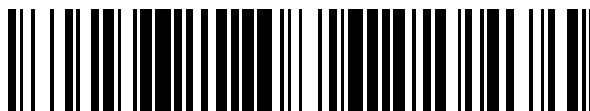


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 685**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)	C07K 14/47	(2006.01)
A61K 35/76	(2006.01)	G01N 33/574	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	G01N 33/50	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)		
A61P 13/08	(2006.01)		
A61P 13/10	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 35/02	(2006.01)		
C07K 7/06	(2006.01)		
C12Q 1/02	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07714676 .9**
- 96 Fecha de presentación: **21.02.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1988163**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **Péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 y composición farmacéutica que comprende el mismo**

30 Prioridad:
22.02.2006 JP 2006045287

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.09.2012

73 Titular/es:
**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
IMMUNOLOGY, INC.
13-9, ENOKI-CHO
SUITA-SHI, OSAKA 564-0053, JP**

72 Inventor/es:
SUGIYAMA, Haruo

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 387 685 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).

DESCRIPCIÓN

Péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 y composición farmacéutica que comprende el mismo.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un péptido restringido por HLA-A*3303, específicamente un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos constituida por 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, en la que un aminoácido en la posición 2 de la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo constituido por Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y un aminoácido en la posición 9 es Arg. Además, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido, una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer que comprende el mismo.

15 **Antecedentes**

El gen WT1 (gen del tumor 1 de Wilms) se identificó como un gen responsable del tumor de Wilms, que es un cáncer renal en niños (documentos no patentes 1 y 2). El WT1 es un factor de transcripción que tiene una estructura en dedo de cinc. Al principio, el gen WT1 se consideró un gen supresor tumoral. No obstante, estudios posteriores (documentos no patentes 3, 4, 5 y 6) mostraron que, en vez de ello, el gen WT1 funciona como oncogen en tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos.

El gen WT1 se expresa a niveles altos en muchos tipos de tumores malignos. Se ha estudiado si el producto del gen WT1 sin mutaciones, que es una proteína autóloga, tiene o no inmunogenicidad en un cuerpo vivo. Los resultados revelaron que la proteína derivada del gen WT1 que se expresa a niveles elevados en las células tumorales se fragmenta mediante procedimiento intracelular, los péptidos resultantes forman complejos con las moléculas de MHC de clase I y los complejos se presentan sobre las superficies de las células y que los CTL que reconocen dichos complejos se pueden inducir mediante vacunación peptídica (documentos no patentes 7, 8 y 9). También se demostró que en un ratón inmunizado con un péptido WT1 o un ADNc de WT1, las células tumorales transplantadas que expresan un gen WT1 se rechazan con una probabilidad alta (documentos no patente 7 y 10), mientras que los tejidos normales que expresan fisiológicamente el gen WT1 no son dañados por las CTL inducidas (documento no patente 7). En experimentos in Vitro usando células humanas se mostró que cuando el péptido Db126 o el péptido WH187 (aminoácidos 187-195 de la SEC ID N° 1, SLGEQQYSV) que tienen una capacidad elevada de unirse a una molécula de HLA-A*0201, que es una de las moléculas del MHC de clase I, se usa para estimular las células mononucleares de sangre periférica humana que tienen HLA-A*0201, se inducen CTL específicas de WT1, los CTL inducidos tienen una actividad citotóxica específica de células tumorales que expresan endógenamente un gen WT1 a niveles elevados y la actividad citotóxica de dichos CTL está restringida por HLA-A2 (Documento no patente 11). En experimentos in vitro en células humanas usando el péptido WT1 que coincide con HLA-A*2402 (que se encuentra con más frecuencia en personas japonesas entre los alelos HLA-A) (WT1₂₃₅; aminoácidos 235-343 de la SEC ID N° 1, CMTWNQMNL) se mostró que los CTL específicos de WT1 (TAK-1) se inducen (documento no patente 12) y los CTL inducidos no suprimen la actividad formadora de colonias de las células madre hematopoyéticas normales que expresan parcialmente fisiológicamente un gen WT1 (Documentos no patente 13 y 14). Estos informes sugieren convincentemente que no solo en ratones, sino también en seres humanos, los CTL específicos de WT1 se pueden inducir, dichos CTL tienen una actividad citotóxica contra las células tumorales que expresan un gen WT1 a niveles elevados, pero no tienen una actividad citotóxica contra células normales que expresan fisiológicamente un gen WT1 (documentos no patente 7, 10, 11, 12, 13 y 14).

El producto del gen WT1 está presente como proteína nuclear y se procesa mediante proteasomas en el citoplasma que se va a fragmentar en péptidos. Los péptidos fragmentados se transportan a la luz del retículo endoplásmico mediante moléculas TAP (transportador asociado con el procesamiento antigénico), forman complejos con las moléculas del MHC de clase I y se presentan sobre las superficies de las células. Los CTL específicos de WT1 se inducen como resultado del reconocimiento de los complejos del péptido WT1-molécula del MHC de clase I por las células precursoras de CTL a través del TCR, ejerciendo de este modo un efecto citotóxico sobre las células tumorales que presentan un producto del gen WT1 mediante moléculas de MHC de clase I (documentos no patente 7, 8 y 9). Por tanto, se requiere al menos que un péptido WT1 usado en inmunoterapia contra el cáncer dirigida a un producto génico de WT1 esté en la forma que se une a una molécula del MHC de clase I en un cuerpo vivo. No obstante, las moléculas del MHC de clase I son diversas y las secuencias de aminoácidos de los péptidos WT1 que se unen a las respectivas moléculas de MHC de clase I son diferentes entre sí. Por tanto, se requiere proporcionar un péptido correspondiente a cada subtipo de MHC de clase I. No obstante, solo los péptidos restringidos por la molécula de HLA-A*2402, por la molécula HLA-A*2601 se conocen como péptidos WT1 restringidos por la molécula HLA hasta la fecha (Documento de Patente 1, Documento No patente 11 y Documento de Patente 2, respectivamente). HLA-A*3303 está presente al siguiente porcentaje más alto con respecto a HLA-A*2402 en japoneses. Por tanto, existe la necesidad de encontrar un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303.

Documento de patente 1: Documento WO 2003/106682

Documento de patente 2: Documento WO 2005/095598

65 Documento 1 que no es una patente: Daniel A. Haber y col., Cell. 1990 Jun 29; 61 (7): 1257-69.

Documento 2 que no es una patente: Call KM y col., Cell. 1990 Feb 9; 60(3):509-20.

Documento 3 que no es una patente: Menke AL y col., Int Rev Cytol. 1998; 181 :151-212. Review.

Documento 4 que no es una patente: Yamagami T y col., Blood. 1996 Apr 1; 87(7):2878-84.

Documento No Patente 5: Inoue K y col., Blood. 1998 Apr 15; 91(8):2969-76.

Documento No Patente 6: Tsuboi A y col., Leuk Res. 1999 May; 23(5):499-505.

5 Documento No Patente 7: Oka Y y col., J Immunol. 2000 Feb 15; 164(4):1873-80.

Documento No Patente 8: Melief CJ y col., Immunol Rev. 1995 Jun; 145:167-77.

Documento No Patente 9: Ritz J, J Clin Oncol. 1994 Feb; 12(2):237-8.

Documento No Patente 10: Tsuboi A y col., J Clin Immunol. 2000 May; 20(3):195-202.

Documento No Patente 11: Oka Y y col., Immunogenetics. 2000 Feb; 51 (2):99-1 07.

10 Documento No Patente 12: Ohminami H y col., Blood. 2000 Jan 1; 95(1):286-93.

Documento No Patente 13: Gao L y col., Blood. 2000 Apr 1; 95(7):2198-203.

Documento No Patente 14: Ohminami H y col., Blood. 2000 Jan 1; 95(1):286-93.

Descripción de la invención

15

Problemas que ha de resolver la invención

Los problemas que se han de resolver en la presente invención son proporcionar un péptido WT1 restringido HLA-A*3303 y un polinucleótido que codifica el mismo, así como una composición farmacéutica para el tratamiento/prevención de un cáncer que comprende el mismo.

20

Medios para resolver los problemas

Como resultado de intensos estudios a la luz de la situación como se ha descrito anteriormente, el presente inventor ha descubierto que un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos constituida por 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, en el que un aminoácido en la posición 2 de la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo constituido por Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y un aminoácido en la posición 9 es Arg puede inducir un CTL específico de WT1 con una tasa elevada. Por tanto, la presente invención se ha realizado.

25

La presente invención proporciona:

30

(1) un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4);

35

(2) una composición farmacéutica para usar en el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303 que comprende un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4);

(3) uso de un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303;

40

(4) un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con (1);

(5) un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con (4);

(6) una composición farmacéutica para usar en el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303 que comprende un polinucleótido que codifica un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4) o un vector que comprende dicho polinucleótido;

45

(7) uso de un polinucleótido que codifica un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4) o un vector que comprende dicho polinucleótido para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303;

50

(8) un CTL específico de WT1, que es inducible por un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4);

(9) un procedimiento para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear de sangre periférica en presencia de un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4) para inducir el CTL específico de WT1 de la célula mononuclear de sangre periférica;

55

(10) un kit para la inducción de un CTL específico de WT1 o para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, en el que dicho kit comprende un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4) como componente esencial;

60

(11) una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, que es inducible por un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4);

(12) un procedimiento para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, que comprende cultivar una célula presentadora de antígeno inmadura en presencia de un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N° 4) para

65

inducir la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 de la célula presentadora de antígeno inmadura;

(13) un procedimiento para el diagnóstico de un cáncer, que comprende usar el CTL de acuerdo con (8) o la célula presentadora de antígeno de acuerdo con (11);

(14) un procedimiento para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo para HLA-A*3303, que comprende:

(a) hacer reaccionar un complejo de un péptido WT1 que comprende una secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4) y una molécula de HLA-A*3303 con una muestra del sujeto; y

(b) determinar la presencia o la cantidad de un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra; y

(15) el procedimiento de acuerdo con (14), en el que el complejo es una forma de tetrámero.

Efectos de la invención

La presente invención proporciona un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 y un polinucleótido que codifica el mismo, así como una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de un cáncer que comprende el mismo. Por tanto, es posible inducir in vivo e in Vitro CTL específicos de WT1 en sujetos que tienen HLA-A*3303. Dado que aproximadamente el 24 % de los japoneses tienen al menos una molécula de HLA-A*3303, los CTL específicos de WT1 se pueden inducir en un abanico muy amplio de sujetos.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por WT1₃₃₇.

La Fig. 2 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por WT1₃₆₄.

La Fig. 3 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por WT1₃₆₇.

La Fig. 4 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por WT1₄₀₉.

La Fig. 5 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por WT1₃₆₄ contra la célula que expresa un gen de WT1 de forma endógena.

La Fig. 6 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por WT1₃₆₇ contra la célula que expresa un gen de WT1 de forma endógena.

La Fig. 7 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por WT1₄₀₉ contra la célula que expresa un gen de WT1 de forma endógena.

La Fig. 8 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por WT1₃₆₇ contra la célula que expresa un gen de WT1.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

En la SEC ID N° 1 se muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína WT1 humana. 1. Un gen WT1 se expresa en su forma nativa a niveles altos en, por ejemplo, tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y cánceres sólidos, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovarios. Además, un motivo de anclaje para HLA-A*3303 se caracteriza por que un aminoácido en la posición 2 es uno cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y un aminoácido en la posición 9 es Arg. Por tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303, que comprende una secuencia de aminoácidos constituida por 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, en la que un aminoácido en la posición 2 de la secuencia de aminoácidos se selecciona, preferentemente, del grupo constituido por Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y un aminoácido en la posición 9 de la secuencia de aminoácidos es, preferentemente, Arg (en lo sucesivo denominado péptido WT1).

El péptido de la invención constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4) conserva una capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*3303.

Como se ha descrito anteriormente, es un objeto de la presente invención obtener un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303. Por tanto, el péptido de la presente invención está constituido por la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de la SEC ID N° 4. Varias sustancias se pueden unir al extremo N y/o al extremo C del péptido de la presente invención. Por ejemplo, se puede unir un aminoácido, un péptido o un análogo del mismo. Si estas sustancias están unidas al péptido de la presente invención, se pueden procesar mediante, por ejemplo, una enzima en un cuerpo vivo o a través de un proceso tal como un procesamiento intracelular y, por último, el péptido de la invención se pueden producir y presentar como complejo con una molécula de HLA-A*3303 sobre la superficie de una célula, de modo que tiene como resultado el efecto de inducir un CTL. Estas Sustancias pueden ser aquellas que modulan la solubilidad de los péptidos de la presente invención o aumentan su estabilidad (resistencia a la proteasa). Como alternativa, estas sustancias pueden ser aquellas que liberan los péptidos de la presente invención específicamente, por ejemplo, en un tejido u órgano dado, o pueden tener la acción de incrementar la eficiencia de la captación por una célula presentadora de antígeno. Estas sustancias pueden ser aquellas que aumentan la capacidad para inducir CTL, tal como péptidos colaboradores.

El péptido de la presente invención se puede sintetizar mediante procedimientos usados generalmente en la técnica o modificaciones de los mismos. Dichos procedimientos se describen en , por ejemplo, Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vo12, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide-Gosei, Maruzen Co., Ltd., 1975; Peptide-Gosei No Kiso To Jikken, Maruzen Co., Ltd., 1985; y Iyakuhin No Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide-Gosei, Hirokawa -Book store, 1991.

El péptido de la presente invención también se puede preparar usando técnicas de ingeniería genética basadas en la información sobre la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la presente invención. El experto en la técnica conoce bien dichas técnicas de ingeniería genética.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el péptido WT1 restringido por HLA-A*3303. El gen WT1 se expresa a niveles altos en tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y cánceres sólidos, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovarios. Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para el tratamiento o prevención de un cáncer. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra a un sujeto positivo para HLA-A*3303, los CTL específicos de WT1 Son inducidos por el péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 comprendido en la composición farmacéutica y las células cancerosas en el sujeto están dañadas por dichos CTL.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además del péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 como ingrediente activo, por ejemplo, un vehículo o un excipiente. El péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención induce un CTL específico de WT1. Por tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un adyuvante adecuado o se puede administrar junto con un adyuvante adecuado con el fin de potenciar la eficiencia de la inducción. Ejemplos de adyuvantes preferibles incluyen adyuvante completo o incompleto de Freund e hidróxido de aluminio.

El procedimiento de la administración de la composición farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar adecuadamente en función de condiciones tales como el tipo de enfermedad, la afección del sujeto o el sitio diana. Ejemplos de dichos procedimientos incluyen administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral. La cantidad del péptido comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención, así como la forma de dosificación, el número de veces de la administración de la composición farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar adecuadamente en función de condiciones tales como el tipo de enfermedad, la afección del sujeto o el sitio diana. La única dosis del péptido normalmente es de 0,0001 mg- 1.000 mg, preferentemente de 0,001 mg – 10.000 mg.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica a un sujeto positivo para HLA-A*3303. El cáncer que se va a tratar o prevenir puede ser uno cualquiera y ejemplos de los mismos incluyen tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno, y cánceres sólidos, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovarios.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 para la fabricación de la composición farmacéutica.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo para *HLA-A*3303, que comprende:*

(a) hacer reaccionar un complejo de un péptido WT1 y una molécula de HLA-A*3303 con una muestra del sujeto; y

(b) determinar la presencia o la cantidad de un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra. La muestra de un sujeto puede ser una cualquier siempre que exista una posibilidad de que contenga un linfocito. Ejemplos de las muestras incluyen fluido corporal, tal como sangre o linfa y un tejido. El complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*3303 se puede preparar, por ejemplo, como un tetrámero o pentámero usando un procedimiento conocido para un experto en la técnica, tal como el procedimiento de biotina-estreptavidina. La presencia o la cantidad de los CTL que reconocen dicho complejo se puede medir mediante un procedimiento conocido para un experto en la técnica. En este aspecto de la presente invención se puede marcar el complejo. Un marcador conocido, tal como un marcador fluorescente o un marcador radioactivo, se puede usar como marcador. El marcaje hace que la determinación de la presencia o la cantidad de un CTL sea fácil y rápida. El procedimiento de este aspecto de la presente invención se puede usar para diagnosticar un cáncer o el pronóstico del mismo.

Por tanto, la presente invención también proporciona una composición para la determinación de la presencia o

cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo para *HLA-A*3303*, que comprende un complejo de un péptido WT1 y una molécula *HLA-A*3303*.

5 Además, la presente invención proporciona un kit para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo para *HLA-A*3303*, que comprende un complejo de un péptido WT1 y una molécula *HLA-A*3303*.

10 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un CTL específico de WT1 usando un complejo de un péptido WT1 y una molécula *HLA-A*3303*, que comprende:

(a) hacer reaccionar el complejo con una muestra; y
 (b) obtener un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra. El complejo de un péptido WT1 y una molécula *HLA-A*3303* se ha descrito anteriormente. La muestra puede ser una cualquiera siempre que exista una posibilidad de que contenga un linfocito. Ejemplos de las muestras incluyen una muestra de un sujeto, tal como sangre y un cultivo celular. El CTL que reconoce el complejo se puede obtener usando un procedimiento conocido para un experto en la técnica, tal como FACS o MACS. La presente invención permite el cultivo de los CTL específicos de WT1 obtenidos y su uso para el tratamiento o prevención de varios cánceres.

20 Por tanto, la presente invención también se refiere a un CTL específico de WT1 que se puede obtener mediante un procedimiento para la producción de un CTL específico de WT1 usando un complejo de un péptido WT1 y una molécula *HLA-A*3303*.

25 Además, la presente invención se refiere a un kit para la producción de un CTL específico de WT1 que comprende un complejo de un péptido WT1 y una molécula *HLA-A*3303*.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido WT1 restringido por *HLA-A*3303* (en lo sucesivo denominado polinucleótido de WT1). El polinucleótido de la presente invención puede ser ADN o ARN. La secuencia de bases del polinucleótido de la presente invención se puede determinar en base a la secuencia de aminoácidos del péptido WT1 restringido por *HLA-A*3303*. El polinucleótido se puede preparar mediante, por ejemplo, un procedimiento para la síntesis de ADN o ARN, un procedimiento de PCR o similar.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende el polinucleótido (en lo sucesivo vector de expresión de WT1). El tipo de vector de expresión, la secuencia comprendida aparte de la secuencia del polinucleótido se puede seleccionar adecuadamente en función del tipo de huésped en el que se introduce el vector de expresión de la presente invención, o la finalidad de uso. Es posible tratar o prevenir los tumores hematopoyéticos o cánceres sólidos administrando el vector de expresión de la presente invención a un sujeto positivo para *HLA-A*3303* para producir un péptido WT1 en un cuerpo vivo e inducir un CTL específico de WT1 y dañar las células de tumores hematopoyéticos o las células de cáncer sólido en el sujeto.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el polinucleótido de WT1 o el vector de expresión de WT1. La composición, el procedimiento de la administración y similares de la composición farmacéutica de la presente invención en este aspecto se han descrito anteriormente.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica que comprende el péptido WT1 o el vector de expresión de WT1 para preparar un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para *HLA-A*3303*. Ejemplos de cánceres que se van a tratar o prevenir incluyen tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y cánceres sólidos, tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovarios.

50 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido de WT1 o un vector de expresión de WT1 para la fabricación de la composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de WT1 o un vector de expresión de WT1.

55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula que comprende el vector de expresión. La célula de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, transformando una célula huésped tal como *E. coli*, levadura, célula de insecto o célula animal con el vector de expresión. El procedimiento para la introducción del vector de expresión en una célula huésped se puede seleccionar adecuadamente de varios procedimientos. Cultivando la célula transformada y recuperando y purificando el péptido WT1 producido, se puede preparar el péptido de la presente invención.

60 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un CTL específico de WT1 que es inducido por el péptido WT1 restringido por *HLA-A*3303*. El CTL de la presente invención reconoce un complejo de un péptido WT1 y una

molécula de HLA-A*3303. Por tanto, el CTL de la presente invención se puede usar para dañar específicamente una célula tumoral positiva para HLAA*3303 y expresar WT1 a un nivel elevado.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un CTL específico de WT1 para preparar un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303. El modo de administración del CTL específico de WT1 se puede seleccionar adecuadamente en función de condiciones tales como el tipo de enfermedad, la afección del sujeto o el sitio diana. Ejemplos de dichos procedimientos incluyen administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración nasal y administración oral.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear de sangre periférica en presencia del péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 para inducir el CTL específico de WT1 de la célula mononuclear de sangre periférica. El sujeto del cual deriva la célula mononuclear de sangre periférica puede ser uno cualquiera siempre que sea positivo para HLA-A*3303. Cultivando las células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 se inducen CTL específicos de WT1 a partir de células precursoras de CTL contenidas e las células mononucleares de sangre periférica. Es posible tratar o prevenir tumores hematopoyéticos o cánceres sólidos en un sujeto positivo para HLA-A*3303 administrando al sujeto el CTL específico de WT1 obtenido de acuerdo con la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 como componente esencial. Preferentemente, el kit se usa en el procedimiento para la inducción de un CTL específico de WT1. El kit de la presente invención puede comprender, además del péptido WT1 restringido por HLA-A*3303, por ejemplo, un medio de obtener una célula mononuclear de sangre periférica, un adyuvante, un vaso de reacción o similar. En general, se adjunta al kit un manual de instrucciones. Usando el kit de la presente invención se pueden inducir CTL específicos de WT1 con eficiencia.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una célula presentadora de antígeno (tal como una célula dendrítica) que presenta un péptido WT1 a través de una molécula de HLA-A*3303, que es inducida por el péptido WT1 específico de HLA-A*3303. Usando la célula presentadora de antígeno de la presente invención se inducen con eficiencia CTL específicos de WT1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303 para preparar un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303. El modo de administración de la célula presentadora de antígeno se puede seleccionar adecuadamente en función de condiciones tales como el tipo de enfermedad, la afección del sujeto o el sitio diana. Ejemplos de dichos procedimientos incluyen administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración nasal y administración oral.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303, que comprende cultivar una célula presentadora de antígeno inmadura en presencia del péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 para inducir la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303 a partir de la célula presentadora de antígeno inmadura. La célula presentadora de antígeno inmadura se refiere a una célula tal como una célula dendrítica inmadura que puede madurar en una célula presentadora de antígeno. Un sujeto a partir del cual deriva la célula presentadora de antígeno inmadura puede ser uno cualquiera siempre que sea positivo para HLA-A*3303. Dado que las células presentadoras de antígeno inmaduras están contenidas en, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica, dichas células se pueden cultivar en presencia del péptido WT1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303, que comprende el péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 como componente esencial. Preferentemente, el kit se usa en el procedimiento para la inducción de una célula presentadora de antígeno. Otro componente que esté comprendido en el kit de la presente invención y similares se han descrito anteriormente. El kit de la presente invención se puede usar para inducir eficientemente una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula de HLA-A*3303.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo contra un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 o un anticuerpo contra un polinucleótido que codifica el péptido. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para el diagnóstico de un cáncer, que comprende usar el CTL específico de WT1, la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula de HLA-A*3303 o el anticuerpo contra un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 o el anticuerpo contra un polinucleótido que codifica el péptido. Preferentemente, el CTL específico de WT1 se usa en el

procedimiento para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, es posible diagnosticar un cáncer incubando el CTL, la célula presentadora de antígeno o el anticuerpo con una muestra de un sujeto positivo para HLA-A*3303 o administrándolo a un sujeto positivo para HLA-A*3303 y determinando, por ejemplo, la posición, el sitio o la cantidad el mismo. El CTL, la célula presentadora de antígeno o el anticuerpo se pueden marcar. Uniendo un marcador, el procedimiento para el diagnóstico de la presente invención se puede poner en práctica con eficiencia.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico de un cáncer, que comprende usar el CTL específico de WT1, la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula de HLA-A*3303 o el anticuerpo contra un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 o el anticuerpo contra un polinucleótido que codifica el péptido como componente esencial.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención con mayor detalle. Las realizaciones que ya no entran dentro del alcance de las reivindicaciones se mantuvieron con fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Selección de un péptido WT1

Se usó el programa NetMHC2.0 Program (Universidad Técnica de Dinamarca) para seleccionar WT1₃₃₇, WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ y WT1₄₀₉, que son péptidos hidrófilos constituidos por 9 aminoácidos con el motivo de anclaje para HLA-A*3303 (el segundo aminoácido del extremo N es uno cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y el aminoácido en el extremo C es Arg) y cabe esperar que tenga una afinidad de unión alta por una molécula de HLA-A*3303 de un péptido WT1 de una proteína WT1 (SEC ID N° 1). Las secuencias de aminoácidos y las afinidades de unión a una molécula de HLA-A*3303 de estos péptidos se muestran en la Tabla 1.

[Tabla 1]

Péptido	Número de aminoácido en la SEC ID N° 1	Secuencia aminoácidos	de Afinidad de unión a la molécula HLA-A*3303
WT1 ₃₃₇ (SEC ID N° 2)	337 - 345	LSHLQMHSR	18,827
WT1 ₃₆₄ (SEC ID N° 3)	364 - 372	FSRSDQLKR	15,143
WT1 ₃₆₇ (SEC ID N° 4)	367 - 375	SDQLKRHQR	14,496
WT1 ₄₀₉ (SEC ID N° 5)	409 - 417	TSEKPFSCR	15,31

Preparación de células B-LCL

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separaron mediante el procedimiento de centrifugación por densidad de gradiente Ficoll-Hypaque de la sangre periférica que se había obtenido de un donante sano positivo para HLA-A*3303 (HLA-A*3300207). Los PBMC se sembraron después en una placa de cultivo celular de 24 pocillos a la densidad de aproximadamente 1×10^7 en medio RPMI 1640 que contiene FCS al 10 % y se añadió un sobrenadante de cultivo de células B95-8 (células productoras del virus de EB). Se cultivaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante aproximadamente 1 mes. Se obtuvieron células B-LCL transformadas con el virus de EB, que son células tumorales de células B. Se confirmó que las células B-LCL resultantes no expresaban el gen WT1. Las células B-LCL se pulsaron incubándolas con 20 µg/ml de WT1₃₃₇, WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ durante 2 horas y se irradiaron con 80 Gy de radiación.

Las células B-LCL resultantes (en lo sucesivo denominadas células B-LCL pulsadas con un péptido WT1) se usaron como células presentadoras de antígeno para los experimentos siguientes.

Inducción de CTL específicos de WT1

Se cultivaron 3×10^6 de PBMC (HLA-A*3303/11 01) en placas de cultivo de 24 pocillos en medio completo (45 % de RPMI, 45 % de medio AMI-V y 10 % de suero AB humano) que contiene 20 µg/ml de WT1₃₃₇, WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 1 semana para obtener células respondedoras. 2×10^6 de las células respondedoras resultantes se cocultivaron con 1×10^6 de las células B-LCL pulsadas con el mismo péptido WT1 en medio completo durante 1 semana (primera estimulación). Las PBMC se cocultivaron con las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1 tres veces más (segunda a cuarta estimulaciones) en condiciones en las que se añadieron 20 UI/ml (concentración final) de IL-2 del siguiente modo: segunda estimulación: dos veces cada dos días comenzando a los 3 días del inicio de la estimulación; tercera y cuarta estimulaciones: tres veces a intervalos de un día desde el día después del inicio de la estimulación. Las células resultantes se concentraron usando el kit Negative Selection Columns Gravity Feed Kit (StemSp), de modo que la proporción de células T positivas para CD8 se

convirtió en aproximadamente un 80 % y se cocultivaron con las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1 (quinta estimulación). Las células T positivas para CD8 (CTL) obtenidas 5 días después de la estimulación final se usaron para medir la actividad citotóxica.

5 Actividad citotóxica de los CTL

La actividad citotóxica de los CTL se midió usando el ensayo de liberación de ^{51}Cr . Las células CTL (en lo sucesivo en el presente documento denominadas células efectoras) se mezclaron a la proporción (proporción E/T) de 1:1, 5:1 o 10:1 en 200 μl de medio con las células diana en las que se había incorporado el ^{51}Cr y se cultivaron en una placa de cultivo de 96 pocillos a 37 °C con CO_2 al 5 % durante 4 horas. Las células B-LCL pulsadas con el mismo péptido WT1 que se usó para la inducción de CTL (BLCL-P) y las células B-LCL sin pulsar con un péptido WT1 (BLCL-NP) se usaron como células diana. Después del cultivo se recogieron los sobrenadantes mediante centrifugación. Las cantidades de ^{51}Cr liberado en los sobrenadantes se midieron usando un contador de centelleo líquido. La actividad citotóxica (%) se determinó usando la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{liberación de } ^{51}\text{Cr en el sobrenadante de la muestra} - \text{liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr}}{\text{liberación máxima de } ^{51}\text{Cr} - \text{liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr}} \times 100$$

en la que liberación espontánea de ^{51}C es la liberación de ^{51}C observada cuando las células diana en las que se había incorporado el ^{51}C se cultivaron solas en las mismas condiciones y liberación máxima de ^{51}Cr es la liberación de ^{51}C observada cuando las células diana en las que se había incorporado el ^{51}C se habían lisado completamente usando Triton X-100 al 1 %. Los resultados se muestran en las Figs. 1-4. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específica (%) y los ejes horizontales representan las proporciones E/T. Los BLCL-P se representan usando líneas completas y los BLCL-NP se representan usando líneas discontinuas. Se confirmó que los CTL inducidos con WT1₃₃₇, WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ dañan específicamente los BLCL-P que presentan el péptido WT1 como complejo con una molécula de HLA-A*3303 en comparación con los BLCL-NP. Los CTL inducidos con WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ se usaron para experimentos adicionales, más adelante.

30 Actividad citotóxica de CTL contra células que expresan el gen WT1 de forma endógena

La actividad citotóxica de los CTL inducidos con WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ contra las células TF-1 que son células tumorales que expresan un gen WT1 (positivas para HLA-A*3303) se determinó usando el procedimiento descrito anteriormente. Como control, se usaron células K562 que expresan un gen WT1 y son negativas para HLA-A*3303. Los resultados se muestran en las Figuras 5-7. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específica (%) y los ejes horizontales representan las proporciones E/T. Las células TF-1 se representan usando líneas completas y las K562 se representan usando líneas discontinuas. Se confirmó que los CTL inducidos con WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ también tienen una actividad citotóxica contra la célula que expresa un gen WT1 de forma exógena.

La actividad citotóxica de los CTL inducidos con WT1₃₆₇ contra células B-LCL que expresan WT1 se determinó usando el procedimiento como se ha descrito anteriormente. Las B-LCL que expresa WT1 (B-LCL-WT1) se refieren a las células B-LCL en las cuales se introduce un gen WT1 humano y expresa una proteína WT1 en la célula y presenta un péptido constituido por aproximadamente 9 aminoácidos resultantes de procesar sobre una molécula de HLA-A*3303. Como control se usaron células B-LCL (B-LCL-CV) en las que se introduce un gen control a excepción del gen WT1. Los resultados se muestran en la Figura 8. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específica (%) y los ejes horizontales representan las proporciones E/T. B-LCL-WT1 se representa usando líneas completas y B-LCL-CV se representa usando líneas discontinuas. Se confirmó que los CTL inducidos con WT1 367 solo dañan las células positivas para HLA-A*3303 y expresan WT1.

50 Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 y un polinucleótido que codifica el péptido, una composición farmacéutica que comprende el mismo y similares. Por tanto, la presente invención se puede usar en los campos de medicina y similares, por ejemplo en los campos de desarrollo y preparación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de varios tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos que expresan el gen WT1 a niveles elevados.

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.

<120> Péptido WT1 restringido por HLA-A*3303 y composición farmacéutica que comprende el mismo

<130> 667343

65 <150> JP 2006-045287

<151> 2006-02-22

<160> 5

5 <170> Patentin versión 3.2

<210> 1

<211>449

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
 1           5           10           15
Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
          20           25           30
Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
          35           40           45
Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
 50           55           60
Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
 65           70           75           80
Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
          85           90           95
Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
          100          105          110
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
          115          120          125
Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
 130          135          140
Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
 145          150          155          160
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
          165          170          175
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
          180          185          190
Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
          195          200          205
Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp

```

ES 2 387 685 T3

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

Leu

5 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

10 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg
 1 5

15 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 387 685 T3

<400> 3

Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg
1 5

5 <210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 4

Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg
1 5

15 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 5

Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4).
- 5 2. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303 que comprende un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4).
- 10 3. Uso de un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303.
- 15 4. Un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
- 5 6. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303 que comprende un polinucleótido que codifica un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4) o un vector que comprende dicho polinucleótido.
- 20 7. Uso de un polinucleótido que codifica un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4) o un vector que comprende dicho polinucleótido para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303.
- 25 8. Un CTL específico de WT1, que es inducible por un péptido constituido por una secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4).
- 30 9. Un procedimiento para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear de sangre periférica en presencia de un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4) para inducir el CTL específico de WT1 de la célula mononuclear de sangre periférica.
- 35 10. Un kit para la inducción de un CTL específico de WT1 o para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, en el que dicho kit comprende un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4) como componente esencial.
- 40 11. Una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, que es inducible por un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4).
- 45 12. Un procedimiento para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, que comprende cultivar una célula presentadora de antígeno inmadura en presencia de un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4) para inducir la *célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 de la célula presentadora de antígeno inmadura*.
- 50 13. Un procedimiento para el diagnóstico de un cáncer, que comprende usar el CTL de acuerdo con la reivindicación 8 o la célula presentadora de antígeno de acuerdo con la reivindicación 11.
14. Un procedimiento para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo para *HLA-A*3303*, que comprende:
 - (1) hacer reaccionar un complejo de un péptido WT1 que comprende una secuencia de aminoácidos de *Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg* (SEC ID N° 4) y una molécula de HLA-A*3303 con una muestra del sujeto; y
 - (b) determinar la presencia o la cantidad de un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra.
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el complejo es una forma de tetrámero.

Fig. 1

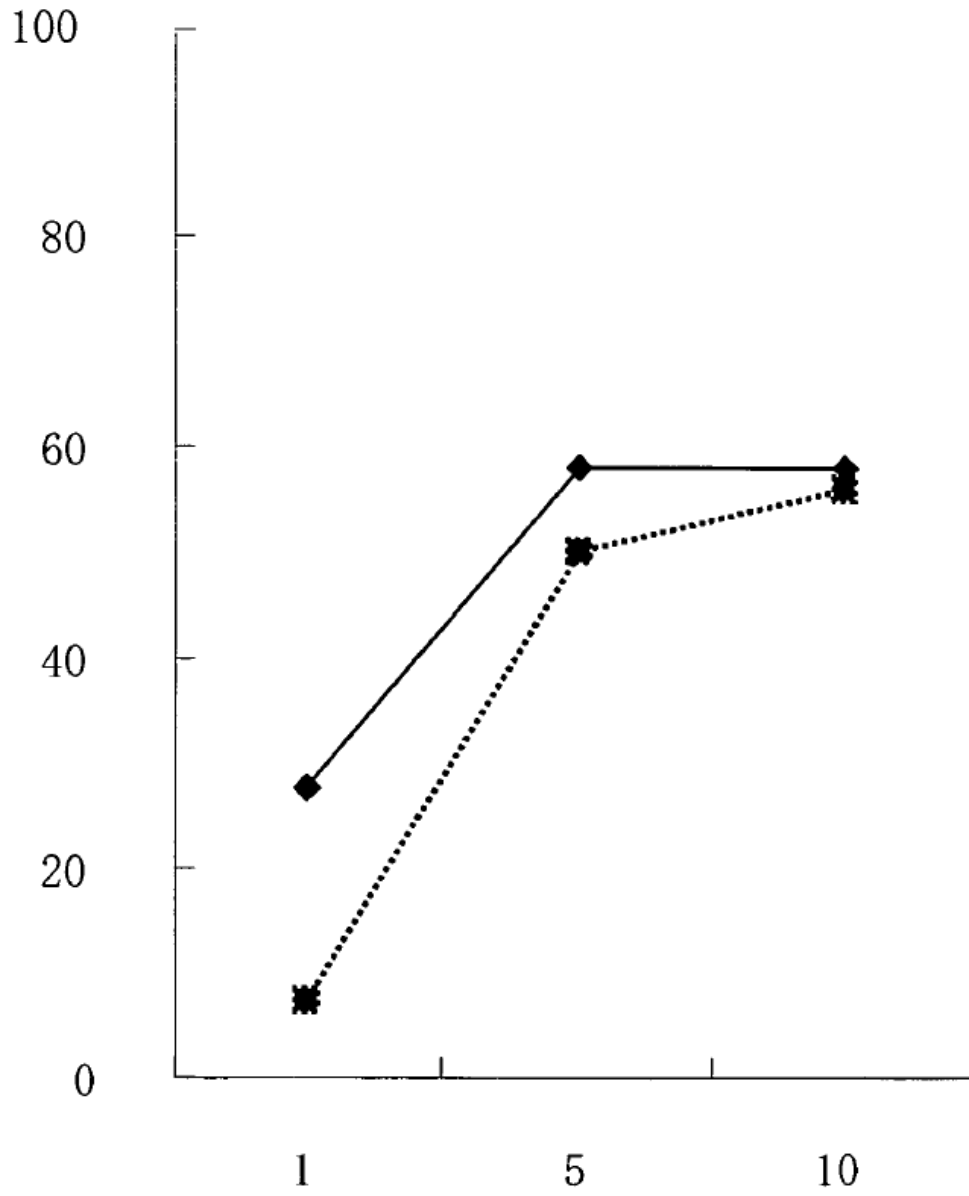


Fig. 2

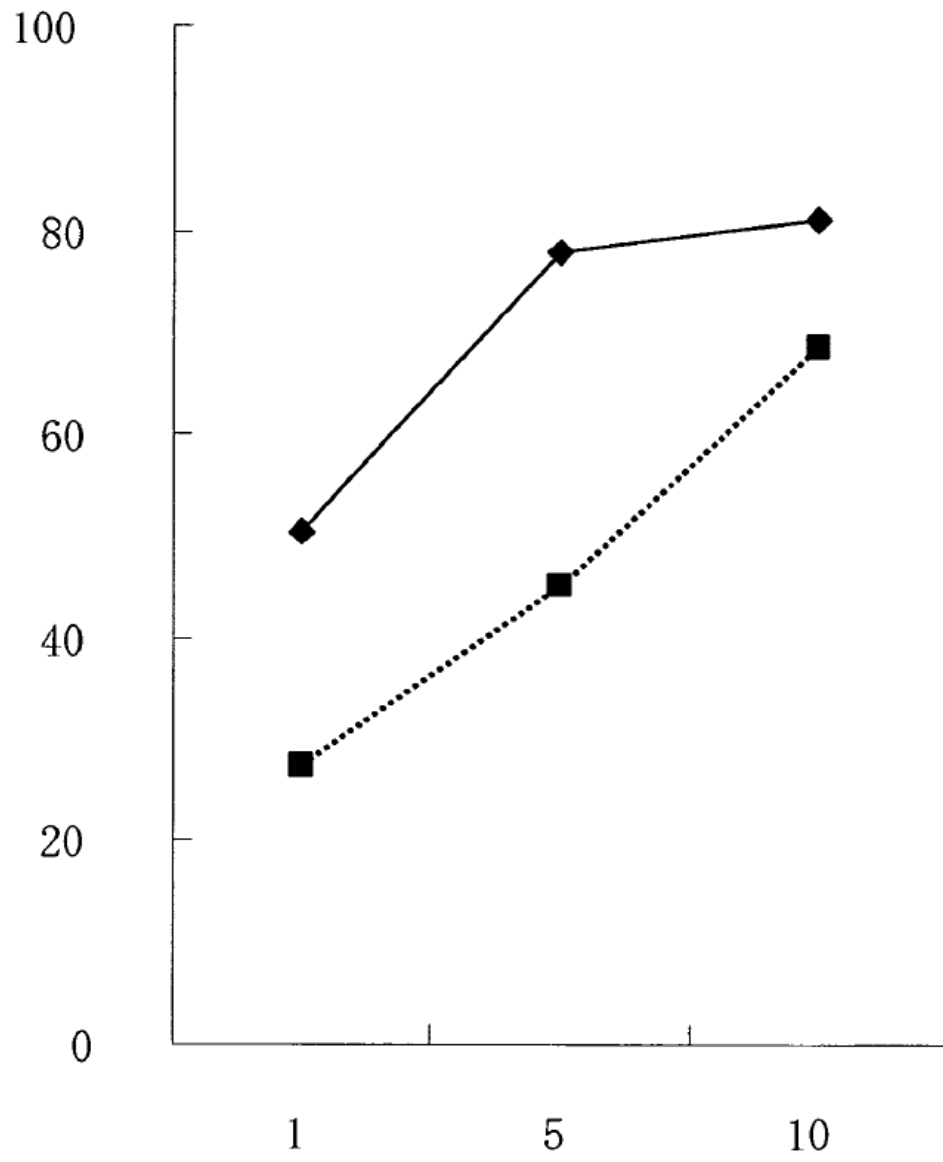


Fig. 3

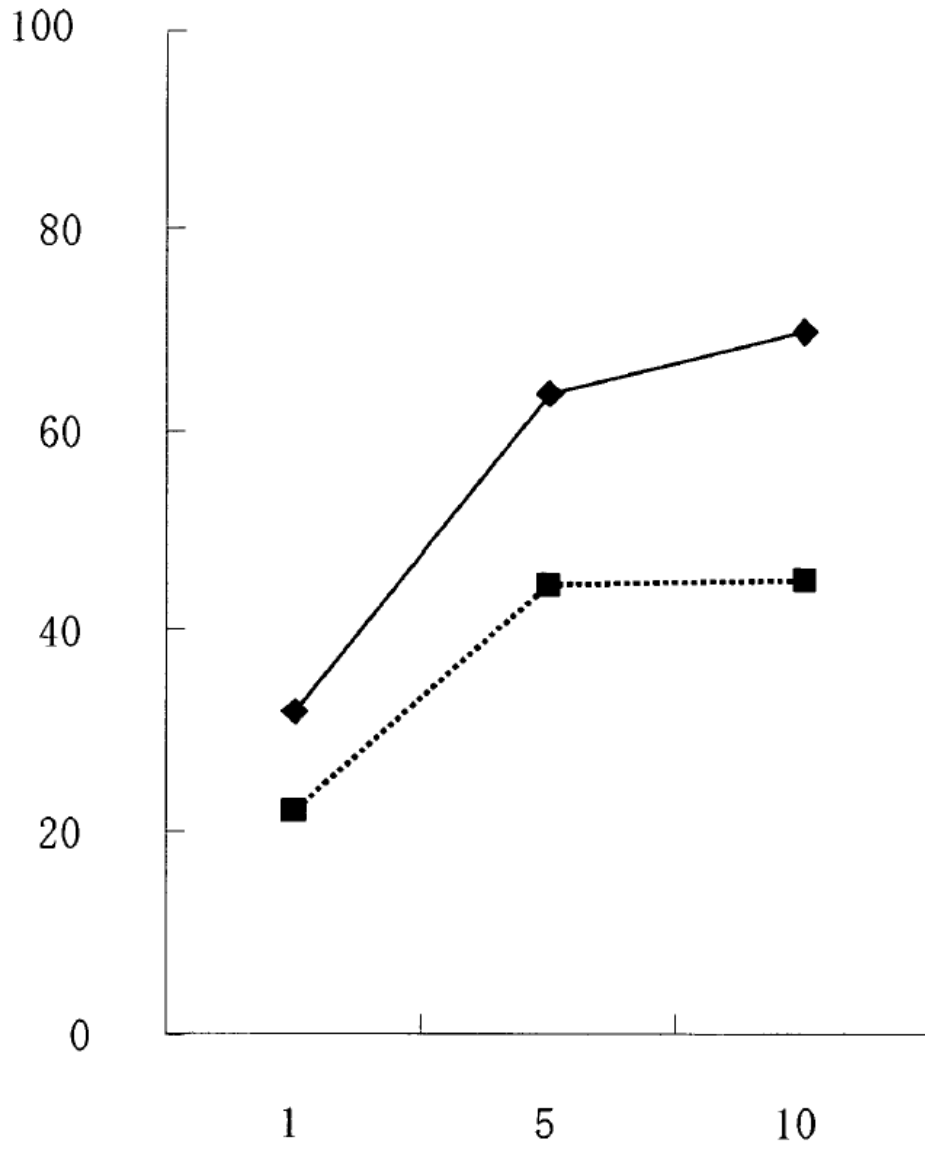


Fig. 4

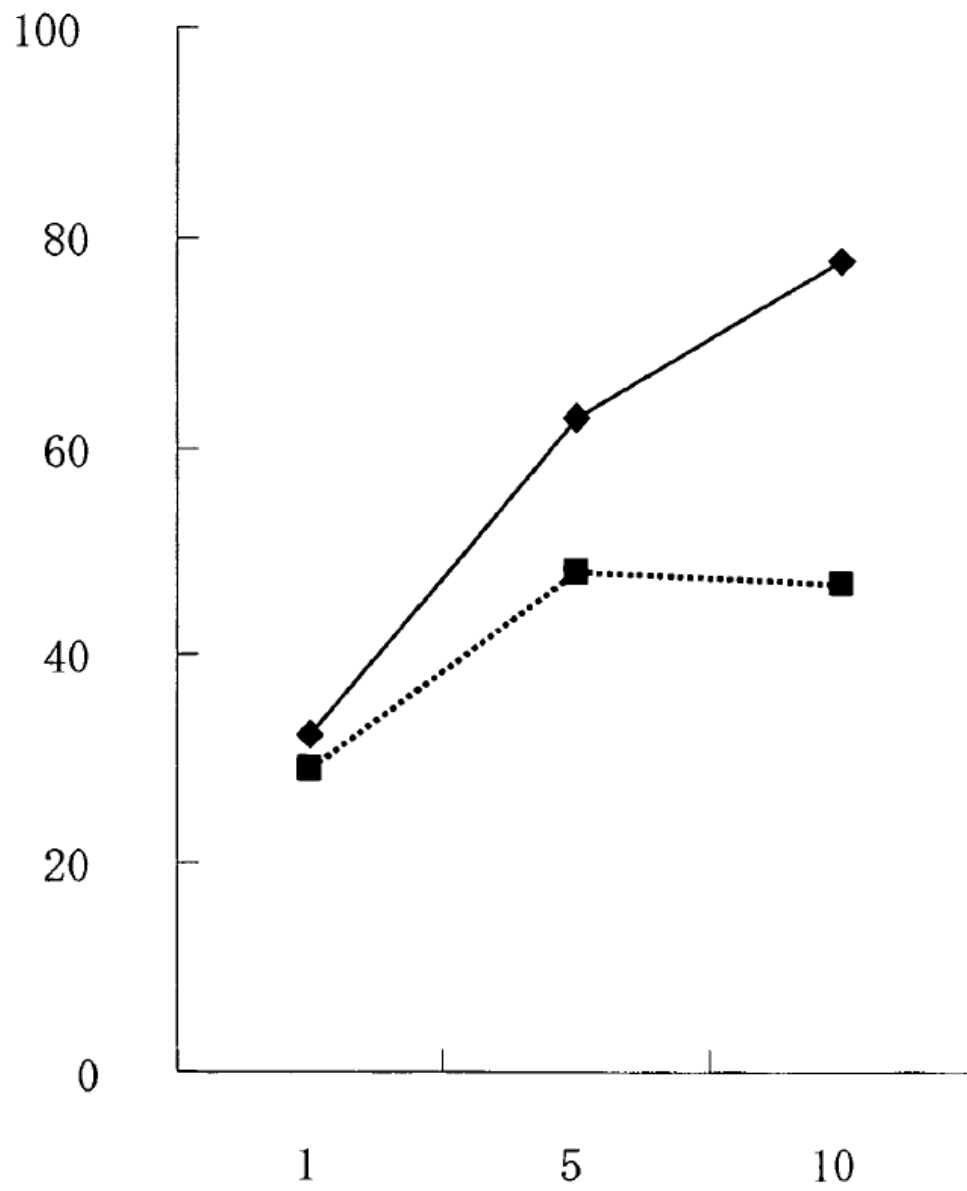


Fig. 5

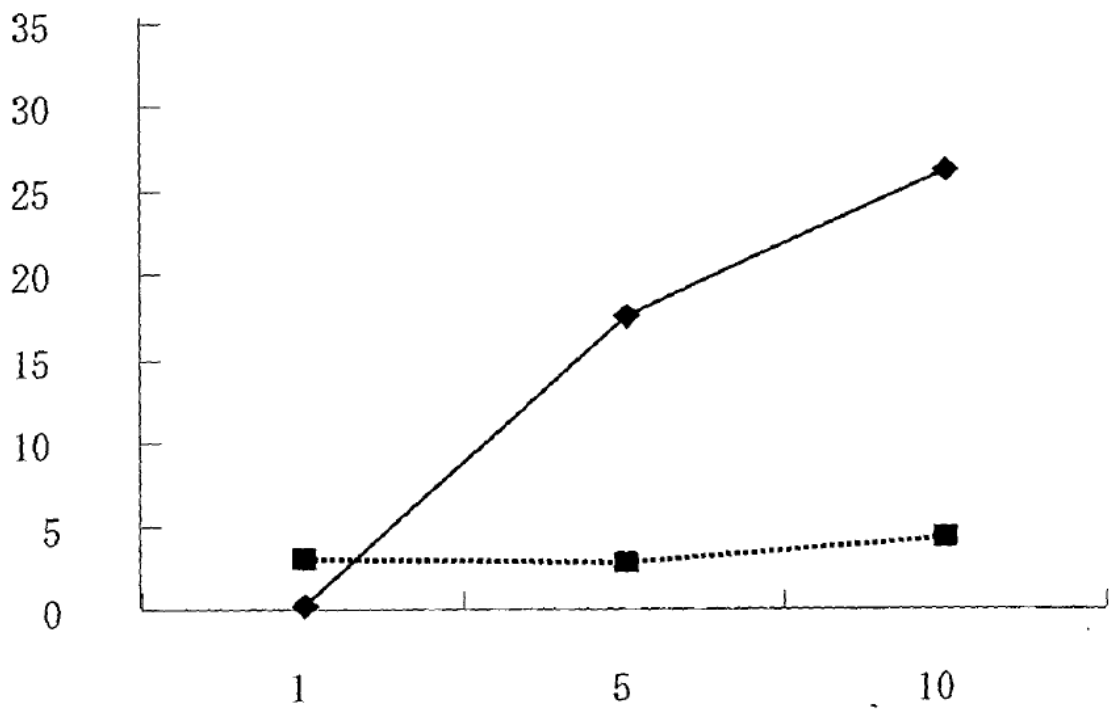


Fig. 6

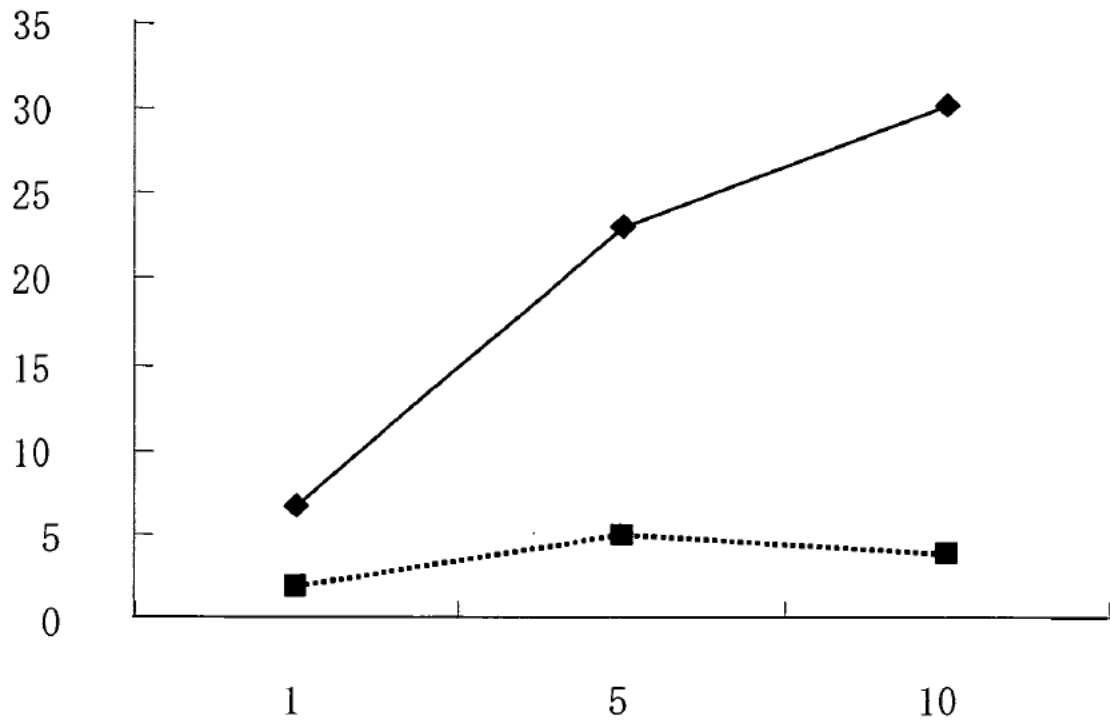


Fig. 7

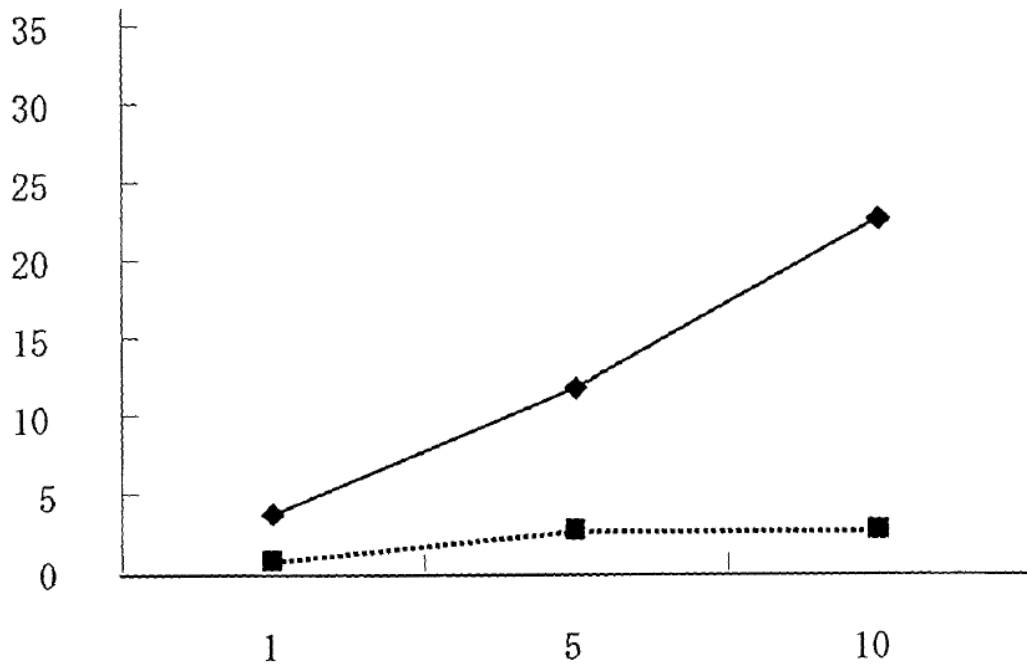


Fig. 8

