

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 055**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06796310 .8**
96 Fecha de presentación: **08.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1923463**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2008**

54 Título: **PÉPTIDO ANTÍGENO DE RECHAZO DE CÁNCER DERIVADO DE GLIPICAN-3 (GPC3) PARA USO EN PACIENTES POSITIVOS A LA HLA-A2 Y PRODUCTO FARMACÉUTICO QUE COMPRENDE EL ANTÍGENO.**

30 Prioridad:
09.08.2005 JP 2005230702

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.01.2012

73 Titular/es:
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
2-1, SAKADO 3-CHOME, TAKATSU-KU
KAWASAKI-SHI
KANAGAWA 213-0012, JP

72 Inventor/es:
NISHIMURA, Yasuharu;
NAKATSURA, Tetsuya y
KOMORI, Hiroyuki

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 055 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Péptido antígeno de rechazo de cáncer derivado de glipican-3 (GPC3) para uso en pacientes positivos a la HLA-A2 y producto farmacéutico que comprende el antígeno.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a nuevos péptidos que son eficaces como una vacuna para cánceres con alta expresión de glipican-3 (GPC3), tal como carcinoma hepatocelular o melanoma maligno (melanoma), y un producto farmacéutico que comprende los péptidos anteriormente mencionados usados para el tratamiento y prevención de tumores.

Antecedentes de la técnica

- 10 El carcinoma hepatocelular primario es una enfermedad maligna que ocurre con una alta frecuencia en diversos países a través del mundo. Como un resultado de grandes brotes de hepatitis B y C a lo largo del mundo, la incidencia del carcinoma hepatocelular ha crecido rápidamente en países de Asia y Europa. Teniendo en cuenta el largo periodo de incubación desde la infección con el virus de la hepatitis hasta la aparición de la enfermedad, es de esperar que dicha tendencia continúe a lo largo de los próximos cincuenta años. El carcinoma hepatocelular cuyo estado ha empeorado, tiene una pobre prognosis. En consecuencia, es de desear el rápido desarrollo de una nueva estrategia de tratamiento.

- 15 Por otra parte, con el desarrollo de la biología molecular y la inmunología de tumores en los últimos años, se ha puesto de manifiesto que las células T citotóxicas (asesinas) y las células T ayudantes, reconocen los péptidos formados mediante la descomposición de proteínas altamente expresadas específicamente en células de cáncer, las cuales están presentes sobre las superficies de las células de cáncer o de células que presentan antígeno a través de moléculas de HLA, y las cuales muestran una reacción inmune para la destrucción de dichas células de cáncer. Más aún, se han identificado un gran número de proteínas y péptidos antigénicos de tumores, que estimulan una reacción inmune de este tipo para atacar los cánceres, habiendo avanzado la aplicación clínica de una inmunoterapia de tumores específica del antígeno.

- 20 Las moléculas de HLA de la clase I están expresadas sobre las superficies de todas las células nucleares en un cuerpo. Los péptidos obtenidos de proteínas nucleares y citoplásmicas descompuestas están unidos a las moléculas de HLA de la clase I, y están expresados sobre las superficies de dichas células. Sobre las superficies de las células normales, los péptidos obtenidos proteínas autólogas normales se unen a las moléculas de HLA de la clase I, y las células T del sistema inmune ni reconocen ni responden a dichos péptidos unidos a las moléculas de HLA de la clase I. Por otra parte, en un proceso en el cual las células normales se convierten en un cáncer, dichas células de cáncer pueden expresar grandes cantidades de proteínas, las cuales están escasamente expresadas o únicamente expresadas en pequeñas cantidades en células normales. Si un péptido generado por descomposición en el citoplasma de una proteína de este tipo que está altamente y específicamente expresado en una célula de cáncer se une a una molécula de HLA de la clase I y está expresado sobre la superficie de dicha célula de cáncer, una célula T asesina reconoce el péptido y destruye únicamente la célula de cáncer. Además, mediante la administración de un péptido o antígeno específico del cáncer a un cuerpo individual, es posible destruir células de cáncer y suprimir el desarrollo de un cáncer, sin perjudicar a las células normales. A esto se le denomina como inmunoterapia del cáncer usando un antígeno específico del cáncer. Más aún, una molécula de HLA de la clase II está fundamentalmente expresada sobre la superficie de una célula que presenta antígeno. Dicha molécula de HLA de la clase II se une a un péptido obtenido de un antígeno específico del cáncer generado mediante la incorporación del antígeno específico del cáncer a partir del exterior de la célula y su descomposición en la célula, y está expresado sobre la superficie de la célula. Una célula T ayudante, la cual ha reconocido al péptido unido mediante la molécula de HLA de la clase II, se activa para generar diversas citocinas que activan otras células inmunocompetentes, con el fin de inducir o reforzar una reacción inmune contra un tumor.

- 25 En consecuencia, si puede desarrollarse una inmunoterapia dirigida a un antígeno que esté altamente y específicamente expresado en dicho cáncer, esto puede llegar a ser un procedimiento de tratamiento para la eliminación de manera eficaz de únicamente el cáncer, sin perjudicar órganos autólogos normales. Más aún, es de esperar que dicha inmunoterapia pueda llegar a ser un procedimiento de tratamiento aplicable a pacientes que sufren de un cáncer en fase terminal, para el cual no pueda implementarse ningún otro tratamiento. Además, si un péptido y antígeno específico del cáncer se administra en la forma de una vacuna a un humano que tiene alto riesgo de desarrollar dicho cáncer, existe una posibilidad de que pueda prevenirse la aparición del cáncer.

- 30 Se ha informado que, en tejidos normales, una α -fetoproteína (AFP) está únicamente expresada en el periodo prenatal, y que esta es lo que se denomina una proteína carcinoembrionica cuya expresión se activa nuevamente en muchos carcinomas hepatocelulares. Además, diversos tipos de células T humanas y de ratón reconocen un epítipo péptido obtenido de AFP presentado por una molécula de MHC de la clase I. Durante la fase de desarrollo, un feto está expuesto a la AFP que existe en una alta proporción en el plasma. Sin embargo, las células T maduras no adquieren tolerancia inmunológica completa a la AFP, y se detectan células T específicas de la AFP en la sangre periférica. Es decir, dicha proteína carcinoembrionica puede ser una diana de inmunoterapia.

Existen diversos procedimientos para el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Sin embargo, la prognosis de dicho carcinoma hepatocelular es peor que el de otros tipos de cánceres y, en consecuencia, este cáncer se considera que es un cáncer intratable. Esto puede ser debido a que el carcinoma hepatocelular se desarrolla sobre la base de la cirrosis del hígado y, por ello, los pacientes con carcinoma hepatocelular tienen funciones hepáticas pobres. Esto puede ser igualmente debido a que, aunque haya sido tratada una masa de cáncer, se desarrolla otro cáncer en otro sitio. De acuerdo con ello, ha sido necesario desarrollar rápidamente una nueva estrategia de tratamiento. Si puede desarrollarse una inmunoterapia dirigida a un antígeno que esté altamente y específicamente expresado en el carcinoma hepatocelular, existe una posibilidad de que dicha inmunoterapia llegue a ser un procedimiento terapéutico para eliminar de manera eficaz únicamente el cáncer, sin perjudicar órganos autólogos normales. Más aún, es de esperar que la inmunoterapia anteriormente mencionada pueda ser un procedimiento terapéutico, el cual esté disponible para pacientes que estén en fase terminal del cáncer, y además para pacientes cuyas funciones hepáticas sean demasiado pobres como para permitir llevar a cabo otros tratamientos. En la actualidad, se dice que, en Japón, más de 2.000.000 personas están infectadas con el virus de la hepatitis C, y que dicha población son pacientes potenciales de carcinoma hepatocelular. Existe una posibilidad de que la inmunoterapia anteriormente mencionada sea de aplicación también para prevenir que dichos pacientes infectados lleguen a ser realmente sufridores de carcinoma hepatocelular.

El melanoma es un tipo de cáncer de piel, al cual frecuentemente se le denomina melanoma maligno. Existen muchos tipos de cánceres de piel. Entre dichos cánceres de piel, el melanoma está clasificado como poseedor del grado más alto de malignidad y, en consecuencia, es grandemente temido. Entre las células que constituyen la piel, diversas células generan el pigmento melanina. Dichas células se denominan melanocitos. Cuando dichos melanocitos se transforman en cancerosos, se produce el melanoma.

En Japón, la incidencia del melanoma varía desde 1,5 hasta 2 personas por cada 100.000 en la población general. De acuerdo con ello, se estima que aproximadamente 1.500 a 2.000 personas desarrollan melanoma anualmente. Por otra parte, en los países Occidentales, más de una docena de personas desarrollan melanoma por cada 100.000 en la población general. En particular, en Australia, veinte o más personas desarrollan dicho melanoma por cada 100.000 en la población general y, en consecuencia, se dice que la incidencia del melanoma en Australia es la más alta en el mundo. Bajo dichas circunstancias, las personas que viven en Europa, los Estados Unidos de América y Australia, están interesadas en el melanoma, y están atentos a la incidencia del melanoma. Además, la frecuencia de la incidencia del melanoma se ha incrementado, en particular entre los Caucasianos, como un resultado de un incremento en la exposición a los rayos ultravioleta debido a la reducción en la capa de ozono en la atmósfera causada por la destrucción del medio ambiente. Más aún, la incidencia del melanoma tiende también a incrementarse de año en año en el Japón. De acuerdo con estudios recientes, el peaje de muertes anuales por melanoma en el Japón se ha incrementado a aproximadamente 450. El melanoma se desarrolla independientemente de la edad. Sin embargo, la incidencia de esta enfermedad se incrementa para los de más de 40 años, y es la más alta para los de los 60 y 70 años. La aparición de esta enfermedad en la infancia es extremadamente rara, pero esto no significa que la enfermedad no se desarrolle nunca en la infancia. Recientemente, la incidencia del melanoma tiende a incrementarse en pacientes jóvenes dentro de los 20 y 30 años. El melanoma se desarrolla independientemente del sexo, y tanto los pacientes masculinos como femeninos sufren de esta enfermedad. En el caso de los pacientes japoneses, el sitio en el cual es más probable que se desarrolle el melanoma es en la planta (la planta del pie), y representa al 30% de todos los casos de melanoma. Como característicos de los pacientes japoneses, el melanoma se desarrolla también en el pie y en las porciones de uña de los dedos. Además, al igual que en el caso de los pacientes Occidentales, el melanoma se desarrolla también entre los pacientes japoneses en todas las partes de la piel, tales como el cuerpo, mano, pie, cara, y cabeza.

En primer lugar, los autores de la presente invención han realizado análisis de expresión de genes a lo largo del genoma, que incluyen la observación de 23.040 tipos de genes humanos, usando análisis de micromatrices de ADNc. Los autores de la presente invención han analizado perfiles de expresión de estos genes en 20 casos de carcinomas hepatocelulares primarios y en diversos tipos de órganos normales, incluyendo los presentes en el período prenatal. Como un resultado de ello, los autores de la presente invención han encontrado que el glipican-3 (GPC3) está expresado en el hígado, riñón y pulmón durante el período prenatal, e igualmente que dicho glipican-3 está altamente expresado en muchos carcinomas hepatocelulares, aunque está siempre escasamente expresado en órganos adultos normales, aunque esté expresado en la placenta. Los autores de la presente invención han informado además que dicha GPC3 es una proteína secretora, que dicha GPC3 puede detectarse en el suero del 40% de pacientes de carcinoma hepatocelular mediante el procedimiento ELISA, y que esta es útil como un nuevo marcador de tumor de carcinoma hepatocelular (Nakatsura, T. y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 306, págs. 16-25, (2003)). Más aún, igualmente han informado que la GPC3 se detecta en el suero de pacientes de melanoma, y que es igualmente útil como un marcador de tumor de melanoma (Nakatsura, T. y otros, Clin. Cancer Res., vol. 10, págs. 6612-6621, (2004)).

Los autores de la presente invención han identificado previamente un péptido GPC3, el cual se une a la HLA-A24 y está presente en una célula T asesina humana, y que es útil para una inmunoterapia dirigida a pacientes con melanoma o carcinoma hepatocelular positivo a la HLA-A24. Los autores de la presente invención han llevado a cabo un experimento sobre animales usando ratones BALB/C que expresan moléculas K^d de ratón, a las cuales se une un péptido que tiene la misma estructura que un péptido de unión a la HLA-A24. A través del mismo, han demostrado la eficacia de la inmunoterapia usando el péptido anteriormente mencionado y han informado ya de los resultados

(Solicitud Internacional No. PCT/JP2004/016374; Fecha de presentación internacional: 28 de Octubre de 2004). En órganos normales, puesto que la GPC3 está expresada únicamente en placentas y en el hígado en el período prenatal, incluso cuando se lleva a cabo una inmunoterapia dirigida a la GPC3 para suprimir el desarrollo del tumor, no se producen episodios adversos tales como de enfermedad autoinmune. Esto se ha confirmado mediante un experimento usando ratones.

Actualmente, con respecto al glipican-3 (GPC3) como un antígeno de rechazo de tumor, los autores de la presente invención han identificado un péptido, el cual se presenta fundamentalmente mediante la HLA-A24 a una célula T asesina (Solicitud Internacional No. PCT/JP03/10459, WO2004/018667; Fecha de presentación internacional: 19 de Agosto de 2003). Sin embargo, solamente con dichos péptidos presentados por la HLA-A24 a las células T asesinas, las vacunas péptidas pueden administrarse únicamente al 60% de la población japonesa que tienen la HLA-A24. Si puede identificarse un péptido presentado a una célula T asesina mediante la HLA-A2, a la cual el 40% de la población japonesa da positivo al ensayo, aproximadamente el 85% de la población japonesa puede llegar a ser las dianas de los dos tipos de vacunas péptidas. Además, puesto que en los Caucasianos de los países Occidentales la frecuencia de la HLA-A2 es relativamente alta, un péptido de este tipo presentado por la HLA-A2 puede aplicarse a mucha población Occidental. En consecuencia, es un objeto importante el identificar el péptido anteriormente mencionado presentado por la HLA-A2 a una célula T asesina. En particular, puesto que el melanoma es un cáncer, el cual se desarrolla frecuentemente en los Caucasianos en los países Occidentales y para el cual es eficaz una inmunoterapia y, además, puesto que el carcinoma hepatocelular ha crecido también rápidamente en los países Occidentales, es de suponer que existiría un gran número de pacientes para los cuales pueda aplicarse una inmunoterapia usando el péptido GPC3 unido a la HLA-A2.

El Documento WO 2004/038420 A1 divulga la secuencia de longitud total del glipican-3 humano (SEC ID NO: 3).

El Documento WO 01/47944 A2 divulga un péptido FFQRLQPGLWVPE (Secuencia ID NO: 8700; página 2451 del documento).

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

Es un objeto de la presente invención el identificar péptidos presentados por la HLA-A2 a una célula T asesina, con el fin de proporcionar un medio para llevar a cabo una inmunoterapia, la cual es capaz de identificar aproximadamente el 40% de los pacientes japoneses que sufren de diversos tipos de cánceres, la cual expresa la GPC3 a un alto nivel.

Medios para resolver los problemas

Previamente, los autores de la presente invención han identificado al glipican-3 (GPC3) como una nueva proteína carcinoembrionica que está específicamente y excesivamente expresada en el carcinoma hepatocelular humano, en base a análisis de micromatrices de ADNc. Los autores de la presente invención han clarificado además que en el suero de un paciente con carcinoma hepatocelular se detecta una proteína GPC3 soluble, y que dicha GPC3 puede ser un nuevo marcador tumoral de carcinoma hepatocelular. Los autores de la presente invención han descubierto que la GPC3 está expresada en una línea de células B16 de melanoma de ratón y que está altamente expresada en una alta proporción en el melanoma, así como en el carcinoma hepatocelular. De acuerdo con ello, los autores de la presente invención han pensado que la GPC3 puede igualmente llegar a ser un marcador tumoral útil de melanoma. Como un resultado de un experimento confirmatorio, los presentes autores han encontrado que la GPC3 actúa como un marcador tumoral de melanoma que posibilita una diagnosis temprana, lo cual no se había logrado nunca hasta ahora. En esta ocasión, los autores de la presente invención han estimulado células T asesinas positivas a CD8 humano mediante el co-cultivo de las mismas *in vitro*, conjuntamente con células dendríticas obtenidas de monocitos de sangre periférica humana, las cuales habían sido tratadas con un péptido GPC3 humano conteniendo un motivo de unión de la HLA-A2, induciendo, de esta forma, las células T asesinas específicas del péptido GPC3. La presencia o la ausencia de inducción de células T asesinas específicas para cada péptido GPC3 se detectó mediante un procedimiento ELISPOT que detecta γ -interferón (IFN- γ) generado por las células T asesinas activadas que reconocen péptidos presentados por la HLA-A2, y se identificó un nuevo péptido GPC3 que podría ser un candidato para un antígeno diana aplicable a una inmunoterapia.

Es decir, la presente invención proporciona las características de invención siguientes:

(1) Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3.

(2) Una composición inmunoinducida usada para cánceres, que comprende al menos un tipo del péptido (1) anterior.

(3) Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o la prevención de tumores, que comprende al menos un tipo del péptido (1) anterior.

(4) Una composición de agente para la inducción de células que presentan antígeno que tienen alta capacidad para inducir células T reactivas a tumores, que comprende el péptido de (1) anterior.

5 (5) Una composición de agente para la inducción de células que presentan antígeno que tienen alta capacidad para inducir células T reactivas a tumores, para uso en el tratamiento y/o la prevención de tumores, que comprende un gen que codifica un péptido de cualquiera de las siguientes (A) o (B):

(A) un péptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3; o

10 (B) un péptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o dos aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3, y que tiene la capacidad para inducir células T asesinas.

(6) Una composición de agente para la inducción de células T reactivas a tumores, que comprende el péptido de (1) anterior.

(7) Un anticuerpo contra el péptido de (1) anterior.

15 (8) Una célula T ayudante, una célula T asesina, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que se induce usando el péptido de (1) anterior.

(9) Una célula que presenta un antígeno, que presenta un complejo que consiste en una molécula HLA y el péptido de (1) anterior.

20 (10) La célula que presenta el antígeno de (9) anterior, que se induce usando la composición de agente de (4) ó (5) anterior.

(11) Un procedimiento *in vitro* para la inducción de células que presentan antígeno que tienen alta capacidad para inducir células T reactivas a tumores, que comprende un gen que codifica un péptido de cualquiera de las siguientes (A) o (B):

25 (A) un péptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3; o

(B) un péptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o dos aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3, y que tiene capacidad para inducir células T asesinas.

30 **Mejor modo para realizar la invención**

(1) Péptido de la presente invención, y composición inmunoinductora que comprende al mismo usado para cánceres

El péptido de la presente invención es un péptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3.

35 El término "péptido que tiene la capacidad para inducir células T asesinas" se usa en la presente memoria descriptiva para indicar un péptido que tiene una actividad de inducción de células T para la estimulación de células T asesinas (linfocitos T citotóxicos (CTL)).

No se limita de manera particular un procedimiento para la obtención/producción del péptido de la presente invención. Puede usarse o bien una proteína químicamente sintetizada, o bien una proteína recombinante producida mediante recombinación genética.

40 Cuando se obtiene un péptido químicamente sintetizado, el péptido de la presente invención puede sintetizarse, por ejemplo, mediante un procedimiento de síntesis química tal como un procedimiento Foc (procedimiento de fluorenilmetiloxycarbonilo) o un procedimiento tBoc (procedimiento de t-butiloxycarbonilo). Además, el péptido de la presente invención puede sintetizarse igualmente usando diversos tipos de sintetizadores de péptidos comercialmente disponibles.

45 Cuando el péptido de la presente invención se produce en la forma una proteína recombinante, se obtiene ADN que tiene una secuencia nucleótida que codifica el péptido anteriormente mencionado, un mutante del mismo, o un homólogo del mismo, el cual, a continuación, se introduce dentro de un sistema de expresión adecuado, con el fin de producir el péptido de la presente invención.

50 Como un vector de expresión, puede usarse preferiblemente un vector capaz de replicarse autónomamente en una célula huésped o capaz de ser incorporado dentro del cromosoma de una célula huésped. Se usa un vector de ex-

presión que comprende un promotor en una posición capaz de expresar un gen que codifica el péptido. Además, puede producirse un transformante que tiene un gen que codifica al péptido de la presente invención, mediante la introducción del vector de expresión anteriormente mencionado dentro de un huésped. Como un huésped, puede usarse cualquiera de entre un bacterio, levadura, una célula de animal, y una célula de insecto. Puede introducirse un vector de expresión dentro de un huésped de acuerdo con un procedimiento conocido, dependiendo del tipo de dicho huésped.

En la presente invención, el transformante se cultiva tal como se ha producido anteriormente y, a continuación, se genera el péptido de la presente invención y se acumula en un cultivo. Después de esto, el péptido de la presente invención se recoge del cultivo, con el fin de aislar un péptido recombinante.

Cuando dicho transformante es un procarionte tal como *Escherichia coli* o un eucariote tal como levadura, un medio usado para el cultivo de dichos microorganismos puede ser o bien un medio natural o bien un medio sintético, siempre y cuando que contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, y similares, que puedan ser asimiladas por el microorganismo anteriormente mencionado, y que sea capaz de llevar a cabo de manera eficaz el cultivo del transformante. Más aún, dicho cultivo puede llevarse a cabo bajo condiciones que son comúnmente aplicadas para el cultivo de los microorganismos anteriormente mencionados. Después de completar el cultivo, el péptido de la presente invención puede ser aislado y purificado a partir del cultivo del transformante de acuerdo con un procedimiento común de aislamiento y purificación de un péptido.

Un péptido consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o más aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3, puede producirse o adquirirse de manera apropiada por personas expertas en la técnica en base a la información relativa a la secuencia nucleótida del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3. Es decir, puede producirse un gen que codifica un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o dos aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3 y que tiene la capacidad para inducir células T asesinas, mediante cualquier procedimiento dado conocido para las personas expertas en la técnica, tal como síntesis química, medios de ingeniería genética, o mutagénesis. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio es útil como un medio de ingeniería genética dado que es un medio para la introducción de una mutación específica dentro de una posición específica. Dicha mutagénesis dirigida al sitio puede llevarse a cabo mediante un procedimiento descrito en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1989) (abreviado en adelante en la presente invención como Molecular Cloning, 2nd Ed.), Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1 a 38, John Wiley & Sons, (1987-1997) (abreviado en adelante en la presente invención como Current Protocols in Molecular Biology), etc.

Tal como se describe más adelante en los ejemplos, el péptido anteriormente mencionado de la presente invención es capaz de inducir inmunidad contra cánceres. Así, la presente invención proporciona un inmunoadyuvante usado para cánceres, que comprende el péptido de la presente invención.

El inmunoadyuvante de la presente invención usado para cánceres se usa *in vivo* o *in vitro*, y preferiblemente *in vitro*, de manera que puede inducir una célula T ayudante, una célula T asesina, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, impartiendo, de esta forma, inmunidad contra cánceres.

(2) Anticuerpo de la presente invención

La presente invención se refiere igualmente a un anticuerpo que reconoce una parte o la totalidad del péptido anteriormente mencionado de la presente invención como un epítipo (antígeno), y una célula T asesina inducida mediante estimulación *in vitro* usando el péptido o la proteína anteriormente mencionada. En general, dicha célula T asesina de este tipo muestra una actividad antitumoral que es más fuerte que la de un anticuerpo.

El anticuerpo de la presente invención puede ser o bien un anticuerpo policlonal o bien un anticuerpo monoclonal. Dicho anticuerpo puede producirse mediante un procedimiento común.

Por ejemplo, un anticuerpo policlonal puede producirse mediante la inmunización de un mamífero o de simios con el péptido de la presente invención usado como antígeno y, a continuación, la recogida de la sangre procedente del mamífero o simios y, a continuación, la separación y purificación de un anticuerpo a partir de la sangre recogida. Por ejemplo, pueden inmunizarse mamíferos o simios, tales como un ratón, un hámster, una cobaya, un pollo, una rata, un conejo, un canino, una cabra, una oveja, o un bovino. Dicho procedimiento de inmunización es conocido para las personas expertas en la técnica. Por ejemplo, un antígeno puede administrarse 2 ó 3 veces a intervalos de 7 a 30 días. Como una dosificación, pueden administrarse, por ejemplo, aproximadamente 0,05 a 2 mg de antígeno en una sola vez. La vía de administración no está particularmente limitada, pudiéndose seleccionar, según sea lo apropiado, la administración subcutánea, administración intracutánea, administración intraperitoneal, administración intravenosa, administración intramuscular, etc. Más aún, un antígeno puede disolverse en un tampón adecuado, por ejemplo, puede usarse un tampón adecuado que contenga un adyuvante de Freund completo o un adyuvante comúnmente usado, tal como óxido de aluminio.

El mamífero o simios así inmunizados se crían durante un cierto periodo de tiempo. A continuación, si aumenta el título del anticuerpo, puede llevarse a cabo un refuerzo usando, por ejemplo, 100 a 1.000 µg de antígeno. Uno o dos meses después de la inmunización final, se recoge sangre del mamífero o simios inmunizados. A continuación, dicha sangre recogida se separa y purifica mediante un procedimiento ordinario que incluye la centrifugación, precipitación usando sulfato amónico o polietileno glicol, cromatografía tal como cromatografía de filtración por gel, cromatografía de intercambio de iones, o cromatografía de afinidad, etc., con el fin de obtener un anticuerpo policlonal que reconozca el péptido de la presente invención en la forma de un antisuero policlonal.

Por otra parte, puede obtenerse un anticuerpo monoclonal mediante la preparación de un hibridoma. Por ejemplo, dicho hibridoma puede obtenerse mediante la fusión de células de una célula que genera anticuerpos y una célula de mieloma. Mediante el procedimiento de fusión de células siguiente, puede obtenerse un hibridoma que genera el anticuerpo monoclonal de la presente invención.

Como una célula que genera anticuerpos, se usa una célula esplénica, una célula del nódulo linfático, un linfocito B, o similares, obtenida a partir del animal inmunizado. Como un antígeno, se usa el péptido de la presente invención. Como un animal a inmunizar, puede usarse un ratón, una rata, o similares. A dicho animal se administra un antígeno de acuerdo con un procedimiento ordinario. Por ejemplo, se administra una suspensión o líquido emulsificado que comprende un adyuvante tal como un adyuvante de Freund completo o un adyuvante de Freund incompleto y el péptido de la presente invención usado como un antígeno, a un animal mediante administración intravenosa, administración subcutánea, administración intracutánea, administración intraperitoneal, etc., varias veces, con el fin de inmunizar el animal. A continuación, se obtiene del animal inmunizado una célula que genera anticuerpos tal como una célula esplénica y, la célula esplénica así obtenida, se fusiona, a continuación, con una célula de mieloma de acuerdo con un procedimiento conocido (G. Kohler y otros, *Nature*, vol. 256, pág. 495, (1975)), produciéndose, de esta forma, un hibridoma.

Los ejemplos de una cepa de célula de mieloma usada en la fusión de células incluye una cepa P3X63Ag8, una cepa P3U1 y una cepa Sp2/0, en el caso de un ratón. Cuando dicha fusión de células se lleva a cabo, se usa un promotor de fusión tal como polietileno glicol o virus Sendai. Para la selección de un hibridoma después de completar la fusión de las células, se usa un medio de hipoxantina aminopterintimidina (HAT) de acuerdo con un procedimiento ordinario. El hibridoma obtenido como un resultado de la fusión de células, se clona mediante un procedimiento de dilución limitante. Después de este, en caso necesario, se lleva a cabo un rastreo mediante un inmunoensayo enzimático usando el péptido de la presente invención, con el fin de obtener una cepa de células que genera un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente el péptido de la presente invención.

Con el fin de producir un anticuerpo monoclonal de interés a partir del hibridoma así obtenido, el hibridoma puede cultivarse mediante un procedimiento de cultivo de células común o un procedimiento de formación de ascitis y, a continuación, el anticuerpo monoclonal de interés puede purificarse a partir del ascitis o del sobrenadante del cultivo. El anticuerpo monoclonal puede purificarse a partir de ascitis o del sobrenadante del cultivo de acuerdo con un procedimiento ordinario. Por ejemplo, pueden combinarse según sea lo apropiado y usarse, el fraccionamiento mediante sulfato amónico, filtración por gel, cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, y otros procedimientos.

Más aún, los fragmentos del anticuerpo anteriormente mencionado están igualmente incluidos en el ámbito de la presente invención. Los ejemplos de un fragmento de anticuerpo de este tipo incluyen un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fab'.

(3) Célula T ayudante, célula T asesina, o una población de inmunocitos que comprende dichas células

La presente invención se refiere igualmente a una célula T ayudante, una célula T asesina, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que se induce mediante la estimulación *in vitro* usando el péptido de la presente invención. Por ejemplo, cuando se estimulan linfocitos de sangre periférica o linfocitos infiltrantes de tumores *in vitro* usando el péptido de la presente invención, se inducen células T activadas reactivas a tumores. Las células T así activadas pueden usarse de manera eficaz para una inmunoterapia adoptiva. Además, las células dendríticas que son fuertes células que presentan antígenos permiten expresar el péptido de la presente invención *in vivo* o *in vitro* y, a continuación, las células dendríticas que expresan antígeno se usan para llevar a cabo la inmunoinducción.

Preferiblemente, una célula T ayudante, una célula T asesina, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, puede ser inducida mediante estimulación *in vitro*, usando el péptido de la presente invención y un inmunoestimulador. Los ejemplos de dichos inmunoestimuladores usados en la presente invención incluyen un factor de crecimiento de células y una citocina.

La célula T ayudante, la célula T asesina, o la población de inmunocitos así obtenida que comprende dichas células, se transfiere dentro de un cuerpo, de manera tal que el tumor pueda suprimirse y que el cáncer pueda prevenirse y/o tratarse.

Además, usando el péptido de la presente invención, puede producirse una célula T ayudante, una célula T asesina, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que es capaz de suprimir un tumor tal como se ha

descrito anteriormente. De acuerdo con ello, la presente invención proporciona una solución de cultivo de células que comprende el péptido de la presente invención. Usando dicha solución de cultivo de células, puede producirse una célula T ayudante, una célula T asesina, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que es capaz de suprimir un tumor. Además aún, la presente invención proporciona igualmente un kit de cultivo de células para la producción de una célula T ayudante, una célula T asesina, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que comprende la solución de cultivo de células anteriormente mencionada y un recipiente para el cultivo de células.

(4) Producto farmacéutico de la presente invención para tratamiento y/o prevención de tumores (vacuna de cáncer)

Puesto que el péptido de la presente invención es capaz de inducir células T asesinas específicas de células de cáncer, puede esperarse que sea un agente para el tratamiento y/o la prevención de cáncer. Por ejemplo, bacterias tales como BCG (Bacillus Calmette-Guérin) transformadas con ADN recombinante producido mediante la incorporación de un gen que codifica el péptido de la presente invención dentro de un vector adecuado, o virus tales como el virus vaccinia, dentro del genoma del cual ha sido incorporado el ADN que codifica el péptido de la presente invención, puede usarse de manera eficaz como una vacuna para el tratamiento y/o la prevención de cánceres humanos. Es de señalar que el procedimiento de dosificación y administración de una vacuna del cáncer de este tipo son los mismos que en el caso de una vacunación ordinaria contra la viruela o una vacunación contra BCG.

Es decir, el ADN que codifica el péptido de la presente invención (el cual se usa tal cual, o está en la forma de ADN plásmido incorporado dentro de un vector de expresión), o un virus recombinante o una bacteria recombinante que comprende el ADN anteriormente mencionado, puede administrarse como una vacuna de cáncer a mamíferos, incluyendo un humano, directamente o en un estado en el cual está dispersado en un adyuvante. Igualmente, el péptido de la presente invención puede administrarse como una vacuna de cáncer en un estado en el cual está dispersado en un adyuvante.

Los ejemplos de un adyuvante usado en la presente invención, incluyen un adyuvante de Freund incompleto, BCG, dimicolato de trehalosa (TDM), liposacárido (LPS), un adyuvante de alumbre, y un adyuvante de sílice. Desde el punto de vista de capacidad para inducir anticuerpos, preferiblemente se usa un adyuvante de Freund incompleto (IFA).

El tipo de cáncer no es particular en la presente memoria descriptiva. Los ejemplos específicos de un cáncer incluyen cáncer de esófago, cáncer de pecho, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer pancreático, melanoma maligno (melanoma), linfoma maligno, osteosarcoma, feocromocitoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de útero, cáncer de ovarios, tumor cerebral, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, cáncer de riñón, cáncer prostático, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer hepático, cáncer de vesícula biliar, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de vejiga, y sarcoma.

El péptido de la presente invención actúa como un epítipo de célula T e induce una célula T asesina específica de la célula de cáncer. En consecuencia, el péptido de la presente invención es útil como un agente para la prevención y/o tratamiento de cánceres humanos. Además, si el anticuerpo de la presente invención es capaz de inhibir la actividad de la GPC3 como un antígeno del cáncer, es igualmente útil como un agente para la prevención y/o tratamiento de cánceres humanos. Como un uso real, el péptido o anticuerpo de la presente invención puede administrarse como un producto de inyección, directamente o conjuntamente con un vehículo y/o diluyente aceptable farmacéuticamente, y en caso necesario, también conjuntamente con las sustancias auxiliares mencionadas más adelante. Más aún, el péptido o anticuerpo de la presente invención puede administrarse igualmente mediante un procedimiento tal como pulverización, mediante absorción transdérmica a través de la mucosa. El término "vehículo" se usa en la presente invención para indicar, por ejemplo, albúmina de suero humano. Además, puede usarse como un diluyente, PBS, agua destilada, o similares.

Como una dosificación, el péptido o anticuerpo de la presente invención puede administrarse dentro del intervalo de entre 0,01 y 100 mg por adulto por administración. Sin embargo, la dosificación no está limitada al intervalo anteriormente mencionado. Tampoco está particularmente limitada la forma de dosificación. Igualmente, puede disponerse un producto criodesecado, o un gránulo producido mediante la adición de un excipiente tal como azúcar.

Los ejemplos de sustancia auxiliar, que puede agregarse al agente de la presente invención para potenciar la actividad que induce la célula T reactiva al tumor, incluye: muramilo dipéptido (MDP); componentes bacterianos tal como bacteria BCG; ISCOM descrito en *Nature*, vol. 344, pág. 873, (1990); saponina QS-21 descrita en *J. Immunol.*, vol. 148, pág. 1438, (1992); liposoma; y óxido de aluminio. Además, pueden usarse también como sustancias auxiliares inmunoestimuladores tales como lentinano, esquizofilano, o Picibanil. Otros ejemplos de productos usados en la presente invención como sustancias auxiliares incluyen: citocinas para la potenciación del desarrollo o diferenciación de células T, tales como IL-2, IL-4, IL-12, IL-1, IL-6, o TNF; una galactosilceramida para la activación de células NKT; CpG que se une a un receptor del tipo célula T para activar un sistema inmune innato; y lipopolisacárido (LPS).

Además, el péptido antígeno anteriormente mencionado se agrega *in vitro* a células recogidas de un paciente, células (allogénicas) de cualquier tipo que compartan diversos alelos de HLA, seguido de de la presentación del antígeno

de las células. A continuación, las células son administradas dentro de los vasos sanguíneos del paciente, de manera tal que las células T asesinas pueden ser inducidas de manera eficaz dentro del cuerpo del paciente. Posteriormente, el péptido presente se agrega a los linfocitos de la sangre periférica de un paciente y, a continuación, la mezcla obtenida se cultiva *in vitro*. De esta forma, las células T asesinas pueden ser inducidas *in vitro* y, a continuación, pueden volver a los vasos sanguíneos del paciente. Una terapia de este tipo que implica la transferencia de células ha sido ya llevada a cabo como un procedimiento para el tratamiento de cánceres y, en consecuencia, es un procedimiento bien conocido para las personas expertas en la técnica.

Mediante la introducción del péptido de la presente invención dentro de un cuerpo, las células T asesinas son inducidas y activadas, y como un resultado de ello, es de esperar un efecto antitumor. Más aún, cuando los linfocitos son estimulados mediante el péptido de la presente invención *in vitro*, se inducen células T activadas. Las células T activadas son inyectadas dentro de un área afectada. De esta forma, esta técnica puede usarse de manera eficaz para una inmunoterapia adoptiva.

La presente invención se describirá adicionalmente en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

(1) Selección de péptido GPC3 que muestra capacidad de unión a la HLA-A2

La secuencia de aminoácidos de la GPC3 humana se investigó mediante un sistema BIMAS, y se seleccionaron 4 tipos de secuencias que tienen una afinidad de unión estimada para la HLA-A2 de 20 o superior.

Tabla 1

Posición del péptido	Secuencia de aminoácidos del péptido	Puntuación de afinidad de unión
GPC3 44-52	RLQPGLKWV	879
GPC3 144-152	FVGEFFTDV	828
GPC 155-163	YILGSDINV	162
GPC3 169-177	ELFDSLFPV	1055

20

Ejemplo 2

Inducción de células T asesinas humanas mediante el péptido GPC3 de unión a la HLA-A2

(1) Recogida de sangre

Se obtuvo el consentimiento informado de pacientes de carcinoma hepatocelular positivos a la HLA-A2, los cuales estaban en terapia en la Gastroenterological Surgery, Kumamoto University School of Medicine, y en el Hospital East, The National Cancer Center. Después de esto, se obtuvieron muestras de 30 ml de sangre de pacientes individuales y, a continuación, se aislaron células mononucleares de sangre periférica usando el procedimiento de centrifugación por gradiente de densidad Ficoll-Conray, de acuerdo con el procedimiento previamente informado (Nakatsura, T. y otros, Eur. J. Immunol., vol. 32, págs. 826-836, (2002)).

(2) Separación de células positivas a CD8 y de células positivas a CD14 a partir de células mononucleares de sangre periférica e inducción de células T asesinas.

A partir de las células mononucleares de sangre periférica aisladas, se indujeron células T asesinas mediante el procedimiento previamente informado (Monji, M. y otros, Clin. Cancer Res., vol. 10, págs. 6047-6057, (2004)). En primer lugar, las células positivas a CD8 y las células positivas a CD14 se separaron de las células mononucleares de sangre periférica usando MACS. Las células positivas a CD14 se cultivaron en la presencia de GM-CSF (100 ng/ml) y de IL-4 (20 ng/ml) durante 5 días, de manera tal que se indujo la diferenciación de células dendríticas. Posteriormente, se agregaron a ellas TNF- α (20 ng/ml) para maduración. Al 7^o día, se agregó a ellas cada péptido GPC3 (10 μ M) y, a continuación, se llevó a cabo el co-cultivo con células positivas a CD8. Esta estimulación de antígeno con células dendríticas obtenidas de células positivas a CD14 autólogas se repitió 3 ó 4 veces cada semana, de manera tal que se indujeron células T asesinas específicas del péptido. Durante la inducción, se cambió la mitad de un medio por otro reciente cada dos días, y al mismo se agregó IL-2 en una concentración de 10 U/ml.

(3) Análisis de actividad de células T asesinas específicas de GPC3 mediante el procedimiento ELISPOT

La presencia o ausencia de una célula T asesina que reaccione de manera fiable y específicamente con GPC3 y produzca IFN- γ en las células T asesinas así inducidas, se examinó mediante el procedimiento ELISPOT. El IFN- γ se detectó usando el set ELISPOT Human IFN- γ ELISPOT (BD). Cuando una célula T asesina (efectora) reacciona con una célula estimuladora (diana) para generar IFN- γ , cada IFN- γ se detecta en forma de una mancha de color rojo. Como células diana, se usaron células SK-Hep-1 como células madre, las cuales son positivas a la HLA-A2 y no expresan GPC3, y células SK-Hep-1/GPC3, en las cuales se había introducido el gen GPC3 dentro de células SK-Hep-1 para expresar la proteína GPC3. En primer lugar, se recubrió una placa ELISPOT (BD Biosciences) con un anticuerpo IFN- γ antihumano durante 18 horas. A continuación, este se bloqueó con FCS al 10%/RPMI durante 2 horas. Las células efectoras (100 μ l/pocillo) se mezclaron con las células diana (100 μ l/pocillo) y, a continuación, la mezcla se cultivó a 37°C durante 22 horas. Se llevó a cabo un experimento a una relación entre efectoras y diana (relación E/T) de 5:1. Después de esto, la placa se lavó con agua esterilizada y, a continuación, esta se dejó reaccionar con un anticuerpo IFN- γ antihumano biotinilado durante 2 horas y, a continuación, con estreptavidina-HRP durante 1 hora. Después de esto, se detectaron manchas positivas a IFN- γ con una solución sustrato. El número de dichas manchas se contó usando un software de análisis automático MINERVA. TECH. Como resultado de ello, pudo detectarse actividad de célula T asesina específica de GPC3 en el caso de células T asesinas inducidas mediante los péptidos GPC3 44-52, 114-52 y 155-163. Sin embargo, no se detectó actividad de célula T asesina en el caso de células T asesinas inducidas mediante un péptido GPC3 169-177 (Figuras 1 y 2). Los resultados analíticos de las células T asesinas inducidas mediante un péptido GPC3 155-163 representativo, se muestra en la Figura 1.

(4) Análisis de actividad citotóxica de células T asesinas mediante un ensayo de citotoxicidad

La actividad citotóxica de las células T asesinas inducidas se analizó mediante un ensayo de citotoxicidad usando, como células estimuladas, células SK-Hep-1 como células madre, las cuales son positivas a la HLA-A2 y no expresan GPC3, y células SK-Hep-1/GPC3, en las cuales el gen GPC3 ha sido introducido dentro de células SK-Hep-1 para expresar la proteína GPC3. La actividad citotóxica de las células T asesinas se valoró mediante un ensayo citotóxico usando Terescan VP. En primer lugar, las células diana se marcaron fluorescentemente con una solución de tinte de calceína AM a 37°C durante 30 minutos. Dichas células se co-cultivaron con células T asesinas sobre la mitad del área de una placa Coster de 96 pocillos y, a continuación, las células marcadas fluorescentemente se detectaron a lo largo del tiempo, midiendo, de esta forma, el grado de citotoxicidad. Los análisis se llevaron a cabo usando el ensayo de citotoxicidad por ordenador con el software CalCt-961 de MINERS TECH, el cual se usó en un procedimiento de fluorescencia. Se llevó a cabo un experimento con una relación E/T de 20:1. Como resultado de ello, se confirmó una actividad citotóxica específica de GPC3 en células T asesinas inducidas mediante los péptidos GPC3 44-52, 144-152 y 155-163. Sin embargo, no observó actividad citotóxica específica de GPC3 en células T asesinas inducidas mediante un péptido GPC3 169-177 (Figura 2).

Aplicabilidad industrial

La eficacia de una inmunoterapia del cáncer que identifica un péptido GPC3 presentado por la HLA-A24 se confirmó mediante un experimento animal usando ratones. Sin embargo, usando dichos péptidos presentados por la HLA-A24 a células T asesinas, las vacunas péptidas podrían administrarse únicamente al 60% de la población japonesa. Ahora, mediante la identificación de un péptido presentado a la célula T asesina por la HLA-A2, aproximadamente el 85% de la población japonesa puede llegar a ser identificado por la combinación de dos tipos de vacunas péptidas. Si se demuestra la eficacia de las terapéuticas experimentales usando un péptido presentado por la HLA-A2 a una célula T asesina, es altamente probable que dicho péptido será clínicamente aplicado también a los Caucásicos en los países Occidentales. Además, mediante la identificación de dicho péptido presentado por la HLA-A2 a una célula T asesina, el péptido identificado puede aplicarse no solamente al 40% de los paciente japoneses que sufren de carcinoma hepatocelular y de melanoma, sino que puede aplicarse también a muchos Caucásicos en los cuales la frecuencia de la HLA-A2 es superior que en los japoneses.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra resultados representativos obtenidos mediante análisis ELISPOT, de IFN- γ producido por células T asesinas, las cuales han reconocido específicamente péptidos GPC3 y han sido activados. Con respecto a las células T asesinas inducidas mediante la estimulación de células positivas a CD8 en la sangre periférica de un paciente con carcinoma hepatocelular mediante células dendríticas obtenidas de monocitos positivos a CD14 cargados con un péptido GPC3 155-163, el número de manchas y el área total de dichas manchas, en un caso en el que las células SK-Hep-1/GPC3, en las cuales el GPC3 había sido introducido dentro de células SK-Hep-1 para expresar la proteína GPC3, se usaron como células estimuladoras (en el lado derecho de la figura), fueron significativamente mayores que en un caso en el que las células SK-Hep-1 como células madre, las cuales fueron positivas a HLA-A2 y no expresan GPC3, se usaron como células estimuladoras (en el lado izquierdo de la figura). A partir de dichos resultados, se determinó que el péptido GPC3 155-163 es un péptido epitopo capaz de inducir células T asesinas específicas de GPC3.

La Figura 2 muestra los resultados del análisis ELISPOT y un ensayo de citotoxicidad. Las células T asesinas positivas a CD8 se seleccionaron a partir de la sangre periférica de un paciente de carcinoma hepatocelular positivo a HLA-A2 y, a continuación, las células seleccionadas se estimularon mediante células dendríticas obtenidas de monocitos cargados con cada péptido GPC3. Tanto si las células T asesinas así obtenidas reaccionaron específica-

mente o no con las células de expresión de GPC3 y produjeron IFN-γ, se examinaron mediante un ensayo ELIS-
 POT. Más aún, tanto si las células T asesinas mencionadas anteriormente mataron específicamente o no las células
 que expresan GPC3, se examinaron mediante un ensayo de citotoxicidad. Como células diana, se usaron células
 SK-Hep-1 como células madre, las cuales fueron positivas a HLA-A2 y no expresan GPC3, y células SK-Hep-
 5 1/GPC3, en las cuales el gen GPC3 había sido introducido dentro de células SK-Hep-1 para expresar la proteína
 GPC3. Como resultado de ello, las células T asesinas inducidas mediante los péptidos GPC3 44-52, 144-152 y 155-
 163, las células SK-Hep-1/GPC3 reconocieron específicamente la GPC3 y produjeron IFN-γ, e igualmente mostraron
 fuerte actividad citotóxica. Por el contrario, las células T asesinas inducidas mediante un péptido GPC3 169-177 no
 10 mostraron actividad de célula T asesina específica de GPC3. A partir de dichos resultados, se demostró que los
 péptidos GPC3 44-52, 144-152 y 155-163 son péptidos epítopos capaces de inducir células T asesinas específicas
 de GPC3.

LISTADO SE SECUENCIAS

<110> Kumamoto University

<120> Péptido antígeno de rechazo de cáncer derivado de glipican-3 (GPC3) para sujeto positivo a HLA-A2 y un
 15 medicamento que lo comprende

<130> A61163A

<160> 3

<210> 1

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 1

25

Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 2

Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val

1 5

35 <210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 3

Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val

1

5

5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3.
- 5 2. Una composición inmunoadyuvante usada para cánceres, que comprende al menos un tipo del péptido de la reivindicación 1.
3. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o prevención de tumores, que comprende al menos un tipo del péptido de la reivindicación 1.
4. Una composición de agente para la inducción de células que presentan antígeno que tienen la capacidad para inducir células T reactivas a tumores, que comprende el péptido de la reivindicación 1.
- 10 5. Una composición de agente para la inducción de células que presentan antígeno que tienen la capacidad para inducir células T reactivas a tumores para uso en el tratamiento y/o la prevención de tumores, que comprende un gen que codifica un péptido de cualquiera de las siguientes (A) o (B):
- (A) un péptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3; o
- 15 (B) un péptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o dos aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3, y que tiene la capacidad para inducir células T asesinas.
6. Una composición de agente para la inducción de células T reactivas a tumores, que comprende el péptido de la reivindicación 1.
- 20 7. Un anticuerpo contra el péptido de la reivindicación 1.
8. Una célula T ayudante, una célula T asesina, o una población de inmunocitos que comprende dichas células, que se induce usando el péptido de la reivindicación 1.
9. Una célula que presenta antígeno, la cual presenta un complejo que consiste en una molécula de HLA y el péptido de la reivindicación 1.
- 25 10. La célula que presenta antígeno de la reivindicación 9, que se induce usando la composición de agente de la reivindicación 4 ó 5.
11. Un procedimiento *in vitro* para la inducción de células que presentan antígeno que tienen alta capacidad para inducir células T reactivas a tumores, que comprende un gen que codifica un péptido de cualquiera de las siguientes (A) o (B):
- 30 (A) un péptido, que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3; o
- (B) un péptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución o adición de uno o dos aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de las SEC ID NOS: 1 a 3, y que tiene capacidad para inducir células T asesinas.

35

Fig. 1

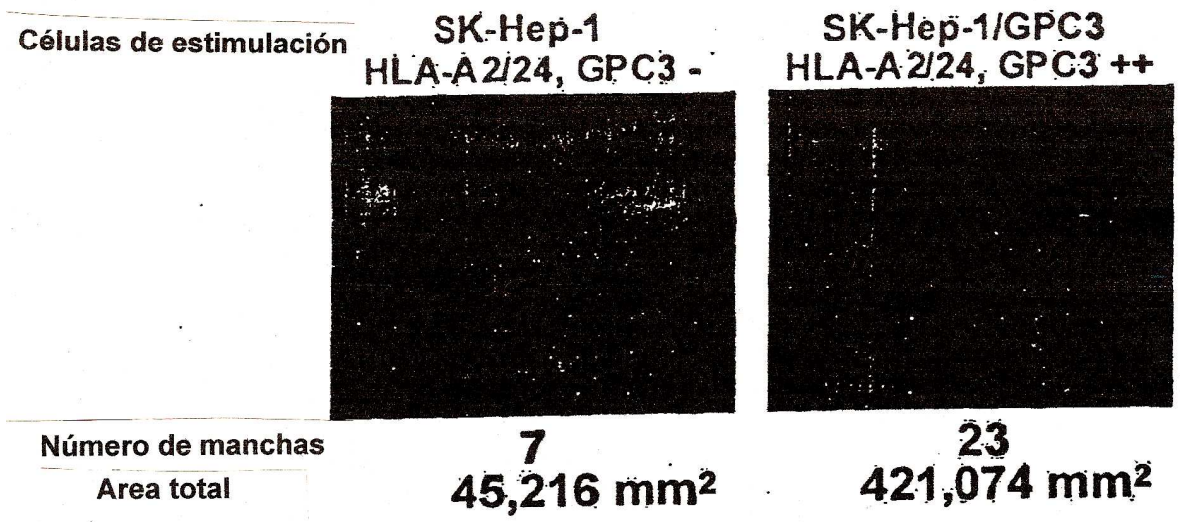


Fig. 2

