



No. 11-160137- -00000-0000

Fecha: 2011-11-23 11:05:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO PEPTIDO AUXILIAR DEL ANTIGENO DEL CANCER

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.

DOMICILIO OSAKA, JAPON

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-160137.-00000-0000

Fecha: 2011-11-23 11:05:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 100**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **INTERNATIONAL INSTITUTE OF
CANCER IMMUNOLOGY, INC.**Sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Japón.Dirección: 13-9, Enoki-cho,
Suita-shi,
Osaka 564-0053,
JapónDomicilio: Osaka,
Japón**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. Haruo SUGIYAMA

2-19-30, Senbanishi,

Minoo-shi,

Osaka 562-0036,

Japón

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/JP2010/057149Fecha: 22 de abril de 2010Publicación Internacional No. WO02010/123065 A1Fecha: 28 de octubre de 2010

6

Título (54)**PÉPTIDO AUXILIAR DEL ANTÍGENO DEL CÁNCER**

7

Clasificación Internacional (51) C12N 015/009

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐JP23 de abril de 20092009-105286

9

Comprobante de pago No.: 11-108564Fecha: 08 de noviembre de 2011Comprobante de pago No.: 11-108619Fecha: 08 de noviembre de 2011Comprobante de pago No.: 11-108624Fecha: 08 de noviembre de 2011Comprobante de pago No.: 11-112863Fecha: 21 de noviembre de 2011

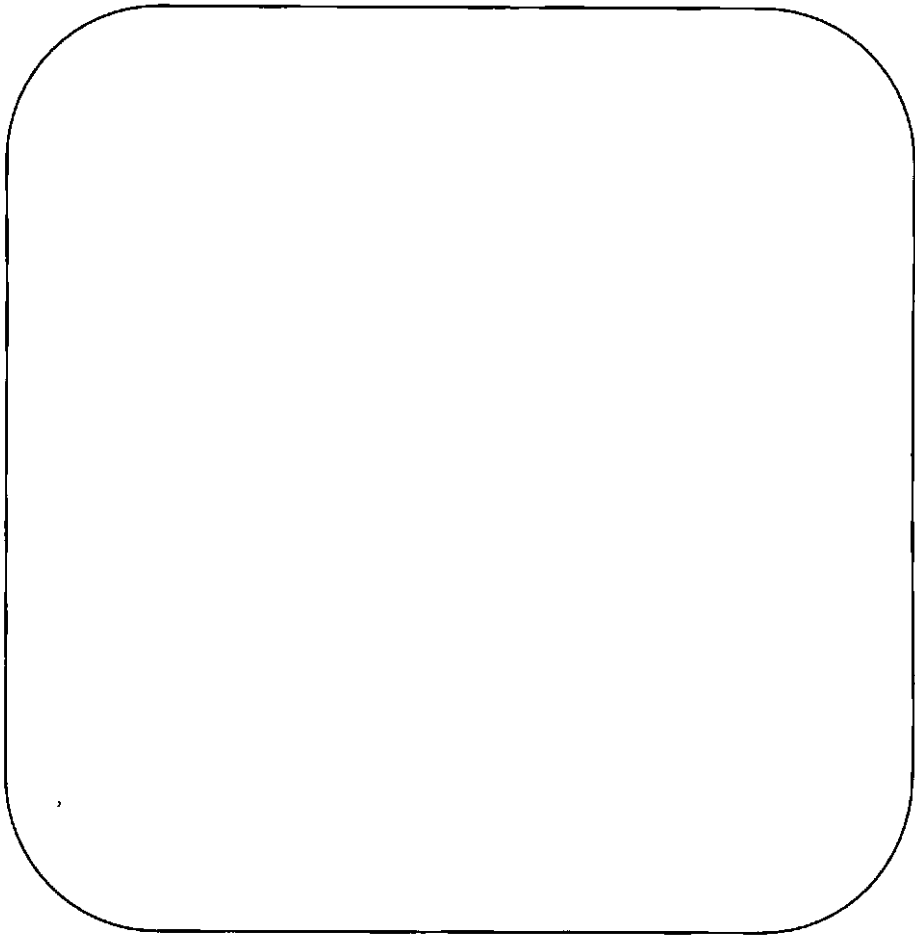
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 7 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$189.000.00.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poder, si fuere el caso de **INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2010/123065 A1.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia Sobrera

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SET

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/123065 A1

Descripción:

Páginas 51 en español

Reivindicaciones: Número (s) 17

Figuras: Número (s) 18

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
International Institute of Cancer Immunology, Inc.
domiciliado (s) en/of 13-9, Enoki-cho, Suita-shi,
Osaka 564-0053 JAPAN

17075
59

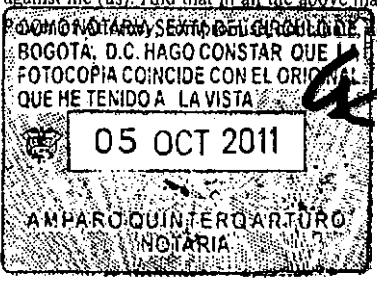
por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

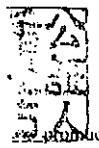
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

© CAVELIER ABOGADOS
WPP0DE01-179 (MINUTA 12.1.1.2.5)

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 and GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this



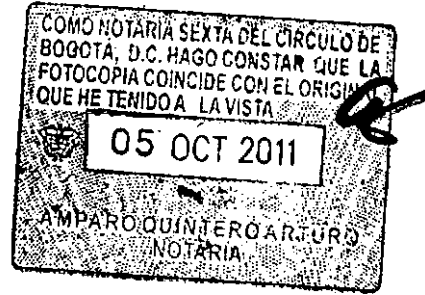
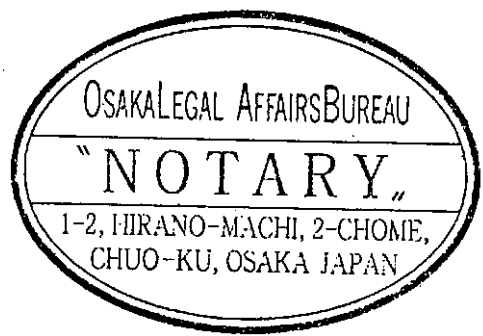


...puedan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan
sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso,
desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes
oficiosos.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by
representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 14th day of May, 2009
en/in Osaka, Japan
por/by Taiji TAKAHASHI, Representative Director and President
International Institute of Cancer Immunology, Inc.

Taiji Takahashi
Firma Signature

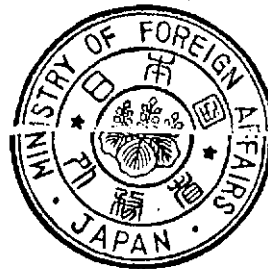


100

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

05 OCT 2011

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: **JAPAN**

This public document

2. has been signed by

Koichiro SHIGEYOSHI

3. acting in the capacity of

Notary Public of the Osaka
Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of

Koichiro SHIGEYOSHI, Notary Public

Certified

5. at **Osaka**

6. **MAY. 21. 2009**

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. No. **2793**

9. Seal/stamp:

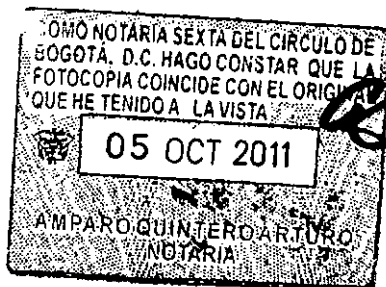


✓ 10. Signature:



Noriko KAWAHITO

For the Minister for Foreign Affairs



8

重吉孝一郎

重吉孝一郎



2737

登簿平成21年第334号

嘱託人 株式会社癌免疫研究所

代表取締役 高橋泰治は、代理人稲本暢子を通じ当公証人の面前で、別紙編綴の証書にある上記嘱託人の署名は同嘱託人がしたものであることを自認する旨陳述した。

上記の会社は日本国大阪府吹田市江の木町13番9号第6マイダビル305に所在し日本の法律に基づいて設立された会社であり高橋泰治は同会社の代表取締役である。

よってこれを認証

平成21年5月2日

公証人重吉孝一郎役場において。

大阪市中心区平野町2丁目1番2号（沢の鶴ビル内）

大阪法務局所属

公証人 重吉孝一郎

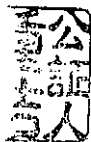
重吉孝一郎

大阪法務局所属 公証人役場

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

05 OCT 2011

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



9

NOTARIAL ATTESTATION

REGISTER NUMBER: 3 3 4 / 2 0 0 9

This is to certify that Nobuko INAMOTO, an agent of Taiji TAKAHASHI, has stated in my very presence that said Taiji TAKAHASHI acknowledged himself to have signed the attached Power of Attorney in compliance with the authority bestowed on him as the Representative Director and President of International Institute of Cancer Immunology, Inc., a corporation organized and existing under the laws of Japan and having a principal place of business at 13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka, JAPAN.

At the Office of Koichiro SHIGEYOSHI, Osaka,
on the 21st day of May, 2009



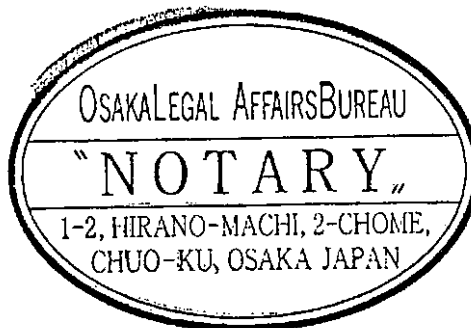
Koichiro Shigeyoshi

Koichiro SHIGEYOSHI

Notary attached to

The Osaka Legal Affairs Bureau

c/o Sawanotsuru Building
1-2, Hirano-machi 2-chome
Chuo-ku, Osaka, Japan



COPIA
FOTOGRAFICA
DE
DOCUMENTO
ORIGINAL

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE
BOGOTA, D.C. HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

05 OCT 2011

ANPARGUINTERO-VERDE
NO. 2112

10

総 第 2239 号

証 明



大阪法務局所属公証人 重吉孝一郎

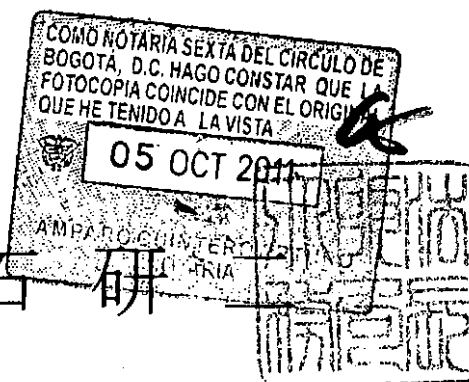
平成 21 年 5 月 21 日付

平成 21 年 登簿 第 334 号

この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

平成 21 年 5 月 21 日
平成 年 月 日

大阪法務局長 白石 研



CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial Certificate has
been executed by Notary, duly authorized and practising in Osaka,
Japan, and that the Official Seal appearing on the same is genuine.

Date MAY 21.2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

TRADUCCIÓN OFICIAL 154/2009 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL DE ACUERDO CON EL CUAL INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC., ENTIDAD DOMICILIADA EN 13-9, ENOKI-CHO, SUITA-SHI, OSAKA 564-0053 JAPÓN, OTORGA PODER A LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, TPA 23555, DANIEL PEÑA, TPA 65620, Y A GERMAN MARIN, TPA 64239.

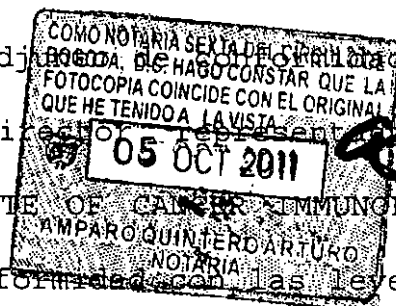
EXPEDIDO Y FIRMADO HOY 14 DE MAYO DE 2009 EN OSAKA, JAPÓN, POR TAIJI TAKAHASHI, director representante y presidente del INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.

FIRMADO: TAIJI TAKAHASHI. SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE OSAKA. NOTARIO. 1-2, HIRANO-MACHI, 2-CHOME, CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

NUMERO DE REGISTRO 334/2009

Por la presente se certifica que NOBUKO INAMOTO, agente de TAIJI TAKAHASHI, ha afirmado en mi presencia que él ha reconocido haber firmado el poder adjunto con la autoridad a el dada como director representante y presidente de INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC. una sociedad organizada de conformidad con las leyes de Japón y con domicilio en 13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka, Japón.



En la oficina de KOICHIRO SHIGEYOSHI, Osaka, Japón hoy 21 de mayo de 2009.

Firmado; KOICHIRO SHIGEYOSHI, notario adjunto a la Oficina de Asuntos jurídicos de Osaka.

Eduardo Calade N.
Eduardo Calade Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

C/o Sawanotsuru Building, 1-2, Hirano-machi, 2-chome, Chuo-ku, Osaka, Japón.

SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURIDICOS DE OSAKA

NOTARIO, 1-2, HIRANO-MACHI, 2-CHOME, CHUO-KU, OSAKA, JAPON

CERTIFICACION

Por la presente se certifica que el certificado notarial adjunto ha sido firmado por un notario debidamente autorizado y practicante en OSAKA, JAPÓN, y que el sello oficial que aparece sobre el mismo es genuino. 21 de mayo de 2009.
DIRECTOR DE LA OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE OSAKA.

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

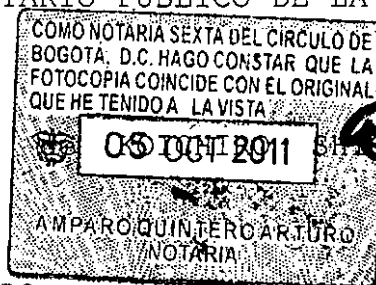
1. PAIS: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por KOICHIRO SHIGEYOSHI

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO DE LA OFICINA DE ASUNTOS JURIDICOS DE OSAKA

4. y lleva el sello/estampilla NOTARIO PÚBLICO.



CERTIFICADO

5. en OSAKA

6. el 21 de mayo de 2009

7. por el MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES

8. 2793

9. Sello: MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES, JAPÓN

10. Firma: NORIKO KAWAHITO, a nombre del Ministro de Asuntos Exteriores. ECN\ECN\ID-151720\WPCL002G

COLO-17075-841-001-4 Bogota, 9 de junio de 2009.

Eduardo Calado
Eduardo Calado FROGUEA
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

RECEIVED

CC

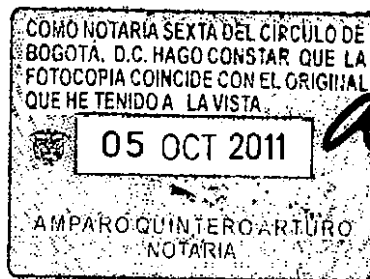
EDUARDO CAJADO

LI

RECEIVED

2.00

[Handwritten signature]



13

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号

(43) 国際公開日
2010 年 10 月 28 日(28.10.2010)

PCT

WO 2010/123065 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/07 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12Q 1/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/057149

(22) 国際出願日: 2010 年 4 月 22 日(22.04.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2009-105286 2009 年 4 月 23 日(23.04.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社癌免疫研究所(International Institute of Cancer Immunology, Inc.) [JP/JP]; 〒5640053 大阪府吹田市江の木町 1 3 番 9 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉山 治夫 (SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒5620036 大阪府箕面市船場西 2-19-30 Osaka (JP).

(74) 代理人: 田中 光雄, 外(TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: CANCER ANTIGEN HELPER PEPTIDE

(54) 発明の名称: 癌抗原ヘルパーペプチド

(57) Abstract: Disclosed are: a WT1 peptide which comprises an amino acid sequence composed of contiguous amino acid residues derived from a WT1 protein and can bind to an MHC class-II molecule to induce a WT1-specific helper T cell; a pharmaceutical composition containing the peptide; and others.

(57) 要約: 本発明は、WT1 タンパク質由来の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を有する WT1 ペプチドであって、MHC クラス II 分子と結合して WT1 特異的ヘルパー T 細胞を誘導するペプチド、ならびにこれらを含む医薬組成物などに関する。

WO 2010/123065 A1

PÉPTIDO AUXILIAR DEL ANTÍGENO DEL CÁNCER

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un péptido auxiliar de WT1, un polinucleótido que codifica el péptido, células T auxiliares específicas de WT1 inducidas por el péptido, una composición farmacéutica para el tratamiento/prevención de cáncer que comprende los mismos y similares. La presente solicitud reclama prioridad sobre la solicitud de patente japonesa N°
10 2009-105286 presentada el 23 de abril de 2009, cuya descripción se incorpora aquí por referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El gen WT1 (gen de tumor de Wilms 1) es un gen identificado como un gen causante de un tumor de Wilms, que es un cáncer renal de los niños (documentos que no son patente 1 y 2), y es un factor de transcripción que tiene una estructura de dedo de zinc. Al principio, se consideró que el gen WT1 era un gen supresor de cáncer. Sin embargo, la investigación posterior
20 demostró que el gen WT1 más bien funciona como un oncogén en tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos (documentos que no son patente 3-6).

Debido al hecho de que el gen WT1 es altamente expresado en muchos tumores malignos, se ha verificado si el producto del gen WT1 que es una proteína autóloga sin mutación tiene o no inmunogenicidad *in vivo*. El
25 resultado reveló que una proteína derivada del gen WT1 que es altamente expresada en las células tumorales se fragmenta con el procesamiento intracelular, los péptidos generados forman los complejos con las moléculas de MHC clase I y se presentan en la superficie celular, y que las células T

citotóxicas (de aquí en adelante denominadas como CTL) que reconocen dichos complejos pueden ser inducidas por la vacunación con el péptido de WT1 (documentos que no son patente 7-9). Además, se ha demostrado que las células tumorales del gen WT1 trasplantadas son rechazadas con una alta probabilidad en los ratones inmunizados con un péptido de WT1 o ADNc de WT1 (documentos que no son patente 7 y 10), mientras que los tejidos normales que expresan fisiológicamente el gen WT1 no son dañados por las CTL inducidas (documento que no es patente 7). En el pasado, se ha sugerido fuertemente, que las CLT específicas de WT1 se pueden inducir no sólo en ratón sino también en seres humanos, y que dichas CTL tienen una actividad tóxica contra las células tumorales que expresan altamente el gen WT1, pero no tienen una actividad tóxica contra la célula normal que expresa fisiológicamente el gen WT1 (documentos que no son patente 7, 10-14).

Entretanto, se ha informado que la presencia de células T auxiliares que son específicas para un antígeno del cáncer es importante para inducir las CTL en forma efectiva (documento que no es patente 15). Una célula T auxiliar (células T positivas para CD4) reconoce un complejo compuesto de una molécula de MHC clase II y se induce, prolifera y activa un péptido antigénico en una célula presentadora de antígeno. Una célula T auxiliar activada produce citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e interferón (IFN) para promover la proliferación, diferenciación y maduración de las células B y un subconjunto de otras células T. Esto sugiere que un péptido antigénico, que se une a las moléculas de MHC clase II, activa eficientemente una CTL por medio de la inducción de una célula T auxiliar para aumentar una función inmunológica (documento que no es patente 16). Previamente, con respecto a WT1, se ha informado sólo un péptido antigénico que se une a HLA-DRB1*0401 y HLA-DRB1*0405 que pertenecen a una molécula de MHC clase II (documento que no es patente 17 y documento de patente 1). Se

necesita hallar un péptido antigénico contra otros subtipos.

Documentos de la técnica anterior

Documento que no es de patente

- 5 Documento de patente 1: Publicación Internacional No. WO 2005/045027

Documento que no es patente:

Documento que no es de patente 1: Daniel A. Haber et al., Cell. 1990 Jun 29; 61 (7): 1257-69.

- 10 Documento que no es patente 2: Call KM et al., Cell. 1990 Feb 9; 60 (3): 509-20.

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

- 15 Documento que no es patente 4: Yamagami T et al., Blood. 1996 Apr 1; 87 (7): 2878-84.

Documento que no es patente 5: Inoue K et al., Blood. 1998 Apr 15; 91 (8): 2969-76.

Documento que no es patente 6: Tsuboi A et al., Leuk Res. 1999 May; 23 (5): 499-505.

- 20 Documento que no es patente 7: Oka Y et al., J Immunol. 2000 Feb 15; 164 (4): 1873-80.

Documento que no es patente 8: Melief CJ et al., Immunol Rev. 1995 Jun; 145: 167-77.

- 25 Documento que no es patente 9: Ritz J, J Clin Oncol. 1994 Feb; 12 (2): 237-8.

Documento que no es patente 10: Tsuboi A et al., J Clin Immunol. 2000 May; 20 (3): 195-202.

Documento que no es patente 11: Oka Y et al., Immunogenetics.

2000 Feb; 51 (2): 99-107.

Documento que no es patente 12: Ohminami H et al., Blood.

2000 Jan 1; 95 (1): 286-93.

Documento que no es patente 13: Gao L et al., Blood. 2000 Apr

5 1; 95 (7): 2198-203.

Documento que no es patente 14: Ohminami H et al., Blood.

2000 Jan 1; 95 (1): 286-93.

Documento que no es patente 15: Cancer. Res. 62: 6438, 2002.

Documento que no es patente 16: J.Immunol. Immunother., 24:

10 195, 2001.

Documento que no es patente 17: Cancer. Immunol.

Immunother. 51: 271, 2002.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15

Problemas que han de ser resueltos por la invención

En consecuencia, un objeto que ha de ser logrado por la presente invención es proveer un péptido que se une a una variedad amplia de moléculas de MHC clase II para inducir las células T auxiliares específicas de WT1, un polinucleótido que codifica el péptido, células T auxiliares de WT1 inducidas por el péptido, y una composición farmacéutica para el tratamiento/prevencción de cáncer que comprende los mismos.

20

Medios para resolver los problemas

25

Los inventores de la presente realizaron estudios serios para lograr el objeto anterior. Posteriormente, los inventores de la presente hallaron que los péptidos que tienen una porción de la secuencia de aminoácidos contigua que codifica la proteína de WT1 tienen una función como péptido

auxiliar del antígeno del cáncer, es decir, dichos péptidos se unen a una molécula de MHC clase II y se presentan en una célula presentadora de antígeno para inducir una célula T auxiliar específica de WT1. Y, los inventores de la presente demostraron que éstos se podían usar como una
5 composición farmacéutica para el tratamiento/prevención de cáncer.

La presente invención provee:

(1) Un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consta de aminoácidos contiguos derivados de una proteína de WT1 e induce
10 células T auxiliares específicas de WT1 al unirse a una molécula de MHC de clase II, en donde la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste de:

- (a) la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 3;
 - (b) la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 4;
 - 15 (c) la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 5;
- y

(d) una secuencia de aminoácidos que tiene uno o varios aminoácidos que han sido sustituidos, suprimidos o añadidos en las secuencias de aminoácidos indicadas en (a) a (c),

20 (2) El péptido de conformidad con (1), en donde la secuencia de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 3;

(3) El péptido de conformidad con (1) o (2), en donde la molécula de MHC clase II se selecciona del grupo que consiste de_DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*0802, DRB1*0803, DRB1*0901, DRB1*1201, DRB1*1403,
25 DRB1*1501, DRB1*1502, DPB1*0201, DPB1*0202, DPB1*0402, DPB1*0501, DPB1*0901, DQB1*0301, DQB1*0302, DQB1*0401, DQB1*0501, DQB1*0601, DQB1*0602 y DRB5*0102;

(4) El péptido de conformidad con (1) o (2), en donde la molécula

de MHC clase II se selecciona del grupo que consiste de DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*1502, DPB1*0201, DPB1*0202, y DQB1*0601,

(5) Un polinucleótido que codifica el péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4);

5 (6) Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de conformidad con (5);

(7) Un anticuerpo contra el péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4) o el polinucleótido de conformidad con (5),

(8) Una composición farmacéutica para tratar o prevenir un
10 cáncer, que comprende el péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4), el polinucleótido de conformidad con (5) o el vector de conformidad con (6),

(9) Un método para tratar o prevenir cáncer, que comprende administrar una dosis efectiva del péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4), el polinucleótido de conformidad con (5), o el vector de conformidad
15 con (6), a un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II de conformidad con (3) o (4),

(10) El uso del péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4), el polinucleótido de conformidad con (5), o el vector de conformidad con (6), para el tratamiento o prevención del cáncer,

20 (11) Células presentadoras de antígeno que despliegan el péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4) por medio de la molécula de MHC clase II de conformidad con (3) o (4);

(12) Un método para inducir células presentadoras de antígeno, que comprende cultivar células presentadoras de antígeno inmaduras en
25 presencia del péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4), e inducir células presentadoras de antígeno que despliegan el péptido por medio de la molécula de MHC clase II de conformidad con (3) o (4) a partir de la célula presentadora de antígeno inmadura.

(13) Células T auxiliares específicas de WT1, inducidas por el péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4);

(14) Un método para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende cultivar células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4), e inducir células T auxiliares específicas de WT1 a partir de las células mononucleares de sangre periférica;

(15) Un kit para inducir las células T auxiliares específicas de WT1, que comprende, como ingrediente esencial, el péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4);

(16) Un kit para prevenir o tratar un cáncer, que comprende, como ingrediente esencial, el péptido de conformidad con cualquiera de (1) a (4), el polinucleótido de conformidad con (5), o el vector de conformidad con (6);

(17) Un método para determinar la presencia o la cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II de conformidad con (3) o (4); el método comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar el péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con una muestra derivada del sujeto, y después

(b) determinar la presencia o la cantidad de citoquina incluida en la muestra.

Efectos de la invención

De conformidad con la presente invención, se pueden obtener los péptidos auxiliares de WT1 que se unen a varias clases de moléculas de MHC clase II, tales como DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*0802, DRB1*0803, DRB1*0901, DRB1*1201, DRB1*1403, DRB1*1501, DRB1*1502, DPB1*0201,

DPB1*0202, DPB1*0402, DPB1*0501, DPB1*0901, DQB1*0301, DQB1*0302, DQB1*0401, DQB1*0501, DQB1*0601, DQB1*0602 y DRB5*0102, y una composición farmacéutica para el tratamiento/prevención de cáncer que comprende los mismos y similares. En consecuencia, es posible inducir

5 células T auxiliares específicas de WT1 *in vivo* e *in vitro* en una variedad significativamente amplia de sujetos (en particular, una población grande de japoneses que tienen las moléculas mencionadas anteriormente). Puesto que las células T auxiliares específicas e WT1 son inducidas por la presente invención, también es posible activar las células T y las células B

10 efectivamente en los cánceres que expresan WT1 en niveles altos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados de las mediciones de la

15 proliferación celular después de que cada línea de células T específicas del péptido generada por la pulsado de tres clases de péptidos (mWT1₃₅, mWT1₈₆ y mWT1₂₉₄) se estimuló con cada péptido. En la figura, el símbolo "-" representa sin estimulación con el péptido.

La figura 2 muestran los resultados de las mediciones de la

20 proliferación celular después de que cada línea de células T específicas del péptido generada por la pulsado de tres clases de péptidos (mWT1₃₅, mWT1₈₆ y mWT1₂₉₄) se estimuló con cada péptido correspondiente en presencia de un anticuerpo anti-MHC clase I o II. En la figura, el símbolo "-" representa sin estimulación con el péptido. El símbolo "cpm" en el eje vertical representa las

25 cuentas por minuto.

La figura 3 muestra los resultados de las mediciones de la proliferación celular de que cada línea de células T específicas del péptido WT1 correspondiente en las células C1498, las células C1498 se pulsaron con

las tres clases de péptidos (mWT1₃₅, mWT1₈₆ y mWT1₂₉₄), y las células C1498 se forzaron a expresar la proteína de WT1. El símbolo "cpm" en el eje vertical representa las cuentas por minuto.

La figura 4 muestra los resultados de las mediciones de la capacidad de producción de IFN γ en cada línea de células T específicas del péptido generada por la pulsado de tres clases de péptidos (mWT1₃₅, mWT1₈₆ y mWT1₂₉₄).

La figura 5 muestra los resultados de las mediciones de la actividad citotóxica de CTL de tres clases de péptidos (mWT1₃₅, mWT1₈₆, y mWT1₂₉₄). Un círculo negro indica los resultados de los experimentos que se realizaron por el uso de células RMAS pulsadas con el péptido WT1₁₂₆ (péptido restringido de MHC clase I). Un círculo blanco indica los resultados de los experimentos que se realizaron por el uso de células RMAS de control.

La figura 6 muestra un diagrama de serie de tiempo en el que se realizaron un trasplante de un tumor e inmunización en el experimento de trasplante del tumor. Después del trasplante subcutáneo de las células de leucemia que expresan WT1 en los ratones, se realizó la inmunización con péptido auxiliar mWT1₃₅ en los días 7, 14 y 21, y se llevó a cabo la disección en el día 29. Una flecha vacía blanca hacia abajo indica un punto de tiempo cuando se administra control (PBS) en forma intradérmica (IFA/30 μ l). Una flecha negra hacia abajo indica un punto de tiempo cuando se administra péptido auxiliar mWT1₃₅ en forma intradérmica (50 μ M/IFA/30 μ l).

La figura 7 muestra el tamaño de los tumores en ratones inmunizados con péptidos auxiliares mWT1₃₅ y la tasa de población de ratones no enfermos. En los ratones inmunizados con el péptido auxiliar mWT1₃₅, cuatro de diez no estaban enfermos, a la inversa, en los ratones inmunizados con el control, no hubo ratones no enfermos entre los nueve individuos.

La figura 8 muestra la tasa de supervivencia libre de enfermedad en los ratones inmunizados con el péptido auxiliar mWT1₃₅.

La figura 9 muestra la actividad citotóxica de una CTL en los ratones inmunizados con el péptido auxiliar mWT1₃₅. Un círculo negro indica los resultados de los experimentos que se realizaron por el uso de células RMAS pulsadas con el péptido WT1_{126n} (péptido de MHCI). Un círculo blanco indica los resultados de los experimentos que se realizaron por el uso de células RMAS de control. Los números entre paréntesis representan el tamaño del tumor (mm).

La figura 10 muestra la actividad citotóxica de CTL específica de mWT1 en ratones control. Un círculo negro indica los resultados de los experimentos que se realizaron por el uso de células RMAS pulsadas con el péptido WT1₁₂₆ péptidos péptido de MHCI). Un círculo blanco indica los resultados de los experimentos que se realizaron por el uso de células RMAS de control. Los números entre paréntesis representan el tamaño del tumor (mm).

La figura 11 muestra la actividad citotóxica de CTL específica del péptido mWT1₁₂₆ (izquierda) y el porcentaje células T positivas al tetrámero de WT1₁₂₆ (derecha) por la administración del péptido de mWT1₃₅.

La figura 12 muestra los resultados de las mediciones de la proliferación celular causada por la estimulación del péptido de WT1₃₅ en las células mononucleares de sangre periférica de sujetos sanos que tienen cada molécula de MHC clase II.

La figura 13 muestra los resultados de las mediciones de la proliferación celular cuando un receptor (PBMC derivados de sujetos sanos positivos para DRB1*0101/0405, DPB1*0201/0402 y DQB1*0401/0501 (sujeto sano A)) se trató con un estimulador (PBMC derivados de sujetos sanos positivos para DRB1*0405/0901, DPB1*0201/0501 y DQB1*0303/0401 (sujeto

sano B)). El eje vertical representa la cantidad de ^3H -timidina incorporada (cpm). El eje horizontal representa los tipos de diversos anticuerpos añadidos (sin anticuerpo, anticuerpo anti-HLA-DR, anticuerpo anti-HLA-DP, y anticuerpo anti-HLA-DQ).

5 La figura 14 muestra los resultados de las mediciones de la proliferación celular cuando un receptor (PBMC derivados de sujetos sanos positivos para DRB1*0101/0405, DPB1*0201/0402 y DQB1*0401/0501 (sujeto sano A)) se trató con un estimulador (PBMC derivadas de sujetos sanos positivos para DRB1*0405/0803, DPB1*0202/0501 y DQB1*0401/0601 (sujeto sano G)). El eje vertical representa la cantidad de ^3H -timidina incorporada (cpm). El eje horizontal representa los tipos de diversos anticuerpos añadidos (sin anticuerpo, anticuerpo anti-HLA-DR, anticuerpo anti-HLA-DP, y anticuerpo anti-HLA-DQ).

15 La figura 15 muestra los resultados de las mediciones de la proliferación celular cuando un receptor (PBMC derivados de sujetos sanos positivos para DRB1*0101/0405, DPB1*0201/0402 y DQB1*0401/0501 (sujeto sano A)) se trató con un estimulador (PBMC derivados de sujetos sanos positivos para DRB1*0101/0803, DPB1*0501/- y DQB1*0501/0601 (sujeto sano H)). El eje vertical representa la cantidad de ^3H -timidina incorporada (cpm). El eje horizontal representa los tipos de diversos anticuerpos añadidos (sin anticuerpo, anticuerpo anti-HLA-DR, anticuerpo anti-HLA-DP, y anticuerpo anti-HLA-DQ).

25 La figura 16 muestra los resultados de las mediciones de capacidad de producción de IFN- γ cuando un receptor (PBMC derivados de sujetos sanos positivos para DRB1*0405/0803, DPB1*0202/0501 y DQB1*0401/0601 (sujeto sano G)) se trató con un estimulador (gen de DQB1*0601 introducido en célula L). El eje vertical representa el porcentaje de la cantidad IFN- γ . El eje horizontal representa la presencia o ausencia de

25

pulso con el péptido WT1₃₅ (+ o -).

La figura 17 muestra los resultados de las mediciones de la proliferación celular cuando un receptor (PBMC derivados de sujetos sanos positivos para DRB1*1502/1502, DPB1*0201/0901 y DQB1*0601/0601 (sujeto sano D)) se trató con un estimulador (PBMC derivado del mismo sujeto sano que el del receptor (es decir, el sujeto sano D)). El eje vertical representa la cantidad de ³H-timidina incorporada (cpm). El eje horizontal representa los tipos de diversos anticuerpos añadidos (sin anticuerpo, anticuerpo anti-HLA-DR, anticuerpo anti-HLA-DP, y anticuerpo anti-HLA-DQ).

10 La figura 18 muestra resultados de las mediciones de capacidad de producción de IFN- γ cuando un receptor (PBMC derivados de sujetos sanos positivos para DRB1*0101/1501, DPB1*0201/0402 y DQB1*0501/0602 (sujeto sano I)) se trató con un estimulador (PBMC derivado del mismo sujeto sano que el del receptor (es decir, el sujeto sano I)). El eje vertical representa el porcentaje de la cantidad IFN- γ . El eje horizontal representa la presencia o ausencia de pulso con el péptido WT1₃₅ (+ o -).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

20 En un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aminoácidos derivados de la proteína de WT1 de ratón o humana. El gen WT1 se expresa en alto nivel, por ejemplo, en tumores de órganos hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome displásico de médula ósea, mieloma múltiple y linfoma

25 maligno, y en cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de glándula prostática, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer de ovario. De

esta manera, el péptido de la presente invención está presente en grandes cantidades en las células de cáncer que expresan el gen WT1.

El péptido de la presente invención se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aminoácidos contiguos
5 derivados de la proteína de WT1 humana representada en SEQ ID NO: 2, un péptido que retiene una capacidad de unirse a una molécula de MHC de clase II y tiene la capacidad de inducir células T auxiliares específicas de WT1. El péptido de la presente invención no está particularmente limitado con la secuencia de aminoácidos y la longitud de los péptidos siempre que éstos
10 tengan las características anteriores. Sin embargo, si el péptido es demasiado largo, es susceptible a una acción de proteasa, y si el péptido es demasiado corto, no se puede unir adecuadamente a un surco de unión del péptido. En consecuencia, la longitud del péptido de la presente invención es con preferencia 10-25 aminoácidos, con más preferencia 15-21 aminoácidos, aún
15 con más preferencia 16-20 aminoácidos, por ejemplo, 17 aminoácidos, 18 aminoácidos, o 19 aminoácidos. Ejemplos específicos del péptido de la presente invención incluyen un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 4; la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 5.

20 También, el péptido de la presente invención incluye variantes de los péptidos anteriores. Las variantes pueden incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que comprenden varios, por ejemplo, de 1 a 9, con preferencia de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, con más preferencia de 1 a 2, y aún con más preferencia 1 aminoácido que ha sido sustituido, suprimido o añadido
25 en una de las anteriores secuencias de aminoácidos. El aminoácido del péptido de la presente invención puede estar sustituido con cualquier aminoácido en cualquier posición. Se prefiere la sustitución conservadora de aminoácidos. Por ejemplo, el residuo de Glu se puede sustituir con el residuo

de Asp, el residuo de Phe se puede sustituir con el residuo de Tyr, el residuo Leu se puede sustituir con el residuo de Ile, el residuo Ala se puede sustituir con el residuo de Ser, el residuo His se puede sustituir con el residuo de Arg. La adición o supresión del aminoácido se realiza con preferencia en el extremo N-terminal y C-terminal del péptido, pero se puede realizar dentro de la secuencia de aminoácidos. Un ejemplo preferido del péptido de la presente invención es un péptido que tiene la SEQ ID NO: 3. Sin embargo, en algunos casos, la condición es que el péptido de la presente invención retenga una capacidad de unirse a una molécula de MHC de clase II y tenga la capacidad de inducir una célula T auxiliar específica de WT1.

En conexión a esto, la molécula de MHC de clase II a la cual se une el péptido de la presente invención puede pertenecer a cualquiera de las subclases de HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Con preferencia, la molécula de MHC de clase II es una molécula seleccionada del grupo que comprende DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*0802, DRB1*0803, DRB1*0901, DRB1*1201, DRB1*1403, DRB1*1501, DRB1*1502, DPB1*0201, DPB1*0202, DPB1*0402, DPB1*0501, DPB1*0901, DQB1*0301, DQB1*0302, DQB1*0401, DQB1*0501, DQB1*0601, DQB1*0602, y DRB5*0102. Con más preferencia, la molécula de MHC de clase II es DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*1403, DRB1*1502, DPB1*0201, DPB1*0202, DPB1*0901, DQB1*0301, DQB1*0601 o DRB5*0102. Con máxima preferencia, es DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*1502, DPB1*0201, DPB1*0202, o DQB1*0601. Como se describe en la presente, un péptido que retiene su capacidad de unirse a una molécula de MHC clase II y que tiene la capacidad de inducir las células T auxiliares específicas de WT1 se denomina péptido auxiliar de WT1. Además, en los siguientes ejemplos, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID No: 3 se denomina péptido WT1₃₅, péptido auxiliar o péptido WT1₃₅.

También, el péptido de la presente invención es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende aminoácidos contiguos derivados de la proteína de WT1 de ratón representada en SEQ ID NO: 1, y la secuencia de aminoácidos anterior puede ser un péptido (SEQ ID NO: 6) en el cual un residuo de aminoácido en la posición 9 de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 4 ha sido sustituido con una leucina; o a péptido (SEQ ID NO: 7) en el cual el residuo de aminoácido en la posición 11 de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 5 ha sido sustituido con una serina. Además, el péptido de la presente invención puede incluir un péptido seleccionado del grupo de las secuencias de aminoácidos que comprenden varios, por ejemplo, de 1 a 9, con preferencia de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, con más preferencia de 1 a 2, y con más preferencia 1 aminoácido que ha sido sustituido, suprimido o añadido en la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7.

En los siguientes ejemplos, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 6 también se denomina péptido mWT1₈₆ o péptido auxiliar mWT1₈₆. Y, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 7 también se denomina péptido mWT1₂₉₄ o péptido auxiliar mWT1₂₉₄.

El péptido de la presente invención deriva de la proteína de WT1 y puede comprender las anteriores secuencias de aminoácidos contiguas o puede incluir las mismas. En consecuencia, el péptido de la presente invención, por ejemplo, puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente *per se*, o una proteína de WT1 que comprende la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente o una porción de esta. También, el péptido de la presente invención puede ser un péptido modificado de la secuencia de aminoácidos anterior. Los residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos anterior se puede modificar

usando métodos conocidos. Dicho péptido modificado puede ser, por ejemplo, esterificado, alquilado, halogenado, fosforilado, sulfonado, amidado en un grupo funcional de la cadena lateral del residuo de aminoácido. Además, el péptido de la presente invención se puede ligar a una variedad de sustancias

5 en el extremo N-terminal y/o C-terminal del péptido que comprende la secuencia de aminoácidos anterior. Por ejemplo, un aminoácido, un péptido, un análogo de este y similares se pueden ligar al péptido. Cuando estas sustancias se ligan al péptido de la presente invención, las sustancias se procesan, por ejemplo, con una enzima *in vivo*, o similares, o por un proceso

10 tal como procesamiento intracelular. Posteriormente, un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos anterior puede finalmente ser generado y presenta en la superficie celular como un complejo con una molécula de MHC clase II. De este modo, se puede obtener un efecto inductor de las células T auxiliares. Las sustancias pueden modular la solubilidad del

15 péptido de la presente invención. Las sustancias pueden aumentar su estabilidad tal como la resistencia a la acción de la proteasa. Las sustancias también pueden administrar el péptido de la presente invención, por ejemplo, a un tejido/órgano específico. Además, las sustancias pueden tener la actividad de mejorar la eficiencia de la absorción de la célula presentadora de

20 antígeno. También, estas sustancias pueden aumentar la capacidad de inducción de CTL, y por ejemplo, las sustancias pueden ser un péptido auxiliar diferente del péptido de la presente invención.

El péptido de la presente invención se puede modificar en el grupo amino del aminoácido N-terminal o el grupo carboxilo del aminoácido C-

25 terminal. Los ejemplos de un grupo que se pueden usar en la modificación del grupo amino del aminoácido N-terminal incluyen 1 a 3 grupos seleccionados del grupo alquilo C₁₋₆, grupo fenilo, grupo cicloalquilo y grupo acilo. Ejemplos específicos de los grupos acilo incluyen grupo alcanóilo C₁₋₆, grupo alcanóilo

C₁₋₆ sustituido con grupo fenilo, grupo carbonilo sustituido con grupo cicloalquilo C₅₋₇, grupo alquilsulfonilo C₁₋₆, grupo fenilsulfonilo, grupo alcóxicarbonilo C₂₋₆, grupo alcóxicarbonilo sustituido con grupo fenilo, grupo carbonilo sustituido con grupo cicloalcoxi C₅₋₇, grupo fenóxicarbonilo y
5 similares. Los ejemplos de los péptidos modificados en el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal incluyen ésteres y amidas. Los ejemplos de los ésteres incluyen ésteres de alquilo C₁₋₆, ésteres de alquilo C₀₋₆ sustituidos con grupo fenilo, ésteres de cicloalquilo C₅₋₇ y similares, y ejemplos específicos de las amidas incluyen amidas, amidas sustituidas con uno o tres grupo alquilo C₁₋₆,
10 amidas sustituidas con uno o dos grupos alquilo C₀₋₆ que están sustituidos con grupo fenilo, amidas que forman azacicloalcano de 5 a 7 miembros que incluyen el átomo de nitrógeno del grupo amida y similares.

También, el péptido modificado de la presente invención se puede unir entre los residuos de aminoácidos por enlaces diferentes del
15 enlace peptídico tal como un enlace carbono-carbono, carbono-nitrógeno o carbono-azufre. Más aún, el péptido de la presente invención puede incluir uno o más D-aminoácidos.

Los péptidos modificados y las variantes de la presente invención son solo ilustrativos, y los expertos en la técnica pueden suponer,
20 preparar y emplear fácilmente su variación.

El péptido de la presente invención se puede sintetizar por un método generalmente usado en la técnica o un método modificado del mismo. Dicho método de síntesis se describe, por ejemplo, en Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New
25 York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd, 1975; Basis and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1985; Development of Medicines (continuación), Volumen 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten, 1991 y similares. . Además, el péptido de la presente invención también se

puede preparar usando técnicas de ingeniería genética basadas en la información acerca de la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la presente invención. Dichas técnicas de ingeniería genética son bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos métodos se pueden
5 determinar de conformidad con, por ejemplo, un método descrito en la bibliografía [Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)], o que se describe de aquí en adelante en la presente.

Se puede examinar si el péptido o el péptido candidato de
10 presente invención se une o no a la molécula de MHC de clase II anterior e induce las células T auxiliares usando, por ejemplo, un método descrito en Cancer Immunol. Immunother. 51: 271 (2002), o el método descrito en los ejemplos de esta memoria descriptiva, y otros métodos.

El péptido de la presente invención es útil para tratar o prevenir
15 de modo eficiente un cáncer, porque el péptido puede activar las células T auxiliares (células T positivas para CD4) para demostrar la inducción de diferenciación y mantenimiento de CTL y la acción de activación de las células efectoras tales como macrófagos. Por consiguiente, es posible usar el péptido de la presente invención para tratamiento o prevención efectiva de cáncer

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido auxiliar de WT1 (de aquí en adelante también denominado polinucleótido de WT1). El polinucleótido de la presente invención puede ser un ADN o ARN. La secuencia base del polinucleótido de la presente invención se puede determinar sobre la base de la secuencia de
25 aminoácidos del péptido auxiliar de WT1. El polinucleótido se puede preparar, por ejemplo, por el método de síntesis de ADN o ARN, método de PCR y similares.

El polinucleótido que codifica el péptido de la presente invención

abarca los polinucleótidos que se pueden hibridar con la secuencia complementaria de dicho polinucleótido en las condiciones rigurosas y que codifican péptidos que tienen actividades equivalentes al péptido de la presente invención. En relación con "hibrida en la condición rigurosa", la

5 "hibridación" usada en la presente se puede llevar a cabo de conformidad con los métodos convencionales descritos en, por ejemplo, Molecular Cloning 2ª. edición, Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T., Cold Spring Harbor Laboratory press y similares. El término "condiciones rigurosas" significa que la hibridación se realiza en una solución que contiene 6xSSC (10 x SSC = 1.5 M

10 de NaCl, 1,5 M de citrato trisódico), 50% de formamida a 45°C, seguido por el lavado en una solución de 2xSSC a 50°C (Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6)), o similares.

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende el polinucleótido anterior (de aquí en adelante

15 también denominado vector de expresión de WT1). El tipo de vector de expresión, la secuencia incluida en la secuencia de polinucleótidos anterior y similares, se pueden seleccionar apropiadamente de conformidad con el tipo de huésped en que se introduce el vector de expresión, el propósito, etc. El vector de expresión descrito en la presente incluye plásmidos, vectores de

20 fago, vectores de virus, y similares. Cuando el huésped es *Escherichia coli*, los ejemplos de vector incluyen vectores de plásmido tales como pUC118, pUC119, pBR322, pCR3, y similares; y vectores de fago tales como λ ZAPII, λ gt11, y similares. Cuando el huésped es levadura, los ejemplos de vector incluyen pYES2, pYEUra3, y similares. Cuando el huésped es células de

25 insecto, los ejemplos de vectores incluyen pAcSGHisNT-A, y similares. Cuando el huésped es células de animales, los ejemplos de vector incluyen vectores de plásmido tales como pKCR, pCDM8, pGL2, pcDNA3.1, pRc/RSV, pRc/CMV, y similares; y los vectores de virus tales como vector de retrovirus,

vector de adenovirus, vector de virus adeno-asociado, y similares. El vector de expresión puede contener opcionalmente un factor tal como un promotor capaz de inducir la expresión, un gen que codifica una secuencia señal, un gen marcador para la selección, terminador y similares. Además, el vector de

5 expresión puede contener una secuencia adicional para permitir que el péptido exprese una proteína de fusión con tiorredoxina, marcador His, GST (glutación S-transferasa), o similares, de modo de facilitar el aislamiento y la purificación. Los vectores que se pueden usar en tal caso incluyen vectores de proteína de fusión de GST que contienen un promotor apropiado (lac, tac, trc,

10 trp, CMV, promotor temprano SV40, etc) que actúa en las células hospederas tales como pGEX4T; vectores que contiene la secuencia Tag (Myc, His, etc) tales como pcDNA3.1/Myc-His; y vectores capaces de expresar una proteína de fusión entre tiorredoxina y marcador His tal como (pET32a).

Al administrar el vector de expresión de la presente invención a

15 un sujeto, el péptido auxiliar de WT1 se produce *in vivo*. Posteriormente, el péptido resultante induce células T auxiliares específicas de WT1, y las células T auxiliares específicas de WT1 producen varias citoquinas (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 o interferón (IFN) y similares) y promueven la proliferación, diferenciación y maduración de las células B y otras células T.

20 En consecuencia, al usar el vector de expresión de WT1 de la presente invención, es posible dañar específicamente las células tumorales que tienen moléculas de MHC clase I y que expresan WT1 a alto nivel.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo contra el péptido auxiliar de WT1 o un polinucleótido que codifica el péptido

25 (de aquí en adelante también denominado anticuerpo WT1). El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Los métodos para la preparación de los anticuerpos son bien conocidos en la técnica y los anticuerpos de la presente invención se pueden

preparar de conformidad con cualquiera de los métodos convencionales (Current protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. (ed.) (1987) John Wiley y Sons. (pub.), sección 11.12-11.13, Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H, D. et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989).

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer, que comprende el péptido auxiliar de WT1, polinucleótido de WT1 o vector de expresión de WT1 descritos anteriormente. El gen WT1 se expresa a niveles altos, por ejemplo, en tumores del órgano hematopoyético tales como leucemia, síndrome displásico de médula ósea, 10 mieloma múltiple y linfoma maligno, y cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de glándula prostática, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer de ovario. En consecuencia, la composición farmacéutica de la presente 15 invención se puede usar para el tratamiento o prevención de los cánceres que expresan el gen WT1. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra a un sujeto que tiene una molécula de MHC clase II, células T auxiliares específicas de WT1 inducidas por el péptido auxiliar de WT1 incluido en la composición farmacéutica producen varias citoquinas (por 20 ejemplo, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 o interferón (IFN) y similares) y promueven la proliferación, diferenciación y maduración de las células B y subconjuntos de otras células T. En consecuencia, al usar el péptido de la presente invención, es posible dañar específicamente las células tumorales que tienen moléculas de MHC clase I y que expresan WT1 en un nivel alto.

25 Además del péptido auxiliar de WT1, el polinucleótido de WT1 o vector de expresión de WT1 como ingrediente activo, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir, por ejemplo, un portador, un diluyente y similares. El péptido auxiliar de WT1 incluido en la composición

farmacéutica de la presente invención induce las células T auxiliares específicas de WT1. En consecuencia, a fin de aumentar la eficiencia de la inducción de las células T auxiliares específicas de WT1, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir un adyuvante adecuado, o

5 se puede administrar junto con un adyuvante adecuado. Los adyuvantes preferidos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, adyuvante de Freund completo o incompleto, hidróxido de aluminio y similares. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede incluir como ingrediente activo un péptido antigénico del cáncer conocido diferente del

10 péptido auxiliar de WT1 mencionado anteriormente, por ejemplo, péptido WT1₁₂₆ que induce CTL específicas de WT1, o similares (Oka et al, "Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product". Journal of Immunology, 164: 1873-1880, 2000 y Oka et al. "Human cytotoxic T-lymphocyte responses specific for peptides of the wild-type Wilms' tumor gene

15 (WT1) product". Immunogenetics, 51: 99-107, 2000).

Más aún, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en combinación con un péptido antigénico de cáncer conocido. Por ejemplo, es posible administrar un péptido antigénico de cáncer conocido, por ejemplo, péptido WT1₁₂₆, antes o después de la administración

20 de la composición farmacéutica de la presente invención. La composición farmacéutica de la presente invención tiene la característica de activar las células B y otras células T por inducción de las células T auxiliares específicas de WT1. En consecuencia, es posible mejorar adicionalmente la actividad de las CTL inducidas por la administración de un péptido antigénico de cáncer

25 conocido, y aumentar marcadamente los efectos del tratamiento.

Un método de administración para la composición farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar apropiadamente de conformidad con condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del

sujeto y el sitio específico. Los métodos de administración incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal, administración oral y similares. Además, los métodos de administración pueden ser terapia de células linfoides o terapia DC (células dendríticas). Las cantidades de péptido incluido en la composición farmacéutica de la presente invención, la forma de dosis de la composición farmacéutica, la frecuencia de administración y similares se pueden seleccionar apropiadamente de conformidad con condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto y el sitio específico. En general, la cantidad de péptido por administración es 0.0001 mg a 1000 mg y con preferencia 0.001 mg a 10000 mg.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar o prevenir un cáncer, que comprende administrar una dosis efectiva de la composición farmacéutica a un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II descrita anteriormente. Cualquiera de los cánceres se puede tratar o prevenir con la presente invención, siempre que los cánceres expresen el gen WT1. Los cánceres incluyen, por ejemplo, tumores de órgano hematopoyético tales como leucemia, síndrome displásico de médula ósea, mieloma múltiple y linfoma maligno, y cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de glándula prostática, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer de ovario.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del péptido auxiliar WT1 anterior, el polinucleótido de WT1 anterior, o el vector de expresión de WT1 anterior, para el tratamiento o prevención de cáncer.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso

37

de un péptido auxiliar de WT1 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir a cáncer.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un polinucleótido de WT1 o un vector de expresión de WT1 para la
5 preparación de una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de WT1 o vector de expresión de WT1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a células que comprenden el péptido auxiliar de WT1, polinucleótido de WT1 o vector de expresión de WT1. Las células de la presente invención se pueden preparar
10 por la transformación de células hospederas tales como *Escherichia coli*, levadura, células de insecto o células de animales con el vector de expresión anterior. El método para introducir un vector de expresión en células hospederas se puede usar por la selección apropiada de varios métodos. El péptido de la presente invención también se puede preparar por el cultivo de
15 las células transformadas y recuperación/purificación del péptido auxiliar de WT1 producido.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas, células linfoides B, macrófagos, etc.), que despliegan el péptido auxiliar de WT1 por
20 medio de la molécula de MHC clase II. Las células presentadoras de antígeno de la presente invención son inducidas por el péptido auxiliar de WT1. Por medio de las células presentadoras de antígeno de la presente invención, se inducen eficientemente las células T auxiliares específicas de WT1.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un
25 método para inducir células presentadoras de antígeno que despliegan un péptido auxiliar de WT1 por medio de una molécula de MHC clase II, que comprende cultivar las células presentadoras de antígeno inmaduras en presencia de a péptido auxiliar de WT1 para inducir a células presentadoras

- de antígeno que presenten un péptido auxiliar de WT1 por medio de la molécula de MHC clase II a partir de células presentadoras de antígeno inmadura. Como se describe en la presente especificación, las células presentadoras de antígeno inmadura significan células que pueden madurar
- 5 en células presentadoras de antígeno, tales como células dendríticas, células linfoides B y macrófagos. Las células presentadoras de antígeno inmaduras pueden derivar de cualquier sujeto siempre que el sujeto tenga la molécula de MHC clase II. Las células presentadoras de antígeno inmaduras se incluyen en, por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica y similares.
- 10 En consecuencia, dichas células se pueden cultivar en presencia del péptido auxiliar de WT1 mencionado anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar o prevenir un cáncer que comprende administrar células presentadoras de antígeno que despliegan un péptido auxiliar de WT1 por

15 medio de la molécula de MHC clase II a un sujeto que tiene la misma molécula que la molécula de MHC clase II. El método de administración para las células presentadoras de antígeno se puede seleccionar apropiadamente de conformidad con condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto y el sitio blanco. Los métodos incluyen, pero sin limitación, por

20 ejemplo, administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración nasal, administración oral y similares.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para prevenir o tratar cáncer, que comprende inducir células presentadoras de

25 antígeno que despliegan un péptido auxiliar de WT1 por medio de la molécula de MHC clase II, que es un método que comprende las etapas de

(a) hacer reaccionar un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de WT1

(SEQ ID NO: 2) o una secuencia parcial de esta, o con el péptido auxiliar de WT1 mencionado anteriormente con una muestra,

(b) obtener células presentadoras de antígeno que despliegan el péptido auxiliar de WT1 por medio de la molécula de MHC clase II de la muestra, y

(c) administrar las células presentadoras de antígeno a un sujeto que tiene la misma molécula que la molécula de MHC clase II.

Se puede usar cualquiera de las muestras del método siempre que exista la posibilidad de que incluya una célula linfocítica o una célula dendrítica. Por ejemplo, las muestras incluyen la muestra derivada del sujeto tal como sangre, soluciones de cultivo celular y similares. La reacción del método anterior se puede llevar a cabo mediante medios convencionales y con preferencia, se puede llevar a cabo usando electroporación. Las células presentadoras de antígeno se puede obtener usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo de las células de la muestra en cada etapa pueden ser determinadas apropiadamente por los expertos en la técnica. El método de administración de células presentadoras de antígeno puede ser el que se describió anteriormente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a células T auxiliares específicas de WT1 inducidas por el anterior péptido auxiliar de WT1. Las células T auxiliares de la presente invención reconocen el complejo compuesto de un péptido auxiliar de WT1 y una molécula de MHC clase II, y experimenta inducción, proliferación y activación. Las células T auxiliares específicas de WT1 activadas producen citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 o interferón (IFN) y promueven la proliferación, diferenciación y maduración de las células B y un subconjunto de otras células T. En consecuencia, por medio de las células T auxiliares de la presente invención, es posible dañar específicamente una célula tumoral que tiene una molécula

de MHC clase I y que expresa WT1 en un nivel alto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende cultivar células mononucleares de sangre periférica en presencia de a péptido auxiliar

5 de WT1 para inducir células T auxiliares específicas de WT1 a partir de las células mononucleares de sangre periférica. Las células mononucleares de sangre periférica pueden derivar de cualquier sujeto siempre que el sujeto tenga la molécula de MHC clase II. Al cultivar las células mononucleares de sangre periférica en presencia de un péptido auxiliar de WT1, se inducen las

10 células T auxiliares específicas de WT1 a partir de una célula precursora de la célula T auxiliar precursor en las células mononucleares de sangre periférica. Al administrar las células T auxiliares específicas de WT1 obtenidas de conformidad con la presente invención a un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II, se puede tratar o prevenir un tumor de órgano hematopoyético o

15 un cáncer sólido en el sujeto. Como se describe en la presente, las células mononucleares de sangre periférica incluyen células presentadoras de antígenos inmaduras que son precursoras de las células presentadoras de antígeno (por ejemplo, precursores de célula dendrítica, célula linfoide B, macrófago y similares). Las células presentadoras de antígeno inmaduras se

20 incluyen en, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica y similares. Dichas células se pueden cultivar en presencia del péptido auxiliar de WT1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende el péptido

25 auxiliar de WT1 como ingrediente esencial. Con preferencia, el kit se usa en el método para inducir las células T auxiliares específicas de WT1. Además del péptido auxiliar de WT1, el kit de la presente invención puede contener, por ejemplo, un medio para obtener las células mononucleares de sangre

periférica, un adyuvante, un recipiente de reacción, y similares. En general, se adjunta un manual del usuario con el kit. Al usar el kit de la presente invención, se puede inducir eficientemente las células T auxiliares específicas de WT1.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para tratar o prevenir un cáncer, que comprende administrar las células T auxiliares específicas de WT1 a un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II. El método de administración para las células T auxiliares específicas de WT1 se puede seleccionar adecuadamente de conformidad con condiciones

10 tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto y el sitio específico. El método de administración incluye, pero sin limitación, por ejemplo, administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración nasal, administración oral y similares.

15 Además, la presente invención se refiere a un kit para prevenir o tratar un cáncer, que comprende el péptido auxiliar de WT1, el polinucleótido de WT1 o el vector de expresión de WT1 como ingrediente esencial. El kit induce células presentadoras de antígeno que despliegan el péptido auxiliar de WT1 por medio de la molécula de MHC clase II. Además del ingrediente

20 esencial descrito anteriormente, el kit de la presente invención puede contener, por ejemplo, medios para obtener una muestra, recipiente de reacción y similares. En general, se adjunta un manual del usuario con el kit. Al usar el kit de la presente invención, se pueden obtener eficientemente células presentadoras de antígeno que despliegan el péptido auxiliar de WT1

25 por medio de la molécula de MHC clase II. Además, al administrar las células presentadoras de antígeno, se puede prevenir o tratar un cáncer.

 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para determinar la presencia o las cantidades de células T auxiliares

específicas de WT1 en un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II, que es un método que comprende las etapas de

- (a) hacer reaccionar un complejo compuesto del péptido auxiliar de WT1 y la molécula de MHC clase II con una muestra derivada del sujeto; y
- 5 (b) examinar la presencia o las cantidades de células T auxiliares que reconocen el complejo incluido en la muestra.

Se puede usar cualquiera de las muestras derivadas del sujeto siempre que tengan la posibilidad de incluir células linfoides y, por ejemplo, pueden incluir fluidos corporales tales como sangre y linfa, tejido y similares.

- 10 El complejo compuesto de la célula T auxiliar de WT1 y la molécula de MHC clase II puede formar, por ejemplo, un tetrámero, un pentámero y similares por medio de los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, el método de biotina-estreptavidina, etc. La presencia o las cantidades de células T auxiliares que reconocen dichos complejos se determinar con
- 15 métodos que son conocidos por los expertos en la técnica. En este aspecto de la presente invención, los complejos se pueden marcar. Se puede usar como marcador, marcadores bien conocidos tales como marcadores fluorescentes y marcadores radioactivos. Por la marcación de los complejos, se determina en forma sencilla e inmediata la presencia o las cantidades de células T
- 20 auxiliares. Por medio de los métodos de este aspecto de la presente invención, se hace posible el diagnóstico, pronóstico y similares de los cánceres.

Por consiguiente, la presente invención también provee una composición que comprende un complejo compuesto del péptido auxiliar de

25 WT1 y la molécula de MHC clase II, para determinar la presencia o las cantidades de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II anterior.

También, la presente invención provee un kit para determinar la

presencia o las cantidades de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II, que comprende un complejo compuesto del péptido auxiliar de WT1 y la molécula de MHC clase II.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un
5 método para determinar la presencia o las cantidades de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II, que es un método que comprende las etapas de

(a) hacer reaccionar el péptido auxiliar de WT1 con una muestra extraída del sujeto; y,

10 (b) examinar la presencia o las cantidades de citoquinas incluida en la muestra.

Se puede usar cualquiera de las muestras extraídas del sujeto siempre que tengan la posibilidad de que comprendan células linfoides, e incluyen, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica, sangre,
15 fluidos corporales, tejidos y otros, con preferencia a células mononucleares de sangre periférica. La reacción de la etapa anterior (a) se puede llevar a cabo en la muestra extraída del sujeto usando un método general para el péptido auxiliar de WT1 anterior. Las condiciones de cultivo de las células de las muestras en cada etapa pueden ser determinadas adecuadamente por los
20 expertos en la técnica. La presencia o las cantidades de citoquina incluidas en la muestra se pueden medir por métodos que son conocidos por los expertos en la técnica. Las citoquinas pueden haber sido extraídas de las células T auxiliares, tales como interferón γ e interleuquina 10. En este modo de la presente invención, se pueden marcar las citoquinas. Como un marcador, se
25 pueden usar marcadores conocidos tales como marcadores fluorescentes y marcadores radioactivos. Al usar la presencia o las cantidades de citoquinas como un índice, se puede examinar en forma fácil y rápida la presencia o las cantidades de células T auxiliares específicas de WT1.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para obtener células T auxiliares específicas de WT1 usando un complejo compuesto de un péptido auxiliar de WT1 y la molécula de MHC clase II, que es un método que comprende las etapas de:

- 5 (a) hacer reaccionar el complejo con una muestra,
- (b) obtener una célula T auxiliar que reconoce el complejo incluido en la muestra.

El complejo compuesto de un péptido auxiliar de WT1 y la molécula de MHC clase II es el que se describió antes. Se puede usar cualquier muestra siempre que existe la posibilidad de que incluya una célula linfóide. Las muestras pueden incluir, por ejemplo, una muestra extraída de un sujeto tal como sangre, soluciones de cultivo de células y similares. Las células T auxiliares que reconocen el complejo se pueden obtener usando métodos conocidos por los expertos en la técnica tales como FACS y MACS.

10 Las células T auxiliares específicas de WT1 obtenidas se cultivan y se pueden usar para el tratamiento o la prevención de varios cánceres.

En consecuencia, la presente invención se refiere adicionalmente a células T auxiliares específicas de WT1 que se pueden obtener por el método para obtener células T auxiliares específicas de WT1 usando un complejo compuesto de un péptido auxiliar de WT1 y la molécula de MHC clase II.

20

Más aún, la presente invención se refiere a un kit para obtener células T auxiliares específicas de WT1 que comprenden un complejo compuesto de un péptido auxiliar de WT1 y la molécula de MHC clase II.

25 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para diagnosticar un cáncer usando células T auxiliares específicas de WT1, células presentadoras de antígeno que presentan un péptido auxiliar de WT1 por medio de la molécula de MHC clase II, o el anticuerpo WT1. Con

preferencia, se usan células T auxiliares específicas de WT1 en el método de la presente invención. Es posible diagnosticar cáncer, por ejemplo, por la incubación de células T auxiliares, células presentadoras de antígeno o el anticuerpo con una muestra extraída de un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II, o por la administración de células T auxiliares, células presentadoras de antígeno o el anticuerpo a un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II, y la posterior determinación, por ejemplo, de la ubicación, sitio, cantidad y similares de las células T auxiliares, las células presentadoras de antígeno o el anticuerpo. Las células T auxiliares, células presentadoras de antígeno o anticuerpo se pueden marcar. Por la marcación de estos, se puede realizar eficientemente el método de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para diagnosticar cáncer que comprende las células T auxiliares específicas de WT1, las células presentadoras de antígeno que despliegan un péptido auxiliar de WT1 por medio de la molécula de MHC clase II, o un anticuerpo contra el péptido auxiliar de WT1 o un anticuerpo contra el polinucleótido que codifica el péptido como ingrediente esencial.

La presente invención se describirá de manera específica y se describirá en detalle a continuación por medio de ejemplos, pero éstos no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

EJEMPLO 1

Selección del péptido WT1 candidato de unión a moléculas de MHC clase II

25

A fin de seleccionar las secuencias de péptidos que se unen a una molécula de MHC clase II, se usó un método mostrado por Rammensee et al. (Rammensee et al, Immunogenetics 41: 178-228,1995). En forma

específica, se realizó la selección por medio de los programas dados en la columna derecha del cuadro en combinación con las reglas por Rammensee et al. Por este método, los péptidos WT1₃₅ se limitaron a las secuencias de péptidos como se muestra en los cuadros 1 y 2, los péptidos WT1₈₆ a las secuencias de péptido mostradas en los cuadros 3 y 4, y los péptidos WT1₂₉₄, a las secuencias de péptido mostradas en los cuadros 5 y 6. En los cuadros 1 a 6, la columna izquierda muestra la "adecuación" como una secuencia de péptidos candidatos. El gran número de círculos indica la mayor adecuación a las reglas por Rammensee et al. Ninguna marca muestra mala adecuación.

10 También, el grupo de aminoácidos entre paréntesis en la columna "secuencias de péptidos candidatos de unión a la molécula de MHC clase II" en los cuadros 1 a 6 indica que se puede seleccionar cualquiera de los aminoácidos del grupo de aminoácidos listados en el paréntesis. Por ejemplo, la descripción [FLM] significa cualquiera de los aminoácidos F, L y M. También,

15 la descripción [VYI (AL)] significa que tanto alguno de los aminoácidos V, Y e I como algunos de los aminoácidos A y L. x indica que puede ser cualquier aminoácido. El "nombre del programa" en la columna derecha significa el programa usado para listar secuencias de péptidos candidatos.

CUADRO 1

Secuencias de péptidos candidatos de unión a varias moléculas de MHC de clase II (péptidos

Adecuación	Especie de molécula de MHC clase II	Secuencia de péptidos candidatos de unión a molécula de MHC Clase II	nombre del programa
○○○	DPA1*0102/DPB1*0201	[FLMVVY]xxx[FLMY]xx[IA]MV]	SYFPEITHI
○	DPA1*0103/DPB1*0201	[YLVFK]xx[DSQT]x[YFWV]xx[LV]	Marsh2000,Chicz1997
○	DPA1*0103/DPB1*0201	[FLM]xxx[FL]xx[IA]	Marsh2000,Rotzschko1994
○	DPA1*0201/DPB1*0401	[FLYMIVA]xxxxx[FLYMVIA]xx[VY][AL]	Marsh2000
○	DPA1*0201/DPB1*0401	[FLYMIVA]xxxxx[FLYMVIA]xx[VY][AL]	SYFPEITHI
○	DPA1*0201/DPB1*0301	[RK]xxxx[AGL]xx[LV]	Marsh2000
○	DPA1*0301	x[R]xxxxxx	Marsh2000
○	DQA1*0101/DQB1*0501	[L]xxx[YFM]	Marsh2000
○	DQA1*0102/DQB1*0602	xxxxx[LV][APST]xx[AGST][LVP]	Marsh2000
○	DQA1*0301/DQB1*0301	xx[AGST]x[AVL]	Marsh2000
○	DQA1*0301/DQB1*0301	[DEW]xx[AGST]x[ACLM]	SYFPEITHI
○	DQA1*0301/DQB1*0302	[RK]xxxx[AG]xx[NED]	Marsh2000
○	DQA1*0301/DQB1*0302	[TSW]xxxxxx[RE]	SYFPEITHI
○○○	DQA1*0501/DQB1*0201	[FWYILV]xx[DELVIH]x[PDEH][ED]x[FWYVILM]	Marsh2000
○○○	DQA1*0501/DQB1*0201	[FWYILV]xx[DELVIH]x[PDEH][DE]x[FWYILVM]	SYFPEITHI
○○○	DQA1*0501/DQB1*0301	[FYIMLV]xx[VLIMY]x[YFMLV]	Marsh2000
○	DQA1*0501/DQB1*0301	[WYAVM]xx[AL]x[AVTS]xxx[QN]	SYFPEITHI
○○○	DQB1*0602	[AFGILMNQSTVWYDE]x[AFGILMNQSTVWYDE][AFGILMNQSTVWY]x[LVAPST]xx[ASTGLVP]	SYFPEITHI
○○○	DRB1*0101	[YVLFIAHW]xx[LAIVMNQ]x[AGSTCP]xx[LAIVFYMW]	Marsh2000
○○○	DRB1*0101	[YVLFIAHW]xx[LAIVMNQ]x[AGSTCP]xx[LAIVNFY]	SYFPEITHI
○	DRB1*0102	[ILVM]xx[ALM]x[AGSTCP]xx[LAIVFYW]	Marsh2000
○	DRB1*0102	[ILVM]xx[ALM]x[AGSTP]xx[LAIVFYW]	SYFPEITHI
○	DRB1*0301	[LIFMV]xx[D]x[KREGN]xx[L]YLF	Marsh2000,Matczerek1993
○	DRB1*0301	[LIFMV]xx[D]x[KREGN]xx[YLF]	SYFPEITHI
○	DRB1*0301	[FILVY]xx[DNQT]	Marsh2000,Chicz1992
○	DRB1*0401	[FLV]xxxxxx[NGST]	Marsh2000
○○○	DRB1*0401	[FYWILVM]xx[FWILVADE]x[INSTOHR]xx[K]	Marsh2000,Friede1996
○	DRB1*0401	[FYW]xxxxxx[ST]	Marsh2000,Verreck1995
○○○	DRB1*0401	[FYWILVM]xx[PWILVADE]x[INSTOHR][DEHKNQSTYACILMV]x[DEHKNQSTYACILMV]	SYFPEITHI
○	DRB1*0402	[VILM]xx[FYWILMRNH]x[INSTOHR]x[RRHNP]x[H]	Marsh2000
○	DRB1*0402	[VILM]xx[FYWILMRNH]x[INSTOHR]x[RRHNP]x[H]	SYFPEITHI
○	DRB1*0404	[VILM]xx[FYWILVADE]x[INSTOHR]x[K]	Marsh2000
○	DRB1*0404	[VILM]xx[FYWILVADE]x[INSTOHR]x[K]	SYFPEITHI
○○○	DRB1*0405	[FYWVILM]xx[VILMDE]x[INSTQKD]xx[DEQ]	Marsh2000
○○○	DRB1*0405	[FYWVILM]xx[VILMDE]x[INSTQKD]xx[DEQ]	SYFPEITHI
○	DRB1*0405	[Y]xxxx[VT]xx[D]	Marsh2000
○○○	DRB1*0407	[FYW]xx[AVTK]x[NTDS]xxx[QN]	SYFPEITHI
○○○	DRB1*0407	[FYW]xx[AVK]x[NTDS]xxx[QN]	Marsh2000
○○○	DRB1*0407	[FYW]xx[AVK]x[NTDS]xxx[QN]	SYFPEITHI

47

CUADRO 2

Secuencias de péptidos candidatos de unión a varias moléculas de MHC de clase II (péptidos

WT135)

Adecuación	Especies de molécula MHC clase II	Secuencia de péptidos candidatos de unión a molécula de MHC clase II	nombre de programa
	DRB1*0701	[FILVY]xxxx[NST]	Marsh2000
○	DRB1*0701	[FYWLV]xx[DEHKQQRSTY]x[NST]xx[VILYF]	SYFPEITHI
	DRB1*0801	[FILVY]xxx[HKR]	Marsh2000
○	DRB1*0901	[YFWL]xx[AS]	Marsh2000
○○○	DRB1*0901	[WYFL]xx[AVS]	SYFPEITHI
○○○	DRB1*1101	[YF]xx[LVMAFY]x[RKH]xx[AGSP]	Marsh2000
○○○	DRB1*1101	[WYF]xx[LVMAFY]x[RKH]xx[AGSP]	SYFPEITHI
	DRB1*1101	[YF]xxxx[RK]x[RK]	Marsh2000
○○○	DRB1*1104	[ILV]xx[LVMAFY]x[RKH]xx[AGSP]	Marsh2000
○○○	DRB1*1104	[ILV]xx[LVMAFY]x[RKH]xx[AGSP]	SYFPEITHI
	DRB1*1201	[ILFY(V)]x[LMNVA]xx[VYFIN]xx[YFM(V)]	Marsh2000
	DRB1*1201	[ILFYV]x[LMNVA]xx[VYFINA]xx[YFM(V)]	SYFPEITHI
○	DRB1*1301	[IVF]xx[YWLVAM]x[RK]xx[YFAST]	Marsh2000
○	DRB1*1301	[ILV]xx[LVMAWY]x[RK]xx[YFAST]	SYFPEITHI
	DRB1*1301	[ILV]xxxx[RK]xx[Y]	Marsh2000
○	DRB1*1302	[YFVAI]xx[YWLVAM]x[RK]xx[YFAST]	Marsh2000
○	DRB1*1302	[YFVAI]xx[LVMAWY]x[RK]xx[YFAST]	SYFPEITHI
	DRB1*1302	[ILFY]xxxx[RK]xx[Y]	Marsh2000
○	DRB1*1501	[LV]xx[FY]xx[LVMF]	Marsh2000
○	DRB1*1501	[LV]xx[FY]xx[LVMF]	SYFPEITHI
	DRB1*1501	[LV]xxxxxx[HKR]	Marsh2000
○	DRB3*0202	[YFIL]xx[N]x[ASPDE]xx[LVISG]	Marsh2000
○	DRB3*0202	[YFIL]xx[N]x[ASPDE]xx[LVISG]	SYFPEITHI
○	DRB3*0301	[ILV]xx[N]x[ASPDE]xx[ILV]	Marsh2000
○	DRB3*0301	[ILV]xx[N]x[ASPDE]xx[ILV]	SYFPEITHI
○○	DRB5*0101	[FYLM]xx[QVIM]xxxx[RK]	Marsh2000
○○	DRB5*0101	[FYLM]xx[QVIM]xxxx[RK]	SYFPEITHI

28

CUADRO 3

Secuencias de péptidos candidatos de unión a varias moléculas de MHC de clase II

(péptidos WT135)

Especie de molécula MHC clase II		Secuencia de péptidos candidatos de unión a molécula de MHC clase II		nombre de programa
DPB1*0102/DPB1*0201	DPw2	unknown		Marsh2000
DPB1*0102/DPB1*0201	DPw2	{FLMVWY}-x-x-{FLMY}-x-x-[IAMV]		SYPPEITH-I
DPB1*0103/DPB1*0201	DPw2	{FLM}-x-x-x-{FL}-x-x-[A]		Marsh2000
DPB1*0103/DPB1*0201	DPw2	{VLVFK}-x-x-[DSOT]-x-x-[YFVV]-x-x-[LV]		Marsh2000
DPB1*0103/DPB1*0201	DPw2	unknown		SYPPEITH-I
DPB1*0103/DPB1*0201	DPw2	unknown		SYPPEITH-E
DPB1*0201/DPB1*0401	DPw4	{FLYM(VA)}-x-x-x-{FLYM(VA)}-x-x-[VYKAL]		Marsh2000
DPB1*0201/DPB1*0401	DPw4	{FLYM(VA)}-x-x-x-{FLYM(VA)}-x-x-[VYAL]		SYPPEITH-I
DPB1*0201/DPB1*0401	DPw4	{FLYM(VA)}-x-x-x-{FLYM(VA)}-x-x-[VYAL]		SYPPEITH-I
DPB1*0301	DPw3	x-[R]-x-x-x-x-x-x		Marsh2000
DPB1*0301	DPw3	desconocido		SYPPEITH-I
DPB1*0301/DPB1*0501	DPw3	{L}-x-x-x-x-[YFW]		Marsh2000
DPB1*0301/DPB1*0501	DPw3	desconocido		SYPPEITH-I
DPB1*0301/DPB1*0602	DPw3	x-x-x-x-x-[LIVAPST]-x-x-[AGST(LVP)]		SYPPEITH-I
DPB1*0301/DPB1*0301	DPw3	x-x-x-x-x-[AGST]-x-x-[AVLI]		Marsh2000
DPB1*0301/DPB1*0301	DPw3	{DEF}-x-x-x-[AGST]-x-x-[ACLM]		SYPPEITH-I
DPB1*0301/DPB1*0302	DPw3	{RK}-x-x-x-x-[AG]-x-x-[NED]		Marsh2000
DPB1*0301/DPB1*0302	DPw3	{ISW}-x-x-x-x-x-x-[RE]		SYPPEITH-I
DPB1*0501/DPB1*0201	DPw2	{FWYILV}-x-x-x-[DELVIH]-x-x-[POEHC]-[ED]-x-x-[FYWILM]		Marsh2000
DPB1*0501/DPB1*0201	DPw2	{FWYILV}-x-x-x-[DELVIH]-x-x-[POEHC]-[ED]-x-x-[FYWILM]		SYPPEITH-I
DPB1*0501/DPB1*0301	DPw3	{FYWILV}-x-x-x-[VLMY]-x-x-[YFMLV]		SYPPEITH-I
DPB1*0501/DPB1*0301	DPw3	{FYWILV}-x-x-x-[VLMY]-x-x-[YFMLV]		Marsh2000
DPB1*0602	DPw6	{AFGLIMNQSTVWYDE}-x-x-[AFGLIMNQSTVWYDE]-x-x-[LIVAPST]-x-x-[ASTGLVP]		SYPPEITH-I
DPB1*0101	DR1	{YFWILMV}-x-x-x-[LMAVNV]-x-x-[AGSTOP]-x-x-[LAIVNTMY]		Marsh2000
DPB1*0101	DR1	{YVLF(IAMV)}-x-x-x-[LAIVNV]-x-x-[AGSTOP]-x-x-[LAIVNTMY]		SYPPEITH-I
DPB1*0102	DR1	{ILVM}-x-x-x-[ALM]-x-x-[AGSTOP]-x-x-[LAMYW]		Marsh2000
DPB1*0102	DR1	{ILVM}-x-x-x-[ALM]-x-x-[AGSTOP]-x-x-[LAMYW]		SYPPEITH-I
DPB1*0301	DR17(3)	{LIFMV}-x-x-x-[D]-x-x-[KREQN]-x-x-[VLF]		Marsh2000
DPB1*0301	DR17(3)	{LIFMV}-x-x-x-[D]-x-x-[KREQN]-x-x-[VLF]		SYPPEITH-I
DPB1*0301	DR17(3)	{LIFMV}-x-x-x-[D]-x-x-[KREQN]-x-x-[VLF]		Marsh2000
DPB1*0301	DR17(3)	desconocido		SYPPEITH-I
DPB1*0401	DR4	{FLV}-x-x-x-x-x-x-x-[NQST]		Marsh2000
DPB1*0401	DR4	desconocido		SYPPEITH-I
DPB1*0401	DR4	{FYWILMV}-x-x-x-[FWILVADE]-x-x-[NSTQHR]-x-x-[K]		Marsh2000
DPB1*0401	DR4	{FYWILMV}-x-x-x-[FWILVADE]-x-x-[NSTQHR]-x-x-[K]		SYPPEITH-I
DPB1*0401	DR4	{FYWILMV}-x-x-x-[FWILVADE]-x-x-[NSTQHR]-x-x-[K]		Marsh2000
DPB1*0401	DR4	{FYWILMV}-x-x-x-[FWILVADE]-x-x-[NSTQHR]-x-x-[K]		SYPPEITH-I
DPB1*0402	DR4	{VLM}-x-x-x-[YFWILMRNH]-x-x-[INSTQHR]-x-x-[RKINOP]-x-x-[H]		Marsh2000
DPB1*0402	DR4	{VLM}-x-x-x-[YFWILMRNH]-x-x-[INSTQHR]-x-x-[RKINOP]-x-x-[H]		SYPPEITH-I

CUADRO 4

Secuencias de péptidos candidatos de unión a varias moléculas de MHC de clase II

(péptidos WT135)

Adecuación	Especies de molécula MHC clase II	Secuencia de péptidos candidatos de unión a molécula de MHC clase II	nombre de programa
○	DRB1*0404	DR4 [VILM]-x-x-[FYWLVMAD]-x-[NTSQR]-x-x-[K]	Marsh2000
○	DRB1*0404	DR4 [VILM]-x-x-[FYWLVMAD]-x-[NTSQR]-x-x-[K]	SYFPEITHI
○	DRB1*0405	DR4 [FYWLILM]-x-x-[VILMDE]-x-[NSTQKD]-x-x-x-[DEG]	Marsh2000
○	DRB1*0405	DR4 [FYWLILM]-x-x-[VILMDE]-x-[NSTQKD]-x-x-x-[DEG]	SYFPEITHI
○	DRB1*0405	DR4 [Y]-x-x-x-[IVT]-x-x-x-[D]	Marsh2000
○	DRB1*0405	DR4 desconocido	SYFPEITHI
○	DRB1*0407	DR4 [FYW]-x-x-[AVIK]-x-[NTDS]-x-x-x-[QN]	Marsh2000
○	DRB1*0407	DR4 [FYW]-x-x-[AVIK]-x-[NTDS]-x-x-x-[QN]	SYFPEITHI
○	DRB1*0701	DR7 [FILVY]-x-x-x-[NSI]	Marsh2000
○	DRB1*0701	DR7 [FYWLIV]-x-x-[DEHKNGRSTY]-x-[NSTI]-x-x-x-[ILLYF]	SYFPEITHI
○	DRB1*0801	DR8 [FILVY]-x-x-x-[HKR]	Marsh2000
○	DRB1*0801	DR8 desconocido	SYFPEITHI
○	DRB1*0901	DR9 [YFWL]-x-x-x-[AS]	Marsh2000
○	DRB1*0901	DR9 [WFR]-x-x-x-[AVS]	SYFPEITHI
○○	DRB1*1101	DR11(35) [YF]-x-x-x-[LYMAFY]-x-[RKH]-x-x-x-[AGSP]	Marsh2000
○○	DRB1*1101	DR11(5) [WVF]-x-x-x-[LYMAFY]-x-[RKH]-x-x-x-[AGSP]	SYFPEITHI
○	DRB1*1101	DRB3*0202DR11(5) [YF]-x-x-x-x-[RK]-x-[RK]	Marsh2000
○	DRB1*1104	DR11(5) [ILV]-x-x-x-[LYMAFY]-x-[RKH]-x-x-x-[AGSP]	Marsh2000
○	DRB1*1104	DR11(5) [ILV]-x-x-x-[LYMAFY]-x-[RKH]-x-x-x-[AGSP]	SYFPEITHI
○	DRB1*1201	DRB3 DR12(5) [ILFYV]-x-x-[LNMVA]-x-x-x-[VYFIH]-x-x-x-[YFMIV]	Marsh2000
○○	DRB1*1201	DRB3 DR12(5) [ILFYV]-x-x-[LNMVA]-x-x-x-[VYFIH]-x-x-x-[YFMIV]	SYFPEITHI
○	DRB1*1301	DR13(5) [IV]-x-x-x-[YMLVAM]-x-[RK]-x-x-x-[YFAST]	Marsh2000
○	DRB1*1301	DR13(5) [IV]-x-x-x-[YMLVAM]-x-[RK]-x-x-x-[YFAST]	SYFPEITHI
○	DRB1*1301	DRB3*0101DR13(5) [ILV]-x-x-x-x-[RK]-x-x-x-[Y]	Marsh2000
○	DRB1*1301	DRB3*0101DR13(5) desconocido	SYFPEITHI
○	DRB1*1302	DR13(5) [YFAI]-x-x-x-[YMLVAM]-x-[RK]-x-x-x-[YFAST]	Marsh2000
○	DRB1*1302	DR13(5) [YFAI]-x-x-x-[YMLVAM]-x-[RK]-x-x-x-[YFAST]	SYFPEITHI
○	DRB1*1302	DRB3*1301DR13(5) [ILFY]-x-x-x-x-[RK]-x-x-x-[Y]	Marsh2000
○	DRB1*1302	DRB3*1301DR13(5) desconocido	SYFPEITHI
○	DRB1*1501	DR15(2) [LV]-x-x-x-[FY]-x-x-x-[LVME]	Marsh2000
○	DRB1*1501	DR15(2) [LV]-x-x-x-[FY]-x-x-x-[LVME]	SYFPEITHI
○	DRB1*1501	DRB5*0101DR15(2) [LV]-x-x-x-x-x-x-x-x-[HQR]	Marsh2000
○○○	DRB3*0202	DR32 [YFIL]-x-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-x-[LVISG]	Marsh2000
○○○	DRB3*0202	DR32 [YFIL]-x-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-x-[LVISG]	SYFPEITHI
○○○	DRB3*0301	DR32 [ILV]-x-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-x-[LV]	Marsh2000
○○○	DRB3*0301	DR32 [ILV]-x-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-x-[LV]	SYFPEITHI
○	DRB5*0401	DR51 [FYLM]-x-x-x-[GVIM]-x-x-x-x-[RK]	Marsh2000
○	DRB5*0401	DR51 [FYLM]-x-x-x-[GVIM]-x-x-x-x-[RK]	SYFPEITHI

80

CUADRO 5

Secuencias de péptidos candidatos de unión a varias moléculas de MHC de clase II (péptidos

WT1_{aa})

Adecuación	Especies de molécula MHC clase II	Secuencia de péptidos candidatos de unión a molécula de MHC clase II	nombre de programa
○ ○	DPA1*0102/DPB1*0201	DPw2 unknown	Marsh2000
○ ○	DPA1*0102/DPB1*0201	DPw2 [FLMVWY]-x-x-x-[FLMY]-x-x-[IAMV]	SYFPEITHI
○	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2 [FLM]-x-x-x-[FL]-x-x-[IA]	Marsh2000
○	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2 [YLVFK]-x-x-[DSQT]-x-[YFWV]-x-x-[LVI]	Marsh2000
○ ○ ○	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2 desconocido	SYFPEITHI
○ ○ ○	DPA1*0103/DPB1*0201	DPw2 [FLY(MVA)]-x-x-x-x-x-[FLY(MVA)]-x-x-[VY(ΔL)]	SYFPEITHI
○ ○ ○	DPA1*0201/DPB1*0401	DPw4 [FLY(MVA)]-x-x-x-x-x-[FLY(MVA)]-x-x-[VY(ΔL)]	Marsh2000
○	DPA1*0201/DPB1*0401	DPw4 [RK]-x-x-x-[AGL]-x-x-[LV]	SYFPEITHI
○	DPB1*0301	DPw3 x-[R]-x-x-x-x-x-x-x	Marsh2000
○	DPB1*0301	DPw3 desconocido	SYFPEITHI
○	DQA1*0101/DQB1*0501	DQ5(1) [L]-x-x-x-[YFW]	Marsh2000
○	DQA1*0101/DQB1*0501	DQ5(1) desconocido	SYFPEITHI
○	DQA1*0102/DQB1*0602	DQ6(1) x-x-x-x-x-[LVAPS]-x-x-x-[AGST(LVP)]	Marsh2000
○	DQA1*0301/DQB1*0301	DQ7(3) x-x-[AGST]-x-[AVL]	Marsh2000
○	DQA1*0301/DQB1*0301	DQ7(3) [DEW]-x-x-x-[AGST]-x-[ACLW]	SYFPEITHI
○	DQA1*0301/DQB1*0302	DQ8(3) [RK]-x-x-x-x-[AG]-x-x-[NEQ]	SYFPEITHI
○ ○ ○	DQA1*0301/DQB1*0302	DQ8(3) [TSW]-x-x-x-x-x-x-[RE]	Marsh2000
○ ○ ○	DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2 [FWYLV]-x-x-x-[DELVIH]-x-[PDEHE]-ED-x-[FYWILM]	SYFPEITHI
○ ○ ○	DQA1*0501/DQB1*0201	DQ2 [FWYLV]-x-x-x-[DELVIH]-x-[PDEHPA]-[DE]-x-[FWYILVM]	SYFPEITHI
○ ○ ○	DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3) [FYMLV]-x-x-x-[VLMY]-x-[YFMLV]	Marsh2000
○ ○ ○	DQA1*0501/DQB1*0301	DQ7(3) [WYAVM]-x-x-x-[A]-x-[AVTS]-x-x-x-[QN]	SYFPEITHI
○ ○ ○	DQB1*0602	DQ6(1) [AFCLMNOSTVWYDE]-x-x-[AFGLMNGSTVWYDCE]-[AFGLMNGSTVWY]-x-x-[LVAPS]-x-x-[ASTGLVP]	SYFPEITHI
○ ○ ○	DRB1*0101	DR1 [YFWILMV]-x-x-x-[LMAIVN]-x-[AGSTCP]-x-x-[LAVNFYMW]	Marsh2000
○ ○ ○	DRB1*0101	DR1 [YVLFIAMV]-x-x-x-[LAVMNQ]-x-[AGSTCP]-x-x-[LAVNFY]	SYFPEITHI
○ ○ ○	DRB1*0102	DR1 [ILVM]-x-x-x-[ALM]-x-[AGSTCP]-x-x-[LAMYW]	Marsh2000
○ ○	DRB1*0102	DR1 [ILVM]-x-x-x-[ALM]-x-[AGSTP]-x-x-[LAMYW]	SYFPEITHI
○ ○	DRB1*0301	DR17(3) [LIFMV]-x-x-x-[D]-x-[KREQN]-x-[L]-[YLF]	Marsh2000
○ ○	DRB1*0301	DR17(3) [LIFMV]-x-x-x-[D]-x-[KREQN]-x-x-[YLF]	SYFPEITHI
○ ○	DRB1*0301 ○ DRB3*0201	DR17(3) [LILVY]-x-x-x-[DNQT]	Marsh2000
○ ○	DRB1*0301 ○ DRB3*0201	DR17(3) desconocido	SYFPEITHI
○ ○	DRB1*0401	DR4 [FLV]-x-x-x-x-x-x-x-[NQST]	SYFPEITHI
○ ○	DRB1*0401	DR4 desconocido	Marsh2000
○ ○ ○	DRB1*0401 ○ DRB4	DR4 [FYWILVM]-x-x-x-[FWILVAD]-x-x-[NSTQHR]-x-x-[K]	Marsh2000
○ ○	DHB1*0401 ○ DRB4*0101	DR4 [FYW]-x-x-x-x-x-x-x-[ST]	SYFPEITHI
○ ○ ○	DRB1*0401 ○ DRB4*0101	DR4 [FYWILVM]-x-x-x-[FWILVAD]-x-x-[NSTQHR]-[DEHKNORSTYACLMV]-x-[DEHKNORSTYACLMV]	SYFPEITHI
○ ○ ○	DRB1*0402 ○ DRB4	DR4 [VILM]-x-x-x-[FWILMRNH]-x-x-[NSTQHK]-x-[RKHNOP]-x-x-[H]	Marsh2000
○ ○ ○	DRB1*0402 ○ DRB4	DR4 [VILM]-x-x-x-[FWILMRNH]-x-x-[NQSTK]-[RKHNOP]-x-x-[DEHKNORSTYACLMVHA]	SYFPEITHI

51

CUADRO 6

Secuencias de péptidos candidatos de unión a varias moléculas de MHC de clase II (péptidos

WT135)

Adecuación	Especies de molécula MHC clase I	Secuencia de péptidos candidatos de unión a molécula de MHC clase II	nombre de programa
○	DRB1*0404	DR4 [VILM]-x-x-[FYWLVMAD]-x-[NTSQK]-x-x-[K]	Marsh2000
○	DRB1*0404	DR4 [VILM]-x-x-[FYWLVMAD]-x-[NTSQK]-x-x-[K]	SYFPEITHI
○○○	DRB1*0405	DR4 [FYWVILM]-x-x-[VILMDE]-x-[NSTQKD]-x-x-x-[DEQ]	Marsh2000
○○○	DRB1*0405	DR4 [FYWVILM]-x-x-[VILMDE]-x-[NSTQKD]-x-x-x-[DEQ]	SYFPEITHI
○	DRB1*0405	DR4 [Y]-x-x-x-x-[VT]-x-x-x-[D]	Marsh2000
○	DRB1*0405	DR4 desconocido	SYFPEITHI
○○○	DRB1*0407	DR4 [FYW]-x-x-x-[AVTK]-x-[NTDS]-x-x-x-[ON]	Marsh2000
○○○	DRB1*0407	DR4 [FYW]-x-x-x-[AVTK]-x-[NTDS]-x-x-x-[ON]	SYFPEITHI
○	DRB1*0701	DR7 [FILV]-x-x-x-x-[NST]	Marsh2000
○	DRB1*0801	DR7 [FYWLVL]-x-x-x-[DEHKGNORSTY]-x-[NST]-x-x-x-[VILYF]	SYFPEITHI
○	DRB1*0801	DR8 [FILV]-x-x-x-x-[HKR]	Marsh2000
○	DRB1*0801	DR8 desconocido	SYFPEITHI
○	DRB1*0801	DR9 [YFWL]-x-x-[AS]	Marsh2000
○	DRB1*0801	DR9 [WYFL]-x-x-[AVS]	SYFPEITHI
○○○	DRB1*1101	DR11(5) [YF]-x-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	Marsh2000
○○○	DRB1*1101	DR11(5) [YF]-x-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	SYFPEITHI
○○○	DRB1*1101	DR11(5) [YF]-x-x-x-[RK]-x-[RK]	Marsh2000
○	DRB1*1104	DR11(5) [ILV]-x-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	Marsh2000
○	DRB1*1104	DR11(5) [ILV]-x-x-x-[LVMAFY]-x-[RKH]-x-x-[AGSP]	SYFPEITHI
○○	DRB1*1201	DR12(5) [ILFYV]-x-x-[LVMAFY]-x-x-[VYFPI]-x-x-x-[YFMIV]	Marsh2000
○○	DRB1*1201	DR12(5) [ILFYV]-x-x-[LVMAFY]-x-x-[VYFPI]-x-x-x-[YFMIV]	SYFPEITHI
○	DRB1*1301	DR13(6) [IVF]-x-x-x-[YWLVA]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	Marsh2000
○	DRB1*1301	DR13(6) [ILV]-x-x-x-[LVMAFY]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	SYFPEITHI
○	DRB1*1301	DR13(6) [ILV]-x-x-x-[LVMAFY]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	Marsh2000
○	DRB1*1301	DR13(6) [ILV]-x-x-x-[LVMAFY]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	SYFPEITHI
○	DRB1*1302	DR13(6) [YFAI]-x-x-x-[YWLVA]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	Marsh2000
○	DRB1*1302	DR13(6) [YFAI]-x-x-x-[LVMAFY]-x-[RK]-x-x-[YFAST]	SYFPEITHI
○	DRB1*1302	DR13(6) [ILFY]-x-x-x-x-[RK]-x-x-[Y]	Marsh2000
○	DRB1*1302	DR13(6) desconocido	SYFPEITHI
○○	DRB1*1501	DR15(2) [LV]-x-x-x-[FY]-x-x-x-[LVMAFY]	Marsh2000
○○	DRB1*1501	DR15(2) [LV]-x-x-x-[FY]-x-x-x-[LVMAFY]	SYFPEITHI
○	DRB1*1501	DR15(2) [LV]-x-x-x-[FY]-x-x-x-[LVMAFY]	Marsh2000
○○○	DRB3*0202	DR11(5) [YF]-x-x-x-x-[RK]-x-[RK]	Marsh2000
○○○	DRB3*0202	DR11(5) [YF]-x-x-x-x-[RK]-x-[RK]	SYFPEITHI
○	DRB3*0301	DR52 [YFIL]-x-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-x-[LVISG]	Marsh2000
○	DRB3*0301	DR52 [YFIL]-x-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-x-[LVISG]	SYFPEITHI
○	DRB3*0301	DR52 [ILV]-x-x-x-[N]-x-[ASPDE]-x-x-x-[LVISG]	Marsh2000
○○○	DRB5*0101	DR51 [FYLM]-x-x-x-[GVIM]-x-x-x-x-[RK]	SYFPEITHI
○○○	DRB5*0101	DR51 [FYLM]-x-x-x-[GVIM]-x-x-x-x-[RK]	Marsh2000

52

S

Enseguida, se seleccionaron los péptidos de WT1 candidatos de los cuadros 1 a 6 por observación visual. Los péptidos que se muestran en el siguiente cuadro 7 se identificaron como péptidos candidatos deseables para las moléculas de MHC clase II. Como se describe a continuación, se analizaron las funciones reales para estos péptidos.

CUADRO 7

Identificación del candidato de péptido de la molécula de MHC clase II de ratón

10

WT1 35	WAPVLDFA	PPGASAYGSL (SEQ ID NO:3)	18 mer	PM 1819.01
WT1 86	EQCLSAFTL	HFSGQFTG (SEQ ID NO: 6)	17 mer	PM 1944.01
WT1 294	FRGIQDVRRV	SGVAPTLVR (SEQ ID NO: 7)	19 mer	PM 2126.48

15

Preparación de líneas celulares específicas del péptido WT1 y medición de la capacidad de proliferación celular

20

En primer lugar, los péptidos WT1 se emulsionaron con adyuvante de Freund incompleto (Montanide ISA51) y posteriormente, 100 µg/ratón de cada péptido WT1 se inyectaron por vía intradérmica a ratones. La inmunización se realizó tres veces por semana, una semana después de la última inmunización se extirpó el bazo y se prepararon las células del bazo. Las células del bazo se estimularon con el mismo péptido WT1 que se usó en la inmunización de cada ratón tres veces en intervalos de 10 días usando las células del bazo de ratones irradiados y no inmunizados como estimuladores.

25

Después, la cuarta estimulación se llevó a cabo usando células del bazo de ratones no inmunizados, que se pulsaron con cada péptido (péptido WT1₃₅, WT1₈₆ o WT1₂₉₄) como se muestra en el cuadro 7 y posteriormente, se determinó la respuesta proliferativa para cada estimulador con experimentos

de la incorporación de ^3H usando las células de bazo de los ratones irradiados y no inmunizados como estimuladores. El péptido de OVA (ovoalbúmina), que es irrelevante para los péptidos WT1, se usó como péptido control. Como resultado, las células del bazo del ratón inmunizadas con un péptido WT1₃₅,
5 péptido WT1₈₆ y péptido WT1₂₉₄ respondieron cada una al estimulador pulsado con un péptido WT1₃₅, un péptido WT1₈₆ o un péptido WT1₂₉₄, respectivamente, y proliferaron (figura 1A a 1C).

Como se describió anteriormente, las células del bazo se pulsaron con cada péptido de WT1 tres veces con intervalos de 10 días *in vitro* usando las células del bazo de ratones irradiados y no inmunizados como
10 estimuladores. En la cuarta estimulación, las células del bazo se pulsaron con el péptido anterior. Cuando se determinó la respuesta proliferativa a cada estimulador con experimentos de incorporación de ^3H usando las células del bazo de los ratones irradiados y no inmunizados como estimuladores, se
15 añadió anticuerpo de MHC clase I (anticuerpo D^b) o anticuerpo de MHC clase II (anticuerpo A^b) a la solución de cultivo para medir la incorporación del ^3H . Como resultado, las respuestas de proliferación a los estimuladores pulsados con el péptido WT1₃₅, el péptido WT1₈₆ y el péptido WT1₂₉₄ respectivos se suprimieron por la adición del anticuerpo de MHC clase II (figuras 2A a 2C).

20 Como se describió antes, las células del bazo se pulsaron con cada péptido de WT1 *in vitro* tres veces con intervalos de 10 días usando las células del bazo de los ratones irradiados y no inmunizados como estimuladores. Las células C1498 irradiadas que no expresan la proteína de WT1, las células C1498 se pulsaron con cada péptido de WT1 que se
25 describió anteriormente, o las células C1498 obtenidas para expresar la proteína de WT1 por la introducción del gen WT1, se usaron como estimuladores para medir la respuesta de proliferación por la incorporación de ^3H . Como resultado, las respuestas de proliferación se produjeron en las

células C1498 pulsadas con el mismo péptido de WT1 que el péptido de WT1 inmunizado *in vivo* y las células C1498 obtenidas para expresar la proteína de WT1 por la introducción del gen WT1 (figura 3). Esto reveló que el péptido WT1₃₅, el péptido WT1₈₆ y el péptido WT1₂₉₄ se generaron por el procesamiento intracelular de la proteína de WT1 endógena y se presentaron en las moléculas de MHC clase II. En consecuencia, esto indica que las tres clases de péptidos de WT1 son péptidos de WT1 restringidos para MHC de clase II.

10 Medición de la capacidad de producción de IFN γ

Como se describió anteriormente, las células del bazo se pulsaron con cada péptido de WT1 tres veces con intervalos de 10 días *in vitro* usando las células del bazo de los ratones irradiados y no inmunizados como estimuladores. Posteriormente, se midieron las concentraciones de IFN- γ e IL-4 en el sobrenadante del cultivo usando un kit de ELISA (BIOSOURCE Immunoassay Kit, Invitrogen). Como resultado, las células del bazo de dos ratones separados respondieron a las células del bazo de los ratones irradiados y no inmunizados que se pulsaron con cada péptido de WT1. Posteriormente, las células del bazo produjeron interferón γ , pero no produjeron interleuquina 4 (figura 4). Esto indica que las tres clases de péptidos de WT1 inducen una actividad de las células T auxiliares específicas de WT1 que pertenecen al tipo Th1.

EJEMPLO 2

25 Medición de células T citotóxicas específicas de WT1 (CTL)

Los ratones se inmunizaron tres veces con el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I) solo, el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I) + el péptido WT1₃₅ (MHC

clase II), el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I) + el péptido WT1₈₆ (MHC clase II), o el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I) + el péptido WT1₂₉₄ (MHC clase II), y se prepararon las células del bazo de los ratones. A los seis días después de estimular las células de bazo con el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I) una vez *in vitro*, se ensaya la actividad citotóxica usando las células de RMAS pulsadas con el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I) como célula blanco. Como control, se usaron las células de RMAS no pulsadas con el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I). Como resultado, las células del bazo del ratón inmunizado con el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I) + el péptido auxiliar de WT1 (MHC clase II) indujeron células T citotóxicas específicas de WT1 más fuertemente en comparación con las células del bazo del ratón inmunizado con el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I) solo (figura 5). Esto ilustra que las tres clases de péptidos de WT1 (MHC clase II) son péptidos auxiliares específicos de WT1.

15

EJEMPLO 3

Experimento de implante del tumor

Células de leucemia C1498 que expresan WT1 se implantaron en forma subcutánea a ratones en una proporción de $2,5 \times 10^5$ células por ratón. Una semana después, se administró por vía intradérmica una vez por semana un total de tres veces, 50 μ g/ratón del péptido auxiliar WT1₃₅ con adyuvante de Freund incompleto (figura 6). Como control, se administró por vía intradérmica solución fisiológica en vez del péptido auxiliar WT1₃₅ con adyuvante de Freund incompleto. Mediante mediciones sucesivas del diámetro del tumor subcutáneo, se calculó la tasa de supervivencia sin enfermedad hasta 29 días después del implante subcutáneo. Como resultado, en el grupo control, los tumores se expandieron en todos los animales. A la inversa, en el grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1₃₅ (MHC clase II),

el crecimiento del tumor se suprimió por completo en cuatro de diez animales (figura 7). Se observó una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1₃₅ y el grupo control (figura 8). Esto indica que el péptido auxiliar WT1₃₅ (MHC clase II) es un péptido de WT1 que

5 tiene una capacidad de inducir inmunidad tumoral *in vivo*.

A continuación, se disecaron ratones 29 días después de que comenzó el experimento anterior. Se extirpó el bazo, y las células del bazo se usaron para analizar la respuesta inmune específica de WT1. En breves palabras, en la disección de ratones del grupo inmunizado con el péptido

10 auxiliar WT1₃₅ (MHC clase II) y el grupo control, se extirpó el bazo para preparar las células del bazo. Las células del bazo se estimularon una vez con el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I). A 6 días a partir de este momento, se midió la actividad citotóxica de las células del bazo usando las células de RMA84 pulsadas con el péptido de WT1₁₂₆ (MHC clase I) como una célula blanco.

15 Como control, se usaron células de RMA84 para medir la actividad citotóxica de las células de bazo. Como resultado, en los ratones del grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1₃₅ (MHC clase II), se indujeron las células T citotóxicas específicas de WT1 en los cuatro animales (figura 9). Mientras tanto, en tres ratones del grupo control, las células T citotóxicas específicas de

20 WT1 se indujeron en forma extremadamente débiles (figura 10). En un animal, no se observaron células citotóxicas específicas de WT1. En efecto, la inducción de las células citotóxicas específicas de WT1 en los ratones del grupo control fue menor que en el grupo inmunizado con el péptido auxiliar WT1₃₅ (MHC clase II) (figuras 9 y 10). Esto muestra que las células T

25 auxiliares específicas de WT1 inducidas con la administración del péptido auxiliar de clase II WT1₃₅, y que las células T citotóxicas específicas de WT1, que fueron inducidas en la respuesta inmune a la proteína de WT1 expresada por las células tumorales trasplantadas, proliferaron fuertemente *in vivo* por

dichas células T auxiliares específicas de WT1. Este resultado indica la utilidad del péptido auxiliar WT1₃₅.

Enseguida, se analizó la citólisis específica en los ratones anteriores del grupo inmunizado con péptido auxiliar WT1₃₅ (MHC clase II) y el grupo control. En pocas palabras, se definió la lisis específica (%) como el grado de citólisis (%) obtenido al sustraer la tasa de citólisis (%) cuando las células de RMA-S actuaron como célula blanco a partir de la tasa de citólisis (%) cuando las células de RMA-S pulsadas con el péptido WT1₁₂₆ (MHC clase I) actuó como célula blanco en el experimento anterior (figura 11, izquierda).

Además, las células del bazo preparadas anteriormente y el tetrámero de WT1 marcado con fluorescencia (H-2Db WT1 Tetramer-RFMPNAPYL-PE) se incubaron a 4°C durante 20 minutos, se lavaron, luego se tiñeron con anticuerpo CD3 marcado con fluorescencia y anticuerpo CD8, se lavaron nuevamente, y analizaron por FACS. Las células positivas a CD3, positivas a CD8, positivas al tetrámero WT1 se definieron como células citotóxicas específicas de WT1 (figura 11, derecha). Como resultado, la lisis específica de las células del bazo del grupo de inmunizado con el péptido auxiliar WT1₃₅ (MHC clase II) fue significativamente mayor que la de un ratón del grupo control ($p < 0,05$). Esto indica que se indujeron las células T citotóxicas específicas de WT1 (figura 11).

EJEMPLO 4

Medición de la capacidad de proliferación de las células T citotóxicas específicas de WT1 (CTL) en seres humanos

5 Las células mononucleares de sangre periférica se prepararon a partir de seis sujetos sanos que tenían moléculas de la subclase DRB1, DPB1, DQB1 o DRB5 como se muestra en la figura 12. El péptido auxiliar WT1₃₅ se añadió a las células mononucleares de sangre periférica, que se cultivaron durante una semana. Posteriormente, las células mononucleares de

10 sangre periférica se pulsaron con el péptido auxiliar WT1₃₅. Las células se estimularon en forma semanal durante un total de cuatro veces usando células mononucleares de sangre periférica irradiadas de la persona idéntica como estimuladores. A los 6 días, se analiza la incorporación de ³H. Las células mononucleares de sangre periférica respondieron al péptido auxiliar

15 WT1₃₅ y proliferaron en los seis sujetos sanos (figura 12). Esto demostró que el péptido auxiliar WT1₃₅ tiene la función de unión a la molécula HLA de clase II e inducción de una respuesta de proliferación. Además, como se muestra en el cuadro 8, el péptido WT1₈₆ y el péptido WT1₂₉₄ de ratón difieren del péptido WT1₈₆ (SEQ ID NO: 4) y el péptido WT1₂₉₄ (SEQ ID NO: 5) humanos en una

20 secuencia de aminoácidos en la ubicación de los péptidos encerrados en el rectángulo.

CUADRO 8

Diferencias en secuencias entre los péptidos WT1₃₅, WT1₈₆ y WT1₂₉₄ en seres humanos y ratones

mWT 1 ₃₅	ratón	VAPVLDFA	PPGASAYGSL (SEQ ID NO :3)	18 - mer
hWT 1 ₃₅	humano	VAPVLDFA	PPGASAYGSL (SEQ ID NO :3)	
mWT 1 ₈₆	ratón	EQCLSAFT	LHFSGQFTG (SEQ ID NO :6)	17 - mer
hWT 1 ₈₆	humano	EQCLSAFT	VHFSGQFTG (SEQ ID NO :4)	
mWT 1 ₂₉₄	ratón	FRGQDVRRV	SGVAPTLVR (SEQ ID NO :7)	19 - mer
hWT 1 ₂₉₄	humano	FRGQDVRRV	PGVAPTLVR (SEQ ID NO :5)	

EJEMPLO 5

La molécula de HLA de clase II restrictiva del péptido WT1₃₅

Para determinar las moléculas de HLA de clase II restrictiva del péptido WT1₃₅, los inventores realizaron los siguientes experimentos usando métodos bien conocidos en la técnica, como se describe a continuación. En primer lugar, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) derivadas de un sujeto sano [sujeto sano positivo para DRB1*0101/0405, DPB1*0201/0402 y DQB1*0401/0501 (de aquí en adelante denominado "sujeto sano A")] se estimuló con péptido WT1₃₅ cinco veces para preparar un receptor. Luego, los PBMC derivados de otro sujeto sano [sujeto sano positivo para DRB1*0405/0901, DPB1*0201/0501 y DQB1*0303/0401 (de aquí en adelante denominado "sujeto sano B")] que tiene diferente tipo de MHC clase II del sujeto sano A se pulsó con el péptido WT1₃₅ para obtener un estimulador. Y, se determinó la proliferación celular [la cantidad de ³H-timidina incorporada (cpm)]. La determinación se realizó en la condición de la ausencia de un anticuerpo, una adición de un anticuerpo anti-HLA-DR (+a-DR), una adición de un anticuerpo anti-HLA-DP (+a-DP), o una adición de un anticuerpo

anti-HLA-DQ (+a-DQ). Si el receptor y el estimulador son positivos a tipo HLA clase II y tienen tipo HLA clase II común, se considera al péptido WT1₃₅ como péptido restringido de la molécula de HLA clase II común. El resultado experimental mostró que la proliferación celular se suprimió con la adición de un anticuerpo anti-HLA-DR, como se muestra en la figura 13, en forma adicional, el sujeto sano A y el B tienen en común que son positivos para DRB1*0405. En consecuencia, el experimento anterior indica que el péptido WT1₃₅ es restringido para DRB1*0405.

Enseguida, con la excepción del derivado de PBMC de un sujeto sano diferente [sujeto sano positivo para DRB1*0405/0803, DPB1*0202/0501 y DQB1*0401/0601 (de aquí en adelante en la presente, denominado "sujeto sano G")] del sujeto sano A que se usó como un estimulador, el experimento se realizó en las mismas condiciones que el experimento anterior. El resultado experimental mostró que la proliferación celular se suprimió en la condición de una adición de un anticuerpo anti-HLA-DR o un anticuerpo anti-HLA-DP, como se muestra en la figura 14 en forma adicional, los sujetos sanos A y G tienen en común que son positivos para DRB1*0405, DPB1*0201 y DPB1*0202 (DPB1*0201 y DPB1*0202 tienen altas semejanzas y muestran una reacción cruzada). En consecuencia, el anterior experimento indica que el péptido WT1₃₅ está restringido en DRB1*0405-, DPB1*0201-, y DPB1*0202.

Enseguida, con la excepción de que los PBMC derivados de un sujeto sano diferente [sujetos sanos positivos para DRB1*0101/0803, DPB1*0501/- y DQB1*0501/0601 (de aquí en adelante, denominado "sujeto sano H")] del sujeto sano A se usó como un estimulador, el experimento se realizó en las mismas condiciones que el experimento anterior. El resultado experimental mostró que la proliferación celular se suprimió en la condición de una adición de un anticuerpo anti-HLA-DR, como se muestra en la fig. 15 en forma adicional, los sujetos sanos A y H tienen en común que son positivos

para DRB1*0101. En consecuencia, el anterior experimento indica el péptido WT1₃₅ es restringido para DRB1*0101.

Más aún, para determinar la molécula de MHC de clase II restrictiva del péptido de WT1₃₅, los PBMC derivados del sujeto sano G se usaron como receptor y las células L con el gen de DQB1*0601 introducido se usó como un estimulador. Se midió la diferencia de la cantidad de IFN-γ en presencia y ausencia del pulso con el péptido de WT1₃₅ en la célula L. Se midió el porcentaje de producción de IFN-γ intracelular usando FACS que es conocido en la técnica. El resultado mostró que el receptor se activó por pulsado de la célula L con el péptido WT1₃₅, como se muestra en la figura 16 esto indica que el péptido WT1₃₅ es restringido para DQB1*0601.

Enseguida, el anterior experimento se realizó usando el mismo sujeto sano como un receptor y un estimulador. El siguiente cuadro 9 se sintetiza para los tipos de moléculas de HLA de clase II de los sujetos sanos usados en el presente experimento.

CUADRO 9

Tipos de moléculas de HLA de clase II de sujetos sanos usados en el presente experimento

20

25

No de sujetos sanos	DRB1	DPB1	DQB1
A	*0101/0405	*0201/0402	*0401/0501
B	*0405/0901	*0201/0501	*0303/0401
C	*0802/1201	*0201/0501	*0301/0302
D	*1502/1502	*0201/0901	*0601/0601
E	*0405/0901	*0202/0501	*0303/0401
F	*1403/1502	*0201/0901	*0301/0601
G	*0405/0803	*0202/0501	*0401/0601
H	*0101/0803	*0501/ -	*0501/0601

5

Como resultado, cuando se realizó el experimento anterior usando los PBMC derivados de los sujetos sanos A-E, disminuyó la cantidad de ^3H -timidina incorporada (cpm) en la condición de una adición de un anticuerpo anti-HLA-DR o un anticuerpo anti-HLA-DP. Esto indica que se

10 suprimió la proliferación celular. Además, cuando se usaron los PBMC derivados del sujeto sano F, la proliferación celular se suprimió en la condición de una adición de un anticuerpo anti-HLA-DR. Además, cuando se usaron los PBMC derivados del sujeto sano G, la proliferación celular se suprimió en la condición de una adición de un anticuerpo anti-HLA-DP. Por medio del

15 experimento que usa el sujeto sano A, se indica que el péptido WT1₃₅ está restringido para DRB1*0101- o DRB1*0405 y restringido para DPB1*0201- o DPB1*0402. Por medio del experimento que usa el sujeto sano B, se indica que el péptido WT1₃₅ está restringido para DRB1*0405- o DRB1*0901 y restringido para DPB1*0201 o DPB1*0501. Por medio del experimento que

20 usa el sujeto sano C, se indica que el péptido WT1₃₅ está restringido DRB1*0802 o DRB1*1201 y restringido para DPB1*0201 o DPB1*0501. Por medio del experimento que usa el sujeto sano D, se indica que el péptido WT1₃ está restringido para DRB1*1502 porque el gen de DRB1*1502 es homocigota (fig. 17). En forma adicional, se indica que el péptido WT1₃₅ está

25 restringido para DPB1*0201 o DPB1*0901. Por medio del experimento que usa el sujeto sano E, se indica que el péptido WT1₃₅ está restringido para DRB1*0405 o DRB1*0901 y restringido DPB1*0202 o DPB1*0505. Por medio del experimento que usa el sujeto sano F, se indica que el péptido WT1₃₅ está

restringido para DRB1*1403 o restringido para DRB1*1502. Por medio del experimento que usa el sujeto sano G, se indica que el péptido WT1₃₅ está restringido para DPB1*0202- o DPB1*0501.

5 También, se midió la diferencia de la cantidad de IFN- γ en presencia y ausencia del pulso con el péptido WT1₃₅ usando las PBMC derivadas del sujeto sano I como un receptor y un estimulador. Se midió el porcentaje de producción de IFN- γ intracelular usando el FACS que es conocido en la técnica. El resultado mostró que el porcentaje de la cantidad de IFN- γ estaba significativamente aumentado por el pulsado con el péptido

10 WT1₃₅, como se muestra en la figura 18. Se indica que el péptido WT1₃₅ está restringido para DRB1*0101-, DRB1*1501-, DPB1*0201-, DPB1*0402-, DQB1*0501-, o DQB1*0602

Aplicabilidad industrial

15 La presente invención provee un péptido WT1 que es restringido a muchos tipos de péptidos WT1 de moléculas de MHC clase II, un polinucleótido que codifica el péptido, una composición farmacéutica que comprende las mismos y similares. En consecuencia, las presentes invenciones se pueden usar en el campo de farmacia, por ejemplo, en el

20 campo de desarrollo y preparación de fármacos profilácticos o terapéuticos para una variedad de tumores de órgano hematopoyético y tumores sólidos que expresan el gen WT1 en niveles altos.

[Texto libre de listado de secuencias]

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste de aminoácidos contiguos derivados de una proteína de WT1 e para induce células T auxiliares específicas de WT1 por unión a una molécula de MHC clase II, en donde la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste de: (a) la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID
- 10 NO: 3; (b) la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 4; (c) la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 5; y (d) una secuencia de aminoácidos que tiene uno o varios aminoácidos que son sustituidos, suprimidos o adicionados en las secuencias de aminoácidos indicadas en (a) a (c).
- 15 2.- El péptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque la secuencia de aminoácidos es la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 3.
- 3.- El péptido de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado además porque la molécula de MHC clase II se selecciona del
- 20 grupo que consiste de DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*0802, DRB1*0803, DRB1*0901, DRB1*1201, DRB1*1403, DRB1*1501, DRB1*1502, DPB1*0201, DPB1*0202, DPB1*0402, DPB1*0501, DPB1*0901, DQB1*0301, DQB1*0302, DQB1*0401, DQB1*0501, DQB1*0601, DQB1*0602, y DRB5*0102.
- 4.- El péptido de conformidad con la reivindicación 1 ó 2,
- 25 caracterizado además porque la molécula de MHC de clase II se selecciona del grupo que consiste de DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*1502, DPB1*0201, DPB1*0202, y DQB1*0601.
5. - Un polinucleótido que codifica el péptido de cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 4.

6.- Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5.

7.- Un anticuerpo contra el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el polinucleótido de la reivindicación 5.

8.- Una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer, que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el polinucleótido de la reivindicación 5 o el vector de la reivindicación 6.

9.- Un método para tratar o prevenir un cáncer, que comprende administrar una dosis efectiva del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el polinucleótido de la reivindicación 5 o el vector de la reivindicación 6, a un sujeto que tiene la molécula de MHC de clase II de la reivindicación 3 ó 4.

10.- El uso del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el polinucleótido de la reivindicación 5 o el vector de la reivindicación 6, para el tratamiento o prevención de cáncer.

11.- Células presentadoras de antígeno que despliegan el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 por medio de la molécula de MHC de clase II de las reivindicaciones 3 ó 4.

12.- Un método para inducir células presentadoras de antígeno, que comprende: cultivar células presentadoras de antígeno inmaduras en presencia del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, e inducir células presentadoras de antígeno que despliegan el péptido por medio de la molécula de MHC de clase II de las reivindicaciones 3 ó 4, a partir de las células presentadoras de antígeno inmaduras.

13.- Células T auxiliares específicas de WT1 que son inducidas por el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

14.- Un método para inducir células T auxiliares específicas de

WT1, que comprende: cultivar células mononucleares de sangre periférica en presencia del péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, e inducir las células T auxiliares específicas de WT1 a partir de las células mononucleares de sangre periférica.

- 5 15.- Un kit para inducir células T auxiliares específicas de WT1, que comprende, como ingrediente esencial, el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

- 16.- Un kit para prevenir o tratar cáncer, el kit comprendiendo, como un ingrediente esencial, el péptido de cualquiera de las reivindicaciones
10 1 a 4, el polinucleótido de la reivindicación 5, o el vector de la reivindicación 6.

- 17.- Un método para determinar la presencia o la cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto que tiene la molécula de MHC clase II de las reivindicaciones 3 ó 4, el método comprendiendo las etapas: (a) hacer reaccionar el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1
15 a 4 con una muestra derivada del sujeto, y después (b) examinar la presencia o la cantidad de citoquina incluida en la muestra.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un péptido de WT1 que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste de aminoácidos contiguos
5 derivados de una proteína WT1 e induce células T auxiliares específicas de WT1 por la unión de una molécula de MHC clase II, una composición farmacéutica que comprende las mismas y similares.

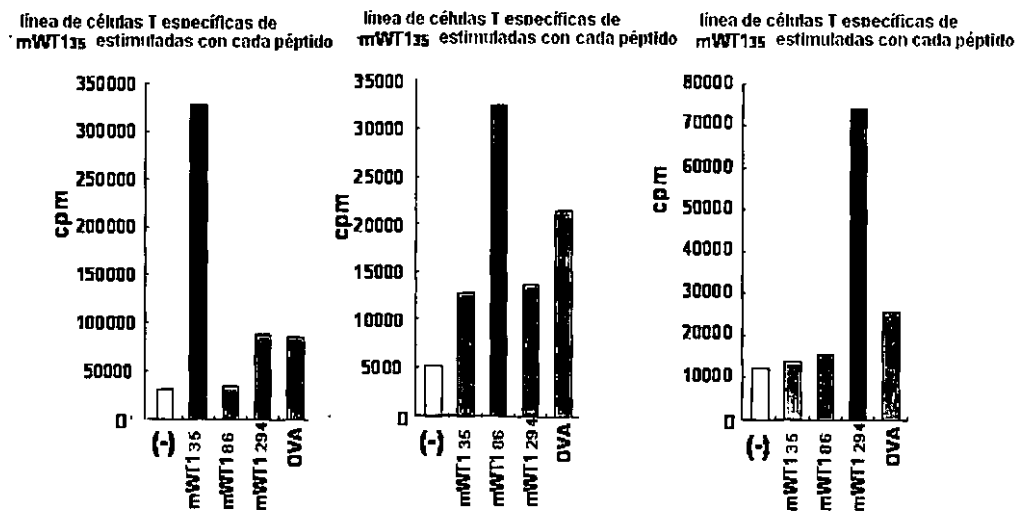
10

15

20

P11/1261F

Figura 1



20

Figura 2

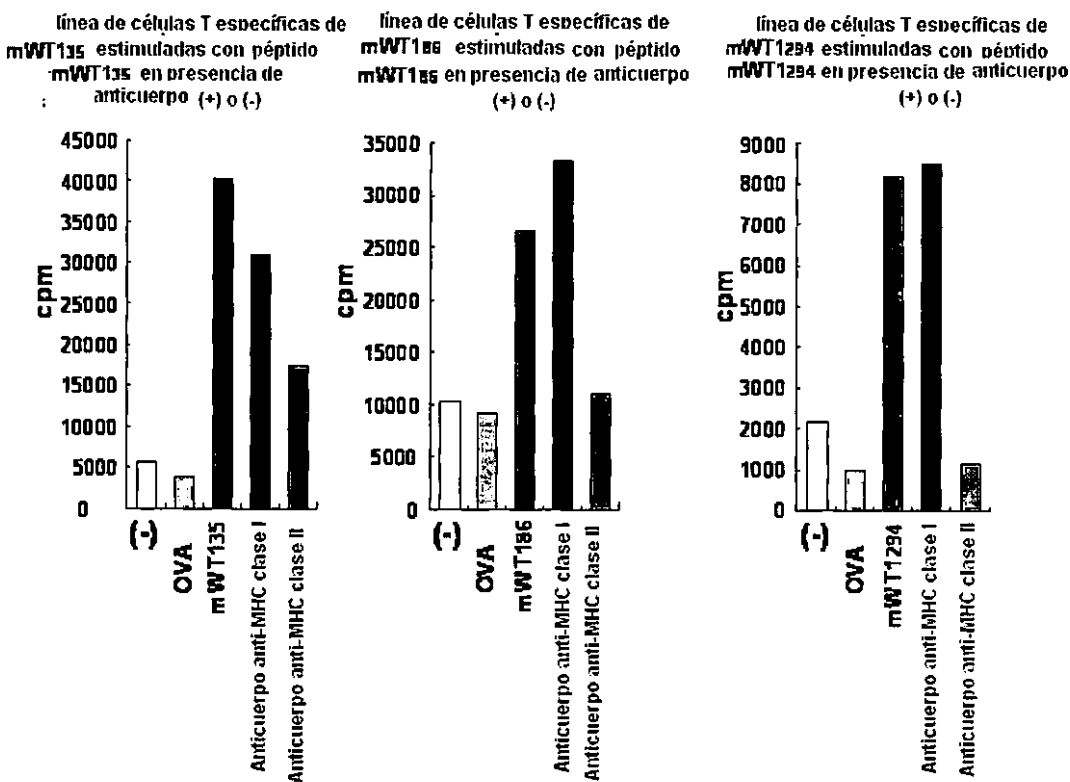
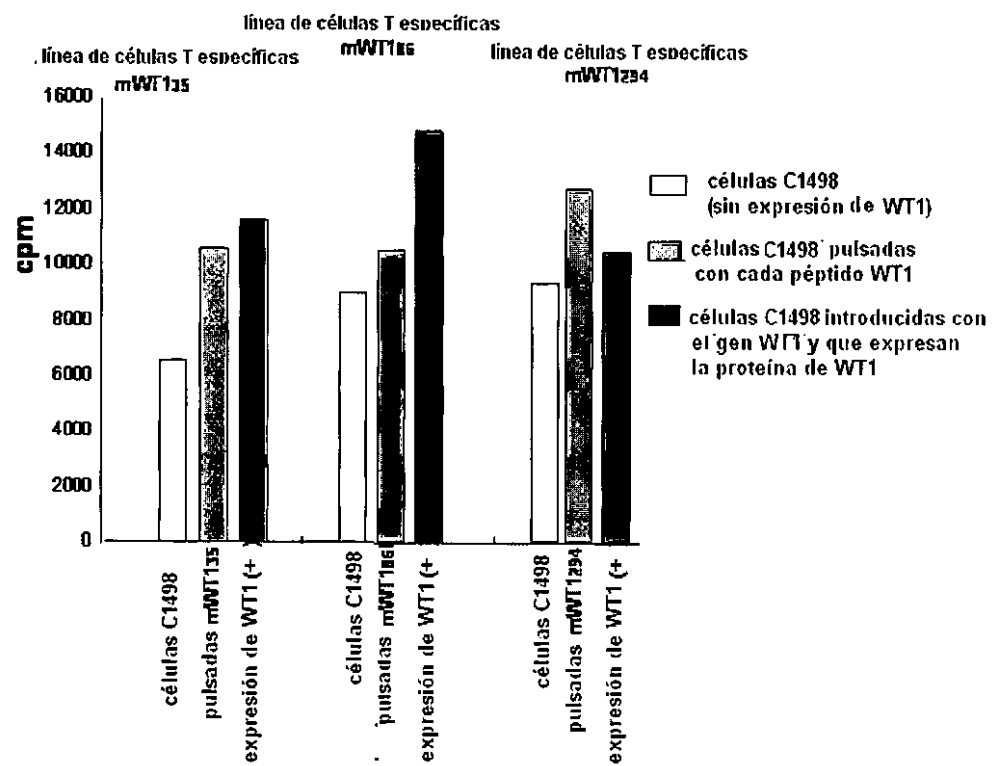


Figura 3



72

Figura 4

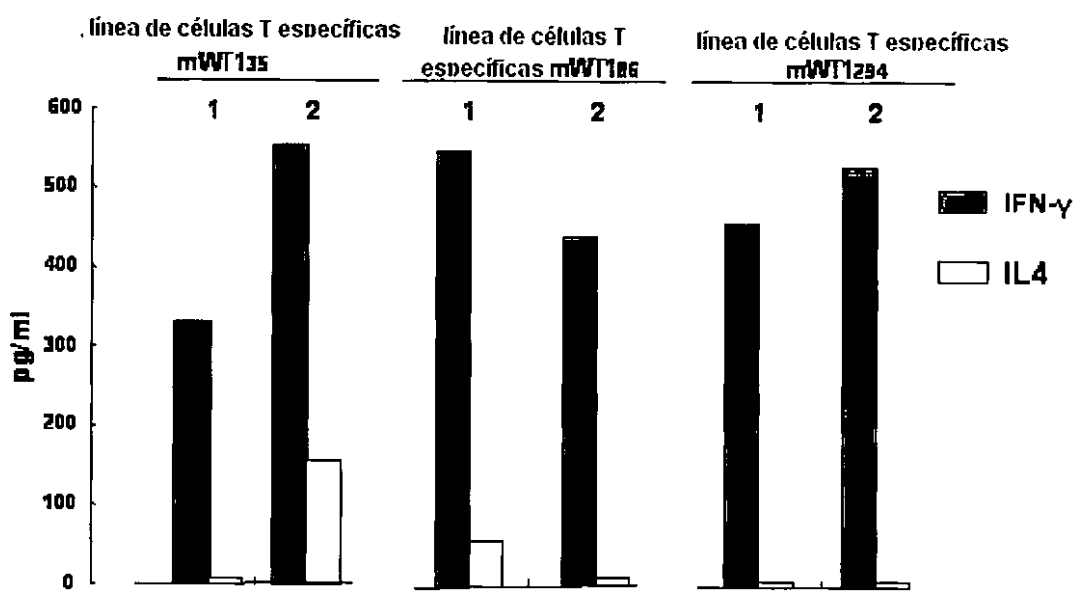


Figura 5

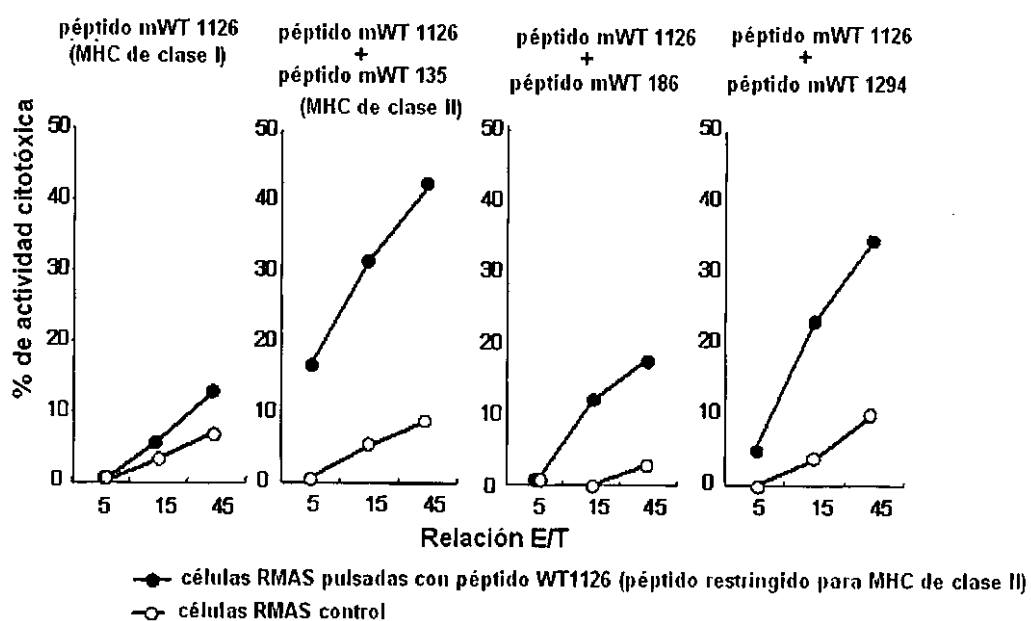


Figura 6

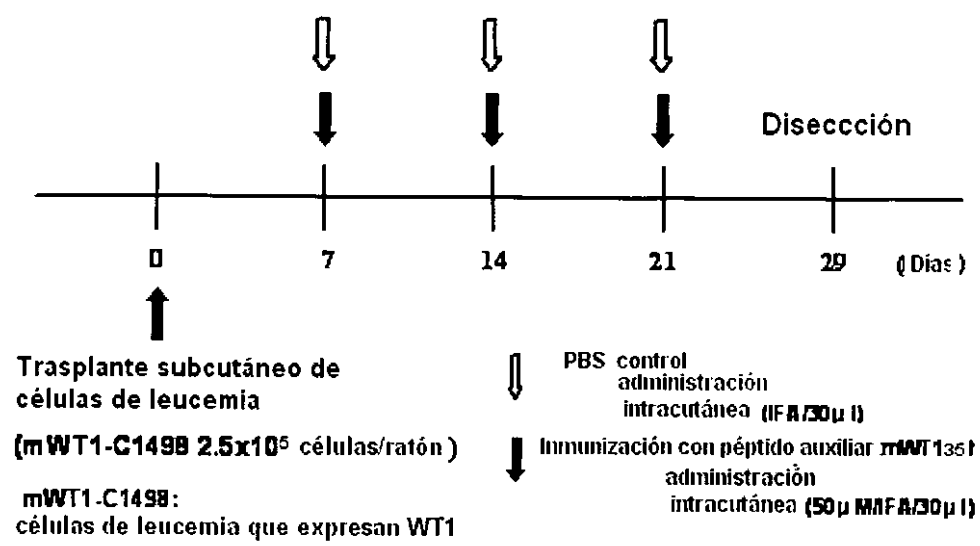


Figura 7

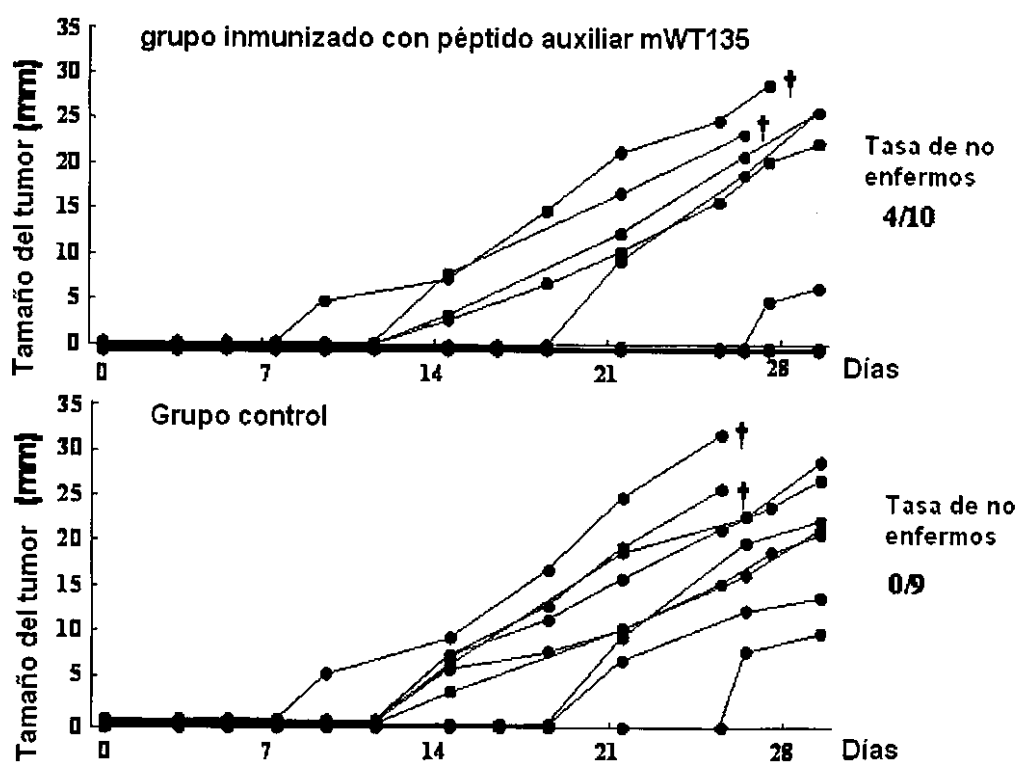
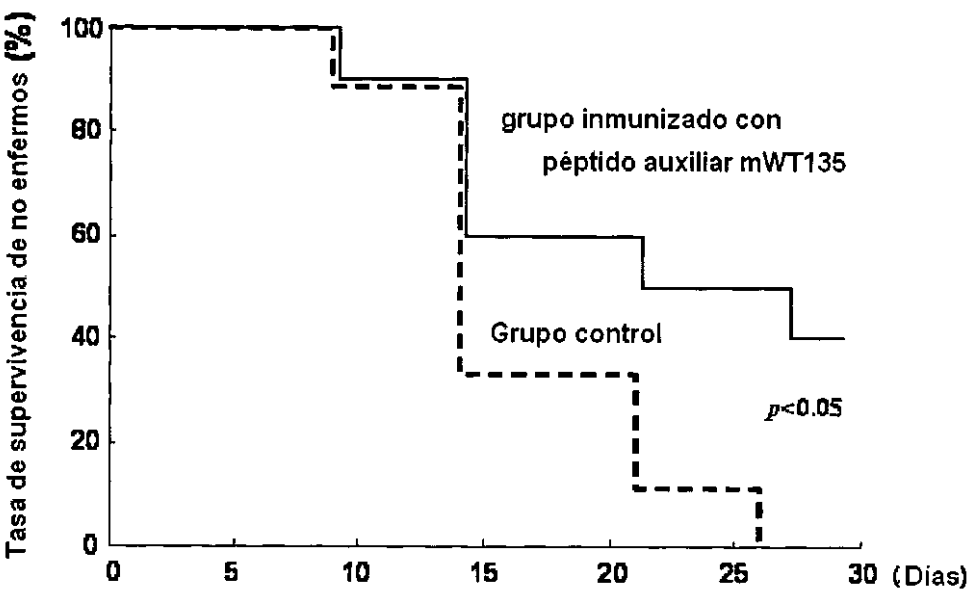


Figura 8



27

Figura 9

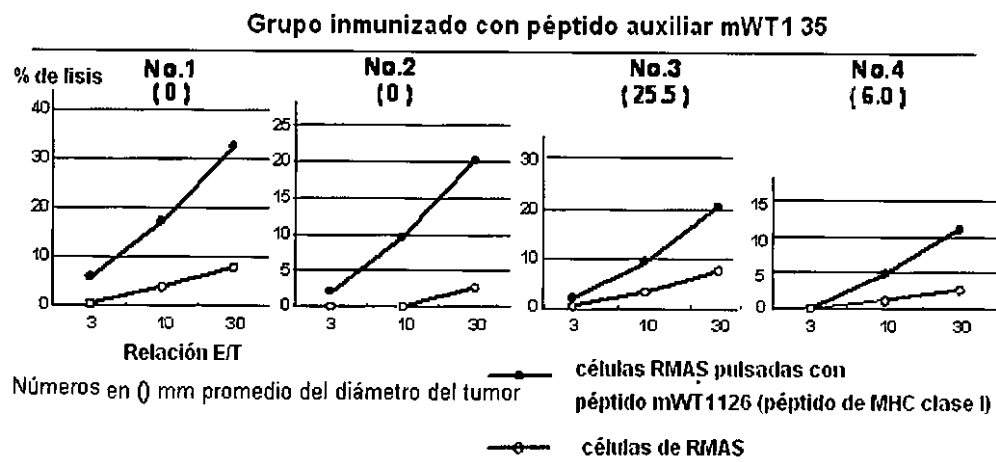


Figura 10

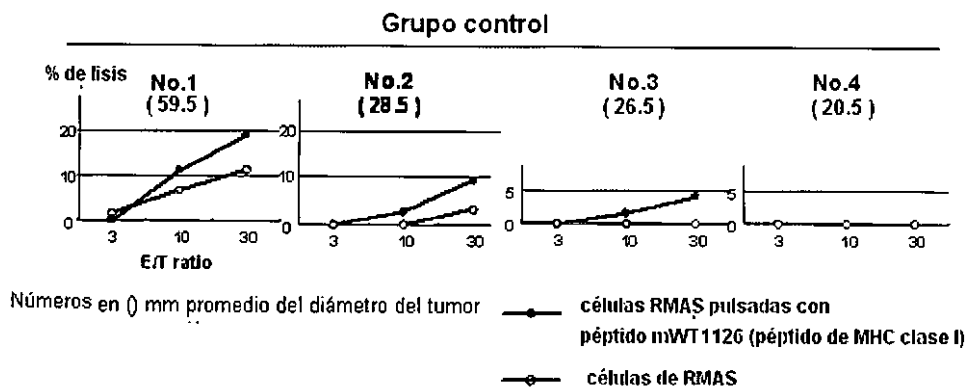


Figura 11

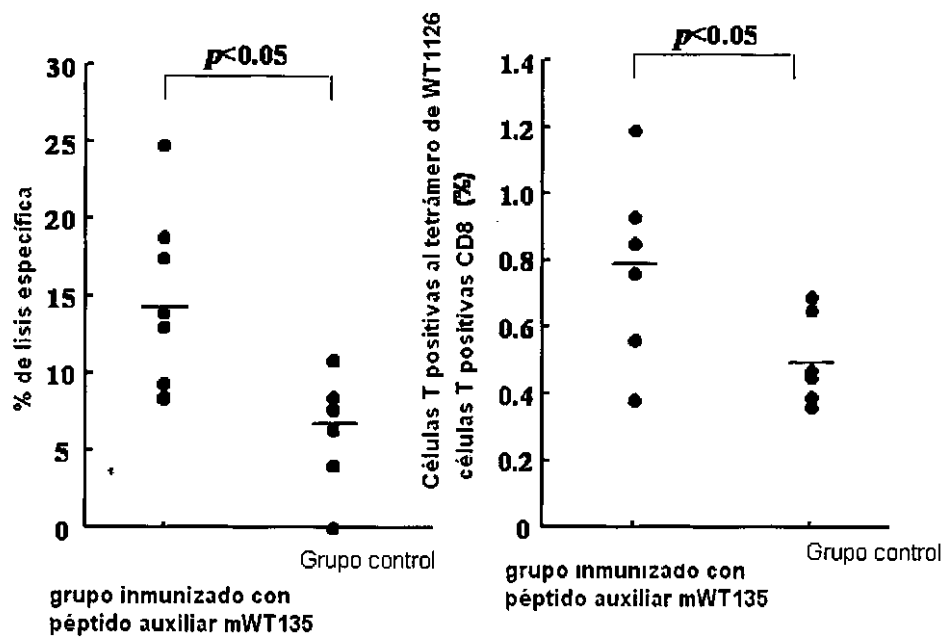


Figura 12

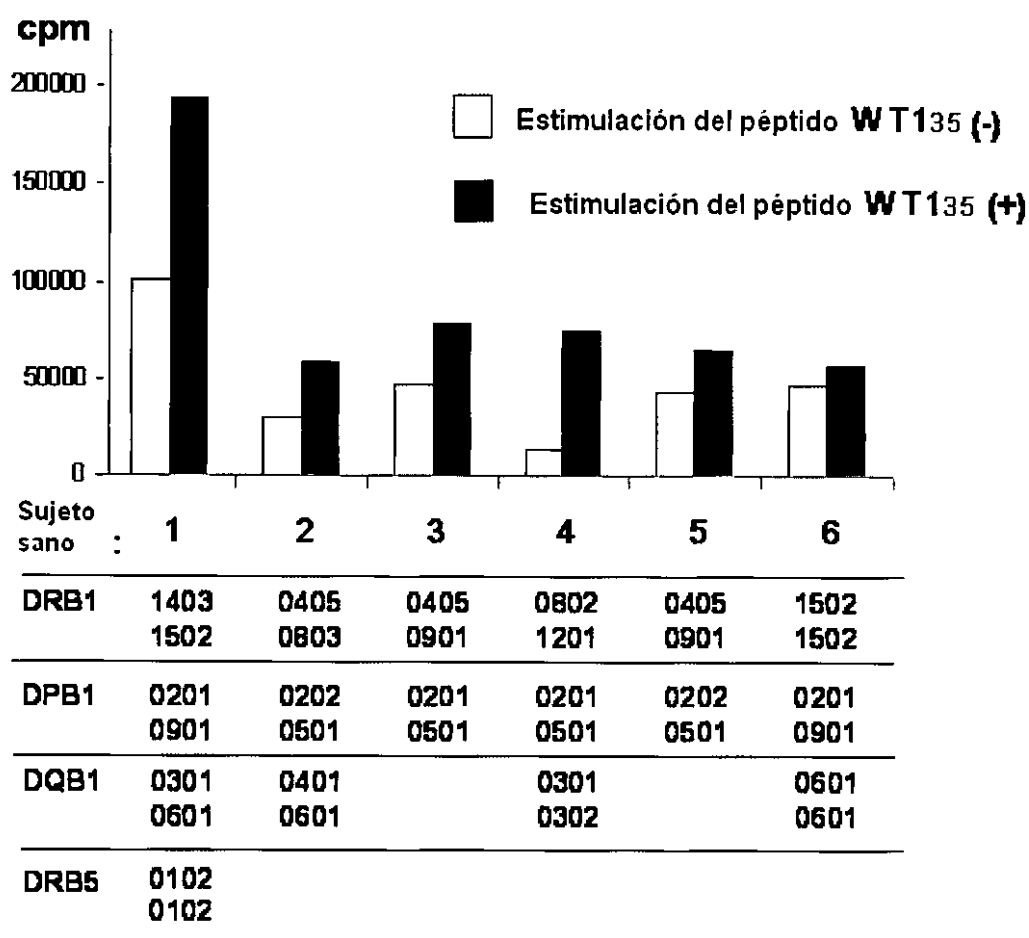


Figura 13

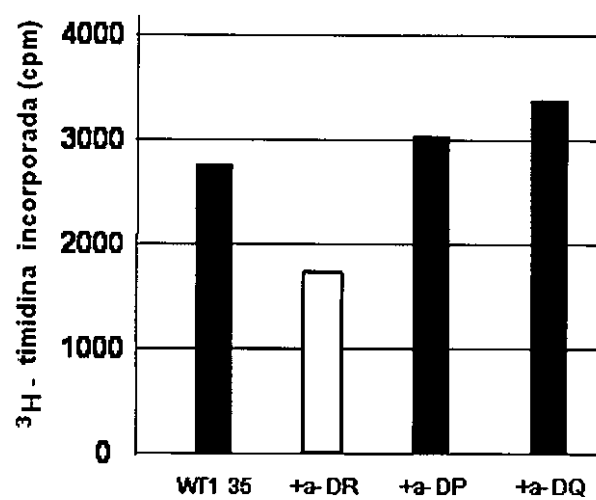


Figura 14

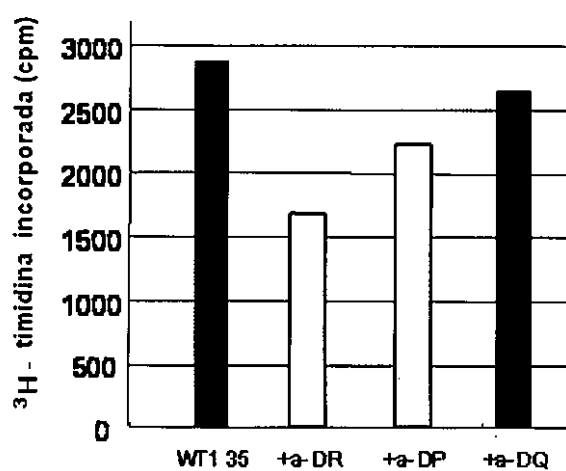


Figura 15

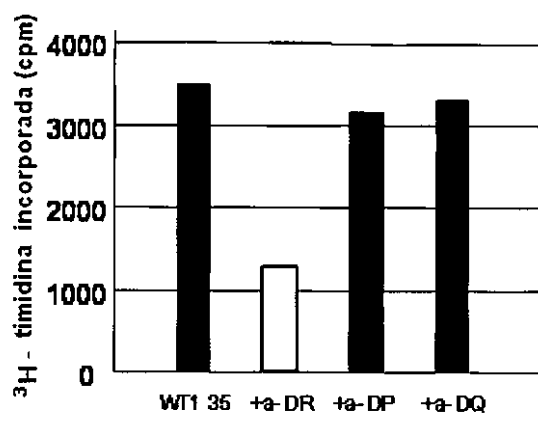


Figura 16

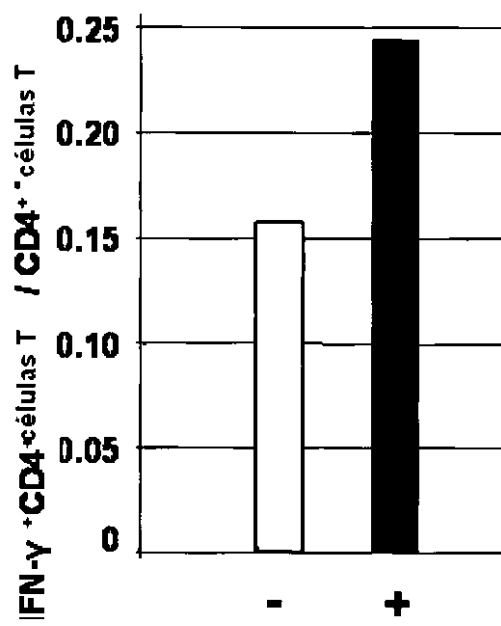


Figura 17

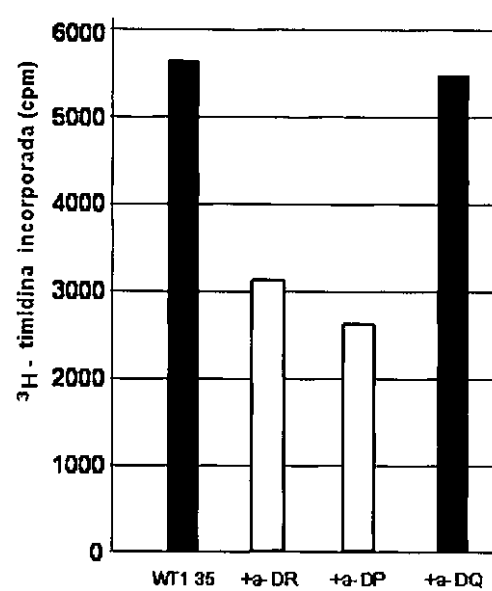
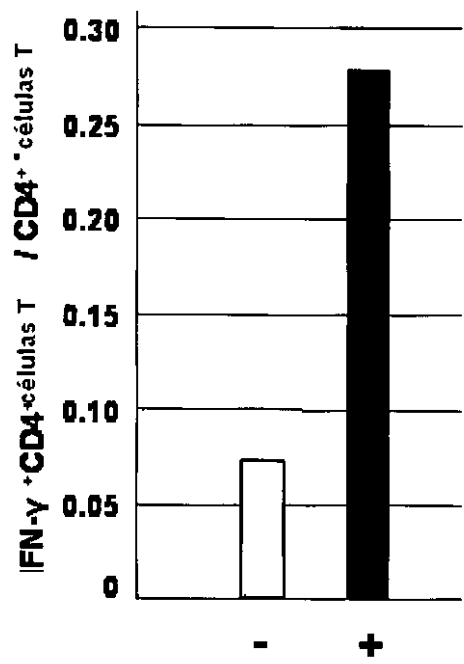


Figura 18



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Solicitante: International Institute of Cancer Immunology, Inc.

<120> Título de la invención: Péptido auxiliar del antígeno del cáncer

<130> Número de referencia: 669667

<150> Número de solicitud previa: JP 2009-105286

<151> Fecha de presentación de la solicitud previa: 2009-04-23

<160> Números de secuencias: 8

<170> Software: PatentIn versión 3.2

<210> SEQ ID NO: 1

<211> Longitud: 449

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Mus musculus*

<400> Secuencia: 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Ser
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Gly Leu Pro Val Ser Gly Ala
 20 25 30
 Arg Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala
 35 40 45
 Tyr 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 Leu 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 Thr Ile
 130 135 140
 Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Ala Pro Ser Tyr
 145 150 155 160
 Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe

86

	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 Met Ala Ala Gly Ser Ser Ser					
	245		250		255
Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Gly Ile Gly Tyr Glu					
	260		265		270
Ser Glu Asn His Thr Ala 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 Ser					
	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 His 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 His Val Ala					
	435		440		445

87

Leu

<210> SEQ ID NO: 2

<211> Longitud: 449

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Homo sapiens*

<400> Secuencia: 2

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> SEQ ID NO: 3

<211> Longitud: 18

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Homo sapiens*

<400> Secuencia: 3

Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr Gly

1 5 10 15

Ser Leu

<210> SEQ ID NO: 4

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Homo sapiens*

<400> Secuencia: 4

Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe Ser Gly Gln Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> SEQ ID NO: 5

<211> Longitud: 19

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Homo sapiens*

<400> Secuencia: 5

Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr

1 5 10 15

Leu Val Arg

<210> SEQ ID NO: 6

<211> Longitud: 17

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Mus musculus*

<400> Secuencia: 6

Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Leu His Phe Ser Gly Gln Phe Thr

1 5 10 15

Gly

<210> SEQ ID NO: 7

<211> Longitud: 19

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Mus musculus*

<400> Secuencia: 7

Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Ser Gly Val Ala Pro Thr

1

5

10

15

Leu Val Arg

<210> SEQ ID NO: 8

<211> Longitud: 9

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: *Mus musculus*

<400> Secuencia: 8

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057149

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/82(2006.01)i, C12N5/07(2010.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, C12Q1/06(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i,
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K31/7088, A61K38/00, A61K48/00, A61P35/00, C07K14/82, C12N5/07, C12Q1/04, C12Q1/06, G01N33/68, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMII), UniProt/GeneSeq, WPI, CAPLUS(STN),
REGISTRY(STN), BIOSIS(DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-518192 A (Corixa Corp.), 23 June 2005 (23.06.2005), sequence no.311, 314; table 45-2 & JP 2008-154588 A & JP 2004-510425 A & JP 2002-525099 A & JP 2007-1984 A & JP 2008-69172 A & JP 2007-515393 A & US 2003/0095971 A1 & US 2003/0039635 A1 & US 2003/0198622 A1 & US 2003/0235557 A1 & US 2003/0072767 A1 & US 2003/0082196 A1 & US 2003/0215458 A1	1, 3-8, 11-17
X	WO 2005/045027 A1 (Haruo SUGIYAMA), 19 May 2005 (19.05.2005), claims 1, 2; sequence no.14, 16, 21 & US 2008/0070835 A1 & EP 1696027 A1 & EP 2071028 A2	1, 3-8, 11-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 May, 2010 (13.05.10)

Date of mailing of the international search report

25 May, 2010 (25.05.10)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057149

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUJIKI F. et al., Identification and characterization of a WT1 (Wilms Tumor Gene) protein-derived HLA-DRB1*0405-restricted 16-mer helper peptide that promotes the induction and activation of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes, J.Immunother., 2007, 30(3), p.282-93	1-8,11-17
A	KNIGHTS A.J. et al., Prediction of an HLA-DR-binding peptide derived from Wilms' tumour 1 protein and demonstration of in vitro immunogenicity of WT1(124-138)-pulsed dendritic cells generated according to an optimised protocol, Cancer Immunol.Immunother., 2002, 51(5), p.271-81	1-8,11-17
A	Fumihiro FUJIKI et al., "WT1 Tokuiteki CD4+ Helper T Saibo o HLA-class II Kosokusei ni Yudo Dekiru WT1 Peptide no Dotei to sono Yuyosei no Kento", The Japanese Society for Immunology Gakujutsu Shukai Kiroku, 2005, 35, page 187, 2-F-W27-8-O/P	1-8,11-17
A	GUO Y. et al., Direct recognition and lysis of leukemia cells by WT1-specific CD4+ T lymphocytes in an HLA class II-restricted manner, Blood, 2005, 106(4), p.1415-8	1-8,11-17
A	FUJIKI F. et al., A WT1 protein-derived, naturally processed 16-mer peptide, WT1(332), is a promiscuous helper peptide for induction of WT1-specific Th1-type CD4(+) T cells, Microbiol.Immunol., 2008, 52(12), p.591-600	1-8,11-17
A	LEHE C. et al., The Wilms' tumor antigen is a novel target for human CD4+ regulatory T cells: implications for immunotherapy, Cancer Res., 2008, 68(15), p.6350-9	1-8,11-17
A	MAY R.J. et al., Peptide epitopes from the Wilms' tumor 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells, Clin.Cancer Res., 2007, 13(15 Pt 1), p.4547-55	1-8,11-17
A	WO 2008/105462 A1 (Kabushiki Kaisha Gan Men'eki Kenkyusho), 04 September 2008 (04.09.2008), entire text & EP 2119778 A1	1-8,11-17

93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057149

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-511637 A (Sloan Kettering Institute For Cancer Research), 19 March 2009 (19.03.2009), entire text & EP 1951281 A & WO 2007/047764 A2	1-8, 11-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057149

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9, 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 and 10 pertain to the methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search under the provisions of PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057149

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

G01N33/53 (2006.01) n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12N 015/009	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 2009-105286	(32) Fecha 23/04/2009	(33) País JP
		(72) Inventor(es) HARUO SUGIYAMA	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 23/11/2011		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 28/10/2010
	Fecha de presentación de la solicitud: 22/04/2010		N° publicación: WO 2010/123065 A1
	No. de solicitud PCT/JP2010/057149		
(54) Título: PÉPTIDO AUXILIAR DEL ANTÍGENO DEL CÁNCER			

Resumen:

La presente invención se refiere a un péptido de WT1 que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste de aminoácidos contiguos derivados de una proteína WT1 e induce células T auxiliares específicas de WT1 por la unión de una molécula de MHC clase II, una composición farmacéutica que comprende las mismas y similares.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

97



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 108564

Bogotá D.C., Noviembre 08 de 2011 - 07:35:41

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430559172	04/11/2011	43.527.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	VR. LINDITARIO	VR. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00
=====				

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-160137- -00000-0000

Fecha: 2011-11-23 11:05:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

0020: 17075- 841-003-0

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 8 de 2011 - 07:35:54

98



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 108619

Bogotá D.C., Noviembre 08 de 2011 - 07:35:41

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430559172	04/11/2011	43.527.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5.000.00	5.000.00
				\$5.000.00

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-160137- -00000-0000

Fecha: 2011-11-23 11:05:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

0016:17075-841-003-0

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 8513240

Noviembre 8 de 2011 - 07:35:55

99



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 108624

Bogotá D.C., Noviembre 08 de 2011 - 07:35:41

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430559172	04/11/2011	43.527.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	5.000.00	5.000.00
				\$5.000.00

SON: **CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-160137- -00000-0000

Fecha: 2011-11-23 11:05:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

COLO: 17075-841-003-0

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 8 de 2011 - 07:35:55

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

100

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 112863

Bogotá D.C., Noviembre 21 de 2011 - 07:19:51

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	186849692	18/11/2011	29.317.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
50005-01-01 SOLICITUDES	93 TASA ANUAL MANTENIMIENTO MODELO DE UTILIDAD	180.000.00	180.000.00
			\$180.000.00

SON: **CIENTO OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-160137- -00000-0000

Fecha: 2011-11-23 11:05:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

COLO: 17075-841-003-0

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 21 de 2011 - 07:19:57



No. 11-160137- -00000-0000

Fecha: 2011-11-23 11:05:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 100

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐

Indicación que se solicita una patente.

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Descripción de la invención

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐

Indicación que se solicita una PCT

☐

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐

Dibujos de ser estos pertinentes

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐