(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 558 330**

(51) Int. CI.:

A61K 38/08 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2007 E 12174393 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2518149**

(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 y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.02.2016

(73) Titular/es:

INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC. (100.0%)
13-9, Enoki-cho
Suita-shi, Osaka 564-0053, JP

(72) Inventor/es:

SUGIYAMA, HARUO

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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

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 la secuencia de aminoácidos Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N.º 4) donde un aminoácido está sustituido por otro aminoácido, donde el aminoácido en la posición 2 se selecciona de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y el 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.

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. Los péptidos de ambiguos de cáncer derivados de WT1 se conocen del documento patente 3.

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.º: 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) ($WT1_{235}$; aminoácidos 235-343 de la SEC ID N.º: 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 en 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 perspectivas 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). Es más, la identificación basada en ordenador del posibles epítopos es engorrosa y no necesariamente tendrá como resultado epítopos producidos y presentados *in vivo* que inducen una respuesta CTL (documento no patente 15). 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
Documento 3 que no es una patente: EP-A-1584627.
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.
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.
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.
Documento No Patente 15: Hossain M. et al., AIDS Res. Human Retrovis. 2003 June, 19(6):503-510.

Descripción de la invención

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.

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 la secuencia de aminoácidos Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N.º 4) en la que un aminoácido está sustituido por otro aminoácido, donde el aminoácido en la posición 2 se selecciona de por Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y el 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.

La presente invención proporciona:

(1) un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos de Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N.º: 4) donde un aminoácido está sustituido por otro aminoácido, donde el aminoácido en la posición 2 se selecciona de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp y el aminoácido en la posición 9 es Arg, donde dicho péptido tiene una capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*3303 y una capacidad para inducir una CTL;
(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 de acuerdo con (1);
(3) el uso del péptido de acuerdo con (1) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303;
(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 el péptido de acuerdo con (1);
(7) el uso de un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con (1) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303;
(8) un CTL específico de WT1, que es inducible por un péptido de acuerdo con (1);
(9) un procedimiento para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear de sangre periférica en presencia del péptido de acuerdo con (1);
(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 el péptido de acuerdo con (1);
(11) una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, que es inducible por un péptido de acuerdo con (1);
(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 del péptido de acuerdo con (1);
(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), siempre que el método no se practique en el cuerpo humano o animal;
(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 del péptido de acuerdo con (1) 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 y similares. 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 $WT1_{337}$.
La Fig. 2 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por $WT1_{364}$.
La Fig. 3 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por $WT1_{367}$.
La Fig. 4 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por $WT1_{409}$.
La Fig. 5 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por $WT1_{364}$ contra la célula que expresa un gen de WT1 de forma endógena.
La Fig. 6 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por $WT1_{367}$ contra la célula que expresa un gen de WT1 de forma endógena.
La Fig. 7 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por $WT1_{409}$ contra la célula que expresa un gen de WT1 de forma endógena.
La Fig. 8 representa la actividad citotóxica del CTL inducido por $WT1_{367}$ contra la célula que expresa un gen de WT1.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

En la SEC ID N.º: 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 el aminoácido en la posición 2 es uno cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y el 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 la secuencia de aminoácidos Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N.º: 4) donde un aminoácido está sustituido por otro aminoácido donde el aminoácido en la posición 2 se selecciona de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y el aminoácido en la posición 9 es Arg (en lo sucesivo denominado péptido WT1).

La secuencia de aminoácidos del péptido de la presente invención es, preferentemente, Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg (SEC ID N.º: 4). Adicionalmente, puede tener una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido en los 9 aminoácidos de cualquiera de la SEC ID N.º: 4. Uno cualquiera de los aminoácidos a excepción de los de la posición 9 puede modificarse adecuadamente. En cualquiera de los casos, el péptido de la presente invención 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 anterior de la presente invención puede ser, por ejemplo, un péptido que está constituido por la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 4 o una proteína WT1 o una parte de la misma que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 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, la secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos se puede 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 aquéllas que modulan la solubilidad de los péptidos de la presente invención o aumentan su estabilidad (resistencia a la proteasa etc.). Como alternativa, estas sustancias pueden ser aquéllas 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 o similar. Estas sustancias pueden ser aquéllas que aumentan la capacidad para inducir CTL, tal como péptidos colaboradores o similares.

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 su uso en 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, aunque sin limitaciones, adyuvante completo o incompleto de Freund e hidróxido de aluminio.

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 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 y similares 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 al uso del péptido de la invención para preparar un medicamento para el tratamiento o prevención de un cáncer en 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 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 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 HLAA*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.

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

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 o un procedimiento de PCR.

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.

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

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de polinucleótido de WT o un vector que codifica dicho polinucleótido 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.

Adicionalmente se divulga una célula que comprende el vector de expresión. La célula 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.

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.

Adicionalmente se divulga un procedimiento para el tratamiento o la prevención de un cáncer que comprende administrar un CTL específico de WT1 a un sujeto positivo para HLA-A*3303. El procedimiento 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, aunque sin limitaciones, 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 en 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 o un vaso de reacción. 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.

Adicionalmente se divulga un procedimiento para el tratamiento o la prevención de un cáncer que comprende administrar la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula de HLA-A*3303 a un sujeto positive para HLA-A*3303. El procedimiento 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, aunque sin limitaciones, 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.

Adicionalmente se divulga 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*330 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.

Adicionalmente se divulga 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*330 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. Los ejemplos que ya no entran dentro del alcance de las reivindicaciones son con fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Selección de un péptido WT1

Se usó el programa NetMHC2.0 Program (Universidad Técnica de Dinamarca) para seleccionar $WT1_{337}$, $WT1_{364}$, $WT1_{367}$ y $WT1_{409}$, 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.º: 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.º: 1	Secuencia de aminoácidos	Afinidad de unión a la molécula HLA-A*3303
$WT1_{337}$ (SEC ID N.º: 2)	337 - 345	LSHLQMHSR	18,827
$WT1_{364}$ (SEC ID N.º: 3)	364 - 372	FSRSDQLKR	15,143
$WT1_{367}$ (SEC ID N.º: 4)	367 - 375	SDQLKRHQR	14,496
$WT1_{409}$ (SEC ID N.º: 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 x 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 ºC con CO_2 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 $WT1_{337}$, $WT1_{364}$, $WT1_{367}$ o $WT1_{409}$ 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 x 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 $WT1_{337}$, $WT1_{364}$, $WT1_{367}$ o $WT1_{409}$ a 37 ºC con CO_2 al 5 % durante 1 semana para obtener células respondedoras. 2 x 10^6 de las células respondedoras resultantes se cocultivaron con 1 x 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.

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 ºC 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:

(liberación de ^{51}Cr en el sobrenadante de la muestra - liberación espontánea de ^{51}Cr)/ (liberación máxima de ^{51}Cr - liberación espontánea de ^{51}C) x 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 $WT1_{337}$, $WT1_{364}$, $WT1_{367}$ o $WT1_{409}$ 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 $WT1_{364}$, $WT1_{367}$ o $WT1_{409}$ se usaron para experimentos adicionales, más adelante.

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

La actividad citotóxica de los CTL inducidos con $WT1_{364}$, $WT1_{367}$ o $WT1_{409}$ 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 $WT1_{364}$, $WT1_{367}$ o $WT1_{409}$ también tienen una actividad citotóxica contra la célula que expresa un gen WT1 de forma exógena.

La actividad citotóxica de los CTL inducidos con $WT1_{367}$ 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 HLAA*3303 y expresan WT1.

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

<110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.

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

<130> 667343

<150> EP 11161436.8
<151> 21-02-2007

<150> EP 07714676.9
<151> 21-02-2007

<150> JP 2006-045287
<151> 22-02-2006

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
    210                 215                 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
225                 230                 235                 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
                245                 250                 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
            260                 265                 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
        275                 280                 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
    290                 295                 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
305                 310                 315                 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
                325                 330                 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
            340                 345                 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
        355                 360                 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
    370                 375                 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
385                 390                 395                 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
                405                 410                 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
            420                 425                 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
        435                 440                 445

Leu
```

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

<400> 2

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

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

<400> 3

```
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg
1               5
```

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

<400> 4

Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg
1 5

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

<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.º: 4) donde un aminoácido está sustituido por otro aminoácido, donde el aminoácido en la posición 2 se selecciona de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y el aminoácido en la posición 9 es Arg, donde dicho péptido tiene una capacidad para unirse a una molécula de HLA-A*3303 y una capacidad para inducir un CTL.

2. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303 que comprende el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Uso del péptido de acuerdo con la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo para HLA-A*3303.

4. Un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

5. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 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 el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

7. Uso de un polinucleótido que codifica el péptido de acuerdo con la reivindicación 1 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.

8. Un CTL específico de WT1, que es inducible por el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

9. Un procedimiento para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear de sangre periférica en presencia del péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

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, comprendiendo dicho kit el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

11. Una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, que es inducible por el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

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 del péptido de acuerdo con la reivindicación 1.

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, siempre que el procedimiento no se practique en el cuerpo de un ser humano o animal.

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 de acuerdo con la reivindicación 1 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

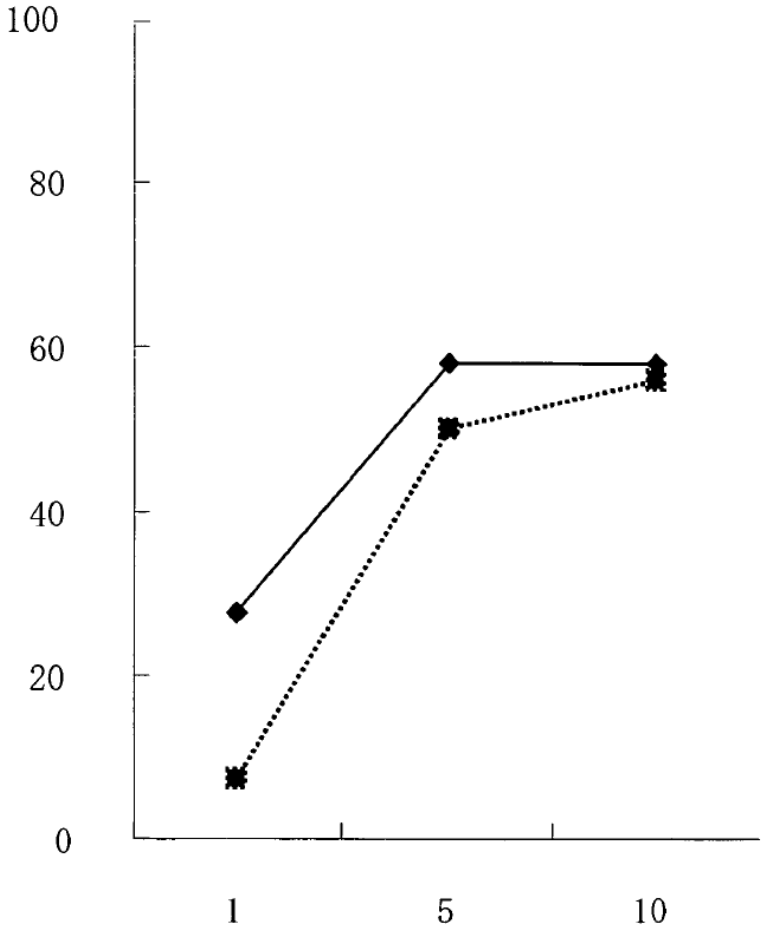

Fig. 2

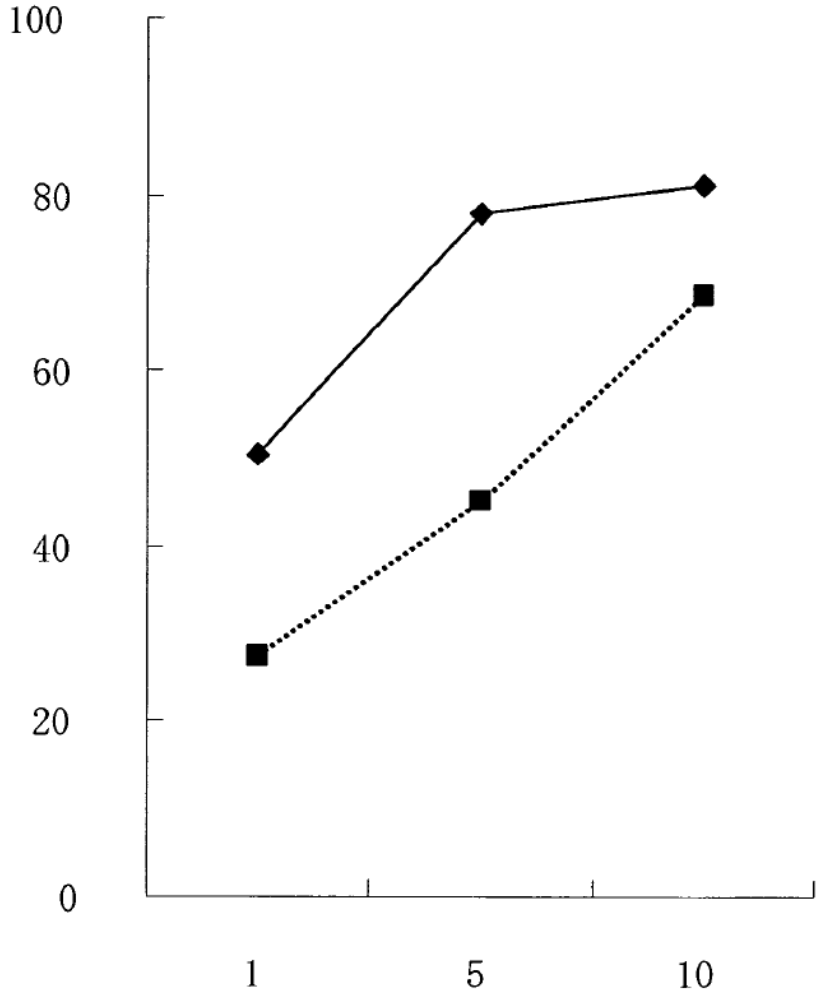

Fig. 3

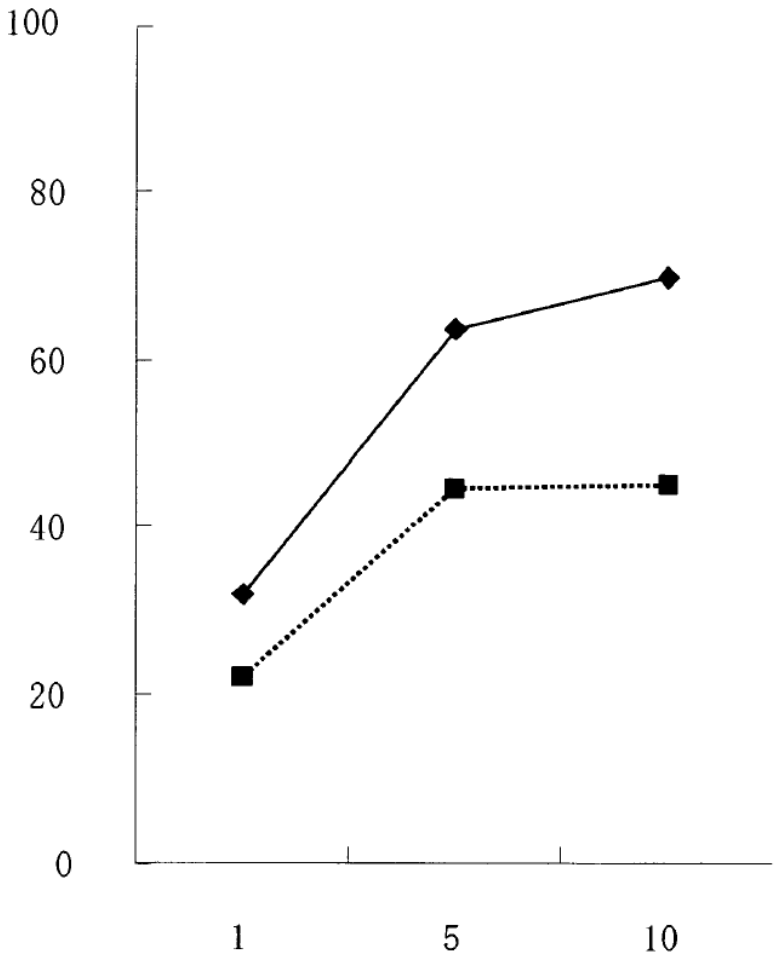

Fig. 4

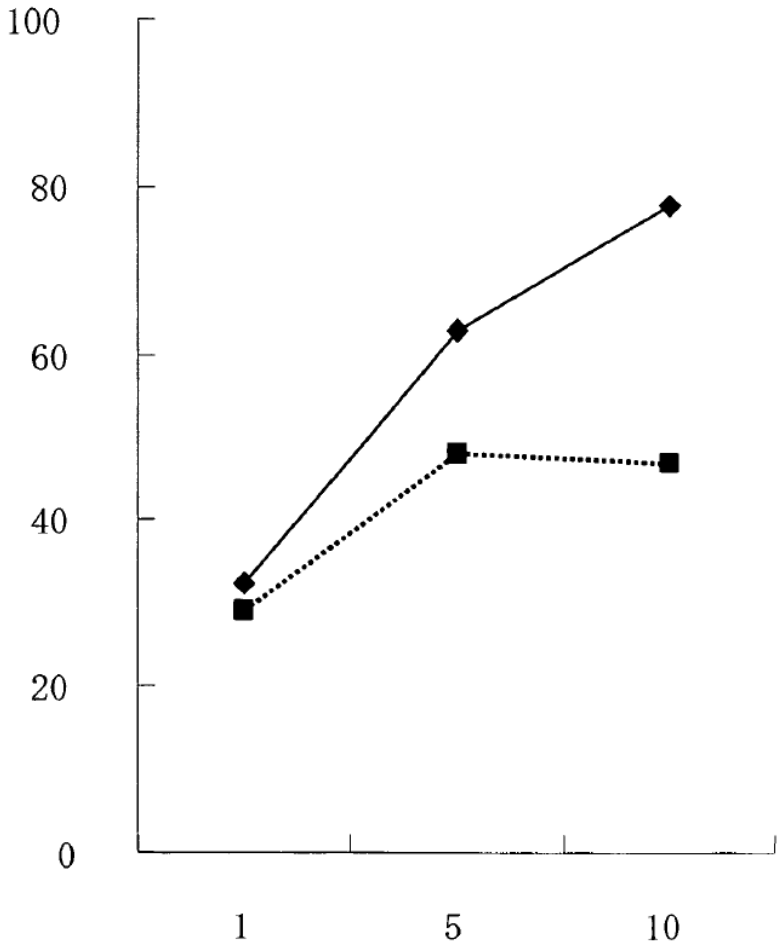

Fig. 5

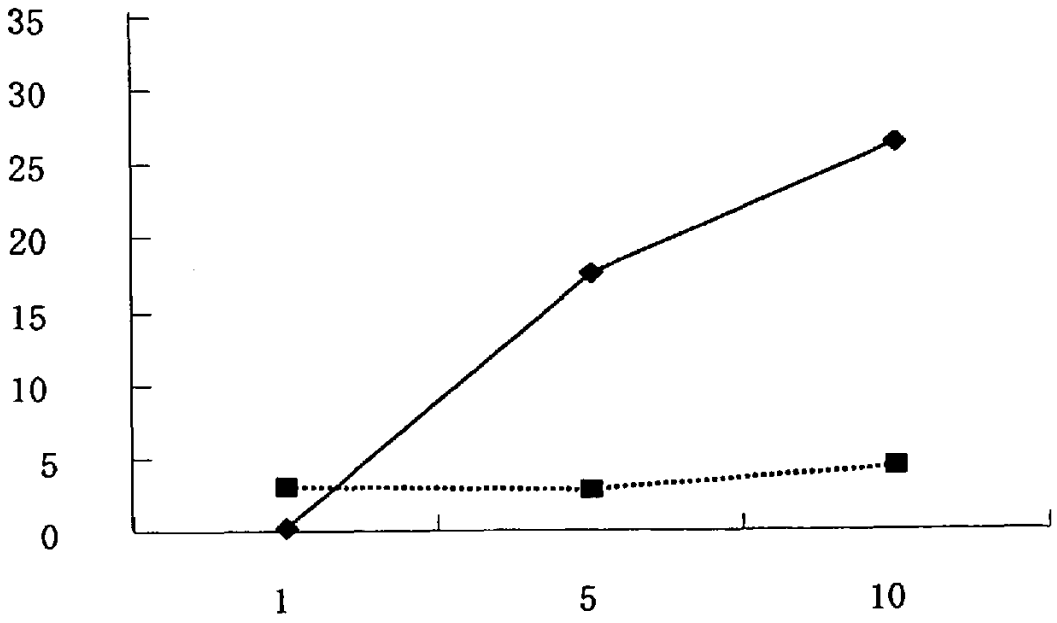

Fig. 6

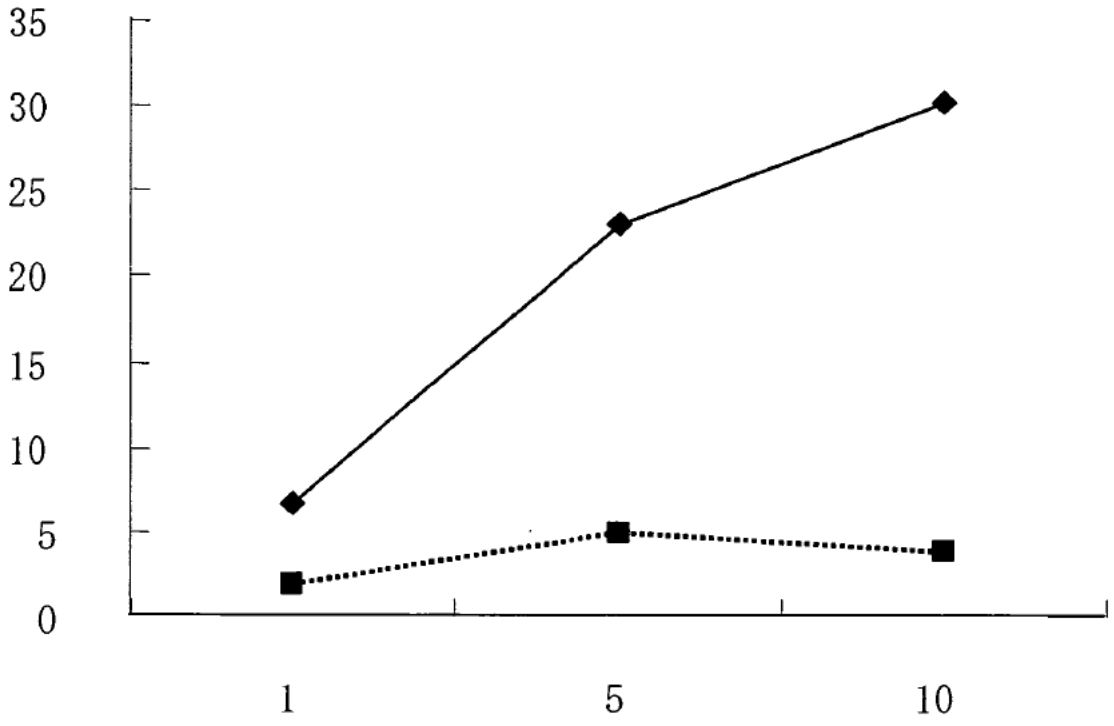

Fig. 7

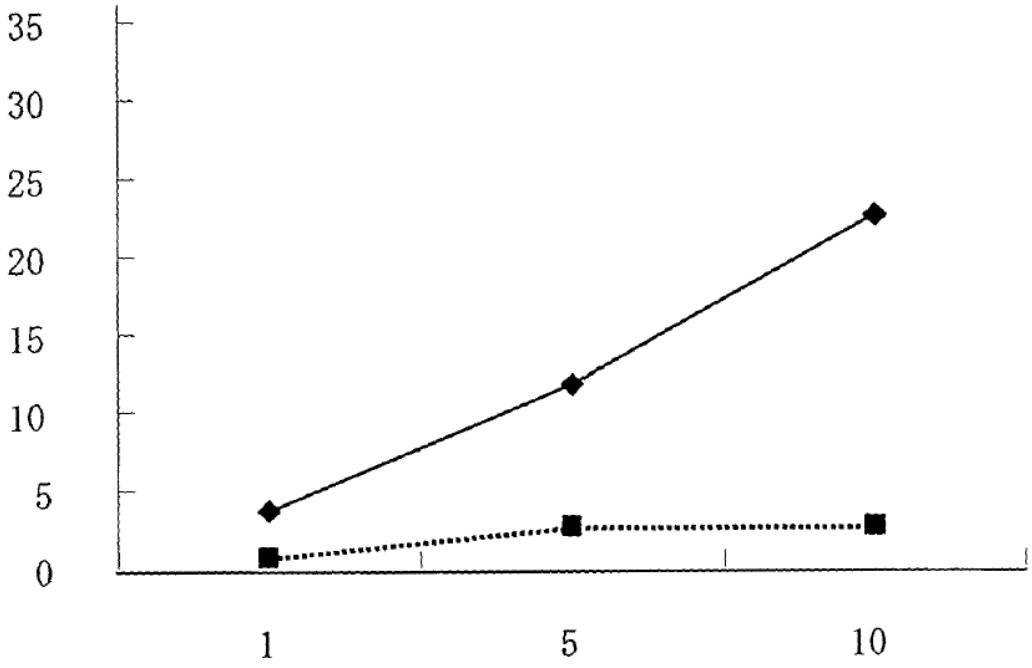
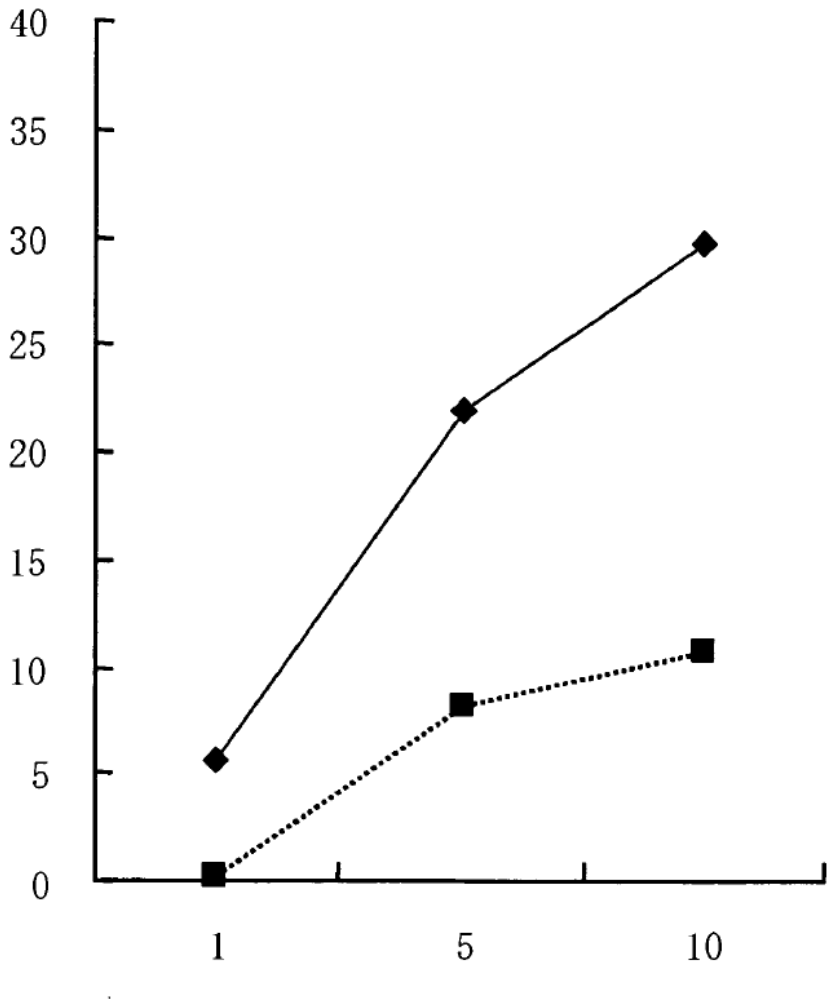
Fig. 8