

Señor Director
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-111246- -00010-0000

Fecha: 2015-07-21 16:23:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act 523 RESPUESTA Folios: 21

wl

Referencia : Expediente No. **13.111.246**
Asunto : Solicitud de patente: "**MÉTODO PARA ACTIVAR CÉLULAS T AUXILIARES**"
Solicitante : INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC. AND OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
Fecha de solicitud : 3 de Mayo de 2013

Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, me refiero al oficio No. **2425** notificado por fijación en lista el 10 de Marzo de 2015, cuyo plazo de respuesta fue prorrogado mediante memorial de 5 de junio de 2015.

1. Mediante oficio No. **2425** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio se refieren a la supuesta presencia de excepciones de patentabilidad, de falta de claridad de algunos apartes del pliego reivindicatorio y una aparente falta de novedad de las reivindicaciones 1-11 en vista del documento **D1**: EP2119778.

2. Respuesta a las objeciones

Con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se desea presentar las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección Oficina 852 - Tel: (57-4) 520 4760 / (57-4) 326 0789 / (57) 317 365 8663 / (57) 318 532 2365- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

2.1. Modificación de una solicitud en trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 12 reivindicaciones.

Se han introducido las siguientes modificaciones al capítulo reivindicatorio:

- Se hace claridad sobre la materia que se solicita proteger y el alcance de la misma, donde se especificó el tipo de moléculas de donde se derivan las células que presentan antígenos. La materia se encuentra debidamente soportada en el capítulo descriptivo.
- Con respecto a la objeción realizada a la reivindicación 12 del pliego reivindicatorio por supuestamente contener materia que es una excepción a la patentabilidad, ponemos de presente que la sección 2.4.4 de la Guía para examen de solicitudes de patente de invención y modelo de utilidad señala que: *“...los métodos de diagnóstico in vitro, aun cuando requieran muestra biológica, podrán ser elegibles para estudio de patentabilidad”*.
- Por otro lado, quisiéramos señalar que la composición reivindicada puede ser fácilmente preparada por una persona versada en la materia, toda vez que podría seleccionar la cantidad del péptido WT1 al usar sentido común técnico, su conocimiento en el área y pruebas preliminares de rutina. Igualmente, ponemos de presente que la Guía para examen de solicitudes de patente de invención y modelo de utilidad en su sección 2.6.5.4 señala que: *“Si, por ejemplo, la característica técnica esencial de la composición es el compuesto activo, el examinador no deberá requerir que se mencionen también otras características estructurales”*.

Los anteriores son argumentos suficientes para dar por contestadas y tener por superadas las objeciones formuladas por el Examinador en cuanto a presencia de excepciones de patentabilidad y falta de claridad y concisión del pliego reivindicatorio

2.2. Argumentos con respecto a la falta de Novedad

De acuerdo al artículo 16 de la Decisión 486, se determina:

“Artículo 16: Una invención se considerará nueva cuando no esté comprendida en el estado de la técnica.

El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de la prioridad reconocida”.

La novedad de una invención se evalúa a través de la comparación uno a uno de sus características esenciales. De este modo, una invención puede ser objetada por novedad cuando sus características esenciales son exactamente iguales a las de un antecedente que represente el estado de la técnica conocido al momento de presentar la solicitud. Por lo tanto en caso que llegue a existir al menos una diferencia en dicha comparación, se afirma que la invención SI cumple con el requisito de novedad.

Teniendo en cuenta las modificaciones realizadas al pliego reivindicatorio, ponemos de presente que la reivindicación 1 de la presente invención y sus dependientes son novedosas, toda vez que el estado de la técnica no revela la característica técnica de que el péptido WT1, como es descrito en el pliego reivindicatorio, pueda ser aplicado a sujetos que tienen una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301.

Así mismo, no era conocido en el estado de la técnica, en el momento de la presentación de la presente solicitud, que las células que presentan antígenos tienen un complejo de un péptido WT1 con una molécula MHC clase II tal y como se menciona en la

reivindicación 7. En el caso de las células T auxiliares, tampoco era conocido que éstas reconocieran un completo de un péptido WT1 con una molécula HMC clase II, como es reivindicado en la reivindicación 8. Tampoco era conocido que las células T citotóxicas, que se reivindican en la reivindicación 9, activaban las células T auxiliares de la reivindicación 8.

Finalmente, se adjuntan datos experimentales que muestran que el péptido WT1 (b) tiene una habilidad para unirse a moléculas HLA-A específicas y que presenta habilidad para activar las células T auxiliares. La tabla 1 muestra los péptidos utilizados en la experimentación. El péptido OCV-501 consiste de 16 amino ácidos de SEQ ID NO: 2. Los péptidos 5+OCV-501 y 9+OCV-501 a N-terminal de los cuales 5 y 9 amino ácidos son adicionados, respectivamente. Lo mismo sucede con los péptidos OCV-501+5 y OCV-501+9 a C-terminal. Todos los anteriores se encuentran dentro del péptido WT1 (b). Es importante mencionar que el péptido WT1-35, es un péptido de control que no contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

Como se puede observar en los datos experimentales, particularmente en la Tabla 6 y en la Figura 1, es absolutamente claro que el péptido WT1 (b) es capaz de activar células T auxiliares para producir IFN-gamma.

De tal manera que, es claro que dicha anterioridad no afecta la novedad del nuevo capítulo reivindicatorio. De esta forma, se ven superadas las objeciones con respecto a novedad para la presente invención.

3. Conclusión

Por todo lo anterior, el documento D1 no resulta una anterioridad capaz de afectar la novedad de la invención de la presente solicitud. Por lo tanto, consideramos que el Examinador está pasando por alto que una sola diferencia con respecto al estado de la técnica, permite concluir que el objeto reivindicado es nuevo. Además, está excluyendo el hecho de que el inventor en el momento de solucionar el problema técnico de la solicitud tuvo que emplear habilidad inventiva, pues la presente invención no resulta de la mera

extrapolación de las enseñanzas del arte previo, como se afirma. Se está desconociendo el mérito investigativo empleado y que está aportando una ventaja al arte previo.

4. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por el Examinador, se solicita atentamente proceder al otorgamiento de la solicitud de patente. En este sentido, respetuosamente recordamos al Examinador que la patente no podrá ser negada con base en objeciones diferentes a las expuestas en la acción oficial No. 2425, toda vez que al no haber sido trasladadas a mi representada, dicha decisión violaría tanto el tenor literal del artículo 45 de la Decisión 486 como el derecho constitucional al debido proceso. En este evento, y con base en el inciso 2 del artículo 45, respetuosamente solicitamos al Examinador expedir una nueva acción oficial que permita a mi representada contra argumentar las mismas o modificar la solicitud con el fin de cumplir los requisitos de patentabilidad.

5. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 12 reivindicaciones.
- Pruebas experimentales.

Señor Director,



LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1.- Un método para activar las células T auxiliares, que comprende el paso de activar las células T auxiliares agregando un péptido WT1 a las células que presentan antígenos y evaluando la activación de las células T auxiliares, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, en donde el péptido WT1 es un péptido (a) o (b):

(a) un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2), o

(b) un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que contiene la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:2,

en donde las células que presentan antígenos se derivan de un sujeto que tiene una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301.

2.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse al menos a dos moléculas MHC Clase II de una HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, y una molécula HLA-DPB1*0301.

3.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado además porque la adición de un péptido WT1 a las células que presentan antígenos se lleva a cabo agregando un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polipéptido, o células que contienen el vector de expresión.

4.- Una composición que contiene un péptido WT1 para activar las células T auxiliares, agregando un péptido WT1 a las células que presentan antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC Clase II de una

molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, en donde el péptido WT1 es un péptido (a) o (b):

(a) un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2), o

(b) un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que contiene la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:2,

en donde las células que presentan antígenos se derivan de un sujeto que tiene una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301.

5.- La composición de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada además porque el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse al menos a dos moléculas MHC Clase II de una HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, y una molécula HLA-DPB1*0301.

6.- La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, caracterizada además porque la adición de un péptido WT1 a las células que presentan antígenos se lleva a cabo agregando un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido, o células que contienen el vector de expresión.

7.- Células que presentan antígenos, las cuales presentan un complejo de un péptido WT1 con una molécula MHC clase II, en donde la molécula MCH Clase II es cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, en donde el péptido WT1 es un péptido (a) o (b):

(a) un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Lys Arg Tyr Phe

Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2), o

(b) un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que contiene la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:2.

8.- Células T auxiliares, las cuales reconocen un complejo de un péptido WT1 con una molécula MHC clase II, en donde la molécula MCH Clase II es cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, en donde el péptido WT1 es un péptido (a) o (b):

(a) un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2), o

(b) un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que contiene la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:2.

9.- Células T citotóxicas, las cuales son activadas por las células T auxiliares que se reclaman en la reivindicación 8.

10.- Una composición farmacéutica, que comprende, como ingrediente activo, la composición que se reclama cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, las células que presentan antígenos que se reclaman en la reivindicación 7, las células T auxiliares que se reclaman la reivindicación 8, o las células T citotóxicas que se reclaman en la reivindicación 9.

11.- Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido, o células que contienen el vector de expresión, y la cual se administra a un sujeto que tiene cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, una molécula HLA-DPB1*0301, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, en donde el péptido WT1 es un péptido (a) o (b):

(a) un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2), o

(b) un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que contiene la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:2.

12.- Un método in vitro para determinar la presencia o la cantidad de células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto positivo con respecto a cualquier molécula MHC Clase II de molécula HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0403, HLA-DRB1*0406, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB3*0202, HLA-DRB4*0101, HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, el método comprendiendo los pasos de: (a) estimular una muestra que se obtiene del sujeto utilizando un péptido WT1, y (b) determinar la presencia o la cantidad de citoquinas o células T auxiliares, en donde el aumento de la presencia o cantidad de citoquinas o células T auxiliares muestra la presencia o cantidad de las células T auxiliares específicas del WT1, en donde el péptido WT1 es un péptido (a) o (b):

(a) un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2), o

(b) un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que contiene la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:2.

CPT\CPTID-409701\WPC20188

DATOS EXPERIMENTALES

Resumen

La producción de IFN- γ por la estimulación del péptido que tiene la secuencia de aminoácidos KRYFKLSHLQMHSRKH (ID SEC NO: 2) (en adelante denominado OCV-501) y péptidos más largos que comprenden la secuencia de OCV-501 fueron analizados por tinción de citoquinas Intracelular (ICS, siglas en inglés) y ELISA. Usando clones Th1 específicos al OCV-501, se analizaron el OCV-501 y cuatro péptidos cada uno de los cuales se preparó añadiendo 5 o 9 aminoácidos al terminal N o C del OCV-501. Como estimulación de control, se utilizaron 10 mM de ácido acético (AcOH) (disolvente) y péptido WT1-35 (péptido de control).

En cuatro clones Th1 en los que el OCV-501 indujo la producción de IFN- γ , todos los péptidos probados indujeron una producción similar de IFN- γ . En tres clones Th1, los péptidos añadidos al terminal C mostraron una producción inferior de IFN- γ , o la adición de aminoácidos resultó en aumento de la producción de IFN- γ , lo que implica que la adición de aminoácidos modificaría la actividad del péptido. Además, en tres clones Th1 en los que el OCV-501 no indujo la producción de IFN- γ , ninguno de los péptidos indujeron producción de IFN- γ ; en otras palabras, no se observó inducción no específica a un peptídico.

Estos resultados demuestran que la actividad del OCV-501 se mantiene incluso si se añaden aminoácidos de hasta 9 a su terminal N o C.

Introducción

El OCV-501, un péptido constituido por la secuencia de aminoácidos KRYFKLSHLQMHSRKH (ID SEC NO: 2), se une a la molécula MHC de clase II e induce a células Th1 que producen IFN- γ . Si bien los péptidos de unión MHC de clase II tienen 12-15 aminoácidos en general, el OCV-501 tiene una secuencia más larga de aminoácidos

que consiste de 16 aminoácidos. Además, no se ha demostrado si péptidos más largo que el OCV-501 muestran una actividad similar al OCV-501 o no. En el presente estudio, se evaluó si péptidos más largos, cada uno de los cuales se preparó añadiendo 5 o 9 aminoácidos al terminal N o C de. OCV-501, tenían actividad equivalente al OCV-501 usando clones Th1 específicos al OCV-501 y basado en la producción de IFN- γ después de la estimulación del péptido determinada por tinción de citoquinas intracelular (ICS) y ELISA.

Materiales y Métodos

Péptidos

Tabla 1 Péptidos

nombre	secuencia amino ácida	MW	proveedor
OCV-5 01	<u>KRYFKLSHLOMHSRKH</u>	2086.45	Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Instituto de Investigación de Química Orgánica
5+OCV-501	YPGCN <u>KRYFKLSHLOMHSRKH</u>	2621.04	
9+OCV-501	FMCAYPGCN <u>KRYFKLSHLOMHSRKH</u>	3073.63	
OCV-501+5	<u>KRYFKLSHLOMHSRKHTGEKP</u>	2599.01	
OCV-501+9	<u>KRYFKLSHLOMHSRKHTGEKPYOCD</u>	3108.55	
WT1-35	WAPVLDFAPPGASAYGSL	1819.05	

Se subraya la secuencia de aminoácidos del OCV-501. El peso molecular (MW) se calculó con la herramienta Compute pI/Mw (ExPASy). Los péptidos se almacenaron en un congelador a -20°C.

Preparación de soluciones de péptidos

Los péptidos, excepto para el WT1-35, se disolvieron en 10 mM de ácido acético (AcOH), respectivamente, y el WT1-35 en DMSO [WAKO: WKK2830] para preparar soluciones madre. Cada una de las soluciones madre se dispensó en tubos de 0,5 ml de polipropileno y se almacenó a - 20°C hasta justo antes de su uso. Las soluciones congeladas se descongelaron y se utilizaron inmediatamente para la prueba.

Células

- 1) Nombre de la célula: células clones Th1

- 2) Fuente: PBMC human de donante de sangre (cada células clon Th1 se estableció a partir de PBMC de un donante sano, obtenido con consentimiento informado)
- 3) Número de clones Th1: 10 clones

Tabla 2 Tipos HLA de clones Th1 utilizados en la prueba

Exp.	clon	HLA-A	HLA-DRB1	HLA-DPB1
120410	#106_3D02	0206/2402	0405/1501	0501/-
	#77_3B08	2402/2402	0405/1405	0501/-
	#107_1E02	2402/2402	0405/0901	0501/-
	#140_1D04	1101/2402	0405/1602	0202/0501
120416	#107_1E04	2402/2402	0405/0901	0501/-
	#77_3B08	2402/2402	0405/1405	0501/-
	#77_3F05	2402/2402	0405/1405	0501/-
	#140_1H05	1101/2402	0405/1602	0202/0501
120417	#106_1H11	0206/2402	0405/1501	0501/-
	#113_1F04	0206/2402	0405/0803	0501/-
	#140_3F06	1101/2402	0405/1602	0202/0501

Estos experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices de bioseguridad de Otsuka Pharmaceutical Co., Ltda. (revisión de Nov. 19, 2010).

Grupos

Tabla 3 Grupos

Grupo#	Estímulo	Estimulante
1	solvente	10 mM de ácido acético AcOH
2	Péptido madre	OCV-5 01
3	Péptido comparativo 1	5+OCV5 01
4	Péptido comparativo 2	9+OCV5 01
5	Péptido comparativo 3	OCV-501+5
6	Péptido comparativo 4	OCV-501+9
7	Péptido de control	WT1-35

Se considera que el WT1-35 es un péptido auxiliar que se sabe que se une a los tipos HLA de clones Th1 utilizados en el experimento (véase el documento WO 2010/123065). Como se muestra abajo, el WT1-35 no indujo respuesta Th1 bajo las actuales condiciones experimentales.

Reactivos

Los reactivos utilizados en la prueba se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4 Reactivos para la prueba

nombre	Código No.	proveedor
interleucina-2 recombinante humana (IL-2)	200-02	PeproTech, Inc.
Solución Brefeldin A (1,000X)	420601	BioLegend
Cytofix Cytoperm Fix/Perm	554723	BD Bioscience
Tampón de Lavado de Permeabilización (10X)	421002	BD Bioscience
Anticuerpo anti-humano CD8 marcado con FITC	A07756	Beckman Coulter
Anticuerpo anti-humano CD4 marcado con PE	A07751	Beckman Coulter
Anticuerpo IFN- γ anti-humano marcado con PerCPCy5.5	502525	BioLegend
Conjunto OptEIA ELISA (IFN- γ humano)	555142	BD Bioscience
Reactivo OptEIA Conjunto B.	550534	BD Bioscience
AIM-V	12055-091	Invitrogen
Suero humano AB	2931949	Dainippon Sumitomo Pharma

Preparación de medio y tampón de tinción

Se inactivó suero AB humano a 56°C durante 30 min. y se filtró con un filtro de 0.22 μm (Serum Acrodisc, Gelman). El suero AB humano inactivado (50 ml) se mezcló con 500 ml de AIM-V en un banco limpio para preparar el medio (90% AIM-V + 10% de suero humano). El tampón de tinción se preparó mezclando 500 ml de PBS(-) con 10 ml de FBS inactivado. El medio y el tampón de tinción se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Método de prueba

Pre-cultura de clon Th1

Los clones Th1 almacenados en un estado congelado se descongelaron en un baño caliente a 37°C y se lavaron inmediatamente con 10 ml de AIM-V por lavado de centrifuga a 1800 rpm durante 5 min. Después de la centrifugación, el sobrenadante se eliminó y las células se re-suspendieron en 1 ml de medio. Después de eso, se contó el número de células de la solución resultante.

La solución se diluyó con medio según lo apropiado y se sembró en placas de 24 pocillos (1 ml/pocillo). Además, se añadió 1 ml de IL-2 que contenía medio (40U/ml) a cada pocillo y las células se cultivaron durante 2 días a 37°C bajo 5% de CO₂.

Recolección de células y la estimulación con péptidos

Después de 2 días de cultivo, las células se recogieron por centrifugación y se re-suspendieron en 1 ml de medio y se contó el número de células de la solución resultante. Después de eso, la solución se diluyó según lo apropiado y se sembró en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (100 µl/pocillo). Entonces, el medio que contenía el péptido (40 µg/ml) se preparó para cada péptido y se añadió el medio así preparado a la placa de 96 pocillos de fondo redondo (100 µl/pocillo) (concentración final de péptido: 20 µg/ml). Las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂. La prueba de ELISA se realizó por triplicado para cada estimulación.

Tinción de citoquinas intracelular (ICS)

Después de 4 horas de la estimulación de péptidos, se añadieron las células con solución Brefeldina A (1000x) tal que la concentración final de solución Brefeldina A se

volvió 1x, y se cultivaron adicionalmente. Después de 6 horas de la iniciación del cultivo, se recogieron las células y se eliminó el sobrenadante del cultivo. Las células recogidas se hicieron reaccionar con anticuerpo CD4 anti-humano marcado con PE y el anticuerpo CD8 anti-humano marcado con FITC (2 µL) durante 15 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con el tampón de tinción, añadido con Cytofix Cytoperm Fix/Perm (250 µL), y se hicieron reaccionar durante 20 min a 4°C para la fijación celular. Las células se lavaron dos veces con 1x Perm/Tampón de lavado, y se reaccionaron con anticuerpo IFN-γ anti-humano marcado con PerCPCy5.5 (0,5 µL) durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron dos veces con 1x Perm/Tampón de lavado, re-suspendieron con 400 µL de tampón de tinción, y se analizaron con Gallios [Beckman Coulter].

ELISA

Después de 24 horas de la estimulación de péptidos, el sobrenadante del cultivo (160 µL) se retiró suavemente de cada pocillo y se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos de fondo redondo. La placa se selló y se almacenó en un estado congelado a -20°C hasta la medición. La concentración de IFN-γ en el sobrenadante del cultivo se midió por ELISA usando un conjunto ELISA BD OptEIA (IFN-γ humano) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y V-max (Dispositivo Molecular).

Evaluación

La proporción Th1 después de la estimulación se determinó mediante tinción intracelular de citoquinas, y la producción de IFN-γ se midió por ELISA.

Proporción específica de péptido Th1 (%) = número de células positivas CD4 y células positivas IFN-γ intracelulares después de la estimulación del péptido / número total de células viables x 100

Proporción no-específica de péptido Th1 (%) = número de células positivas CD4 y células positivas IFN- γ intracelulares después de la estimulación del péptido con 10 mM de AcOH / número total de células viables x 100

Resultados y discusión

La proporción de Th1 específica a péptidos en el clon Th1 específico a. OCV-501 después de la estimulación se determinó mediante ICS de IFN- γ . La proporción Th1 después de la estimulación se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5 Proporción Th1 después de la estimulación determinada por ICS (%)

Exp.	clon	AcOH	OCV-5 01	5+OCV-501	9+OCV-501	OCV-501+5	OCV-501+9	WT1-35
120410	#106_3D02	0.002	2.432	2.950	4.202	2.856	2.968	NT
	#77_3B08	0.004	0.000	0.006	0.000	0.002	0.010	NT
	#107_1E02	NT						
	#140_1D04	0.002	0.080	0.090	0.100	0.080	0.130	NT
120416	#107_1E04	0.006	6.080	4.768	11.648	5.370	6.314	0.006
	#77_3B08	0.004	0.004	0.004	0.008	0.006	0.006	0.008
	#77_3F05	0.002	0.012	0.006	0.008	0.006	0.012	0.006
	#140_1H05	0.006	10.536	5.600	3.922	7.652	4.834	0.004
120417	#106_1H11	0.006	0.922	0.842	0.892	1.174	1.540	0.002
	#113_1F04	0.000	0.000	0.006	0.006	0.004	0.002	0.004
	#140_3F06	0.002	22.066	18.251	20.452	5.317	5.183	0.009

NT: No probado debido a número insuficiente de células.

Como se muestra en la Tabla 5, los siguientes clones Th1 mostraron aumento de la proporción de Th1 después de la estimulación con OCV-501, en comparación con estimulación con AcOH o WT1-35: #106_3D02, #140_1D04 (Exp.120410), #107_1E04, #140_1H05 (Exp.120416), #106_1H11 (Exp.120417). En esos cinco clones, todos los péptidos que contienen la secuencia de OCV-501 indujeron un aumento en la proporción de Th1, de manera similar.

A diferencia de los otros clones, sólo en el clon #140_3F06 (Exp.120417), los péptidos añadidos al terminal C mostraron menor proporción de Th1 en comparación con el OCV-501 y los péptidos añadidos al Terminal N.

En los tres clones #77_3B08, #77_3F05, y #113_1F04, no se observó aumento de la proporción de Th1 con OCV-501 ni con ninguno de los péptidos que contienen la secuencia de OCV-501.

A continuación, se determinó por ELISA la producción de IFN- γ en clones Th1 específicos al OCV-501 después de la estimulación. La producción de IFN- γ después de 24 horas de estimulación en cada clon se muestra en la Tabla 6 y la Figura 1.

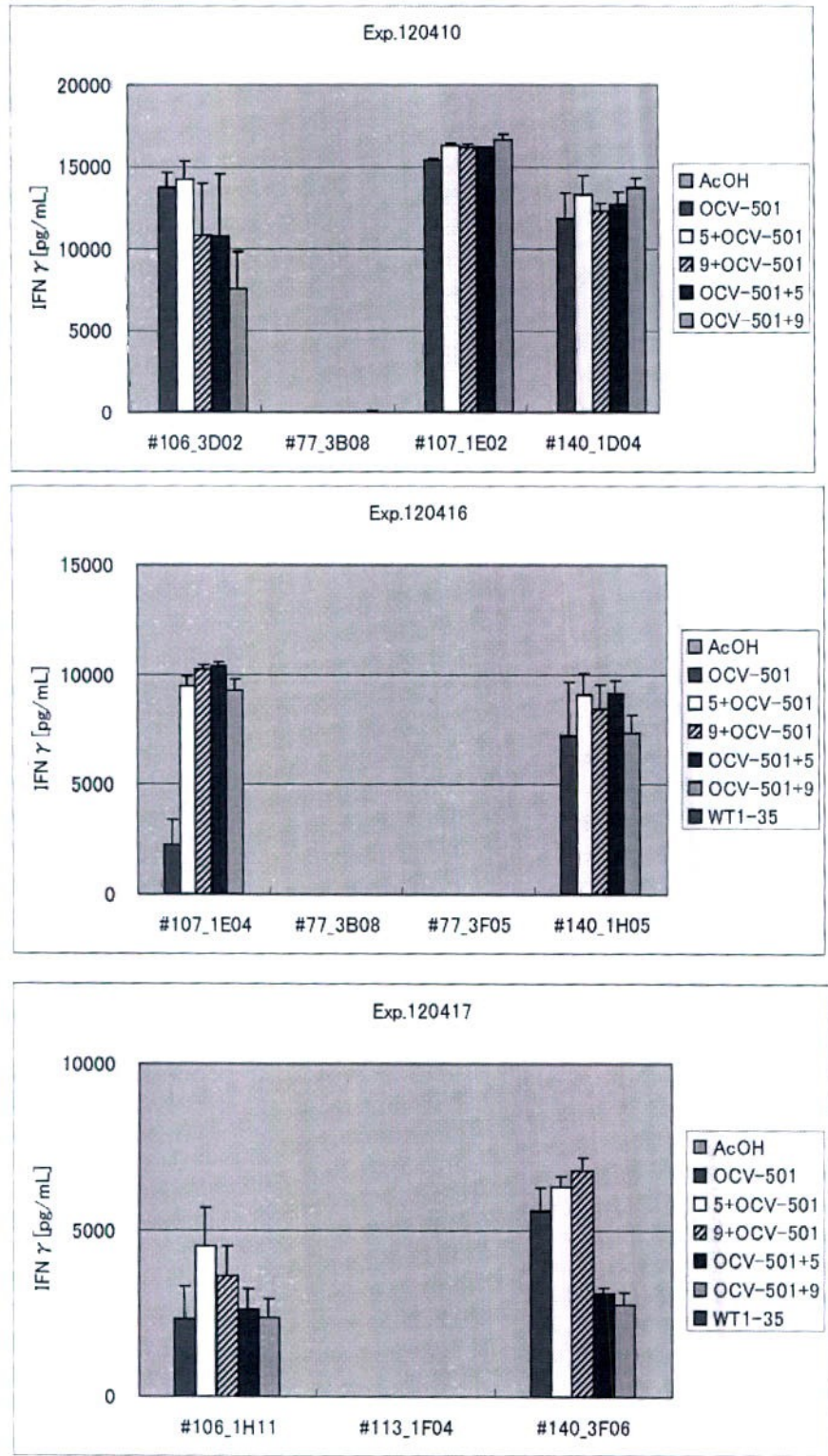
Tabla 6 Producción de IFN- γ después de 24 horas de estimulación, determinada por ELISA

Exp.	clon	AcOH	OCV-5 01	5+OCV-501	9+OCV-501
120410	#106 3D02	4.83 $\pm$ 2.7	13716.73 $\pm$ 937.32	14223.66 $\pm$ 1107.56	10850.58 $\pm$ 3135.34
	#77 3B08	0.76 $\pm$ 0	16.52 $\pm$ 0	3.86 $\pm$ 6.38	2.00 $\pm$ 0
	#107 1E02	1.12 $\pm$ 0	15478.01 $\pm$ 55.93	16322.26 $\pm$ 193.77	16264.41 $\pm$ 87.96
	#140 1D04	10.33 $\pm$ 11.1	11877.91 $\pm$ 1540.12	13313.63 $\pm$ 1153.17	12241.89 $\pm$ 507.78
120416	#107 1E04	27.13 $\pm$ 0	2243.59 $\pm$ 1149.68	9460.86 $\pm$ 445.75	10218.31 $\pm$ 184.85
	#77 3B08	ND	ND	ND	ND
	#77 3F05	ND	ND	ND	ND
	#140 1H05	ND	7228.09 $\pm$ 2458.95	9102.68 $\pm$ 951.49	8421.16 $\pm$ 1133.13
120417	#106 1H11	ND	2302.70 $\pm$ 1001.15	4517.55 $\pm$ 1165.76	3593.52 $\pm$ 898.22
	#113 1F04	ND	ND	8.12 $\pm$ 1.53	ND
	#140 3F06	ND	5594.96 $\pm$ 658.74	6297.21 $\pm$ 312.43	6771.15 $\pm$ 403.97

Exp.	clon	OCV-501+5	OCV-501+9	WT1-35
120410	#106 3D02	10749.32 $\pm$ 3839.2	7544.47 $\pm$ 2250.98	NT
	#77 3B08	3.03 $\pm$ 0	36.88 $\pm$ 49.26	
	#107 1E02	16233.51 $\pm$ 29.21	16614.37 $\pm$ 361.26	
	#140 1D04	12691.97 $\pm$ 753.57	13718.67 $\pm$ 644.33	
120416	#107 1E04	10369.6 $\pm$ 220.14	9238.24 $\pm$ 548.58	15.46 $\pm$ 16.62
	#77 3B08	0.54 $\pm$ 0	3.02 $\pm$ 4.08	30.84 $\pm$ 0
	#77 3F05	ND	ND	ND
	#140 1H05	9153.63 $\pm$ 562.07	7342.38 $\pm$ 830.53	ND
120417	#106 1H11	2630.98 $\pm$ 604.56	2341.75 $\pm$ 563.77	ND
	#113 1F04	ND	ND	ND
	#140 3F06	3108.16 $\pm$ 146.85	2753.77 $\pm$ 397.19	ND

Unidad: pg/mL. NT: No probado debido a número insuficiente de células. ND: Por debajo del límite de detección.

Fig. 1 Producción de IFN- γ después de 24 horas de estimulación, determinada por ELISA



Como se muestra en la Tabla 6 y la Fig. 1, al AcOH y el WT-1 35 no indujeron la producción de IFN- γ en todos los clones.

En 4 clones, #107_1E02, #140_1D04 (Exp.120410), #140_1H05 (Exp.120416), #106_1H11 (Exp.120417), el OCV-501 y todos los péptidos que contienen la secuencia del OCV-501 indujeron una producción similar de IFN- γ .

Similar al resultado de ICS, sólo en el clon #140_3F06 (Exp.120417), los péptidos añadidos al terminal C indujeron una menor producción de IFN- γ en comparación con el OCV-501 y los péptidos añadidos al terminal N. Además, en el clon #106_3D02 (Exp.120410), los péptidos añadidos al terminal C mostraron una producción ligeramente inferior de IFN- γ en comparación con el OCV-501, y en el clon #107_1E04 (Exp.120416), tanto los péptidos añadidos al terminal N como los añadidos al terminal C mostraron una mayor producción de IFN- γ en comparación con el OCV-501. Aunque las concentraciones molares de los péptidos en la prueba no fueron idénticas entre sí, la diferencia de concentración molar estaba dentro de las dos veces, dado el MW. El aumento y la disminución de la actividad superaron la diferencia y por lo tanto se consideran como un resultado del cambio de la estabilidad de péptidos debido a la adición de aminoácidos.

En tres clones, #77_3B08, #77_3F05 y #113_1F04, no se observó la producción de IFN- γ con ninguno de los péptidos, y no se observó inducción peptídica no específica.

Conclusión

Los resultados anteriores demuestran que el péptido más largo (hasta 25 aminoácidos) que contiene la secuencia de OCV-501 puede inducir de manera similar producción de IFN- γ en un clon de Th1 específico al OCV-501. Además, en algunos clones la actividad puede variar mediante la adición de aminoácidos.