a neoplasma maligno na população japonesa. Deste modo, câncer de estômago ainda é uma causa principal de morte. Dentre os vários tipos de cânceres de estômago, o câncer de estômago difuso (cirrótico) ocorre em pessoas jovens em comparação com outro tipo de câncer de estômago (adenocarcinoma). Tal câncer de estômago difuso (cirrótico) tende a ter um rápido progresso, e ocorre freqüentemente a metástase distante ou a metástase peritoneal, desta forma resultando num fraco prognóstico. Em muitos casos de câncer de estômago cirrótico, já se tornou impossível de efetuar a excisão cirúrgica no momento da diagnose. Mesmo se ainda for possível cortar o tumor, o câncer geralmente retorna após o tratamento. Desta forma, é altamente desejável estabelecer um novo método de tratamento.

A quantidade de mortes causadas por câncer pancreático tende a aumentar no Japão. 21.148 pessoas morreram devido ao câncer pancreático em 2003. Até o momento, tal câncer pancreático compõe 6,8% dos cânceres que causaram morte no Japão. Isto é, câncer pancreático é classificado como a

5 quinta causa de morte depois de câncer de pulmão, câncer de estômago, câncer de cólon e câncer de fígado. Os dados demográficos mundiais foram analisados, e a taxa de mortalidade ajustada para a idade, o que é usado para a comparação dentre as taxas de mortalidade de populações com diferentes estruturas de idade, foi calculada. Como resultado, em 2000, no caso de

10 100.000 homens, 8,6 pessoas morreram devido ao câncer pancreático no Japão, enquanto que 7,3 pessoas morreram nos Estados Unidos e 6,3 a 7,0 pessoas morreram no Reino Unido devido ao mesmo tipo de câncer. No caso de 100.000 mulheres, 4,9 pessoas morreram devido ao câncer pancreático no

15 Japão, enquanto que 5,3 pessoas morreram nos Estados Unidos e 4,8 a 5,1 pessoas morreram no Reino Unido devido ao mesmo tipo de câncer. Desta forma, a taxa de mortalidade devido ao câncer pancreático no Japão tem atingido o mesmo nível que os daqueles de países ocidentais.

Levando-se em consideração a taxa ajustada para a idade em 2000 (100.000 pessoas da população mundial), na causa dos homens, 8,6

20 pessoas morreram devido ao câncer pancreático no Japão, enquanto que 7,3 pessoas morreram nos Estados Unidos e 6,3 a 7,0 pessoas morreram no Reino Unido devido ao mesmo tipo de câncer. Além disso, no caso das mulheres, 4,9 pessoas morreram devido ao câncer pancreático no Japão, enquanto que 5,3 pessoas morreram nos Estados Unidos e 4,8 a 5,1 pessoas morreram no

25 Reino Unido devido ao mesmo tipo de câncer. Deste modo, a taxa de mortalidade devido ao câncer pancreático no Japão assumiu o mesmo nível que em países ocidentais. Apesar do desenvolvimento da visualização de diagnóstico, atualmente, aproximadamente 40% do total de pacientes japoneses com câncer pancreático sofrem de câncer pancreático progressivo

envolvendo metástase distante, e ainda, também há muitos casos onde o câncer é descoberto depois dele ter alcançado um estágio de câncer localmente avançado, no qual o tumor não pode ser retirado. A taxa de sobrevivência relativa de 5 anos dos pacientes totais com câncer pancreático é de 4,3% nos casos de diagnóstico em 1996. Embora essa taxa tenda a ser maior do que a taxa de sobrevivência convencional (2% a 3%), ela ainda é baixa. Considerando fatores de desenvolvimento de câncer pancreático, foi sugerido que vários fatores, incluindo hábitos de vida tais como fumo, adipose, refeições, bebidas alcoólicas e uso de café, assim como pancreatite crônica, diabetes, fatores genéticos, etc. estão envolvidos no início do câncer pancreático.

Câncer pancreático não tem sintomas específicos, e deste modo, em muitos casos, o câncer já progrediu quando certos sintomas aparecem. Como resultado, a taxa de sobrevivência de 5 anos dos pacientes totais é de 5% ou menos, e a prognose depois da diagnose é extremamente baixa. Devido à dificuldade na diagnose do câncer pancreático, a taxa desse câncer como uma doença causadora de morte por câncer tem aumentado gradualmente, particularmente em países desenvolvidos. Atualmente, a terapia multidisciplinar, incluindo a excisão cirúrgica como tratamento principal, radioterapia e quimioterapia, tem sido executada. Entretanto, nenhuma melhoria drástica nos efeitos terapêuticos pode ser obtida, e deste modo, o estabelecimento de uma nova estratégia terapêutica é urgentemente necessária.

Melanoma é um tipo de câncer de pele, o qual é geralmente chamado de melanoma maligno. Dentre vários tipos de câncer de pele, melanoma é altamente provável de se tornar infiltrativo e metastático e tem o maior grau de malignidade, e deste modo, é muito temido. Dentre as células que constituem a pele, várias células geram pigmentos de melanina. Tais células são chamadas de melanócitos. Quando tais melanócitos se tornam

cancerosos, ocorre o melanoma. Além disso, a frequência de ocorrência de melanoma tem aumentado, particularmente entre caucasianos, como resultado do aumento da exposição aos raios ultravioleta devido a uma redução na camada de ozônio da atmosfera causada pela destruição ambiental.

5 No Japão, a incidência de melanoma varia de 1,5 até 2 pessoas em 100.000 na população geral. Deste modo, é estimado que aproximadamente 1.500 a 2.000 pessoas desenvolvam melanoma por ano. Por outro lado, nos países ocidentais, mais de uma dúzia de pessoas desenvolvem melanoma em 100.000 na população geral. Particularmente na Austrália, vinte
10 ou mais pessoas desenvolvem tal melanoma em 100.000 na população geral e, deste modo, sabe-se que a incidência de melanoma na Austrália é a maior do mundo. Sob tais circunstâncias, pessoas que vivem na Europa, Estados Unidos e Austrália estão interessadas no melanoma, e elas prestam atenção à ocorrência de melanoma. Além disso, surpreendentemente, a ocorrência de
15 melanoma tende a ser crescente ano após ano no Japão, assim como em países estrangeiros. De acordo com estudos recentes, a quantidade de mortos anual do melanoma é de aproximadamente 450 no Japão. Melanoma se desenvolve independentemente da idade. Entretanto, a incidência dessa doença aumenta para as pessoas com mais de 40 anos, e é a mais alta para as pessoas na faixa
20 de 60 e 70 anos. O início dessa doença na infância é extremamente raro, porém isso não significa que a doença nunca se desenvolva na infância. Recentemente, a ocorrência de melanoma tende a ser crescente em pacientes jovens na faixa de 20 a 30 anos. Melanoma se desenvolve independentemente do sexo, e pacientes tanto homens quanto mulheres sofrem dessa doença. No
25 caso de pacientes japoneses, o sítio no qual o melanoma é mais propenso a se desenvolver é a sola (a sola do pé), e este contabiliza por 30% de todos os exemplos de melanoma. Como característica dos pacientes japoneses, o melanoma também se desenvolve no pé e nas porções das unhas dos dedos. Além disso, como no caso de pacientes ocidentais, o melanoma se desenvolve

em todas as partes da pele, tais como o corpo, mão, pé, face e cabeça.

Atualmente, os métodos que podem ser aplicados para tratar melanoma incluem terapia cirúrgica, quimioterapia e radioterapia. Entretanto, como terapia para aliviar os sintomas de câncer metastático ou câncer intratável, ao qual a terapia anteriormente mencionada não pode ser aplicada, uma imunoterapia para intensificar a imunidade de um paciente com câncer ao câncer, tal como suprimir o crescimento de câncer, se tornou um foco de atenção. Tal imunoterapia é atualmente eficaz para alguns pacientes.

Por outro lado, com o desenvolvimento da biologia molecular e da imunologia tumoral nos últimos anos, foi revelado que as células T citotóxicas (exterminadoras) e as células T auxiliaadoras reconhecem peptídeos gerados pela degradação de proteínas altamente e especificamente expressas nas células cancerígenas, as quais são apresentadas nas superfícies das células cancerígenas ou nas células apresentadoras de antígenos através de moléculas HLA, e que elas exibem uma reação imune para destruir tais células cancerígenas. Além disso, uma grande quantidade de proteínas e peptídeos antigênicos tumorais derivados delas, os quais estimulam tal reação imune para atacar cânceres, foi identificada, e a aplicação clínica de uma imunoterapia tumoral antígeno-específica avançou.

Moléculas HLA de classe I são expressas nas superfícies de todas as células nucleadas num corpo. Proteínas geradas nos citoplasmas e núcleos proporcionam peptídeos gerados como resultado de serem degradados nas células, e eles são expressos nas superfícies de tais células. Nas superfícies das células normais, peptídeos derivados de proteínas autólogas normais se ligam às moléculas de HLA de classe I, e as células T do sistema imune nem reconhecem e nem destroem tais peptídeos ligados às moléculas de HLA de classe I. Por outro lado, num processo no qual as células cancerígenas são convertidas em câncer, tais células cancerígenas podem expressar grandes quantidades de proteínas, as quais são dificilmente

expressas ou são somente expressas em pequenas quantidades em células normais. Se um peptídeo gerado pela degradação no citoplasma de tal proteína que é altamente expressa especificamente numa célula cancerígena se ligar a uma molécula HLA de classe I e é expressa na superfície de tal célula cancerígena, uma célula T exterminadora reconhece o peptídeo e destrói somente a célula cancerígena. Além disso, pela imunização de tal antígeno ou peptídeo câncer-específico num corpo individual, é possível destruir as células cancerígenas e suprimir o crescimento de câncer, sem prejudicar as células normais. Isto é referido como imunoterapia de câncer usando um antígeno específico de câncer. Além disso, uma molécula HLA de classe II é principalmente expressa na superfície de uma célula apresentadora de antígeno. Tal molécula HLA de classe II se liga aos peptídeos derivados de um antígeno câncer-específico gerado pela incorporação do antígeno câncer específico fora da célula e o degrada, e ele é expresso na superfície da célula. Uma célula T auxiliadora, a qual tenha reconhecido os peptídeos ligados à molécula HLA de classe II, é ativada para gerar várias citocinas que ativem outras células imunocompetentes, de modo a induzir ou reforçar uma reação imune contra um tumor.

Deste modo, se uma imunoterapia alvejando um antígeno especificamente expressando num alto nível em tal câncer for desenvolvida, ela pode proporcionar um método terapêutico, eliminando efetivamente o câncer sozinho, sem prejudicar órgãos autólogos normais. Além disso, é esperado que tal imunoterapia possa proporcionar um método terapêutico aplicável aos pacientes que sofrem de câncer em estágio terminal, para os quais nenhum outro tratamento possa ser implementado. Além disso, se um antígeno e peptídeo câncer-específico são administrados na forma de vacina a um ser humano com alto risco de desenvolver tal câncer, existe a possibilidade de que o início do câncer possa ser prevenido.

Em primeiro lugar, os inventores efetuaram uma análise de

expressão gênica no amplo genoma. Eles analisaram 23.040 tipos de genes em tecidos cancerosos e em tecidos normais de estômago utilizando um microarranjo de DNAc. Como resultado, em 11 dos 20 casos de pacientes com câncer de estômago infiltrativo difuso, os inventores identificaram a

5 proteína secretada ácida e rica em cisteína (SPARC), a qual é um gene altamente expresso em tecidos cancerosos de estômago, e o nível de expressão do qual é 5 ou mais vezes maior do que aquele dos tecidos normais (130.000 vezes maior, em média) (Figura 1). O gene SPARC é expresso num

10 baixo nível também em tecidos adiposos normais, glândula mamária, ovário, corda espinal, testículos, útero, placenta, etc. Entretanto, o nível de expressão do gene SPARC em qualquer um dos órgãos anteriormente mencionados é mais baixo do que o da membrana mucosa gástrica normal por um fator de 5 vezes ou menos (Figura 2).

Outros pesquisadores já reportaram que SPARC não é somente

15 altamente expresso no câncer de estômago infiltrativo difuso, porém também é expresso no câncer pancreático e no melanoma. Além disso, os presentes inventores descobriram que SPARC é secretado no soro de pacientes com melanoma, e que SPARC pode ser um marcador tumoral útil particularmente para a detecção precoce de melanoma (Pedido de Patente Japonesa No. 2004-

20 303688; e *Clinical Cancer Research* 11: 8079-8088, 2005).

SPARC é uma proteína secretória ácido de 43-KD consistindo de 286 aminoácidos. Essa proteína é rica em cisteína, e ela se move para o núcleo durante a fase de divisão celular. Além disso, SPARC controla a interação entre uma proteína da matriz extracelular e a célula, de modo que

25 ela também possa estar associada com o controle do crescimento celular. Uma vez que SPARC é expresso em osteoblastos, trombócitos e áreas de ferimento, é considerado que essa proteína está associada com o reparo e reconstrução de tecidos. Além disso, também é reportado que SPARC é altamente expresso também em cânceres tais como melanoma ou

osteossarcoma e nas células intersticiais de tumores, e que a expressão de SPARC é correlacionada com o prognóstico, infiltração ou metástase tumoral.

[Documento não-patente 1] Ikuta Y et al., Clinical Cancer Research 11: 8079-8088, 2005.

5 [Documento Patente 1] Pedido de Patente JP 2004-303688.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Problemas a serem solucionados pela invenção.

É um objetivo da presente invenção desenvolver um método para aumentar a imunidade de um paciente que sofre de câncer metastático ou de câncer intratável, ao qual a terapia cirúrgica, quimioterapia e radioterapia que são usados como tratamento para tumores expressando altos níveis de SPARC, tais como câncer de estômago infiltrativo difuso, câncer pancreático ou melanoma podem ser dificilmente aplicados, de modo a aliviar os sintomas de tais cânceres e de modo a executar uma imunoterapia que suprima o crescimento de tais cânceres. Em outras palavras, é um objetivo da presente invenção identificar um peptídeo derivado de uma proteína SPARC que seja superexpresso no tecido cancerígeno, o qual seja capaz de induzir uma forte resposta imune nos cânceres anteriormente mencionados sem causar o fenômeno prejudicial aos pacientes com câncer, e aplicar o peptídeo identificado numa imunoterapia tumoral. Isto é, é um objetivo da presente invenção identificar um peptídeo derivado de proteína SPARC que seja capaz de induzir as células T exterminadoras humanas e as células T auxiliadoras com reatividade a tumores, e proporcionar uma forma para executar uma imunoterapia tumoral em pacientes com vários tipos de câncer expressando em alto nível SPARC.

Formas para solucionar os problemas.

Os presentes inventores identificaram um gene, SPARC, que é altamente expresso em câncer de estômago infiltrativo difuso, pela execução da análise de microarranjo de DNAC no câncer de estômago anteriormente

mencionado e em vários tecidos normais. A expressão de SPARC também é observada em vários tipos de tecidos normais. Entretanto, o nível de expressão de SPARC em tecidos normais é significativamente mais baixo do que em tecidos cancerosos. Para examinar a presença ou ausência da indução da imunidade antitumoral por células T exterminadoras específicas de SPARC, foram utilizados camundongos BALB/c que expressam moléculas K^d de camundongo, as características da seqüência de aminoácidos do peptídeo ligado a elas sendo idênticas àquelas de HLA-A24, que é o alelo HLA de classe I mais freqüente na população japonesa. SPARC humana tem 95% de homologia de seqüência de aminoácido em comparação com SPARC de camundongo. Deste modo, peptídeos consistindo de seqüências de aminoácidos compartilhadas entre humanos e camundongos, e com uma porção de ligação compartilhada por HLA-A24 humano e K^d de camundongo foram sintetizados. Depois disso, camundongos BALB/c (K^d-expressos) foram imunizados com células dendríticas derivadas da medula óssea, nos quais tal mistura peptídica foi carregada, e os inventores investigaram se as células T exterminadoras reativas às células cancerígenas expressando SPARC eram induzidas ou não. Além disso, em relação aos camundongos que foram pré-tratados pelo mesmo método de imunização que o descrito acima, os inventores investigaram se o crescimento de células cancerígenas transplantadas expressando SPARC de camundongo é suprimido e se o tempo de sobrevivência dos camundongos é prolongado ou não. Além disso, também foi analisado se o fenômeno prejudicial aparece ou não juntamente com a ocorrência do fenômeno auto-imune nos camundongos imunizados com peptídeo também foi examinado. Como resultado, foi descoberto que o peptídeo com a seqüência de aminoácidos conforme mostrado em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3 é capaz de induzir as células T exterminadoras que destroem células cancerígenas expressando SPARC. Além disso, o crescimento das células cancerígenas de camundongo transplantadas

expressando SPARC é suprimido em camundongos imunizados com o peptídeo anteriormente mencionado e, deste modo, o tempo de sobrevivência dos camundongos é prolongado. A presente invenção foi completada baseando-se nessas constatações.

5 A presente invenção proporciona a seguinte invenção.

(1) Um peptídeo de qualquer um dentre os seguintes:

(A) Um peptídeo o qual consiste da seqüência de aminoácidos conforme demonstrado em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3; ou

10 (B) Um peptídeo o qual consiste de uma seqüência de aminoácidos compreendendo uma substituição ou adição de um ou vários aminoácidos em relação ao peptídeo consistindo da seqüência de aminoácidos conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3, e o qual tenha a capacidade de induzir as células T citotóxicas (exterminadoras).

15 (2) Agente indutor imune para cânceres, o qual compreende pelo menos um tipo de peptídeo de (1).

(3) Um medicamento para tratar e/ou prevenir tumores, o qual compreende pelo menos um tipo do peptídeo de (1).

20 (4) Um agente para induzir células apresentadoras de antígeno com alta capacidade de induzir células T reativas a tumor, o qual compreende pelo menos um tipo do peptídeo de (1).

(5) Um agente para induzir células T reativas a tumor, o qual compreende pelo menos um tipo do peptídeo de (1).

25 (6) Um agente para induzir células apresentadoras de antígeno com alta capacidade de induzir células T reativas a tumor, o qual compreende um gene codificando um peptídeo de qualquer um dos seguintes:

(A) Um peptídeo o qual consiste da seqüência de aminoácidos conforme demonstrado em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3; ou

(B) Um peptídeo o qual consiste de uma seqüência de aminoácidos compreendendo uma substituição ou adição de um ou vários

aminoácidos em relação ao peptídeo consistindo da seqüência de aminoácidos conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3, e o qual tenha a capacidade de induzir as células T exterminadoras.

(7) Um anticorpo contra o peptídeo de (1).

5 (8) Uma célula T exterminadoras, uma célula T auxiliadora ou uma população de imunócitos, compreendendo tais células, a qual é induzida usando o peptídeo de (1).

(9) Uma célula apresentadora de antígeno, a qual apresente um complexo de uma molécula HLA e o peptídeo de (1).

10 (10) A célula apresentadora de antígeno de (9), a qual é induzida usando o agente de (4) ou (6).

MELHOR MODO DE EXECUTAR A INVENÇÃO

(1) Peptídeo da presente invenção, e agente imunoadjuvante para cânceres compreendendo o mesmo.

15 O peptídeo da presente invenção é descrito conforme a seguir:

(A) Um peptídeo o qual consiste da seqüência de aminoácidos conforme demonstrado em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3; ou

(B) Um peptídeo o qual consiste de uma seqüência de aminoácidos compreendendo uma substituição ou adição de um ou vários aminoácidos em relação à seqüência de aminoácidos conforme mostrada em
20 qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3, e o qual tenha a capacidade de induzir as células T exterminadoras.

O termo “peptídeo com capacidade de induzir células T citotóxicas” é usado na presente especificação para significar um peptídeo
25 com a atividade de estimular células T exterminadoras reativas a tumor.

Um método de obtenção/produção do peptídeo da presente invenção não está particularmente limitado. Ou um peptídeo quimicamente sintetizado ou um peptídeo recombinante produzido por recombinação genética pode ser usado.

Quando um peptídeo quimicamente sintetizado é obtido, o peptídeo da presente invenção pode ser sintetizado por um método de síntese química, tal como um método Fmoc (método fluorenilmetiloxicarbonil) ou um método tBoc (método t-butiloxicarbonil), por exemplo.

5 Além disso, o peptídeo da presente invenção também pode ser sintetizado usando vários tipos de sintetizadores de peptídeo comercialmente disponíveis.

Quando o peptídeo da presente invenção é produzido na forma de uma proteína recombinante, DNA com uma seqüência de nucleotídeo
10 codificando o peptídeo anteriormente mencionado, um mutante seu ou um homólogo seu é obtido, e este é, a seguir, introduzido num sistema de expressão preferido, de modo a produzir o peptídeo da presente invenção.

Como um vetor de expressão, um vetor capaz de se replicar autonomicamente numa célula hospedeira ou capaz de ser incorporado no
15 cromossomo de uma célula hospedeira pode ser preferivelmente usado. Um vetor de expressão compreendendo um promotor numa posição capaz de expressar um gene codificando o peptídeo é usado. Além disso, um transformante com um gene codificando o peptídeo da presente invenção pode ser produzido pela introdução do vetor de expressão anteriormente
20 mencionado num hospedeiro. Como um hospedeiro, qualquer uma dentre células bacteriana, de levedura, animal e de inseto podem ser usadas. Um vetor de expressão pode ser introduzido num hospedeiro de acordo com um método conhecido, dependendo do tipo de tal hospedeiro.

Na presente invenção, o transformante conforme produzido
25 acima é cultivado, e o peptídeo da presente invenção é, a seguir, gerado e acumulado numa cultura. Depois disso, o peptídeo da presente invenção é coletado a partir da cultura, de modo a isolar um peptídeo recombinante.

Quando tal transformante é um procarioto, tal como *Escherichia coli* ou um eucarioto, tal como levedura, um meio usado para o

cultivo de tais microrganismos pode ser ou um meio natural ou um meio sintético, contanto que ele contenha uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, sais inorgânicos e semelhantes que possam ser assimilados pelos microrganismos anteriormente mencionados, e que seja capaz de executar eficientemente a cultura do transformante. Além disso, tal cultura pode ser executada sob condições que são comumente aplicadas para o cultivo dos microrganismos anteriormente mencionados. Depois do completamento da cultura, o peptídeo da presente invenção pode ser isolado e purificado da cultura do transformante de acordo com um método comum de isolamento e purificação de um peptídeo.

O termo “um ou vários aminoácidos” é usado na presente especificação para significar geralmente de 1 a 10 aminoácidos, preferivelmente de 1 a 8 aminoácidos, mais preferivelmente de 1 a 5 aminoácidos, e particularmente preferivelmente de 1 a 3 aminoácidos (por exemplo, 1, 2 ou 3 aminoácidos).

Um peptídeo consistindo de uma seqüência de aminoácidos compreendendo uma substituição ou adição de um ou de vários aminoácidos em relação ao peptídeo consistindo da seqüência de aminoácidos conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3 pode ser apropriadamente produzido ou adquirido por pessoas versadas na técnica baseando-se na informação considerando a seqüência de aminoácidos conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3. Em outras palavras, um peptídeo o qual consiste de uma seqüência de aminoácidos compreendendo uma substituição ou adição de um ou vários aminoácidos em relação à seqüência de aminoácidos conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3 e a qual tenha a capacidade de induzir células T citotóxicas pode ser produzido por qualquer dado método conhecido pelas pessoas versadas na técnica, tal como a síntese química anteriormente mencionada, meios de engenharia genética ou mutagênese. Por exemplo, a mutagênese direcionada a

sítio, a qual é uma forma de engenharia genética, é útil porque é uma forma para introduzir uma mutação específica numa posição específica. Tal mutagênese direcionada a sítio pode ser executada por um método descrito em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989 (de agora em diante abreviado como *Molecular Cloning 2^a Ed.*), *Current Protocols in Molecular Biology*, Suplemento 1 a 38, John Wiley & Sons (1987-1997) (de agora em diante abreviado como *Current Protocols in Molecular Biology*), etc.

Conforme descrito posteriormente nos exemplos, o peptídeo anteriormente mencionado da presente invenção é capaz de induzir imunidade contra cânceres. Deste modo, a presente invenção proporciona um agente imunoadjuvante para cânceres, o qual compreende o peptídeo da presente invenção.

O agente imunoadjuvante da presente invenção usado para cânceres é usado *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, e preferivelmente *ex vivo*, de modo que ele possa incluir células T exterminadoras, células T auxiliaadoras ou uma população de imunócitos compreendendo tais células, deste modo conferindo imunidade contra os cânceres.

(2) Anticorpo da presente invenção

A presente invenção também se refere a um anticorpo que reconhece uma parte ou todo o peptídeo anteriormente mencionado da presente invenção como um epítopo (antígeno) e uma célula T exterminadoras induzida por estimulação *ex vivo* ou *in vitro* usando o peptídeo anteriormente mencionado. Em geral, sabe-se que tal célula T exterminadoras exibe uma atividade antitumoral que é mais forte do que aquela do anticorpo.

O anticorpo da presente invenção pode ser ou um anticorpo policlonal ou um anticorpo monoclonal. Tal anticorpo pode ser produzido por um método conhecido.

Por exemplo, um anticorpo policlonal pode ser produzido pela

imunização de um mamífero ou aves com o peptídeo da presente invenção usado como antígeno, a seguir pela coleta de sangue do mamífero ou aves, e então pela separação e purificação do sangue coletado. Por exemplo, mamíferos ou aves, tais como um camundongo, um hamster, um porquinho-da-índia, uma galinha, um rato, um coelho, um canino, uma cabra, uma ovelha, um bovino ou um cavalo podem ser imunizados. Tal método de imunização é conhecido pelas pessoas versadas na técnica. Por exemplo, um antígeno pode ser administrado 2 ou 3 vezes em intervalos de 7 a 30 dias. Como uma dosagem, aproximadamente 0,05 a 2 mg de antígeno podem ser administrados uma vez, por exemplo. Uma via de administração não é particularmente limitada, e a administração subcutânea, a administração intracutânea, a administração intraperitoneal, a administração intravenosa, a administração intramuscular, etc. pode ser selecionada, conforme apropriado. Além disso, um antígeno pode ser dissolvido num tampão adequado contendo um adjuvante, por exemplo, num tampão adequado contendo um adjuvante comumente usado, tal como adjuvante de Freund completo ou hidróxido de alumínio, e ele pode ser usado.

Deste modo, o mamífero imunizado ou ave é criado por certo período de tempo. Depois disso, se o título do anticorpo aumentar, um reforço pode ser efetuado usando 100 a 1.000 µg de antígeno, por exemplo. Um ou dois meses depois da imunização final, o sangue é coletado do mamífero ou ave imunizado. O sangue coletado dessa forma (antissoro policlonal) é, a seguir, separado e purificado por um método comum incluindo centrifugação, precipitação usando sulfato de amônio ou polietilenoglicol, cromatografia tal como cromatografia de gel filtração, cromatografia de troca iônica ou cromatografia por afinidade, etc. de modo a obter um anticorpo policlonal que reconheça o peptídeo da presente invenção.

Por outro lado, um anticorpo monoclonal pode ser obtido pelo preparo de um hibridoma. Por exemplo, tal hibridoma pode ser obtido por

fusão celular de uma célula geradora de anticorpo e uma célula de mieloma. Um hibridoma que gere o anticorpo monoclonal da presente invenção pode ser obtido pelo seguinte método de fusão celular.

5 Como uma célula geradora de anticorpo, uma célula de baço, uma célula do linfonodo, um linfócito B ou semelhante obtido a partir do animal imunizado é usada. Como um antígeno, o peptídeo da presente invenção é usado. Como um animal a ser imunizado, um camundongo, um rato ou semelhante pode ser usado. Um antígeno é administrado em tal animal de acordo com um método comum. Por exemplo, uma suspensão ou líquido emulsificado compreendendo um adjuvante, tal como adjuvante Freund 10 completo ou adjuvante Freund incompleto e o peptídeo da presente invenção usado como antígeno é administrado a um animal através da administração venosa, administração subcutânea, administração intracutânea, administração intraperitoneal, etc. várias vezes, de modo a imunizar o animal. Depois disso, 15 uma célula geradora de anticorpo, tal como uma célula do baço, é obtida a partir do animal imunizado, e a célula do baço obtida dessa forma é, a seguir, fundida com uma célula de mieloma de acordo com um método conhecido (G. Kohler et al., Nature, 256 495 (1975)), produzindo desta forma um hibridoma.

20 Exemplos de uma cepa de célula de mieloma usada na fusão celular incluem uma cepa P3X63Ag8, uma cepa P3U1 e uma cepa Sp2/0, no caso de um camundongo. Quando tal fusão celular é executada, um promotor de fusão, tal como polietilenoglicol ou vírus Sendai é usado. Para seleção de um hibridoma depois do completamento da fusão celular, meio de 25 hipoxantina aminopterina timidina (HAT) é usado de acordo com um método comum. O hibridoma obtido como resultado da fusão celular é clonado por um método de diluição limitante. Além disso, conforme necessário, a varredura é efetuada por um imunoenensaio enzimático usando o peptídeo da presente invenção, de modo a obter uma cepa celular que gere um anticorpo

monoclonal reconhecendo especificamente o peptídeo da presente invenção.

Para produzir um anticorpo monoclonal de interesse a partir do hibridoma obtido dessa forma, o hibridoma pode ser cultivado por um método de cultivo celular comum ou pelo método de formação de ascite, e o anticorpo monoclonal de interesse pode ser, a seguir, purificado a partir do sobrenadante de cultura ou ascite. O anticorpo monoclonal pode ser purificado a partir do sobrenadante de cultura ou ascite de acordo com um método comum. Por exemplo, fracionamento de sulfato de amônio, gel filtração, cromatografia de troca iônica, cromatografia por afinidade e outros métodos podem ser combinados conforme apropriado e usados.

Além disso, os fragmentos do anticorpo anteriormente mencionado também estão incluídos no escopo da presente invenção. Exemplos de tal fragmento de anticorpo incluem um fragmento $F(ab')_2$ e um fragmento Fab' .

(3) Célula T exterminadoras, célula T auxiliadora ou população de imunócitos compreendendo tais células

A presente invenção também se refere a uma célula T exterminadoras, a uma célula T auxiliadora ou a uma população de imunócitos compreendendo tais células, a qual é induzida por estimulação *in vivo* usando o peptídeo da presente invenção. Por exemplo, quando linfócitos do sangue periférico ou linfócitos infiltrantes tumorais são estimulados *in vitro* com o peptídeo da presente invenção, células T ativadas exibindo reatividade tumoral são induzidas. Deste modo, as células T ativadas podem ser eficientemente usadas para uma imunoterapia adotiva de câncer. Além disso, o peptídeo da presente invenção é deixado ser expresso em células dendríticas que são fortes células apresentadoras de antígeno *in vivo* ou *in vitro*, e células dendríticas expressando o peptídeo antigênico são, a seguir, administradas de modo a induzir uma resposta imune aos tumores.

Preferivelmente, uma célula T exterminadoras, uma célula T

auxiliadora ou uma população de imunócitos compreendendo tais células pode ser induzida por estimulação *ex vivo* ou *in vitro* usando o peptídeo da presente invenção e um imunostimulador. Exemplos de tais imunostimuladores aqui utilizados incluem um fator de crescimento celular e
5 uma citocina.

A célula T exterminadoras, célula T auxiliadora ou população de imunócitos compreendendo tais células obtidas dessa forma é transferida para um corpo, de modo que o tumor possa ser suprimido e que o câncer seja prevenido e/ou tratado.

10 Além disso, usando o peptídeo da presente invenção, uma célula T exterminadoras, célula T auxiliadora ou população de imunócitos compreendendo tais células, a qual é capaz de suprimir o crescimento tumoral conforme descrito acima pode ser produzida. Concordantemente, a presente invenção proporciona uma solução de cultura celular compreendendo células
15 T reativas a tumor e o peptídeo da presente invenção. Usando tal solução de cultura de células, uma célula T exterminadoras, célula T auxiliadora ou população de imunócitos compreendendo tais células, a qual seja capaz de suprimir o crescimento tumoral, pode ser produzida. Ainda adicionalmente, a presente invenção também proporciona um kit de cultura celular para produzir
20 uma célula T exterminadoras, uma célula T auxiliadora ou uma população de imunócitos compreendendo tais células, a qual compreenda a solução de cultura celular anteriormente mencionada e um frasco de cultura celular.

(4) Medicamento da presente invenção para tratar e/ou prevenir tumor (vacina de câncer).

25 Uma vez que o peptídeo da presente invenção é capaz de induzir células T exterminadoras específicas para célula cancerígena, pode-se esperar que ela seja um agente para tratar e/ou prevenir câncer. Por exemplo, bactérias tais como BCG (bacilo Calmette-GuErin), o qual foi transformado com DNA recombinante produzido pela incorporação de um gene codificando

o peptídeo da presente invenção num vetor adequado, ou vírus tal como vírus vaccinia, no genoma do qual DNA codificando o peptídeo da presente invenção tenha sido incorporado, podem ser efetivamente usadas como vacina viva para tratar e/ou prevenir cânceres humanos. É para ser notado que o método de dosagem e administração de uma vacina de câncer são os mesmos que aqueles no caso de uma vacinação com smallpox normal ou vacinação por BCG.

Em outras palavras, DNA codificando o peptídeo da presente invenção (o qual é usado como tal, ou está na forma de DNA de plasmídeo incorporado num vetor de expressão) ou um vírus recombinante ou bactéria recombinante compreendendo o DNA anteriormente mencionado, pode ser administrado como uma vacina de câncer para mamíferos incluindo um ser humano, diretamente ou num estado onde ele esteja disperso num adjuvante. Da mesma forma, o peptídeo da presente invenção pode também ser administrado como uma vacina de câncer num estado onde ela esteja dispersa num adjuvante.

Exemplos de um adjuvante usado na presente invenção incluem um adjuvante de Freund incompleto, BCG, dimicolato de trealose (TDM), lipopolissacarídeo (LPS), um adjuvante de alume e um adjuvante de sílica. Do ponto de vista da capacidade de indução de anticorpos, um adjuvante de Freund incompleto (IFA) é preferivelmente usado.

O tipo de câncer não está particularmente na presente invenção. Exemplos específicos de um câncer incluem câncer de estômago, câncer de cólon, câncer de esôfago, câncer pancreático, câncer hepático, câncer da vesícula biliar, câncer de pulmão, câncer de mama, câncer da tireóide, melanoma (melanoma maligno), câncer de pele, osteossarcoma, feocromocitoma, câncer de cabeça e pescoço, tumor cerebral, leucemia mielógena crônica, leucemia mielógena aguda, linfoma maligno, câncer de rim, câncer de bexiga, câncer de próstata, câncer testicular, câncer uterino,

câncer ovariano e sarcoma de tecido conjuntivo. Dentre estes, cânceres que expressam altamente SPARC, tal como câncer de estômago (particularmente, câncer de estômago infiltrativo difuso), câncer pancreático e melanoma (melanoma maligno) são exemplos típicos.

5 O peptídeo da presente invenção age como um epítopo de célula T para induzir uma célula T exterminadoras ou célula T auxiliadora específica de célula cancerígena. Deste modo, o peptídeo da presente invenção é útil como um agente para prevenir e/ou tratar cânceres humanos. Além disso, se o anticorpo da presente invenção for capaz de inibir a
10 atividade de SPARC como antígeno de câncer, ele também será útil como um agente para prevenir e/ou tratar cânceres humanos. Como uso atual, o peptídeo ou anticorpo da presente invenção pode ser administrado como um produto de injeção, diretamente ou juntamente com um veículo e/ou diluente farmacologicamente aceitável, e quando necessário, também juntamente com
15 as substâncias adjuvantes mencionadas abaixo. Além disso, o peptídeo ou anticorpo da presente invenção também pode ser administrado por um método tal como pulverização, através da absorção transdérmica através da mucosa. O termo “veículo” é aqui utilizado para significar albumina de soro humano, por exemplo. Além disso, como diluente, PBS, água destilada ou semelhante
20 podem ser usados.

Como dosagem, o peptídeo ou anticorpo da presente invenção pode ser administrado na faixa entre 0,01 e 100 mg por adulto por administração. Entretanto, a dosagem não está limitada à faixa anteriormente mencionada. Da mesma forma, a forma de dosagem não é particularmente
25 limitada. um produto liofilizado, ou um grânulo produzido pela adição de um excipiente tal como açúcar, pode também ser disponível.

Exemplos de uma substância adjuvante, a qual pode ser adicionada ao agente da presente invenção para intensificar a atividade indutora de célula T tumor-reativa incluem: murmaril-dipeptídeo (MDP);

componentes bacterianos tais como bactéria BCG; ISCOM descrito em Nature, vol. 344, p. 873 (1990); saponina QS-21 descrita em J. Immunol. vol. 148, p. 1438 (1992); lipossoma; e óxido de alumínio. Além disso, imunoestimuladores tais como lentinano, esquizofilano ou Picibanil também podem ser usados como substâncias adjuvantes. Outros exemplos de produtos usados aqui como substâncias adjuvantes incluem: citocinas para intensificar o crescimento ou diferenciação de células T, tais como IL-2, IL-4, IL-12, IL-1, IL-6, ou TNF; α -galactosilceramida para ativar células NKT; CpG que se liga a um receptor tipo Toll para ativar o sistema imune natural; e lipopolissacarídeo (LPS).

Além disso, o peptídeo antígeno anteriormente mencionado é adicionado *in vitro* em células coletadas de um paciente HLA-A24 positivo ou de células alogênicas isoladas de qualquer pessoa que seja HLA-A24-positivo, seguido pela apresentação de antígeno das células. Depois disso, as células são administradas no vaso sanguíneo do paciente, de modo que as células T exterminadoras possam ser induzidas eficientemente no corpo do paciente. Além disso, o presente peptídeo é adicionado nos linfócitos de sangue periférico de um paciente, e a mistura obtida é, a seguir, cultivada *in vitro*. Por meio disso, as células T exterminadoras podem ser induzidas *in vitro*, e elas podem, a seguir, retornar para o vaso sanguíneo do paciente. Tal terapia envolvendo transferência celular tem sido executado como um método para tratar cânceres, e, deste modo, este é um método bem conhecido pela pessoa versada na técnica.

Pela introdução do peptídeo da presente invenção num corpo, células T reativas a tumor são induzidas e, como resultado, um efeito antitumoral pode ser antecipado. Além disso, quando os linfócitos são estimulados pelo peptídeo da presente invenção *ex vivo* ou *in vitro*, células T ativadas são induzidas. As células T ativadas são injetadas numa área afetada. Deste modo, esta técnica pode ser efetivamente usada para uma imunoterapia

adotiva.

A presente invenção será agora descrita nos exemplos a seguir. Entretanto, esses exemplos não são tencionados a limitar o escopo da presente invenção.

5 EXEMPLOS

[Exemplo 1]

(1) Análise de microarranjo de DNA

Em relação ao tecido canceroso cortado de um paciente com
câncer de estômago infiltrativo difuso, um tecido canceroso foi distinto de
10 tecidos não-cancerosos por microdissecção de captura a Laser, e ambas as
porções cancerosas e não-cancerosas foram, a seguir, cortadas. em seguida,
RNA foi extraído de cada tecido. Quando o DNAc foi sintetizado de tal RNA
por uma reação de transcrição reversa, DNAc gerado de tecido canceroso foi
15 marcado fluorescentemente com Cy5, e o DNAc gerado de tecido não-
canceroso foi marcado fluorescentemente com Cy3. Subseqüentemente, as
duas preparações de DNAc foram misturadas para obter o DNA alvo. A
hibridização foi executada numa lâmina de vidro, na qual sonda de DNAc foi
disposto, e ligações não-específicas foram a seguir, eliminadas por lavagem.
Após isso, imagens fluorescentes obtidas depois da hibridização foram
20 capturadas usando uma câmera CCD ou um scanner de fluorescência, e elas
foram, a seguir, apresentadas com cores falsas (Cy5: vermelho; Cy3: verde).
Ao mesmo tempo, a proporção dos dois tipos de intensidade de fluorescência
(R/G) foi calculada, e ela foi indicada como um perfil de expressão gênico.
Além disso, a expressão de 23.040 tipos de genes nas porções cancerosas e
25 não-cancerosas de 20 pacientes com câncer de estômago infiltrativo difuso
foram submetidos à investigação comparativa, e 15 tipos de genes dos quais a
proporção de expressão em tecido canceroso/tecido não-canceroso foi 5 ou
maior foram selecionados (Figura 1).

Subseqüentemente, o perfil de expressão dos 23.040 tipos de

genes nos tecidos normais de 29 órgãos (incluindo 4 órgãos embrionários) foi analisado, e os genes dos quais o nível de expressão foi baixo em tais órgãos normais foram selecionados. No caso de SPARC, o qual nós selecionamos como um antígeno tumoral nesse experimento, a proporção de expressão de porções cancerosas/não-cancerosas foi de 5 ou mais (133.359 vezes em média) em 11 dos 20 pacientes com câncer de estômago infiltrativo difuso. SPARC foi expresso em alguns tecidos normais, porém os níveis de expressão em tais tecidos não-cancerosos foram significativamente menores do que em tecidos cancerosos (Figura 2).

10 [Exemplo 2]

(2) Seleção de repertórios de peptídeo SPARC restritos a HLA-A24 humano e K^d de camundongo.

Em SPARC humano e de camundongo com homologia de 95%, os seguintes peptídeos foram selecionados do fragmento SPARC, dos quais seqüências de aminoácidos foram compartilhadas entre humanos e camundongos. As seqüências de aminoácidos total de moléculas SPARC foram buscadas baseando-se na informação conhecida considerando seqüências de aminoácidos comumente observadas em peptídeos com forte afinidade de ligação tanto a moléculas K^d de camundongo quanto de HLA-A24 humana. Os repertórios de peptídeos que foram considerados como tendo alta afinidade de ligação para os dois tipos de moléculas foram selecionados pelo uso de um programa de computador. Como resultado, 4 tipos de peptídeos foram selecionados como peptídeos candidatos (Tabela 1).

Tabela 1. Peptídeos derivados SPARC possivelmente com afinidade de ligação às moléculas HLA-A24 humana e K^d de camundongo

Peptídeo	Seqüência	Posição de início	Pontuação de ligação	
			A24	K ^d
SPARC-K ^d -1	DYIGPCKYI	143	75	400
SPARC-K ^d -2	HFFATKCTL	123	20	1382
SPARC-K ^d -3	EFPLMRDWL	161	30	960
SPARC-K ^d -4	MYIFPVHWQF	225	210	120

Prognosticado por: http://bimas.dcrn.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform

SPARC Kd-1: SEQ ID NO: 1

SPARC Kd-3: SEQ ID NO: 2

SPARC Kd-4: SEQ ID NO: 3

(3) Vacina de célula dendrítica (DC)

Células dendríticas derivadas da medula óssea (BM-DC) foram induzidas das células da medula óssea derivadas da medula óssea de BALBc pelo uso de GM-CSF conforme descrito anteriormente por nós (Nakatsura, T et al., Clin Cancer Res 10, 8630-8640, 2004). Deste modo, as BM-DC obtidas foram cultivadas com uma mistura dos 4 tipos de peptídeos selecionados conforme descrito acima numa concentração de 10 μ M por 2 horas, e a BM-DC pulsada com peptídeo (5×10^5 células) foram, a seguir, administradas intraperitonealmente em cada camundongo. Depois de um intervalo de 1 semana, as mesmas BM-DC pulsadas com peptídeo foram administradas ao camundongo duas vezes, de modo que o camundongo foi fortemente imunizado. Após isso, as células do baço do camundongo foram recuperadas e a indução das células T exterminadoras foi avaliada. Para analisar estritamente a indução das células T exterminadoras derivadas das células T CD8⁺, depois da coleta do baço, as células T CD4⁺ foram eliminadas das células de baço coletadas, usando pérolas de MACS, e as células remanescentes foram, a seguir, usadas para análise.

Os seguintes protocolos foram usados para a geração e caracterização de células T exterminadoras específicas para SPARC (o dia da recuperação das células do baço do camundongo imunizado foi definido como Dia 0).

Dia-21 (1) GM-CSF foi adicionado às células da medula óssea de um camundongo BALB/c, de modo a iniciar a indução de células dendríticas derivadas da medula óssea (de agora em diante referidas como BM-DC).

Dia-14 (2) Uma mistura dos 4 tipos de peptídeos SPARC foi

adicionada nas BM-DC induzidas, e 2 horas depois, 5×10^5 células foram intraperitonealmente administradas em cada camundongo.

Os passos (1) e (2) foram repetidos duas vezes, semana sim, semana não.

5 Dia 0 As células do baço do camundongo BALB/c imunizado foram recuperadas. As células foram co-cultivadas com BM-DC pré-pulsado com cada peptídeo SPARC por 2 horas. Após isso, as células resultantes foram co-cultivadas por 6 dias.

10 Dia 6 Para detectar as células T exterminadoras reconhecendo especificamente os peptídeos SPARC, um ensaio de liberação Cr foi executado. Células T2K^d, uma linhagem celular 1 de macho RL, uma linhagem celular Meth A e uma linhagem celular BALB/3T3 foram selecionadas como células tumorais alvo para células T exterminadoras.

15 (4) Análise dos efeitos citotóxicos de células T exterminadoras específicas para SPARC em células tumorais pelo ensaio de liberação Cr.

20 A atividade citotóxica das células T exterminadoras específicas para SPARC induzidas em células tumorais foi analisada como a seguir. A célula T2K^d é uma linhagem celular obtida pela introdução de um gene K^d numa linhagem de células T2 de camundongo que não tenha a expressão de um gene TAP. Somente no caso quando o peptídeo adicionado de fora se liga a uma molécula MHC de classe I devido à deficiência de TAP, a expressão de um complexo da molécula de MHC de classe I e o peptídeo é estavelmente expresso na superfície celular. Uma linhagem celular de macho 1 RL são células leucêmicas de células T derivadas de camundongo BALB-c
25 e não expressa SPARC. Os dois tipos de células acima não expressam SPARC. Por outro lado, uma linhagem celular Meth A e uma linhagem celular BALB/3T3 são linhagem celular e de fibrossarcoma derivado de camundongo BALB/c e linhagem celular de fibrossarcoma, respectivamente. Ambas essas linhagens celulares expressam SPARC. As linhagens celulares

acima mencionadas foram marcadas com cromo radioativo (Cr) e elas foram, a seguir, cultivadas com as células T exterminadoras anteriormente mencionadas por 4 horas. Após isso, o sobrenadante da cultura foi recuperado, e a quantidade de Cr radioativo liberada das células mortas foi
5 quantificada, de modo que a atividade citotóxica foi detectada.

Como resultado, não foi observada nenhuma citotoxicidade em relação às células T2K^d e RL de macho 1, as quais não expressaram SPARC. Entretanto, a citotoxicidade foi observada especificamente nas células T2K^d, as quais expressaram peptídeos SPARC no contexto da molécula K^d na
10 superfície por carregamento dos peptídeos K^d SPARC 1, 3 e 4, e também à Meth A e BALB/3T3, os quais expressaram espontaneamente SPARC (Figura 3).

[Exemplo 3]

(5) Indução de imunidade antitumoral em camundongos
15 BALB/c pela imunização com peptídeo SPARC

(Método)

BM-DC foi cultivado com uma mistura de peptídeos SPARC K^d-1, 3 e 4 (10 µM para cada) por 2 horas. Após isso, 5 x 10⁵ células foram intraperitonealmente administradas em cada camundongo. Depois de um
20 intervalo de 1 semana, BM-DC carregado com peptídeo foi administrado no camundongo da mesma maneira, de modo que o camundongo foi imunizado duas vezes no total. Sete dias depois, uma linhagem celular de fibrossarcoma de camundongo, Meth A (1 x 10⁶ células), a qual expressa altamente SPARC de camundongo, foi subcutaneamente transplantada no camundongo. Deste
25 modo, o crescimento do tumor e o tempo de sobrevivência do camundongo foram examinados.

(Resultados)

Os resultados estão mostrados na Figura 4. A administração preventiva de BM-DC pulsado pulsadas com peptídeo SPARC pôde induzir a

inibição do crescimento de Meth A transplantado subcutaneamente e induzir o prolongamento do tempo de sobrevivência do camundongo.

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

5 HLA-A24 (A*2402) é o alelo HLA classe I mais freqüente, possuído por aproximadamente 60% dos japoneses. As porções estruturais dos peptídeos ligados às moléculas K^d do camundongo BALB/c são significativamente similares àquelas dos peptídeos ligados às moléculas HLA-A24 humanas. Concordantemente, foi revelado que, quando um camundongo BALB/c é imunizado com um certo peptídeo, se o peptídeo se ligar a
10 molécula K^d e, deste modo, induzir as células T exterminadoras, e se as células T exterminadoras destruírem as células cancerosas que expressam um complexo do peptídeo e da molécula K^d, é altamente possível que o peptídeo também se ligue à HLA-A24 e induza as células T exterminadoras humanas que podem destruir as células cancerosas. Deste modo, o peptídeo da presente
15 invenção pode ser aplicável a uma imunoterapia para pacientes com câncer de estômago infiltrativo difuso, câncer pancreático e melanoma, os quais possuem HLA-A24. É antecipado que o QOL dos pacientes pode ser melhorado pela supressão do crescimento ou progressão de tais cânceres por imunoterapia de câncer baseada em peptídeo SPARC.

20 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 mostra o grau de expressão dos principais 15 genes que foram expressos em tecidos de câncer de estômago num nível superior do que na membrana da mucosa do estômago normal, os quais foram identificados efetuando-se análise de microarranjo de DNAC em 20 pacientes
25 com câncer de estômago infiltrativo difuso. Levando-se em consideração os resultados obtidos, assim como os resultados da análise de microarranjo de DNAC de tecidos normais, conforme descrito abaixo, dos 15 genes anteriormente mencionados, a proteína secretada ácida e rica em cisteína (SPARC) especificamente superexpressa num tecido canceroso foi

selecionada como o antígeno específico para câncer mais ideal no câncer de estômago infiltrativo difuso.

5 Figura 2 mostra os resultados obtidos pela análise da expressão de SPARC em 25 tipos de órgãos principais adultos e em 4 tipos de órgãos embrionários, usando um microarranjo de DNAc. A expressão do gene SPARC foi observada mesmo em alguns tecidos normais, porém o nível de expressão em tais tecidos normais foi significativamente mais baixo do que no tecido canceroso.

10 Figura 3 mostra a citotoxicidade das células tumorais positivas para SPARC por CTL, a qual foi induzida usando um peptídeo de epítipo K^d-1, K^d-3 ou K^d-4 SPARC K^d restrito de camundongo em camundongos BALB/c.

15 Figura 4 mostra a supressão do crescimento das células cancerosas Meth A subcutaneamente transplantadas e o prolongamento do tempo de sobrevivência de camundongos BALB/c pela pré-administração de células dendríticas derivadas da medula óssea (BM-DC) carregados com uma mistura de peptídeos K^d-1, K^d-3 e K^d-4 SPARC.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS

<110> Kumamoto University
 <120> Peptídeos antigênicos de rejeição tumoral derivados de SPARC e
 medicamentos compreendendo os mesmos
 <130> A71142A
 <160> 3
 <210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> Descrição da seqüência artificial: peptídeo sintético
 <400> 1
 Asp Tyr Ile Gly Pro Cys Lys Tyr Ile
 1 5
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> Descrição da seqüência artificial: peptídeo sintético
 <400> 2
 Glu Phe Pro Leu Arg Met Arg Asp Trp Leu
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Seqüência artificial
 <220>
 <223> Descrição da seqüência artificial: peptídeo sintético
 <400> 3
 Met Tyr Ile Phe Pro Val His Trp Gln Phe
 1 5 10

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo, caracterizado pelo fato de ser qualquer um dentre os seguintes:

5 (A) um peptídeo o qual consiste da seqüência de aminoácidos conforme demonstrado em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3; ou

(B) um peptídeo o qual consiste de uma seqüência de aminoácidos compreendendo uma substituição ou adição de um ou vários aminoácidos em relação ao peptídeo consistindo da seqüência de aminoácidos conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3, e o qual tenha
10 a capacidade de induzir as células T citotóxicas (exterminadoras).

2. Agente indutor de imunidade direcionado contra cânceres, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos um tipo de peptídeo, de acordo com a reivindicação 1.

3. Medicamento para tratar e/ou prevenir tumores, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos um tipo de peptídeo, de acordo com a reivindicação 1.
15

4. Agente para induzir células apresentadoras de antígeno com alta capacidade para induzir células T reativas a tumor, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos um tipo de peptídeo, de acordo com a
20 reivindicação 1.

5. Agente para induzir células T reativas a tumor, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos um tipo de peptídeo, de acordo com a Reivindicação 1.

6. Agente para induzir células apresentadoras de antígeno com alta capacidade de induzir células T reativas a tumor, caracterizado pelo fato de compreender um gene codificando um peptídeo de qualquer um dos
25 seguintes:

(A) um peptídeo o qual consiste de uma seqüência de aminoácidos conforme demonstrado em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a

3; ou

(B) um peptídeo o qual consiste de uma seqüência de aminoácidos compreendendo uma substituição ou adição de um ou vários aminoácidos em relação ao peptídeo consistindo da seqüência de aminoácidos conforme mostrada em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3, e o qual tenha a capacidade de induzir as células T exterminadoras.

7. Anticorpo, caracterizado pelo fato de ser contra o peptídeo de acordo com a reivindicação 1.

8. Célula T exterminadora, célula T auxiliadora ou população de imunócitos compreendendo tais células, caracterizadas pelo fato de serem induzidas usando o peptídeo, de acordo com a reivindicação 1.

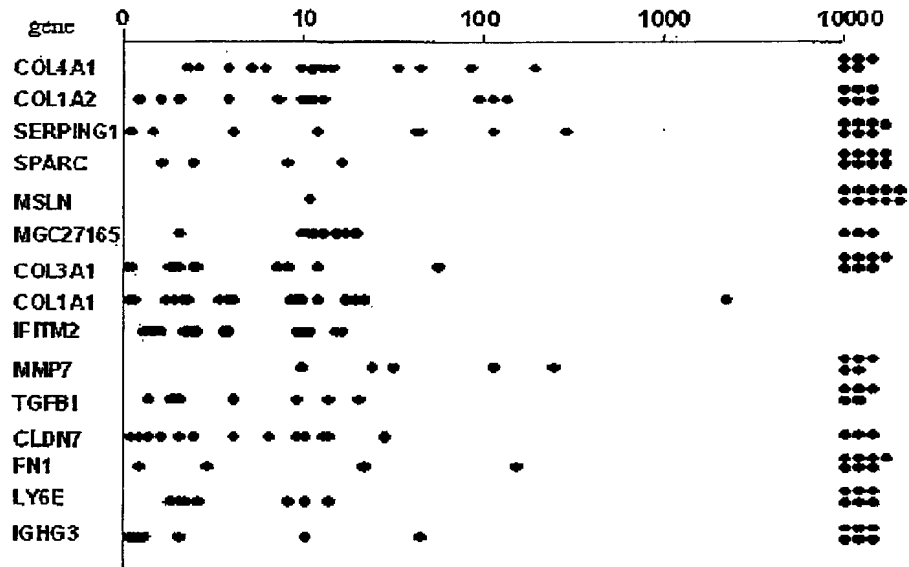
9. Célula apresentadora de antígeno, caracterizado pelo fato de apresentar um complexo de uma molécula HLA e o peptídeo, de acordo com a reivindicação 1.

10. Célula apresentadora de antígeno, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ser induzida usando o agente de acordo com a reivindicação 4 ou 6.

Fig.1

Fig. 1 Genes os quais foram identificados por análise de microarranjo de DNAc e foram superexpressos em câncer de estômago infiltrativo difuso

Proporção de expressão de RNAm em câncer de estômago/membrana da mucosa de estômago normal



SPARC : Em 11 pacientes dentre 20 pacientes, a expressão do gene no câncer foi maior 5 vezes ou mais em comparação com aquela do tecido normal. (média: 133.359 vezes)

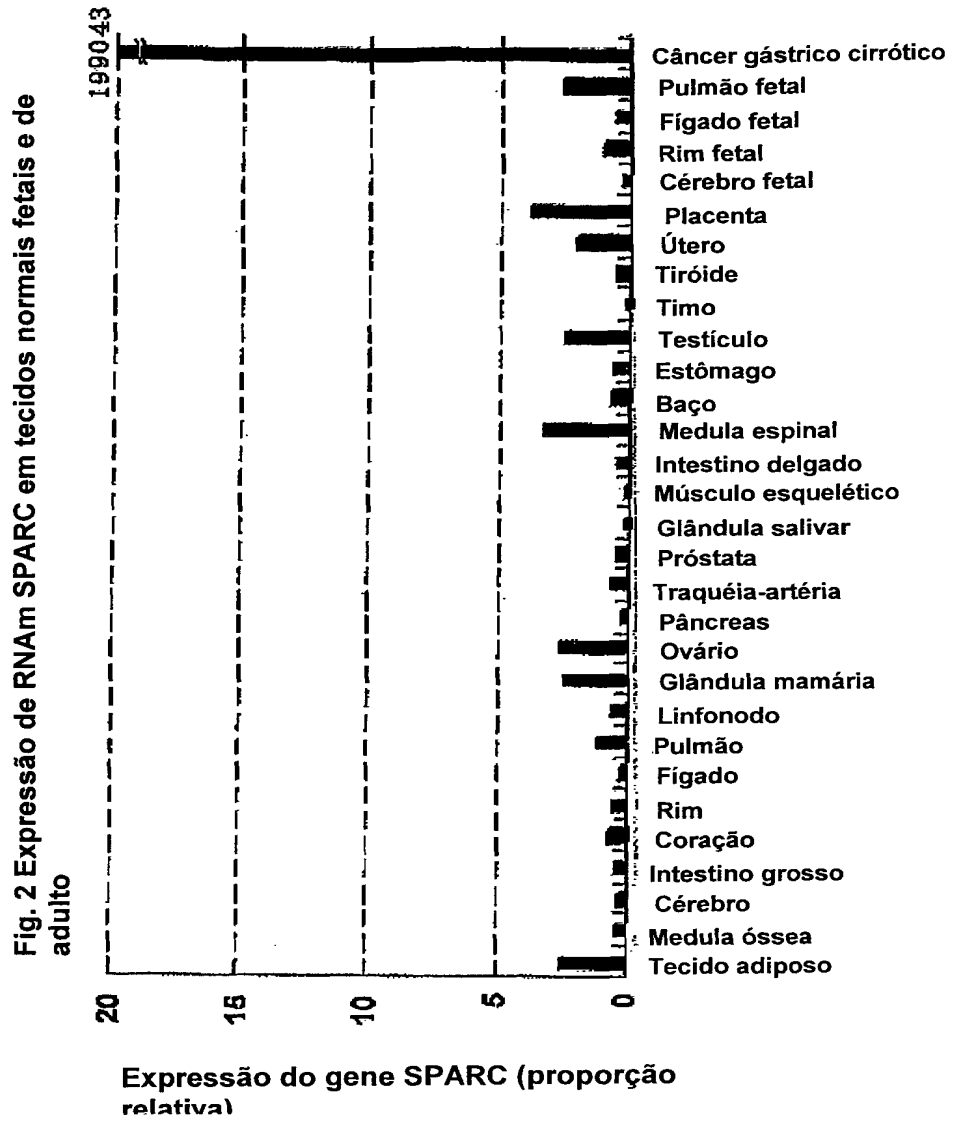


Fig.2

Fig.3

Fig. 3 Identificação do peptídeo do epítipo SPARC restrito Kd (=HLA-A24) de camundongo em camundongo BALB/c, e dano das células tumorais SPARC-positivas por CTL induzido

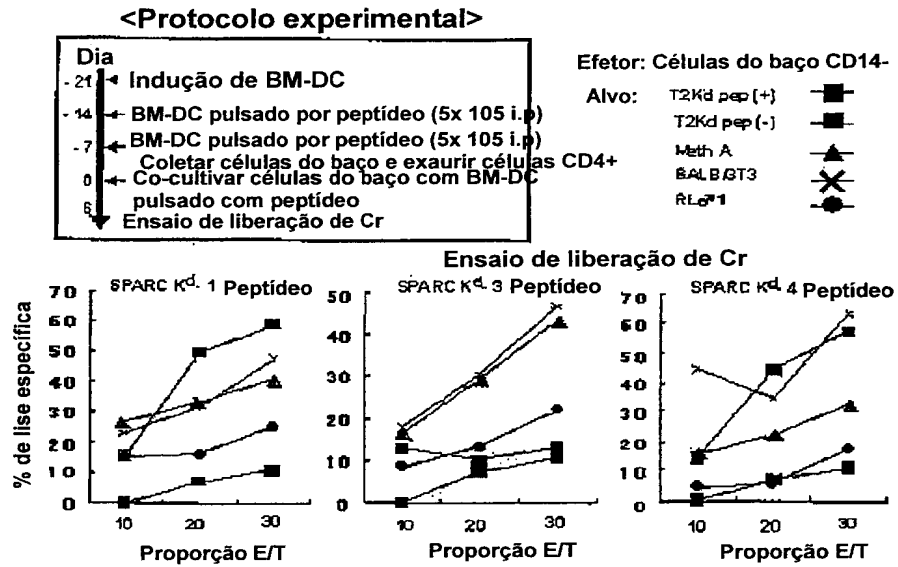
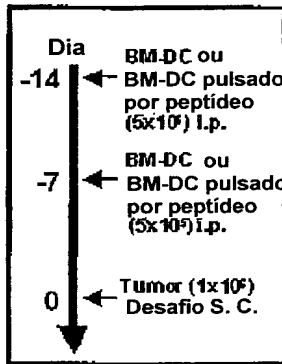


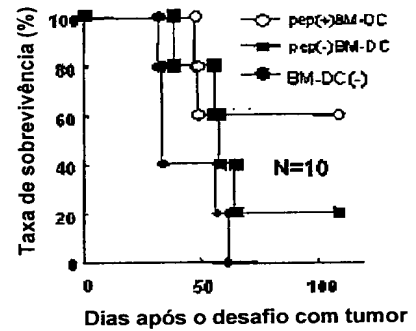
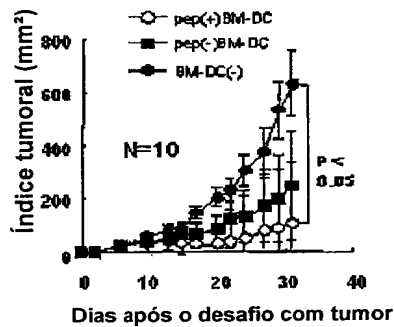
Fig.4

Fig. 4 Inibição do crescimento e prolongamento do tempo de sobrevivência de células cancerosas Meth A pela pré-administração de células dendríticas derivadas da medula óssea (BM-DC), as quais foram carregadas com uma mistura de peptídeos, Kd-1, 3 e 4 SPARC em camundongo BALB/c

<Protocolo de prevenção>



Meth A (1×10^6) s.c.



RESUMO

“PEPTÍDEO, AGENTE INDUTOR DE IMUNIDADE DIRECIONADO
CONTRA CÂNCERES, MEDICAMENTO PARA TRATAR E/OU
PREVENIR TUMORES, AGENTE PARA INDUZIR CÉLULAS,
5 ANTICORPO E CÉLULA”

É um objetivo da presente invenção identificar peptídeos
derivados de proteína SPARC que sejam capazes de induzir as células T
exterminadoras humanas e as células T auxiliaadoras com atividade citotóxica
a tumores, e de proporcionar uma forma de executar uma imunoterapia
10 tumoral em pacientes com vários tipos de cânceres superexpressando SPARC.
A presente invenção proporciona um peptídeo dentre qualquer um dos
seguintes:(A) um peptídeo o qual consiste de uma seqüência de aminoácidos
conforme demonstrado em qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3; ou (B) um
peptídeo o qual consiste de uma seqüência de aminoácidos compreendendo
15 uma substituição ou adição de um ou vários aminoácidos em relação ao
peptídeo consistindo da seqüência de aminoácidos conforme mostrada em
qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 3, e o qual tenha a capacidade de induzir
as células T citotóxicas (exterminadoras).