

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 980**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (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 11161436 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** **EP 2385117**

54 Título: **Péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 y composición farmacéutica que lo contiene**

30 Prioridad:

22.02.2006 JP 2006045287

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.10.2016

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

ES 2 587 980 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 con restricción HLA-A*3303 y composición farmacéutica que lo contiene

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303 que contiene un péptido con restricción HLA-A*3303 específico que tiene una secuencia de aminoácidos consistente en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1.

10

Antecedentes

El gen WT1 (gen del tumor 1 de Wilms) fue identificado como un gen responsable del tumor de Wilms, que es un cáncer renal en niños (Documentos no de patente 1 y 2). WT1 es un factor de transcripción que tiene una estructura de dedo de zinc. Inicialmente, se consideró que el gen WT1 era un gen supresor tumoral. Sin embargo, estudios posteriores (Documentos no de patente 3, 4, 5 y 6) mostraron que el gen WT1 más bien funciona como un oncogén en tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos.

15

El gen WT1 se expresa a altos niveles en muchos tipos de tumores malignos. Se ha examinado si el producto del gen WT1 libre de mutaciones, que es una proteína autóloga, tiene o no inmunogenicidad en un organismo vivo. Los resultados revelaron que la proteína derivada del gen WT1, que se expresa a altos niveles en las células tumorales, se fragmenta por procesamiento intracelular, que los péptidos resultantes forman complejos con moléculas de la clase I del MHC y que los complejos se presentan sobre las superficies de las células, y que los CTL que reconocen dichos complejos pueden ser inducidos por vacunación con péptidos (Documentos no de patente 7, 8 y 9). También se vio que, en un ratón inmunizado con un péptido WT1 o un ADNc WT1, las células tumorales trasplantadas que expresan un gen WT1 son rechazadas con una gran probabilidad (Documentos no de patente 7 y 10), mientras que los tejidos normales que expresan fisiológicamente el gen WT1 no resultan dañados por los CTL inducidos (Documento no de patente 7). Se vio en experimentos *in vitro* usando células humanas que, cuando se usa el péptido Db126 o el péptido WH187 (aminoácidos 187-195 de la SEC. ID. N° 1, SLGEQQYSV), que tiene una gran capacidad para unirse a una molécula HLA-A*0201, que es una de las moléculas de la clase I del MHC humano, para estimular las células mononucleares de sangre periférica humana que tienen HLA-A*0201, se inducen CTL específicos de WT1, que los CTL inducidos tienen una actividad citotóxica específica para células tumorales que expresan endógenamente un gen WT1 a altos niveles y que la actividad citotóxica de dichos CTL está restringida en HLA-A2 (Documento no de patente 11). Se vio en experimentos *in vitro* en células humanas usando péptido WT1 que se aparee con HLA-A*2402 (que se encuentra más frecuentemente en personas japonesas entre los alelos HLA-A) (WT1₂₃₅; aminoácidos 235-243 de la SEC. ID. N° 1, CMTWVNMNL) que se inducen CTL específicos de WT1 (TAK-1) (Documento no de patente 12), y que los CTL inducidos no suprimen la actividad formadora de colonias de las células madre hematopoyéticas normales que parcialmente expresan fisiológicamente un gen WT1 (Documentos no de patente 13 y 14). Estos informes sugieren firmemente que no sólo en ratones, sino también en seres humanos, se pueden inducir CTL específicos de WT1, que dichos CTL tienen una actividad citotóxica frente a células tumorales que expresan un gen WT1 a altos niveles, pero que no tienen una actividad citotóxica frente a células normales que expresan fisiológicamente un gen WT1 (Documentos no de patente 7, 10, 11, 12, 13 y 14).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

El producto del gen WT1 está presente como una proteína nuclear, y es procesado por proteasomas en el citoplasma para fragmentarse en péptidos. Los péptidos fragmentados son transportados a la luz del retículo endoplásmico por moléculas TAP (transportador asociado al procesamiento antigénico), forman complejos con moléculas de la clase I del MHC y se presentan sobre la superficie de las células. Se inducen CTL específicos de WT1 como resultado del reconocimiento de los complejos péptido WT1-molécula de la clase I del MHC por las células precursoras de CTL a través de los TCR, ejerciendo así un efecto citotóxico sobre células tumorales que presentan un producto génico WT1 a través de las moléculas de la clase I del MHC (Documentos no de patente 7, 8 y 9). Se requiere entonces al menos que un péptido WT1 usado en inmunoterapia contra el cáncer dirigida a un producto génico WT1 esté en una forma que se una a una molécula de la clase I del MHC en un organismo vivo. Dichos productos génicos WT1 son conocidos por los Documentos de patente 3 y 4. Sin embargo, las moléculas de la clase I del MHC son diversas y las secuencias de aminoácidos de los péptidos WT1 que se unen a las respectivas moléculas de la clase I del MHC son diferentes entre sí. Por lo tanto, se requiere disponer de un péptido que se aparee con cada subtipo de la clase I del MHC. Sin embargo, sólo se conocen los péptidos con restricción de la molécula HLA-A*2402, de la molécula HLA-A*0201 y de la molécula HLA-A*2601 como péptidos WT1 con restricción de molécula HLA hasta la fecha (Documento de patente 1, Documento no de patente 11 y Documento de patente 2, respectivamente). HLA-A*3303 está presente en el siguiente porcentaje más próximo a HLA-A*2402 en los japoneses. Por lo tanto, se necesita encontrar un péptido WT1 con restricción HLA-A*3303.

Documento de patente 1: WO 2003/106682

Documento de patente 2: WO 2005/095598

Documento de patente 3: WO 2000/18795

Documento de patente 4: EP-A-1584627

65

Documento no de patente 1: Daniel A. Haber *et al.*, Cell. 29 de junio de 1990; 61(7): 1257-69.
 Documento no de patente 2: Call KM *et al.*, Cell. 9 de febrero de 1990; 60(3): 509-20.
 Documento no de patente 3: Menke AL *et al.*, Int Rev Cytol. 1998; 181: 151-212. Revisión.
 Documento no de patente 4: Yamagami T *et al.*, Blood. 1 de abril de 1996; 87(7): 2878-84.
 Documento no de patente 5: Inoue K *et al.*, Blood. 15 de abril de 1998; 91(8): 2969-76.
 Documento no de patente 6: Tsuboi A *et al.*, Leuk Res. mayo de 1999; 23(5): 499-505.
 Documento no de patente 7: Oka Y *et al.*, J Immunol. 15 de febrero de 2000; 164(4): 1873-80.
 Documento no de patente 8: Melief CJ *et al.*, Immunol Rev. junio de 1995; 145: 167-77.
 Documento no de patente 9: Ritz J, J Clin Oncol. febrero de 1994; 12(2): 237-8.
 Documento no de patente 10: Tsuboi A *et al.*, J Clin Immunol. mayo de 2000; 20(3): 195-202.
 Documento no de patente 11: Oka Y *et al.*, Immunogenetics. febrero de 2000; 51(2): 99-107.
 Documento no de patente 12: Ohminami H *et al.*, Blood. 1 de enero de 2000; 95(1): 286-93.
 Documento no de patente 13: Gao L *et al.*, Blood. 1 de abril de 2000; 95(7): 2198-203.
 Documento no de patente 14: Ohminami H *et al.*, Blood. 1 de enero de 2000; 95(1): 286-93.

Divulgación de la invención

Problemas que la invención ha de resolver

Los problemas que la presente invención ha de resolver consisten en proporcionar un péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 particular para el tratamiento/la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303.

Medios para resolver los problemas

Como resultado de estudios intensivos teniendo en cuenta la situación antes descrita, el presente inventor ha visto que péptidos particulares que tienen una secuencia de aminoácidos consistente en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1 pueden inducir un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo a HLA-A*3303 con un alto índice. De este modo, se ha completado la presente invención.

La presente invención proporciona:

(1) una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303, que incluye un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. Nº 2),
 Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. Nº 3) y
 Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. Nº 5);

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. Nº 2, la SEC. ID. Nº 3 y la SEC. ID. Nº 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene capacidad para unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene capacidad para inducir CTL, y donde el cáncer es cualquiera de un tumor hematopoyético, tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno, y un cáncer sólido, tal como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer ovárico;

(2) uso de un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (1) o (2) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303:

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. Nº 2),
 Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. Nº 3) y
 Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. Nº 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. Nº 2, la SEC. ID. Nº 3 y la SEC. ID. Nº 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene capacidad para unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene capacidad para inducir CTL, y donde el cáncer es cualquiera de un tumor hematopoyético, tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno, y un

cáncer sólido, tal como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer ovárico;

5 (3) una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303, que incluye un polinucleótido codificante de un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (1) o (2), o un vector que incluye dicho polinucleótido:

10 (1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

15 (2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene capacidad para unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene capacidad para inducir CTL, y donde el cáncer es cualquiera de un tumor hematopoyético, tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno, y un
20 cáncer sólido, tal como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer ovárico;

25 (4) uso de un polinucleótido codificante de un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (1) o (2), o de un vector que incluye dicho polinucleótido, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A* 3303:

30 (1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

35 (2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene capacidad para unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene capacidad para inducir CTL, y donde el cáncer es cualquiera de un tumor
40 hematopoyético, tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno, y un cáncer sólido, tal como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer ovárico;

45 (5) un CTL específico de WT1 derivado de un sujeto positivo a HLA-A*3303, que es inducible por un péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303 y que comprende una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

50 (1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

55 (2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene la capacidad de inducir CTL, y donde el CTL específico de WT1 reconoce un
60 complejo del péptido WT1 y una molécula HLA-A*3303;

(6) un método para la inducción de un CTL específico de WT1, consistente en cultivar una célula mononuclear de sangre periférica obtenida de un sujeto positivo a HLA-A*3303 en presencia de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos (1) o (2) para inducir el CTL específico de WT1 a partir de la célula mononuclear de
65 sangre periférica:

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. Nº 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. Nº 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. Nº 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. Nº 2, la SEC. ID. Nº 3 y la SEC. ID. Nº 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303, y tiene la capacidad de inducir CTL;

(7) una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 y que deriva de un sujeto positivo a HLA-A*3303, que es inducible por un péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303 y que comprende una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. Nº 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. Nº 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. Nº 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. Nº 2, la SEC. ID. Nº 3 y la SEC. ID. Nº 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303, y tiene la capacidad de inducir CTL, y donde la célula presentadora de antígeno presenta el péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303;

(8) un método para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, consistente en cultivar una célula presentadora de antígeno inmadura obtenida de un sujeto positivo a HLA-A*3303 en presencia de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos (1) o (2) para inducir la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a partir de la célula presentadora de antígeno inmadura:

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. Nº 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. Nº 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. Nº 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. Nº 2, la SEC. ID. Nº 3 y la SEC. ID. Nº 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303, y tiene la capacidad de inducir CTL;

(9) un método para el diagnóstico de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303, consistente en usar el CTL según la reivindicación 5 o la célula presentadora de antígeno según el aspecto (7) anterior, siempre que el método no sea practicado sobre el organismo humano o animal;

(10) un método para la determinación de la presencia o la cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo a HLA-A*3303, que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303 y que reconoce un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*3303, consistiendo dicho método en:

(a) la reacción de un complejo de un péptido WT1 que comprende una secuencia de aminoácidos (1) o (2) y una molécula HLA-A*3303 con una muestra del sujeto:

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. Nº 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. Nº 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. Nº 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. Nº 2, la SEC. ID. Nº 3 y la SEC. ID. Nº 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la

posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303, y tiene la capacidad de inducir CTL;

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

(11) el método según el punto (10) anterior, donde el complejo es una forma de tetrámero.

Efectos de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303 que incluye péptidos WT1 con restricción HLA-A*3303 específicos y un polipéptido codificante de los mismos. Por lo tanto, es posible inducir *in vivo* e *in vitro* CTL específicos de WT1 en sujetos que tienen HLA-A*3303. Dado que aproximadamente un 24% de las personas japonesas tienen al menos una molécula HLA-A*3303, se pueden inducir CTL específicos de WT1 en una gama muy amplia de sujetos.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

La Fig. 5 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₃₆₄ frente a la célula que expresa un gen WT1 endógenamente.

La Fig. 6 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₃₆₇ frente a la célula que expresa un gen WT1 endógenamente.

La Fig. 7 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₄₀₉ frente a la célula que expresa un gen WT1 endógenamente.

La Fig. 8 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₃₆₇ frente a la célula que expresa un gen WT1.

Mejor modo de realización de la invención

Se muestra una secuencia de aminoácidos de una proteína WT1 humana en la SEC. ID. N° 1. Un gen WT1 se expresa en su forma nativa a altos niveles, por ejemplo, en tumores hematopoyéticos, tales como la leucemia, el síndrome mielodisplásico, el mieloma múltiple o el linfoma maligno, y en cánceres sólidos, tales como el cáncer gástrico, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de células germinales, el cáncer hepático, el cáncer de piel, el cáncer de vejiga, el cáncer de próstata, el cáncer uterino, el cáncer cervical o el cáncer de ovario. Además, una unidad de anclaje para HLA-A*3303 se caracteriza por que el aminoácido en la posición 2 es Ser, y por que el aminoácido en la posición 9 es Arg.

La secuencia de aminoácidos del péptido incluido en la composición farmacéutica de la presente invención (al que a partir de ahora se hará referencia abreviadamente como péptido WT1) es Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2), Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) o Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5). Además, puede tener una sustitución de un aminoácido con otro aminoácido en los 9 aminoácidos de cualquiera de las SEC. ID. N° 2, N° 3 y N° 5. Cualquiera de los 9 aminoácidos o de otros aminoácidos sustituidos puede estar apropiadamente modificado. En cualquier caso, el péptido anterior conserva su capacidad para unirse a una molécula HLA-A*3303.

Como se ha descrito anteriormente, es un objeto de la presente invención obtener un péptido WT1 con restricción HLA-A*3303. Así, el péptido anterior es un péptido consistente sólo en la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEC. ID. N° 2, N° 3 y N° 5. Se pueden unir diversas sustancias en el extremo N y/o el extremo C del péptido. Por ejemplo, se pueden unir un aminoácido, un péptido o un análogo del mismo. Si se unen estas sustancias al péptido, éstas pueden ser procesadas, por ejemplo, mediante una enzima en un organismo vivo o a través de un procedimiento, tal como un procesamiento intracelular, y finalmente se puede producir la secuencia de aminoácidos consistente en 9 aminoácidos contiguos y presentarla como un complejo con una molécula HLA-A*3303 sobre la superficie de una célula, para dar así como resultado el efecto de inducción de un CTL. Estas sustancias pueden ser las que modulan la solubilidad de los péptidos, o las que aumentan su estabilidad (resistencia a proteasas). De manera alternativa, estas sustancias pueden ser las que suministran los péptidos específicamente, por ejemplo, a un tejido u órgano dado, o pueden tener la acción de aumentar la eficacia de captación por una célula presentadora de antígeno o similar. Estas sustancias pueden ser las que aumentan la capacidad para inducir un CTL, tales como péptidos de ayuda.

El péptido puede ser sintetizado por métodos generalmente empleados en la técnica o modificaciones de los mismos. Dichos métodos están descritos, por ejemplo, en Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide-Gosei, Maruzen Co., Ltd., 1975; Peptide-Gosei No Kiso To Jikken, Maruzen Co., Ltd., 1985; e Iyakuhiin No Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide-Gosei, Hirokawa - Book store, 1991.

El péptido puede ser también preparado usando técnicas de ingeniería genética basadas en la información acerca de la secuencia nucleotídica que codifica el péptido de la presente invención. Dichas técnicas de ingeniería genética son bien conocidas para un experto en la materia.

El aspecto (1) de la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer que incluye el péptido WT1 con restricción HLA-A*3303. El gen WT1 se expresa a altos niveles en tumores hematopoyéticos, tales como la leucemia, el síndrome mielodisplásico, el mieloma múltiple o el linfoma maligno, y en cánceres sólidos, tales como el cáncer gástrico, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de células germinales, el cáncer hepático, el cáncer de piel, el cáncer de vejiga, el cáncer de próstata, el cáncer uterino, el cáncer cervical o el cáncer de ovario. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser usada para el tratamiento o la prevención de un cáncer. Cuando se administra la composición farmacéutica de la presente invención a un sujeto positivo a HLA-A*3303, se inducen CTL específicos de WT1 por el péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 incluido en la composición farmacéutica, y las células cancerosas del sujeto resultan dañadas por dichos CTL.

La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir, además del péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 como principio activo, por ejemplo, un soporte o un excipiente. El péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 incluido en la composición farmacéutica de la presente invención induce un CTL específico de WT1. De este modo, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir un adyuvante apropiado, o puede ser administrada junto con un adyuvante apropiado para aumentar la eficacia de la inducción. Como ejemplos de adyuvantes preferibles, se incluyen el adyuvante completo o incompleto de Freund y el hidróxido de aluminio.

El método de administración de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser apropiadamente seleccionado dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Como ejemplos de dichos métodos, se incluyen la administración intradérmica, la administración subcutánea, la administración intramuscular, la administración intravenosa, la administración nasal y la administración oral. La cantidad del péptido incluido en la composición farmacéutica de la presente invención, así como la forma de dosificación y el número de veces de administración de la composición farmacéutica de la presente invención, pueden ser apropiadamente seleccionados dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Una dosis única del péptido es habitualmente de 0,0001 mg - 1.000 mg, preferiblemente de 0,001 mg - 10.000 mg.

El aspecto (2) de la presente invención se relaciona con el uso del péptido como se ha definido anteriormente para preparar un método para el tratamiento o la prevención del cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303. El cáncer que ha de ser tratado o prevenido puede ser cualquiera, y como ejemplos del mismo se incluyen tumores hematopoyéticos, tales como la leucemia, el síndrome mielodisplásico, el mieloma múltiple o el linfoma maligno, y cánceres sólidos, tales como el cáncer gástrico, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de células germinales, el cáncer hepático, el cáncer de piel, el cáncer de vejiga, el cáncer de próstata, el cáncer uterino, el cáncer cervical o el cáncer de ovario.

El aspecto (10) de la presente invención se relaciona con un método para la determinación de la presencia o de la cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo a HLA-A*3303, consistente en:

(a) la reacción de un complejo de un péptido WT1 como se ha definido anteriormente y una molécula HLA-A*3303 con una muestra del sujeto, y

(b) la determinación de la presencia o de la cantidad de un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra. La muestra de un sujeto puede ser cualquiera, siempre que exista la posibilidad de que contenga un linfocito. Como ejemplos de las muestras, se incluyen fluidos corporales, tales como sangre o linfa, y un tejido.

Se puede preparar el complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*3303, por ejemplo, como un tetrámero o un pentámero usando un método conocido para un experto en la técnica, tal como el método de biotina-estreptavidina. Se puede medir la presencia o la cantidad del CTL que reconoce dicho complejo por un método conocido para un experto en la técnica. En este aspecto de la presente invención, se puede marcar el complejo. Se puede usar un marcaje conocido, tal como un marcaje fluorescente o un marcaje radiactivo, como marcaje. El marcaje hace que la determinación de la presencia o de la cantidad de un CTL sea fácil y rápida. El método de este aspecto de la presente invención puede ser usado para diagnosticar un cáncer o para el pronóstico del mismo.

El aspecto (6) de la presente invención se relaciona con un método para la producción de un CTL específico de WT1 usando un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*3303, consistente en:

(a) la reacción del complejo con una muestra, y

(b) la obtención de un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra. El complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A* 3303 ha sido descrito anteriormente. La muestra puede ser cualquiera, siempre que exista la posibilidad de que contenga un linfocito. Como ejemplos de las muestras, se incluyen una muestra de un sujeto, tal como sangre, y un cultivo celular. Se puede obtener el CTL que reconoce el complejo usando un método conocido para un experto en la técnica, tal como FACS o MACS. La presente invención permite cultivar el CTL específico de WT1 obtenido y usarlo para el tratamiento o la prevención de diversos cánceres.

Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con un CTL específico de WT1 que puede ser obtenido mediante el método anterior para la producción de un CTL específico de WT1 usando un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*3303.

Se desvelan polinucleótidos codificantes del péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 (a los que de aquí en adelante se hará referencia como un polinucleótido WT1). El polinucleótido puede ser de ADN o ARN. Se puede determinar la secuencia de bases del polinucleótido en base a la secuencia de aminoácidos del péptido WT1 con restricción HLA-A*3303. Se puede preparar el polinucleótido, por ejemplo, mediante un método para la síntesis de ADN o de ARN o un método de PCR.

También se desvela un vector de expresión que contiene el polinucleótido (al que de aquí en adelante se hará referencia como un vector de expresión WT1). El tipo del vector de expresión y la secuencia incluida distinta de la secuencia del polinucleótido pueden ser apropiadamente seleccionados dependiendo del tipo de hospedador en el que se introduce el vector de expresión de la presente invención o del objetivo de uso. Es posible tratar o prevenir tumores hematopoyéticos o cánceres sólidos administrando el vector de expresión a un sujeto positivo a HLA-A*3303 para producir un péptido WT1 en un organismo vivo e inducir un CTL específico de WT1 y dañar las células de los tumores hematopoyéticos o las células de los cánceres sólidos en el sujeto.

El aspecto (3) de la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer, que contiene el polinucleótido WT1 antes definido o el vector de expresión WT1 antes definido. La composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer en este aspecto es como se ha descrito anteriormente.

El aspecto (4) de la presente invención se relaciona con el uso del polinucleótido WT1 o del vector de expresión WT1 para preparar un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303. Como ejemplos de cánceres que han de ser tratados o prevenidos, se incluyen tumores hematopoyéticos, tales como la leucemia, el síndrome mielodisplásico, el mieloma múltiple o el linfoma maligno, y cánceres sólidos, tales como el cáncer gástrico, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de células germinales, el cáncer hepático, el cáncer de piel, el cáncer de vejiga, el cáncer de próstata, el cáncer uterino, el cáncer cervical o el cáncer de ovario.

Se desvela además una célula que contiene el vector de expresión. La célula puede ser preparada, por ejemplo, transformando una célula huésped, tal como *E. coli*, una levadura, una célula de insecto o una célula animal, con el vector de expresión. El método para la introducción del vector de expresión en una célula huésped puede ser apropiadamente seleccionado entre diversos métodos. Cultivando la célula transformada y recuperando y purificando el péptido WT1 producido, se puede preparar el péptido WT1.

El aspecto (5) de la presente invención se relaciona con un CTL específico de WT1, que es inducido por el péptido WT1 con restricción HLA-A*3303. El CTL de la presente invención reconoce un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*3303. Por lo tanto, el CTL de la presente invención puede ser usado para dañar específicamente una célula tumoral positiva para HLA.A* 3303 y que expresa WT1 a un alto nivel.

También se desvela un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer, consistente en administrar un CTL específico de WT1 a un sujeto positivo a HLA-A*3303. El método de administración del CTL específico de WT1 puede ser apropiadamente seleccionado dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Como ejemplos de dichos métodos, se incluyen la administración intravenosa, la administración intradérmica, la administración subcutánea, la administración intramuscular, la administración nasal y la administración oral.

El aspecto (6) de la presente invención se relaciona con un método para la inducción de un CTL específico de WT1, consistente en cultivar una célula mononuclear de sangre periférica en presencia del péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 para inducir el CTL específico de WT1 a partir de la célula mononuclear de sangre periférica. El sujeto del que deriva la célula mononuclear de sangre periférica puede ser cualquiera, siempre que sea positivo para HLA-A*3303. Cultivando las células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido WT1 con restricción 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 a HLA-A*3303 administrando el CTL específico de WT1 obtenido según la presente invención al

sujeto.

5 El aspecto (7) de la presente invención se relaciona con una célula presentadora de antígeno (tal como una célula dendrítica) que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303, que es inducida por el péptido WT1 con restricción HLA-A*3303. Utilizando la célula presentadora de antígeno de la presente invención, se inducen eficazmente CTL específicos de WT1.

10 También se desvela un método para el tratamiento o la prevención de un cáncer, consistente en administrar la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303 a un sujeto positivo a HLA-A*3303. El método de administración de la célula presentadora de antígeno puede ser apropiadamente seleccionado dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio diana. Como ejemplos de dichos métodos, se incluyen la administración intravenosa, la administración intradérmica, la administración subcutánea, la administración intramuscular, la administración nasal y la administración oral.

15 El aspecto (8) de la presente invención se relaciona con un método para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303, consistente en cultivar una célula presentadora de antígeno inmadura en presencia del péptido WT1 con restricción 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
20 una célula dendrítica, inmadura que puede madurar hacia una célula presentadora de antígeno. El sujeto del que deriva la célula presentadora de antígeno inmadura puede ser cualquiera, siempre que sea positivo para HLA-A*3303. Como las células presentadoras de antígeno inmaduras están contenidas, por ejemplo, en las células mononucleares de sangre periférica, dichas células pueden ser cultivadas en presencia del péptido WT1.

25 También se desvela un anticuerpo contra un péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 o un anticuerpo contra un polinucleótido codificante del péptido. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

30 El aspecto (9) de la presente invención se relaciona con un método para el diagnóstico de un cáncer, consistente en usar el CTL específico de WT1, la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303 o el anticuerpo contra un péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 o el anticuerpo contra un polinucleótido codificante del péptido. Preferiblemente, se usa el CTL específico de WT1 en el método 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 a HLA-A*3303, o administrándolos a un sujeto positivo a HLA-A*3303, y determinando, por ejemplo, su posición, sitio o cantidad. Se puede marcar el
35 CTL, la célula presentadora de antígeno o el anticuerpo. Mediante la unión de un marcaje, se puede llevar eficazmente a la práctica el método para el diagnóstico de la presente invención.

40 Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención con más detalle. Los ejemplos que ya no quedan dentro del alcance de las reivindicaciones tienen un fin ilustrativo.

Ejemplos

Ejemplo 1

45 Selección del péptido WT1

50 Se usó el Programa NetMHC2.0 (Technical University of Denmark) para seleccionar WT1₃₃₇, WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ y WT1₄₀₉, que son péptidos hidrofílicos consistentes en 9 aminoácidos con la unidad de anclaje adecuada para HLA-A*3303 (el segundo aminoácido desde el extremo N es cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y el aminoácido en el extremo C es Arg) y se espera que tengan una gran afinidad de unión hacia una molécula HLA-A*3303 de un péptido WT1 de una proteína WT1 (SEC. ID. N° 1). En la Tabla 1, se muestran las secuencias de aminoácidos y las afinidades de unión hacia una molécula HLA-A*3303 de estos péptidos.

[Tabla 1]

Péptido	Número de aminoácido en la SEC. ID. N° 1	Secuencia de aminoácidos	Afinidad de unión hacia 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	15,310

Preparación de célula B-LCL

Se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por el método de centrifugación con gradiente

de densidad Ficoll-Hypaque de sangre periférica que había sido recogida de un donante sano positivo a HLA-A*3303 (HLA-A*3303/0207). Se sembraron entonces las PBMC en una placa de cultivo celular de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 1×10^7 en medio RPMI 1640 que contenía un 10% de FCS, y se añadió un sobrenadante de cultivo de células B95-8 (células productoras de virus EB). Se cultivaron a 37°C con un 5% de CO₂ durante aproximadamente 1 mes. Se obtuvieron células B-LCL transformadas con virus EB, que son células de tumores de células B. Se confirmó que las células B-LCL resultantes no expresaban el gen WT1. Se pulsaron las células B-LCL incubándolas con 20 µg/ml de WT1₃₃₇, WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ durante 2 horas, y se las irradió con 80 Gy de radiación. Se usaron las células B-LCL resultantes (a las que de aquí en adelante se hará referencia como células B-LCL pulsadas con un péptido WT1) como células presentadoras de antígeno para los experimentos siguientes.

Inducción de CTL específico de WT1

Se cultivaron 3×10^6 PBMC (HLA-A*3303/1101) en una placa de cultivo celular de 24 pocillos en medio completo (45% de RPMI, 45% de medio AMI-V y 10% de suero AB humano) que contenía 20 µg/ml de WT1₃₃₇, WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ a 37°C con un 5% de CO₂ durante 1 semana para obtener células respondedoras. Se cocultivaron 2×10^6 células respondedoras resultantes con 1×10^6 células B-LCL pulsadas con el mismo péptido WT1 en medio completo durante 1 semana (primera estimulación). Se cocultivaron las PBMC con las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1 tres veces más (segunda a cuarta estimulaciones) en condiciones en las cuales se añadieron 20 UI/ml (concentración final) de IL-2 como sigue: segunda estimulación: dos veces en días alternos a partir de los 3 días desde el inicio de la estimulación; tercera y cuarta estimulaciones: tres veces a intervalos de un día desde el día siguiente al inicio de la estimulación. Se concentraron las células resultantes usando el Negative Selection Columns Gravity Feed Kit (StemSp), de tal forma que la proporción de células T positivas a CD8 resultara de aproximadamente el 80%, y se cocultivaron con las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1 (quinta estimulación). Se usaron las células T positivas a CD8 (CTL) obtenidas 5 días después de la estimulación final para la medición de la actividad citotóxica.

Actividad citotóxica de los CTL

Se midió la actividad citotóxica de los CTL usando el ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Se mezclaron células CTL (a las que de aquí en adelante se hará referencia como células efectoras) en una proporción (razón E/T) de 1:1, 5:1 ó 10:1 en 200 µl de medio con células diana a las que se había incorporado ⁵¹Cr, y se cultivaron en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 37°C con un 5% de CO₂ durante 4 horas. Se usaron células B-LCL pulsadas con el mismo péptido WT1 que el usado para la inducción de CTL (BLCL-P) y células B-LCL sin pulsar con un péptido WT1 (BLCL-NP) como células diana. Tras el cultivo, se recogieron los sobrenadantes por centrifugación. Se midieron las cantidades de ⁵¹Cr liberadas a los sobrenadantes usando un contador de centelleo líquido. Se determinó la actividad citotóxica (%) usando la siguiente fórmula:

$$(\text{liberación de } ^{51}\text{Cr en el sobrenadante de la muestra} - \text{liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr}) /$$

$$(\text{liberación máxima de } ^{51}\text{Cr} - \text{liberación espontánea de } ^{51}\text{Cr}) \times 100$$

donde la liberación espontánea de ⁵¹Cr es la liberación de ⁵¹Cr observada cuando se cultivaron las células diana a las que se había incorporado ⁵¹Cr solas en las mismas condiciones, y la liberación máxima de ⁵¹Cr es la liberación de ⁵¹Cr observada cuando se lisaron por completo las células diana a las que se había incorporado ⁵¹Cr usando Triton X-100 al 1%. Los resultados son mostrados en las Figs. 1-4. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específica (%), y los ejes horizontales representan las razones E/T. Las BLCL-P están representadas usando líneas continuas, y las BLCL-NP están representadas usando líneas discontinuas. Se confirmó que los CTL inducidos con WT1₃₃₇, WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ dañan específicamente las BLCL-P que presentan el péptido WT1 como un complejo con una molécula HLA-A*3303 en comparación con las BLCL-NP. Se usaron los CTL inducidos con WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ para otros experimentos que se indican a continuación.

Actividad citotóxica de los CTL frente a células que expresan el gen WT1 endógenamente

Se determinó la actividad citotóxica de los CTL inducidos con WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ frente a células TF-1, que son células tumorales que expresan un gen WT1 (positivas a HLA-A*3303) usando el método antes descrito. Como control, se usaron células K562 que expresan un gen WT1 y son negativas para HLA-A*3303. Los resultados son mostrados en las Figs. 5-7. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específica (%), y los ejes horizontales representan las razones E/T. Se representa TF-1 usando líneas continuas, y se representa K562 usando líneas discontinuas. Se confirmó que los CTL inducidos con WT1₃₆₄, WT1₃₆₇ o WT1₄₀₉ también tienen una actividad citotóxica frente a la célula que expresa un gen WT1 exógenamente.

Se determinó la actividad citotóxica de los CTL inducidos con WT1₃₆₇ frente a células B-LCL que expresan WT1 usando el método antes descrito. La B-LCL que expresa WT1 (B-LCL-WT1) se refiere a una célula B-LCL en la que se introduce un gen WT1 humano y que expresa una proteína WT1 en la célula, y presenta un péptido consistente en aproximadamente 9 aminoácidos resultante del procesamiento sobre una molécula HLA-A*3303. Como control,

5 se usó una célula B-LCL (B-LCL-CV) en la que se introduce un gen control, a excepción de un gen WT1. Los resultados son mostrados en la Fig. 8. En las figuras, los ejes longitudinales representan la lisis específica (%), y los ejes horizontales representan las razones E/T. Se representa B-LCL-WT1 usando líneas continuas, y se representa B-LCL-CV usando líneas discontinuas. Se confirmó que los CTL inducidos con WT1₃₆₇ dañan sólo la célula que es positiva para HLA-A* 3303 y que expresa WT1.

Aplicabilidad industrial

10 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que incluye un péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 para uso en la prevención o el tratamiento de diversos tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos que expresan el gen WT1 a altos niveles.

Lista de secuencias

- 15 <110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.
<120> Péptido WT1 con restricción HLA-A*3303 y composición farmacéutica que lo contiene
- 20 <130> 667343
<150> EP 07714676.9
<151> 2007-02-21
- 25 <150> JP 2006-045287
<151> 2006-02-22
- <160> 5
- 30 <170> Patent In versión 3.2
<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 35 <400> 1

ES 2 587 980 T3

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

ES 2 587 980 T3

	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								
	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

ES 2 587 980 T3

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5
<400> 3

Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg
1 5

10
<210> 4
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15
<400> 4

Ser Asp Gln Leu Lys Arg His Gln Arg
1 5

20
<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25
<400> 5

Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303, que incluye un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5);

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene capacidad para unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene capacidad para inducir CTL, y donde el cáncer es cualquiera de un tumor hematopoyético, tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno, y un cáncer sólido, tal como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer ovárico.

2. Uso de un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (1) o (2) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303:

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene capacidad para unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene capacidad para inducir CTL, y donde el cáncer es cualquiera de un tumor hematopoyético, tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno, y un cáncer sólido, tal como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer ovárico.

3. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303, que incluye un polinucleótido codificante de un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (1) o (2), o un vector que incluye dicho polinucleótido:

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene capacidad para unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene capacidad para inducir CTL, y donde el cáncer es cualquiera de un tumor hematopoyético, tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno, y un cáncer sólido, tal como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer ovárico.

4. Uso de un polinucleótido codificante de un péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (1) o (2), o de un vector que incluye dicho polinucleótido, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A* 3303:

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y

Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene capacidad para unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene capacidad para inducir CTL, y donde el cáncer es cualquiera de un tumor hematopoyético, tal como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno, y un cáncer sólido, tal como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer ovárico.

5. Un CTL específico de WT1 derivado de un sujeto positivo a HLA-A*3303, que es inducible por un péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303 y que comprende una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303 y tiene la capacidad de inducir CTL, y donde el CTL específico de WT1 reconoce un complejo del péptido WT1 y una molécula HLA-A*3303.

6. Un método para la inducción de un CTL específico de WT1, consistente en cultivar una célula mononuclear de sangre periférica obtenida de un sujeto positivo a HLA-A*3303 en presencia de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos (1) o (2) para inducir el CTL específico de WT1 a partir de la célula mononuclear de sangre periférica:

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303, y tiene la capacidad de inducir CTL;

7. Una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 y que deriva de un sujeto positivo a HLA-A*3303, que es inducible por un péptido que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303 y que comprende una secuencia de aminoácidos (1) o (2):

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

(2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303, y tiene la capacidad de inducir CTL, y donde la célula presentadora de antígeno presenta el péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*3303.

8. Un método para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1, consistente en cultivar una célula presentadora de antígeno inmadura obtenida de un sujeto positivo a HLA-A*3303 en presencia de un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos (1) o (2) para inducir la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a partir de la célula presentadora de antígeno inmadura:

(1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

5 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

10 (2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303, y tiene la capacidad de inducir CTL.

15 9. Un método para el diagnóstico de un cáncer en un sujeto positivo a HLA-A*3303, consistente en usar el CTL según la reivindicación 5 o la célula presentadora de antígeno según la reivindicación 7, siempre que el método no sea practicado sobre el organismo humano o animal.

20 10. Un método para la determinación de la presencia o la cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto positivo a HLA-A*3303, que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303 y que reconoce un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*3303, consistiendo dicho método en:

(a) la reacción de un complejo de un péptido WT1 que comprende una secuencia de aminoácidos (1) o (2) y una molécula HLA-A*3303 con una muestra del sujeto:

25 (1) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg (SEC. ID. N° 2),
Phe Ser Arg Ser Asp Gln Leu Lys Arg (SEC. ID. N° 3) y
Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg (SEC. ID. N° 5),

30 (2) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC. ID. N° 2, la SEC. ID. N° 3 y la SEC. ID. N° 5, en donde un aminoácido está substituido con otro aminoácido, siempre que el aminoácido en la posición 2 sea cualquiera de Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Tyr, Ser y Asp, y que el aminoácido en la posición 9 sea Arg, donde el péptido consistente en una secuencia de aminoácidos (2) tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*3303, y tiene la capacidad de inducir CTL;

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

11. El método según la reivindicación 10, donde el complejo es una forma de tetrámero.

Fig. 1

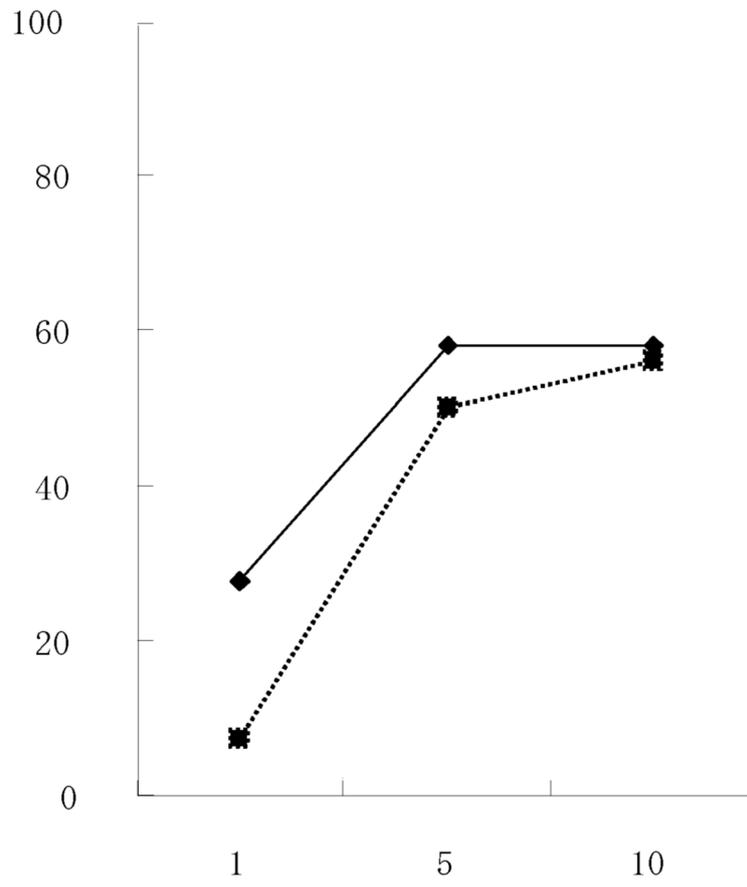


Fig. 2

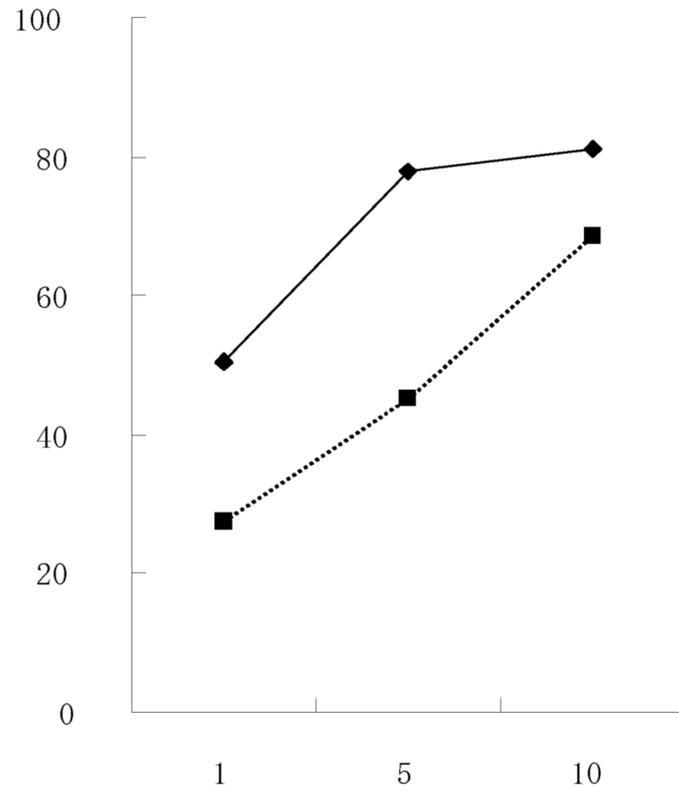


Fig. 3

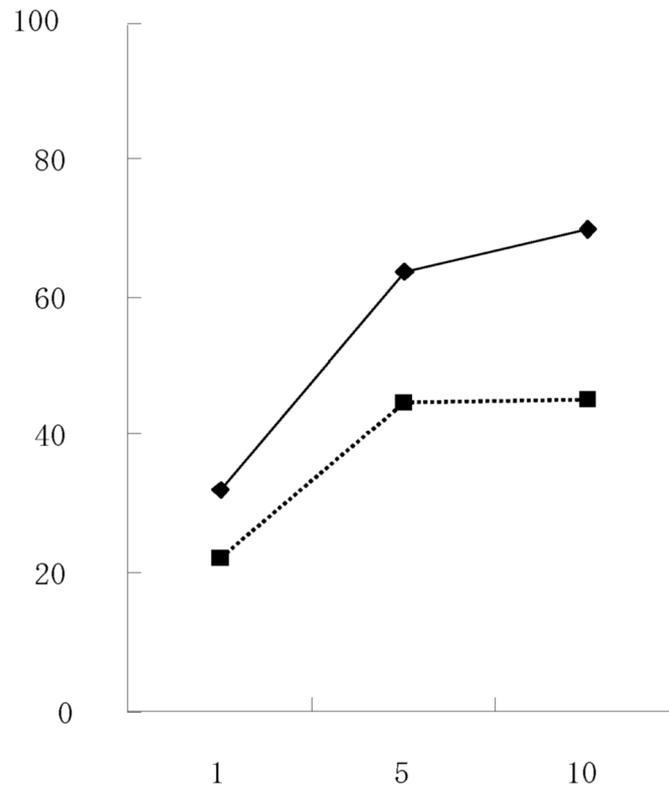


Fig. 4

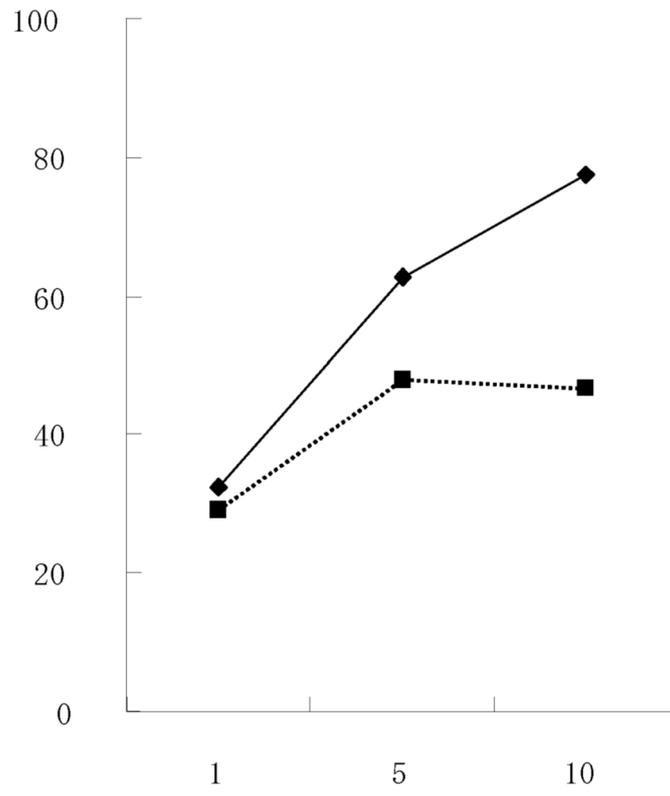


Fig. 5

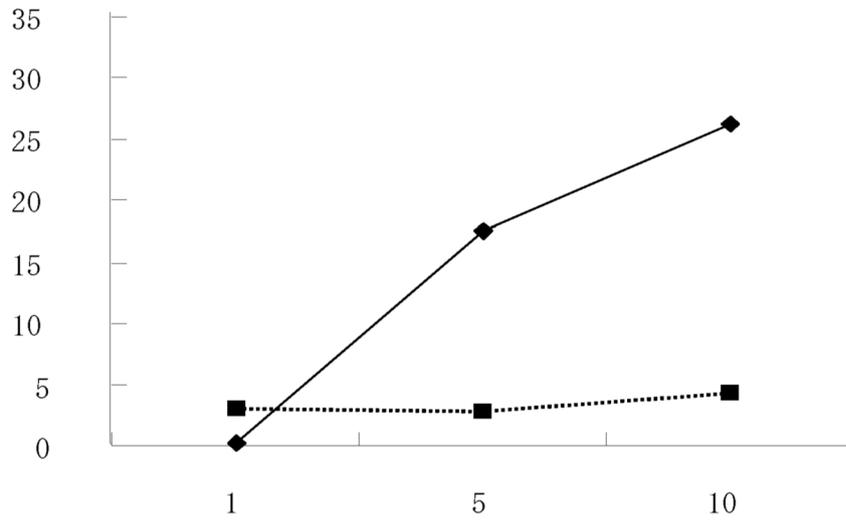


Fig. 6

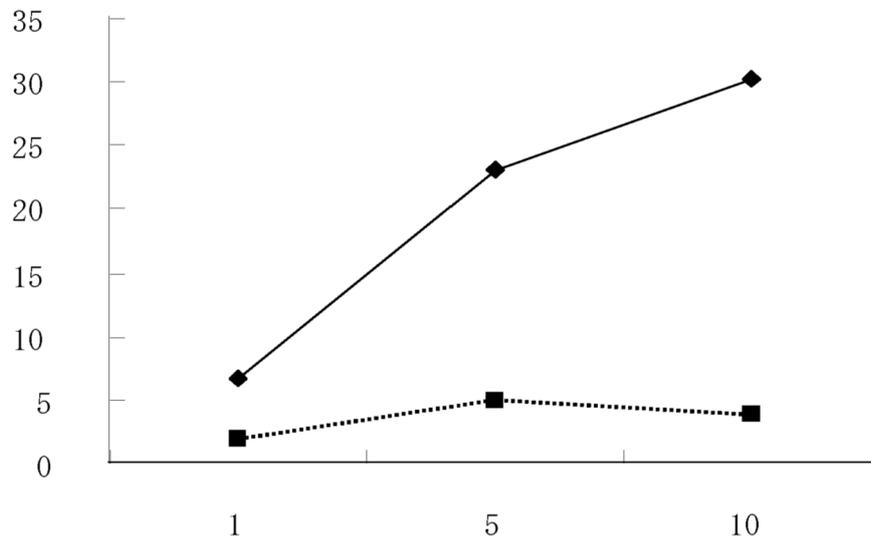


Fig. 7

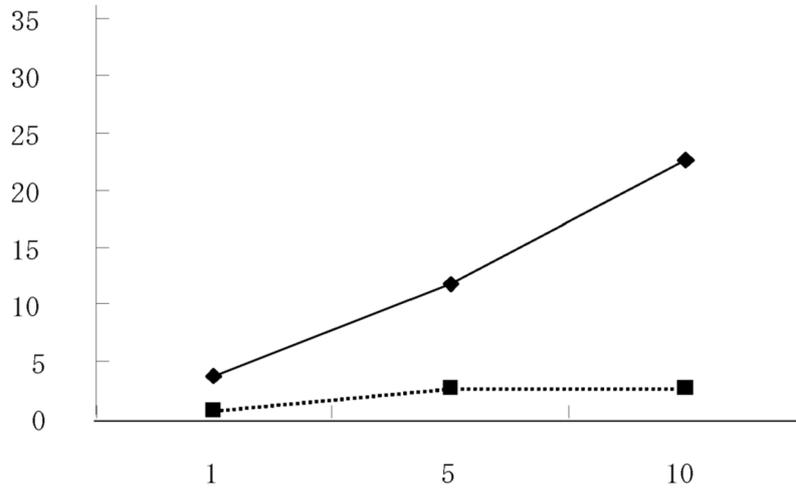


Fig. 8

