



CSA046933

Industria y Comercio**SUPERINTENDENCIA**

34



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

Organización y
Digitalización CSA Ltda

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION**09-18403**

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

PEPTIDO WT1 RESTRINGIDO A HLA-A*1101 Y COMPOSICION

FARMACEUTICA QUE COMPRENDE EL MISMO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.

OSAKA, JAPON

DOMICILIO

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. 09-078403- -00000-0000

Fecha: 2009-07-28 16:22:08 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

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,
Japón

Domicilio: Osaka,
Japón

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ**

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 35.456.344 T. 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/JP2007/074146

Fecha: 14 de diciembre de 2007

Publicación Internacional No. WO 2008/081701 A1

Fecha: 10 de julio de 2008

6

Título (54)

**PEPTIDO WT1 RESTRINGIDO A HLA-A*1101 Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA
QUE COMPRENDE EL MISMO**

7

Clasificación Internacional (51) C12N 015/012

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

JP

(32) Fecha

28 de diciembre de 2006

(31) Número de Solicitud

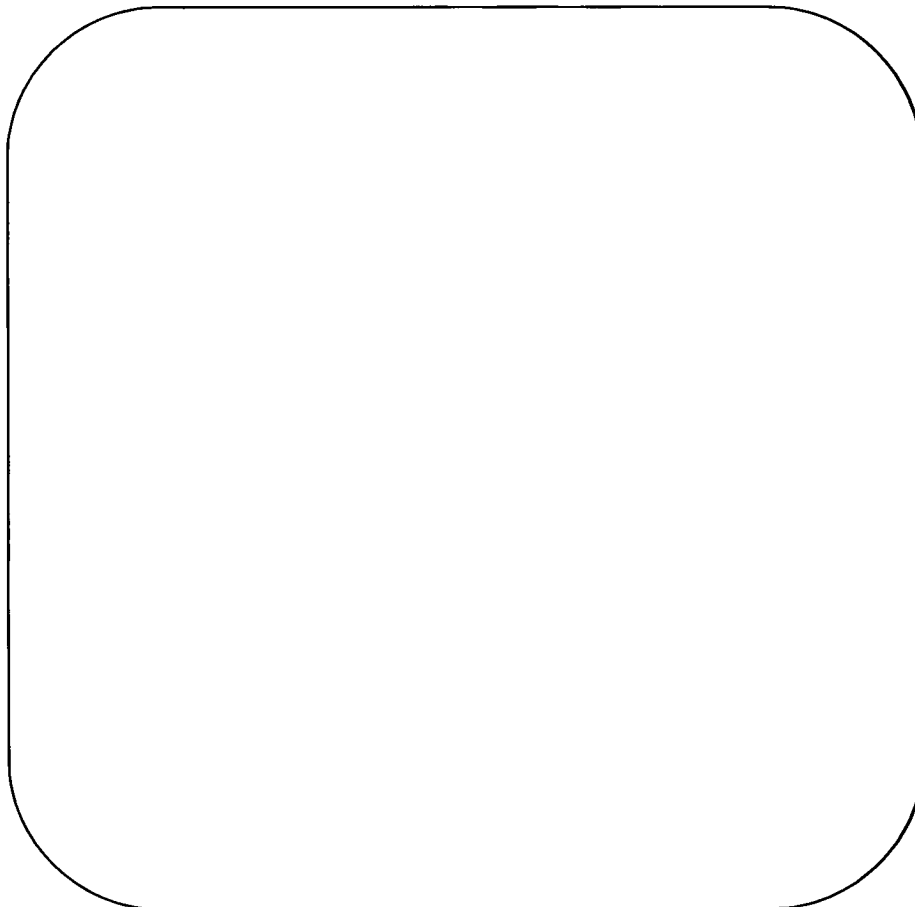
2006-355356

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 4 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por \$100.000.00.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ 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

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/081701 A1

Descripción:

Páginas 21 en el idioma original

Páginas 38 en español

Reivindicaciones: Número (s) 19

Figuras: Número (s) 14

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

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES DENTRO
DE LA FASE INTERNACIONAL**

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, 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

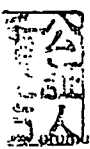
por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como 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 abogados 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, enseñas, 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

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 Power of

5

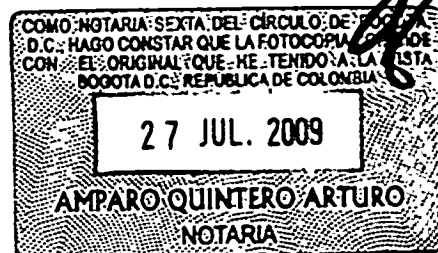
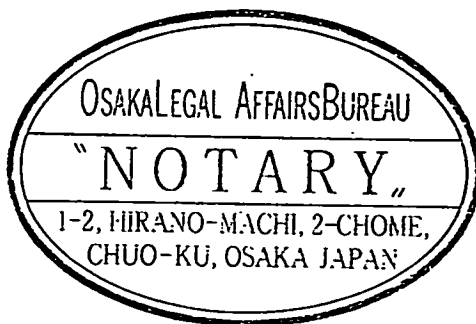


introduzcan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan
sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso,
desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes
oficiosos.

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





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:

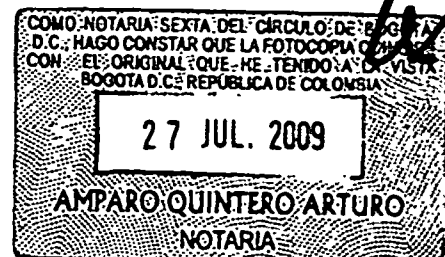


✓ 10. Signature:

Noriko KAWAHITO

Noriko KAWAHITO

For the Minister for Foreign Affairs



重吉人

2737

重吉人



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。_____

よってこれを認証する。_____

平成21年5月21日 _____

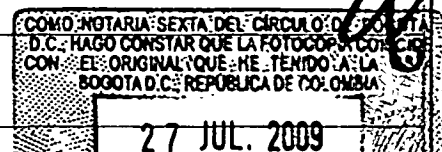
公証人重吉孝一郎役場において。_____

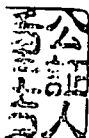
大阪府中央区平野町2丁目1番2号（沢の鶴ビル内）

大阪法務局所属

公証人 重吉孝一郎

重吉人





8.

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.

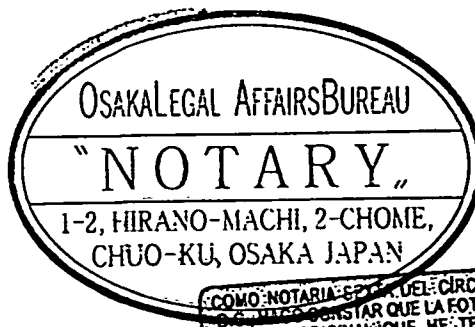
At the Office of Koichiro SHIGEYOSHI, Osaka, Japan
on the 21st day of May, 2009

Koichiro SHIGEYOSHI

Notary attached to

The Osaka Legal Affairs Bureau

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



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 EMILIO FERRERO, TPA 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, TPA 23555 Y A DANIEL PEÑA, TPA 65620.

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

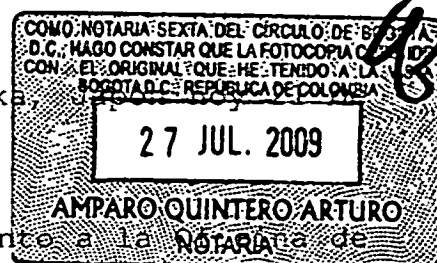
CERTIFICACIÓN NOTARIAL

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 de conformidad 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, mayo de 2009.

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



037 12

P A T E N T S

CESION

El (los) suscrito (s)

en consideración al pago de la suma de
(.....), que he(mos)
recibido, por el presente documento cedo
(cedemos) a

una compañía constituida de conformidad con las
leyes de

con oficinas en

todos los derechos y títulos sobre la invención
denominada

EL CESIONARIO firma también el presente y
declara que acepta dicha cesión

Dado y firmado hoy

en

ASSIGNMENT

The undersigned

Haruo SUGIYAMA

in consideration of the sum of US\$10.00-
(.....), the receipt of which
is hereby acknowledged, by these presents do sell,
assign and transfer unto

International Institute of Cancer Immunology, Inc.
a corporation organized under the laws of
Japan

having a place of business at
13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka 564-0053 JAPAN

all rights and title to the invention related to

"HLA-A*1101-restricted WT1 peptide and
pharmaceutical composition comprising the same".

THE ASSIGNEE signs these presents and declares
that accepts the aforesaid assignment

Given and signed this 14th day of May, 2009

in Osaka, Japan

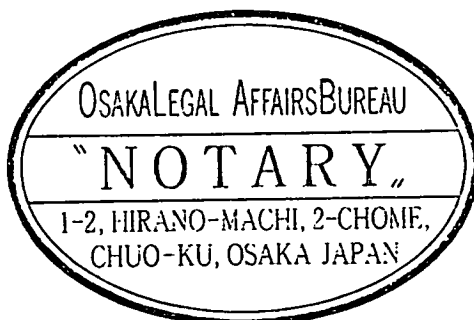
Inventors

Haruo Sugiyama
Haruo SUGIYAMA

International Institute of Cancer Immunology, Inc.

Assignee

Taiji Takahashi
Taiji TAKAHASHI
Representative Director and President





13

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. **2792**

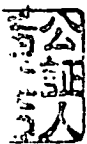
9. Seal/stamp:



10. Signature:

Noriko KAWAHITO

For the Minister for Foreign Affairs



登簿平成21年第335号

嘱託人 杉山治夫 及び 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。——

よってこれを認証する。——

平成21年5月21日 ——

公証人重吉孝一郎役場において。——

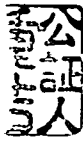
大阪府中央区平野町2丁目1番2号（沢の鶴ビル内）

大阪法務局所属

公証人

重吉孝一郎





LS

NOTARIAL ATTESTATION

REGISTER NUMBER: 335 / 2009

This is to certify that Nobuko INAMOTO, an agent of Haruo SUGIYAMA and Taiji TAKAHASHI, has stated in my very presence that said Haruo SUGIYAMA and Taiji TAKAHASHI acknowledged themselves to have signed the attached Assignment; and further that said Taiji TAKAHASHI has signed said document 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, Japan
on the 21st day of May, 2009

Koichiro Shigeyoshi

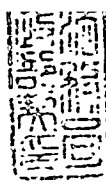
Koichiro SHIGEYOSHI

Notary attached to

The Osaka Legal Affairs Bureau

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

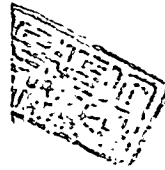




16

総 第 2238 号

証



明

大阪法務局所属公証人

重吉孝一郎

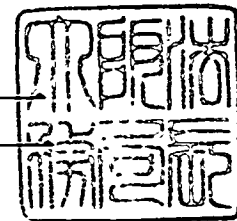
平成21年5月21日付

平成21年登簿第 335 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 185/2009 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN IDIOMA INGLÉS REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL AUTORIZADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 Y DEBIDAMENTE INSCRITO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA.

CESIÓN DE PATENTE

El suscrito HARUO SUGIYAMA, como compensación por el pago de la suma de diez dólares estadounidenses, transacción de la cual acusamos recibo, por el presente documento cedo y transfiero a INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC, una sociedad constituida de conformidad con las leyes de JAPON, con domicilio en 13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka 564-0053, JAPÓN, todos los derechos y titulo sobre la invención denominada **PÉPTIDO WT1- RESTRINGIDO A HLA-A* 1101 Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE EL MISMO.**

El cesionario firma también el presente y declara que acepta dicha cesión.

Dado y firmado hoy 14 de mayo de 2009 en Osaka, Japón

Inventor: HARUO SUGIYAMA

INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY INC.

Cesionario: TAIJI TAKAHASHI

Representante, director y presidente

SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE OSAKA

NOTARIO. 1-2, HIRANO-MACHI, 2-CHOME, CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

NÚMERO DE REGISTRO 335/2009

dichos HARUO SUGIYAMA y TAIJI TAKAHASHI reconocieron haber firmado la cesión adjunta. Además que TAIJI TAKAHASHI ha firmado dicho documento cumpliendo con la autorización a él concedida como director representante y presidente de INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC., una sociedad constituida y existente de conformidad con las leyes de Japón y con domicilio principal en 13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka, Japón.

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

FIRMADO: KOICHIRO SHIGEYOSHI, notario adjunto a la Oficina de Asuntos Jurídicos de Osaka.

C/O SAWANOTSURU BUILDING

1-2, HIRANO-MACHI 2-CHOME

CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE OSAKA

NOTARIO. 1-2, HIRANO-MACHI, 2-CHOME, CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

CERTIFICACION

Por la presente certifico que la certificación notarial adjunta ha sido firmada por un notario debidamente autorizado y practicante en Osaka, Japón, y que el sello oficial que aparece en la misma es genuino. Fecha: 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. PAÍS: JAPÓN

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

4. lleva el sello/estampilla de KOICHIRO SHIGEYOSHI, NOTARIO PÚBLICO

CERTIFICADO

5. en OSAKA 6. el 21 de mayo de 2009

7. por el MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES

8. No. 2792

9. Sello/estampilla: MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES, JAPÓN

10. Firma: NORIKO KAWAHITO, a nombre del Ministro de Asuntos Exteriores.

ECN\ECN\ID-152807\WPCL002G

COLO-17075-841-001-4

Bogotá, 25 de junio de 2009.

Eduardo Calado N.

Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL

Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

932198
Eduardo Calado
AUTENTICADO EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

(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(43) 国際公開日
2008年7月10日 (10.07.2008)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2008/081701 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/12 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) C07K 14/82 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

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

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2007/074146

(22) 国際出願日:

2007年12月14日 (14.12.2007)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GN, GR, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(30) 優先権データ:

特願 2006-355356

2006年12月28日 (28.12.2006) JP

(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, 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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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13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).

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別箇に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: HLA-A*1101-RESTRICTED WT1 PEPTIDE AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING THE SAME

(54) 発明の名称: HLA-A*1101拘束性WT1ペプチド、およびそれを含む医薬組成物

(57) Abstract: Disclosed are: an HLA-A*1101-restricted WT1 peptide, specifically a peptide which comprises an amino acid sequence composed of nine contiguous amino acid residues derived from WT1 protein, is capable of binding to an HLA-A*1101 molecule and has a CTL-inducing ability; a peptide dimer which comprises two peptide monomers each comprising an amino acid sequence composed of nine contiguous amino acid residues containing at least one cysteine residue and derived from WT1 protein, wherein the two peptide monomers are linked to each other via a disulfide bond and the peptide dimer is capable of binding to an HLA-A*1101 molecule and has a CTL-inducing ability; a polynucleotide encoding the peptide; a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of cancer, which comprises the peptide or the peptide dimer, and others.

(57) 要約: 本発明は、HLA-A*1101拘束性WT1ペプチド、詳細には、WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、HLA-A*1101分子と結合能を有し、かつCTL誘導能を有するペプチド、および少なくとも1個のシステイン残基を含むWT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含む2個のペプチド単量体が、ジスルフィド結合により互いに結合しているペプチド二量体であって、HLA-A*1101分子と結合能を有し、かつCTL誘導能を有する、ペプチド二量体に関する。さらに本発明は、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、それらを含む癌治療および/または予防用医薬組成物などに関するものである。

明 細 書

HLA-A*1101拘束性WT1ペプチド、およびそれを含む医薬組成物
技術分野

- [0001] 本発明は、HLA-A*1101拘束性WT1ペプチド、詳細には、WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、HLA-A*1101分子と結合能を有し、かつCTL誘導能を有するペプチド、および少なくとも1個のシステイン残基を含むWT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含む2個のペプチド単量体が、ジスルフィド結合により互いに結合しているペプチド二量体であって、HLA-A*1101分子と結合能を有し、かつCTL誘導能を有する、ペプチド二量体に関する。さらに本発明は、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、それらを含む癌治療および／または予防用医薬組成物などに関するものである。

背景技術

- [0002] WT1遺伝子(Wilms' tumor 1 gene)は、小児の腎癌であるウイلمス腫瘍の責任遺伝子として同定された遺伝子であり(非特許文献1および2)、ジンクフィンガー構造を有する転写因子である。当初、WT1遺伝子は癌抑制遺伝子であるとされたが、その後の研究(非特許文献3、4、5および6)により、造血器腫瘍や固形癌においてはむしろ癌遺伝子として働くことが示された。
- [0003] WT1遺伝子が多くの悪性腫瘍において高発現していることから、変異のない自己タンパク質であるWT1遺伝子産物の生体内における免疫原性の有無が検証されてきた。その結果、腫瘍細胞で高発現しているWT1遺伝子由来のタンパク質は細胞内プロセッシングにより断片化され、生じたペプチドがMHCクラスI分子と複合体を形成して細胞表面に提示されること、およびかかる複合体を認識するCTLがWT1ペプチドワクチネーションにより誘導され得ることが明らかとなった(非特許文献7、8および9)。さらに、WT1ペプチドまたはWT1 cDNAで免疫されたマウスは、移植されたWT1遺伝子発現腫瘍細胞を高い確率で拒絶するが(非特許文献7および10)、WT1遺伝子を生理的に発現している正常組織は誘導されたCTLによって傷害されないこ

とも示された(非特許文献7)。ヒト細胞を用いたインビトロの実験において、ヒトMHCクラスI分子の1つであるHLA-A*0201分子高結合性Db126ペプチドおよびWH187ペプチド(配列番号:1におけるアミノ酸187-195、SLGEQQYSV)を用いてHLA-A*0201を持つヒト末梢血単核球を刺激すると、WT1特異的CTLが誘導され、誘導されたCTLは内因性にWT1遺伝子を高発現している腫瘍細胞に対し特異的な傷害活性を有すること、およびかかるCTLの傷害活性はHLA-A2拘束性であることが示された(非特許文献11)。HLA-Aアレルのうち、日本人に最も多いHLA-A*2402に適合するWT1ペプチド(WT1235;配列番号:1におけるアミノ酸235-243、CMTWNQMNL)を用いたヒト細胞でのインビトロの実験において、WT1特異的CTL(TAK-1)が誘導され(非特許文献12)、誘導されたCTLは、一部WT1遺伝子を生理的に発現している正常造血幹細胞のコロニー形成能を抑制しないことが示された(非特許文献12および13)。これらの報告から、マウスだけでなくヒトにおいてもWT1特異的CTLの誘導が可能であり、かかるCTLがWT1遺伝子を高発現する腫瘍細胞に対しては傷害活性を有するが、WT1遺伝子を生理的に発現する正常細胞には傷害活性を有さない可能性が強く示唆された(非特許文献7、10、11、12および13)。

- [0004] WT1遺伝子産物は核内タンパク質として存在し、細胞質内でプロテアソームによってプロセッシングを受け、ペプチドに断片化される。断片化されたペプチドは、TAP(transporter associated with antigen processing)分子によって小胞体内腔へと導かれ、MHCクラスI分子と複合体を形成し、細胞表面に提示される。CTL前駆細胞がTCRを介してWT1ペプチド-MHCクラスI分子複合体を認識することによって、WT1特異的CTLが誘導され、MHCクラスI分子を介してWT1遺伝子産物を提示する腫瘍細胞に対して細胞傷害作用を発揮する(非特許文献7、8および9)。そうすると、WT1遺伝子産物を標的とした癌免疫療法において用いられるWT1ペプチドは、少なくとも生体内でMHCクラスI分子に結合する形態となる必要がある。しかし、MHCクラスI分子には多様性があり、それぞれのMHCクラスI分子に結合するWT1ペプチドのアミノ酸配列は異なるため、MHCクラスIの型別に適合するペプチドを用意する必要がある。しかしながら、現在分かっているHLA分子に拘束性のWT1ペプチドは、

HLA-A*2402分子、HLA-A*0201分子、HLA-A*2601分子、HLA-A*3303分子拘束性のもののみである(それぞれ、特許文献1、非特許文献11、特許文献2、および特許文献3)。従って、HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドを見出す必要があった。

特許文献1:国際公開2003/106682号公報

特許文献2:国際公開2005/095598号公報

特許文献3:特願2006-45287

非特許文献1:Daniel A. Haber et al., Cell. 1990 Jun 29;61(7):1257-69.

非特許文献2:Call KM et al., Cell. 1990 Feb 9;60(3):509-20.

非特許文献3:Menke AL et al., Int Rev Cytol. 1998;181:151-212. Review.

非特許文献4:Yamagami T et al., Blood. 1996 Apr 1;87(7):2878-84.

非特許文献5:Inoue K et al., Blood. 1998 Apr 15;91(8):2969-76.

非特許文献6:Tsuboi A et al., Leuk Res. 1999 May;23(5):499-505.

非特許文献7:Oka Y et al., J Immunol. 2000 Feb 15;164(4):1873-80.

非特許文献8:Melief CJ et al., Immunol Rev. 1995 Jun;145:167-77.

非特許文献9:Ritz J, J Clin Oncol. 1994 Feb;12(2):237-8.

非特許文献10:Tsuboi A et al., J Clin Immunol. 2000 May;20(3):195-202.

非特許文献11:Oka Y et al., Immunogenetics. 2000 Feb;51(2):99-107.

非特許文献12:Ohminami H et al., Blood. 2000 Jan 1;95(1):286-93.

非特許文献13:Gao L et al., Blood. 2000 Apr 1;95(7):2198-203.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の解決課題は、HLA-A*1101分子拘束性であって、WT1タンパク質由来のアミノ酸配列を含むペプチド、およびそれをコードするポリヌクレオチド、ならびにそれらを含む癌の治療および/または予防用医薬組成物などを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、上記事情に鑑み鋭意研究を重ねた結果、WT1タンパク質由来の9個

の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドのうちHLA-A*1101分子と結合能を有するペプチドが、高い確率でWT1特異的CTLを誘導できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は、

(1) WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、HLA-A*1101分子と結合能を有し、かつCTL誘導能を有する、ペプチド、

(2) アミノ酸配列の第9位のアミノ酸がLysまたはArgである、(1)記載のペプチド、

(3) アミノ酸配列が以下の群：

Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys(配列番号:2)、

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(配列番号:3)、

Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys(配列番号:4)、

Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(配列番号:5)、

Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys(配列番号:6)、

Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys(配列番号:7)、

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg(配列番号:8)、

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys(配列番号:9)、

Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys(配列番号:10)、

からなる群より選択される、(1)記載のペプチド、

(4) アミノ酸配列がAla Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys(配列番号:2)である、(3)記載のペプチド、

(5) 少なくとも1個のシステイン残基を含むWT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含む2個のペプチド単量体が、ジスルフィド結合により互いに結合しているペプチド二量体であって、HLA-A*1101分子と結合能を有し、かつCTL誘導能を有する、ペプチド二量体、

(6) ペプチド単量体のアミノ酸配列が、以下の群：

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(配列番号:3)、

Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys(配列番号:7)、

- Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg(配列番号:8)、
Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys(配列番号:9)、
からなる群より選択される、(5)記載のペプチド二量体、
(7)(1)記載のペプチドおよび／または(5)記載のペプチド二量体を含む、癌を治療
または予防するための医薬組成物、
(8)有効量の(1)記載のペプチドおよび／または(5)記載のペプチド二量体をHLA
-A^{*}1101陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための
方法、
(9)(1)記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド、
(10)(9)記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、
(11)(9)記載のポリヌクレオチドまたは(10)記載のベクターを含む、癌を治療または
予防するための医薬組成物、
(12)有効量の(9)記載のポリヌクレオチドまたは(10)記載のベクターをHLA-A^{*}1
101陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法、
(13)(1)記載のペプチドおよび／または(5)記載のペプチド二量体により誘導され
る、WT1特異的CTL、
(14)末梢血単核球を(1)記載のペプチドおよび／または(5)記載のペプチド二量体
の存在下で培養し、該末梢血単核球からWT1特異的CTLを誘導することを特徴と
する、WT1特異的CTLの誘導方法、
(15)(1)記載のペプチドおよび／または(5)記載のペプチド二量体を必須構成成分
として含む、WT1特異的CTLを誘導するためのキット、
(16)(1)記載のペプチドおよび／または(5)記載のペプチド二量体により誘導され
る、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞、
(17)未熟抗原提示細胞を(1)記載のペプチドおよび／または(5)記載のペプチド二
量体の存在下で培養し、該未熟抗原提示細胞からWT1ペプチドを提示する抗原提
示細胞を誘導することを特徴とする、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞の誘導
方法、
(18)(1)記載のペプチドおよび／または(5)記載のペプチド二量体を必須構成成分

として含む、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞を誘導するためのキット、
(19)(13)記載のCTLまたは(16)記載の抗原提示細胞を用いることを特徴とする、
癌の診断方法、
を提供するものである。

発明の効果

- [0008] 本発明により、HLA-A*1101拘束性であって、WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチド、およびそれをコードするポリヌクレオチド、ならびにそれらを含む癌の治療および／または予防用医薬組成物などが得られるので、HLA-A*1101を有する対象におけるインビボおよびインビトロでのWT1特異的CTLの誘導が可能となる。日本人におけるHLA-A*1101陽性率は、約17.9%と高いことから、広範囲の対象においてWT1特異的CTLを誘導できる。

図面の簡単な説明

- [0009] [図1]図1は、WT1₂₅₁を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
[図2]図2は、WT1₂₇₉を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
[図3]図3は、WT1₃₁₂を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
[図4]図4は、WT1₃₁₃を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
[図5]図5は、WT1₃₃₈を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
[図6]図6は、WT1₃₇₈を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
[図7]図7は、WT1₃₈₆を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
[図8]図8は、WT1₄₁₅を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
[図9]図9は、WT1₄₃₆を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す。
[図10]図10は、WT1₃₇₈ペプチドを用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す(a、b、cは、それぞれHLA-A*1101陽性健常人ドナー1、2、3由来PBMCを用いたときの細胞傷害活性を示す)。
[図11]図11は、WT1₃₇₈ペプチド二量体を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す(aおよびbは、それぞれHLA-A*1101陽性健常人ドナー1および2由来PBMCを用いたときの細胞傷害活性を示す)。
[図12]図12は、改変WT1₃₇₈ペプチド(G→I)を用いて誘導されたCTLの細胞傷害

活性を示す(a、b、cは、それぞれHLA-A*1101陽性健常人ドナー1、2、3由来P BMCを用いたときの細胞傷害活性を示す)。

[図13]図13は、改変WT1₃₇₈ ペプチド(G→V)を用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す(a、b、cは、それぞれHLA-A*1101陽性健常人ドナー1、2、3由来P BMCを用いたときの細胞傷害活性を示す)。

[図14]図14は、WT1₃₇₉ ペプチドを用いて誘導されたCTLの細胞傷害活性を示す(a、b、cは、それぞれHLA-A*1101陽性健常人ドナー1、2、3由来PBMCを用いたときの細胞傷害活性を示す)。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明は、1の態様において、WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、HLA-A*1101分子と結合能を有し、かつCTL誘導能を有するペプチド(本明細書において、「WT1ペプチド」ともいう)に関するものである。ヒトWT1タンパク質のアミノ酸配列を配列番号:1に示す。本発明のペプチドは、かかる配列番号:1に示されるアミノ酸配列中の連続する9個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むものである。本発明のペプチドが、後述の配列番号3、7、8および9のアミノ酸配列などのシステインを含むアミノ酸配列を含む場合、かかるアミノ酸配列中のシステインを他のアミノ酸などの別の物質(例えば、セリン、アラニン、 α -アミノ酪酸)に置換して、あるいはシステインのSH基を当該技術分野で既知の保護基(例えば、カルボキシメチル基、ピリジルエチル基)で修飾することにより、安定性を上昇させてもよい。本発明のペプチドは、細胞内でプロセッシングされて、プロセッシングされたペプチドが抗原提示細胞により提示されることにより、CTLを誘導することができる癌抗原ペプチドである。

[0011] 本発明は、上述の通りHLA-A*1101拘束性を有するペプチドを得ることを目的とする。従って、本発明のペプチドは、HLA-A*1101分子と結合能を有するものである。結合能は、当該技術分野において既知の方法により調べることができる。かかる方法として、例えば、Rankpep、BIMAS、SYFPEITHIなどのコンピューターベースの方法、HLA-A*1101分子結合能を有する既知のペプチドとの競合的結合試験などがある。例えば、調べた結合能を既知のHLA-A*1101拘束性ペプチ

ドの結合能と比較し、本発明のペプチドが結合能を有するかどうかを判断することができる。本発明における結合能を有するペプチドの例は、本願明細書の実施例1に記載した方法により得られるHLA-A*1101分子に対する親和性スコアが4以上のもの、好ましくは、5以上のもの、より好ましくは、6以上のものである。

- [0012] 本発明のペプチドは、さらに、CTL誘導能を有するものである。WT1遺伝子は、例えば、白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌において天然型で高発現しているので、本発明のペプチドは、かかる疾患に罹患した対象において、高い確率でCTLを誘導することなどが可能である。CTL誘導能は、インビボまたはインビトロにおいてCTLを誘導することができる能力をいう。かかる誘導能は、一般的な方法、例えば、Cr遊離アッセイを用いてCTLの細胞傷害活性を調べることなどにより調べることができる。
- [0013] 本発明のペプチドは、アミノ酸配列の第9位のアミノ酸がLysまたはArgのものであってもよい。かかるアミノ酸を有することで、ペプチドのHLA-A*1101分子との結合能が高くなると考えられる。
- [0014] 本発明のペプチドが含む該9個のアミノ酸からなるアミノ酸配列のうち好ましいものは、Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys(配列番号:2)、Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(配列番号:3)、Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys(配列番号:4)、Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(配列番号:5)、Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys(配列番号:6)、Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys(配列番号:7)、Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg(配列番号:8)、Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys(配列番号:9)、またはAsn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys(配列番号:10)であり、最も好ましいものは、Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys(配列番号:7)である。さらに、配列番号:2～10のいずれかにおいて、該9個のアミノ酸のうち1個ないし数個、好ましくは1個ないし5個のアミノ酸が別のアミノ酸に置換されたものであってもよい。また、該9個のアミノ酸および置換された別のアミノ酸のいずれかが、適宜修飾されたものであってもよい。但し、いずれの場合に

においても、本発明のペプチドがHLA-A*1101分子との結合能を保持していることが条件となる。

[0015] 上述の通り、本発明のペプチドは、WT1タンパク質由来であって、上記9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含んでいけばよい。従って、本発明のペプチドは、例えば、配列番号:2~10に示すアミノ酸配列からなるペプチドそのものであってもよく、あるいは配列番号:2~10に示すアミノ酸配列を含む、WT1タンパク質またはその一部であってもよい。本発明のペプチドに含まれるアミノ酸の数は特に限定されないが、例えば、9~500個、9~300個、9~200個、9~100個、9~50個、9~30個、9~12個などである。本発明のペプチドはまた、上記9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列のN末端および/またはC末端に、種々の物質を結合させることができる。例えば、アミノ酸、ペプチド、それらのアナログ等を結合させてもよい。本発明のペプチドにこれらの物質が結合している場合、これらの物質が例えば、生体内酵素などにより、あるいは細胞内プロセッシングなどの過程により処理され、最終的に上記9個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を生じ、HLA-A*1101分子との複合体として細胞表面に提示されることにより、CTL誘導効果を得ることができる。これらの物質は、本発明のペプチドの溶解性を調節するものであってもよく、耐プロテアーゼ作用等その安定性を向上させるものであってもよく、また例えば、所定の組織・器官に特異的に本発明のペプチドをデリバリーするようなものであってもよく、あるいはまた抗原提示細胞の取込み効率を増強させる作用などを有するものであってもよい。これらの物質はまた、CTL誘導能を増大させるもの、例えば、ヘルパーペプチドなどであってもよい。

[0016] 本発明のペプチドは、当該技術分野において通常用いられる方法またはそれらの変法を用いて合成することができる。かかる合成方法は、例えば、Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成、丸善(株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成、広川書店, 1991などに記載されている。

[0017] 本発明のペプチドはまた、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列情報に

基づき、遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。かかる遺伝子工学的手法は、当業者に周知のものである。

- [0018] 本発明は、さらなる態様において、少なくとも1個のシステイン残基を含むWT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含む2個のペプチド単量体が、ジスルフィド結合により互いに結合している、HLA-A*1101分子との結合能を有し、かつCTL誘導能を有する、ペプチド二量体(本明細書において、「WT1ペプチド二量体」ともいう)に関するものである。本発明のペプチド二量体の安定性は、二量体形態をとることによりペプチド単量体と比較して増大する。本発明のペプチド二量体は、細胞内でプロセッシングされて、プロセッシングされたペプチドが抗原提示細胞により提示されることにより、CTLを誘導することができる癌抗原ペプチド二量体である。
- [0019] 本発明のWT1ペプチド二量体は、2個のペプチド単量体が、単量体に存在するシステイン残基間のジスルフィド結合を介して結合することにより、形成される。従って、本発明のWT1ペプチド二量体に含まれるペプチド単量体は、上述のWT1ペプチドであって、かつ少なくとも1個のシステイン残基を含むものである。本発明のWT1ペプチド二量体は、ホモ二量体であっても、ヘテロ二量体であってもよい。
- [0020] 本発明のWT1ペプチド二量体において、ペプチド単量体が含むアミノ酸配列のうち好ましいものは、Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(配列番号:3)、Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys(配列番号:7)、Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg(配列番号:8)、またはSer Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys(配列番号:9)であり、最も好ましいものは、Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys(配列番号:7)である。
- [0021] 本発明のWT1ペプチド二量体は、当該技術分野において既知の方法を用いて製造することができる。例えば、ペプチド単量体が1対のシステイン残基を含むとき、本発明のWT1ペプチド二量体は、例えば、システイン側鎖上の保護基を含む全ての保護基を除去し、次に、得られた単量体溶液をアルカリ条件下で空気酸化の対象とするか、あるいはアルカリまたは酸性条件下で酸化剤を添加することによりジスルフィド結合を形成することにより、製造され得る。酸化剤としては、例えば、ヨウ素、ジメチ

ルスルホキシド(DMSO)、フェリシアン化カリウムなどが挙げられる。

- [0022] ペプチド単量体が2個以上のシステイン残基を含むときも、本発明のWT1ペプチド二量体は前記方法により合成される。この場合、異なるタイプのジスルフィド結合に起因して、異性体が得られる。あるいは、本発明のWT1ペプチド二量体は、システイン側鎖の保護基の組み合わせを選択することにより、製造され得る。保護基の組み合わせとしては、例えば、MeBzl(メチルベンジル)基とAcm(アセトアミドメチル)基、Trit(トリチル)基とAcm基、Npys(3-ニトロ-2-ピリジルチオ)基とAcm基、S-Bu^t(S-tert-ブチル)基とAcm基の組み合わせなどが挙げられる。例えば、MeBzl基とAcm基との組み合わせの場合、WT1ペプチド二量体は、MeBzl基以外の保護基およびシステイン側鎖上の保護基以外の保護基を除去し、得られた単量体溶液を空気酸化の対象とし、保護されたシステイン残基間でジスルフィド結合を形成し、次に、ヨウ素により脱保護および酸化して、Acmで保護されていたシステイン残基間でジスルフィド結合を形成することにより、製造され得る。
- [0023] 本発明は、もう1つの態様において、上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび/またはWT1ペプチド二量体を含む、癌を治療または予防するための医薬組成物に関するものである。WT1遺伝子は、各種の癌や腫瘍、例えば、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌において高発現しているため、本発明の医薬組成物を癌の治療または予防のために用いることができる。本発明の医薬組成物がHLA-A*1101陽性対象に投与されると、該医薬組成物に含まれるHLA-A*1101拘束性WT1ペプチドまたはWT1ペプチド二量体により、WT1特異的CTLが誘導され、かかるCTLにより対象中の癌細胞が傷害される。
- [0024] 本発明の医薬組成物は、有効成分としての上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび/またはWT1ペプチド二量体以外に、例えば、担体、賦形剤などを含んでいてもよい。本発明の医薬組成物に含まれるHLA-A*1101拘束性WT1ペプチドまたはWT1ペプチド二量体は、WT1特異的CTLを誘導することから、その誘導効率を増強させるために、本発明の医薬組成物は適当なアジュバントを含むか、ある

いは適当なアジュバントと共に投与されてもよい。好ましいアジュバントとしては、例えば、完全または不完全フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどが挙げられるがこれらに制限されない。

[0025] 本発明の医薬組成物の投与方法は、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択することができる。当該方法は、例えば、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、経鼻投与、経口投与などが挙げられるが、これらに限らない。本発明の医薬組成物に含まれるペプチドまたはペプチド二量体の量、医薬組成物の剤形、投与回数などは、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択できるが、1回あたりのペプチド投与量は、通常、0.0001mg～1000mg、好ましくは、0.001mg～1000mgである。

[0026] 本発明は、別の態様において、有効量の上記WT1ペプチドおよび／またはWT1ペプチド二量体をHLA-A*1101陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法に関するものである。治療または予防される癌は、いずれのものであってもよく、例えば、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌を含む。

[0027] 本発明は、さらなる態様において、HLA-A*1101陽性対象におけるWT1特異的CTLの存在または量を決定する方法であって、

(a) WT1ペプチドとHLA-A*1101分子との複合体を該対象由来試料と反応させ、次に、

(b) 該試料に含まれる該複合体を認識するCTLの存在または量を調べる、工程を含む方法に関するものである。対象由来試料は、リンパ球が含まれている可能性があればいずれのものであってもよく、例えば、血液、リンパ液などの体液、組織などが挙げられる。WT1ペプチドとHLA-A*1101分子との複合体は、例えば、ビオチンストレプトアビジン法などの当業者に既知の方法を用いて、例えば、テトラマー、ペンタマーなどの形態にされていてもよい。かかる複合体を認識するCTLの存在または量は、当業者に既知の方法により測定することができる。本発明のこの態様において、上記複合体は標識されたものであってもよい。標識としては、蛍光標識、放射

性標識などの公知のものを使用することができる。標識することで、CTLの存在または量の決定が容易かつ迅速になる。

- [0028] 従って、本発明はまた、HLA-A*1101陽性対象におけるWT1特異的CTLの存在または量を決定するための、HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドを含む組成物を提供する。
- [0029] さらに、本発明は、HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドを含む、HLA-A*1101陽性対象におけるWT1特異的CTLの存在または量を決定するためのキットを提供する。
- [0030] 本発明は、さらなる態様において、WT1ペプチドとHLA-A*1101分子との複合体を用いて、WT1特異的CTLを生成する方法であって、
- (a) 試料と該複合体を反応させ、
 - (b) 該試料中に含まれる該複合体を認識するCTLを得る、
- 工程を含む方法に関するものである。WT1ペプチドとHLA-A*1101分子との複合体については上述の通りである。試料は、リンパ球が含まれている可能性があればいずれのものであってもよく、例えば、血液などの対象由来試料、細胞培養液などが挙げられる。複合体を認識するCTLの取得は、例えば、FACS、MACSなど当業者に既知の方法を用いて行うことができる。得られたWT1特異的CTLを培養し、種々の癌の治療または予防に用いることも可能になる。
- [0031] 従って、本発明はまた、WT1ペプチドとHLA-A*1101分子との複合体を用いて、WT1特異的CTLを生成する方法により得ることのできる、WT1特異的CTLに関するものである。
- [0032] 本発明は、さらにもう1つの態様において上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドに関するものである。本発明のポリヌクレオチドは、DNAであってもRNAであってもよい。本発明のポリヌクレオチドの塩基配列は、上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドのアミノ酸配列に基づき決定できる。該ポリヌクレオチドは、例えば、化学合成法などの公知のDNAまたはRNA合成方法、PCR法などにより製造することができる。
- [0033] 本発明は、別の態様において上記ポリヌクレオチドを含む発現ベクターに関するも

のである。発現ベクターの種類、上記ポリヌクレオチド配列以外で含まれる配列等は、当該発現ベクターを導入する宿主の種類、目的等に応じて適宜選択できる。本発明の発現ベクターをHLA-A*1101陽性対象に投与し、生体内においてHLA-A*1101拘束性WT1ペプチドを産生させ、WT1特異的CTLを誘導し、これにより対象中の造血器腫瘍細胞、固形癌細胞などを傷害することで、該造血器腫瘍、固形癌の治療または予防を行うことができる。

- [0034] 本発明は、さらに別の態様において上記ポリヌクレオチドまたは上記発現ベクターを含む、癌を治療または予防するための医薬組成物に関するものである。本発明のこの態様の医薬組成物の組成、投与方法等は、上述の通りである。
- [0035] 本発明は、別の態様において、有効量の上記ポリヌクレオチドまたは発現ベクターをHLA-A*1101陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法に関するものである。治療または予防される癌は、白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌を含む。
- [0036] 本発明は、別の態様において、上記発現ベクターを含有する細胞に関するものである。本発明の細胞は、例えば、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などの宿主細胞を上記発現ベクターを用いて形質転換することにより製造することができる。宿主細胞への発現ベクターの導入方法は、種々の方法を適宜選択して用いることができる。形質転換した細胞を培養し、産生されたWT1ペプチドを回収・精製することにより、本発明のペプチドを製造することもできる。
- [0037] 本発明は、さらなる態様において、上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび/またはWT1ペプチド二量体により誘導される、WT1特異的CTLに関するものである。本発明のCTLは、WT1ペプチドとHLA-A*1101分子との複合体を認識する。従って、本発明のCTLを用いて、HLA-A*1101陽性、かつWT1高発現腫瘍細胞を特異的に傷害することができる。
- [0038] 本発明は、別の態様において、WT1特異的CTLをHLA-A*1101陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法に関するものである。

。WT1特異的CTLの投与方法は、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択することができる。当該方法は、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、経鼻投与、経口投与などが挙げられるが、これらに限らない。

- [0039] 本発明は、別の態様において、末梢血単核球を上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび／またはWT1ペプチド二量体の存在下で培養し、該末梢血単核球からWT1特異的CTLを誘導することを特徴とする、WT1特異的CTLの誘導方法に関するものである。末梢血単核球が由来する対象は、HLA-A*1101陽性であればいずれであってもよい。末梢血単核球をHLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび／またはWT1ペプチド二量体の存在下で培養することで、末梢血単核球中のCTL前駆細胞からWT1特異的CTLが誘導される。本発明により得られたWT1特異的CTLをHLA-A*1101陽性対象に投与することで、対象の造血器腫瘍、固形癌を治療または予防することができる。
- [0040] 本発明は、さらに別の態様において、HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび／またはWT1ペプチド二量体を必須構成成分として含む、WT1特異的CTLを誘導するためのキットに関するものである。好ましくは、該キットは上記WT1特異的CTLの誘導方法に用いられる。本発明のキットは、上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび／またはWT1ペプチド二量体のほかに、例えば、末梢血単核球の取得手段、アジュバント、反応容器等を含んでいてもよい。一般的には、キットには取扱説明書を添付する。本発明のキットを用いて、WT1特異的CTLを効率よく誘導できる。
- [0041] 本発明は、さらなる態様において、上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび／またはWT1ペプチド二量体により誘導される、WT1ペプチドをHLA-A*1101分子を介して提示する抗原提示細胞（樹状細胞など）に関するものである。本発明の抗原提示細胞を用いることで、上記WT1特異的CTLが効率よく誘導される。
- [0042] 本発明は、別の態様において、上記WT1ペプチドをHLA-A*1101分子を介して提示する抗原提示細胞をHLA-A*1101陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法に関するものである。抗原提示細胞の投与方法

法は、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択することができる。当該方法は、例えば、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、経鼻投与、経口投与などが挙げられるが、これらに限らない。

- [0043] 本発明は、別の態様において、未熟抗原提示細胞を上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび／またはWT1ペプチド二量体の存在下で培養し、該未熟抗原提示細胞からWT1ペプチドをHLA-A*1101分子を介して提示する抗原提示細胞を誘導することを特徴とする、WT1ペプチドをHLA-A*1101分子を介して提示する抗原提示細胞の誘導方法に関するものである。未熟抗原提示細胞は、未熟樹状細胞などの成熟して抗原提示細胞となり得る細胞をいう。未熟抗原提示細胞が由来する対象は、HLA-A*1101陽性であればいずれのものであってもよい。未熟抗原提示細胞は、例えば、末梢血単核球などに含まれているため、かかる細胞を上記WT1ペプチドおよび／またはWT1ペプチド二量体の存在下で培養してもよい。
- [0044] 本発明は、さらに別の態様において、上記HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドおよび／またはWT1ペプチド二量体を必須構成成分として含む、WT1ペプチドをHLA-A*1101分子を介して提示する抗原提示細胞を誘導するためのキットに関するものである。好ましくは、該キットは上記抗原提示細胞の誘導方法に用いられる。本発明のキットに含まれるその他の構成成分等は上述の通りである。本発明のキットを用いて、WT1ペプチドをHLA-A*1101分子を介して提示する抗原提示細胞を効率よく誘導できる。
- [0045] 本発明は、別の態様において、HLA-A*1101拘束性WT1ペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドに対する抗体に関するものである。本発明の抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれであっていてもよい。
- [0046] 本発明は、さらなる態様において、上記WT1特異的CTL、WT1ペプチドをHLA-A*1101分子を介して提示する抗原提示細胞、またはHLA-A拘束性WT1ペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドに対する抗体を用いることを特徴とする、癌の診断方法に関するものである。好ましくは、WT1特異的CTLが本発明の診断方法に用いられる。例えば、上記CTL、抗原提示細胞または抗体をHLA-A*1101陽性対象由来の試料とインキュベーションする、あるいはHLA-A*110

1陽性対象に投与し、次に該CTL、抗原提示細胞または抗体の例えば、位置、部位、量等を決定することで、癌の診断が可能となる。上記CTL、抗原提示細胞または抗体は、標識されたものであってもよい。かかる標識を付すことで、本発明の診断方法を効率よく行うことができる。

[0047] 以下に実施例を示して本発明を具体的かつ詳細に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

実施例 1

[0048] WT1ペプチドの選択

RANKPEP(<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>)を用いて、WT1タンパク質(配列番号:1)由来のペプチドから、HLA-A*1101分子との結合能の高いWT1₂₅₁、WT1₂₇₉、WT1₃₁₂、WT1₃₁₃、WT1₃₃₈、WT1₃₇₈、WT1₃₈₆、WT1₄₁₅、およびWT1₄₃₆を選択した。これらのペプチドのアミノ酸配列、配列番号:1におけるアミノ酸番号、HLA-A*1101分子に対する親和性スコアを表1に示す。

[0049] [表1]

ペプチド	アミノ酸番号	アミノ酸配列	親和性スコア
WT1 ₂₅₁ (配列番号:2)	251~259	AAGSSSSVK	15.18
WT1 ₂₇₉ (配列番号:3)	279~287	PILCGAQYR	11.47
WT1 ₃₁₂ (配列番号:4)	312~320	RSASETSEK	14.96
WT1 ₃₁₃ (配列番号:5)	313~321	SASETSEKR	6.87
WT1 ₃₃₈ (配列番号:6)	338~346	SHLQMHSRK	13.72
WT1 ₃₇₈ (配列番号:7)	378~386	TGVKPFQCK	11.33
WT1 ₃₈₆ (配列番号:8)	386~394	KTCQRKFSR	13.82
WT1 ₄₁₅ (配列番号:9)	415~423	SCRWPSCQK	10.29
WT1 ₄₃₆ (配列番号:10)	436~444	NMHQRNMTK	14.19

[0050] B-LCL細胞の調製

HLA-A*1101陽性健常人ドナーより採取した末梢血からFicoll-Hypaque gradie

nt density centrifugation法により末梢血単核球(PBMC)を分離した。次に、PBMCを24ウェル細胞培養用プレートに10% FCS含有RPMI 1640培地中約 1×10^7 個の密度で播種し、B95-8細胞(EBウイルス産生細胞)の培養上清を添加して、37°C、5% CO_2 で約1ヶ月間培養した。EBウイルスにより形質転換された、B細胞系腫瘍細胞であるB-LCL細胞を得た。得られたB-LCL細胞がWT1遺伝子を発現していないことを確認した。B-LCL細胞を $20 \mu\text{g/ml}$ WT1₂₅₁、WT1₂₇₉、WT1₃₁₂、WT1₃₁₃、WT1₃₃₈、WT1₃₇₈、WT1₃₈₆、WT1₄₁₅、またはWT1₄₃₆と共に2時間インキュベーションすることでパルスし、次に、放射線80Gyを照射させた。得られたB-LCL細胞(以下、WT1ペプチドでパルスしたB-LCL細胞という)を抗原提示細胞として以下の実験に用いた。

[0051] WT1特異的CTLの誘導

自己のPBMC 3×10^6 個を、24ウェル細胞培養用プレートにて $20 \mu\text{g/ml}$ WT1₂₅₁、WT1₂₇₉、WT1₃₁₂、WT1₃₁₃、WT1₃₃₈、WT1₃₇₈、WT1₃₈₆、WT1₄₁₅、またはWT1₄₃₆を含む完全培地(45% RPMI、45% AMI-V培地、および10% ヒトAB血清)中、37°C、5% CO_2 で1週間培養し、応答細胞を得た。得られた応答細胞 2×10^6 個を、同じWT1ペプチドでパルスしたB-LCL細胞 1×10^6 個と完全培地中で1週間共培養した(1回目刺激)。PBMCをWT1ペプチドでパルスしたB-LCL細胞とさらに3回共培養し(2~4回目刺激)、その際20IU/ml(最終濃度)IL2を、次の条件; 2回目刺激: 刺激開始の3日後から1日置き計2回; 3回目および4回目刺激: 刺激開始の翌日から1日置き計3回添加した。得られた細胞を、Negative Selection Columns Gravity Feed Kit (StemSp)を用いてCD8陽性T細胞が約80%となるよう濃縮し、次に、WT1ペプチドでパルスしたB-LCL細胞と共培養した(5回目刺激)。最終刺激の5日後のCD8陽性T細胞(CTL)を細胞傷害活性の測定のために用いた。

[0052] CTLの細胞傷害活性

CTLの細胞傷害活性を ^{51}Cr 遊離試験を用いて測定した。CTL細胞(以下、エフェクター細胞ともいう)を、あらかじめ ^{51}Cr を取り込ませた標的細胞と1:1ないし30:1の比率(E/T比)となるよう培地 $200 \mu\text{l}$ に調製し、96ウェル細胞培養用プレート中、37°C、5% CO_2 で4時間培養した。標的細胞として、CTL誘導に用いたWT1ペプチ

ドと同じペプチドでパルスしたB-LCL細胞(BLCL-P)、およびWT1ペプチドをパルスしていないB-LCL細胞(BLCL-NP)を用いた。培養後、遠心して上清を回収し、液体シンチレーションカウンターを用いて、上清中に遊離した ^{51}Cr 量を測定した。細胞傷害活性(%)を次の式:

$$(\text{試料上清中の}^{51}\text{Cr遊離量} - \text{自然発生}^{51}\text{Cr遊離量}) / (\text{最大}^{51}\text{Cr遊離量} - \text{自然発生}^{51}\text{Cr遊離量}) \times 100$$

(自然発生 ^{51}Cr 遊離量は、 ^{51}Cr を取り込ませた標的細胞のみを同様の条件で培養したときの ^{51}Cr 遊離量であり、最大 ^{51}Cr 遊離量は、 ^{51}Cr を取り込ませた標的細胞を1%トリトンX-100を用いて全細胞を溶解させたときの ^{51}Cr 遊離量である)

を用いて決定した。結果を図1~9に示す。図中、縦軸は特異的溶解(%)を示し、横軸はE/T比を示す。また、BLCL-Pを実線、BLCL-NPを点線で示す。WT1₂₅₁、WT1₂₇₉、WT1₃₁₂、WT1₃₁₃、WT1₃₃₈、WT1₃₇₈、WT1₃₈₆、WT1₄₁₅、およびWT1₄₃₆を用いて誘導されたCTLは、BLCL-NP細胞と比較して、WT1ペプチドをHLA-A*1101分子との複合体として提示しているBLCL-P細胞を特異的に傷害することが確認できた。以下で、WT1₂₅₁、WT1₂₇₉、WT1₃₁₃、WT1₃₃₈、およびWT1₃₈₆を用いて誘導されたCTLについてさらなる実験を行った。

[0053] CTLの内因性WT1遺伝子発現細胞に対する細胞傷害活性

WT1₂₅₁、WT1₂₇₉、WT1₃₁₃、WT1₃₃₈、およびWT1₃₈₆を用いて誘導されたCTLのWT1発現B-LCLに対する細胞傷害活性を上述の方法を用いて決定した。WT1発現細胞は、ヒトWT1遺伝子を導入したB-LCL細胞であって、細胞内でWT1タンパク質を発現し、プロセスされて約9個のアミノ酸からなるペプチドをHLA-A*1101分子上に発現する細胞をいう。結果を図1、2、4、5、および7に示す。図中、WT1発現B-LCLを破線で示す。WT1₂₅₁、WT1₂₇₉、WT1₃₁₃、WT1₃₃₈、およびWT1₃₈₆を用いて誘導されたCTLが、WT1遺伝子を内因性に発現している細胞に対しても傷害活性を有することが確認できた。

[0054] WT1ペプチド二量体の製造

WT1₃₇₈ペプチド単量体227.5mg、N-メチルグルカミン(NMG)227.5mgおよび水23mlの混合物を室温で約2日間攪拌することにより、空気酸化した。得られた

混合液に酢酸ナトリウム2gを水5mlに溶解した水溶液を加え約20分間、室温にて攪拌した。水200mlとアセトニトリル約200mlを添加し、桐山ロート(ろ紙 No. 5C)でろ過し、水(約50ml×3回)で洗浄した。残渣に水約200mlを添加し、凍結乾燥を行い、粗ペプチドWT1₃₇₈ 二量体158mgを得た。

[0055] 粗WT1ペプチド二量体の精製

粗WT1ペプチド₃₇₈ 二量体158mgをDMSO 9mlに溶解し、HPLC(島津製作所製 LC8AD型)にセットした、1液(H₂O/1% AcOH)で平衡化したODS C₁₈ カラム(5cm Φ×50cm L, YMC社製)にHPLCポンプを用いて注入した。カラムを約30分間そのままにし、0%～40%の濃度勾配の2液(CH₃CN/1% AcOH)で360分間かけて溶出した。220nmでのUV吸収をモニターしながら、自動分画装置を用いて、WT1ペプチド二量体を含む分画を回収した。回収した分画を合わせ、HPLC(日立製 L-4000型)にセットした、17%の2液で平衡化したODS C₁₈ カラム(4.6mm Φ×25cm L, YMC社製)に注入し、0%～47%の濃度勾配の2液で30分かけて溶出し、保持時間20.51分の精製WT1₃₇₈ ペプチド二量体46.6mgを得た。

FAB. MS 2365.0(理論値 2342.70)Na⁺ F=0.25%

[0056] WT1ペプチド二量体によるCTL誘導

得られたWT1₃₇₈ ペプチド二量体、WT1₃₇₈ ペプチド、改変WT1₃₇₈ ペプチド(G→I)(配列番号:11)および改変WT1₃₇₈ ペプチド(G→V)(配列番号:12)、WT1₃₇₉ ペプチド(配列番号:13, 国際公開第2002/28414号において開示)のCTL誘導能を、上述の方法により、HLA-A*1101陽性健常人ドナー1～3由来のPBMCを用いて調べた。結果を図10～14に示す。図中、縦軸は特異的溶解(%)を示し、横軸はE/T比を示す。また、BLCL-Pを実線、BLCL-NPを点線で示す。WT1₃₇₈ ペプチド二量体がCTL誘導能を有することが確認できた。また、WT1タンパク質のアミノ酸配列において、WT1₃₇₈ ペプチドと1アミノ酸ずつ異なるWT1₃₇₉ ペプチドのCTL誘導能は、WT1₃₇₈ ペプチドと比較して極めて低く、本発明のWT1ペプチドが既知のWT1ペプチドと比較して格別顕著なCTL誘導能を有することがわかった。

産業上の利用可能性

- [0057] 本発明により、HLA-A*1101拘束性WT1ペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、およびそれらを含む医薬組成物等が提供されるので、医薬品等の分野、例えば、WT1遺伝子を高発現している種々の造血器腫瘍、固形癌の予防薬、または治療薬の開発、製造分野において利用可能である。

配列表フリーテキスト

- [0058] SEQ ID NO: 11: Modified WT1 peptide
SEQ ID NO: 12: Modified WT1 peptide

請求の範囲

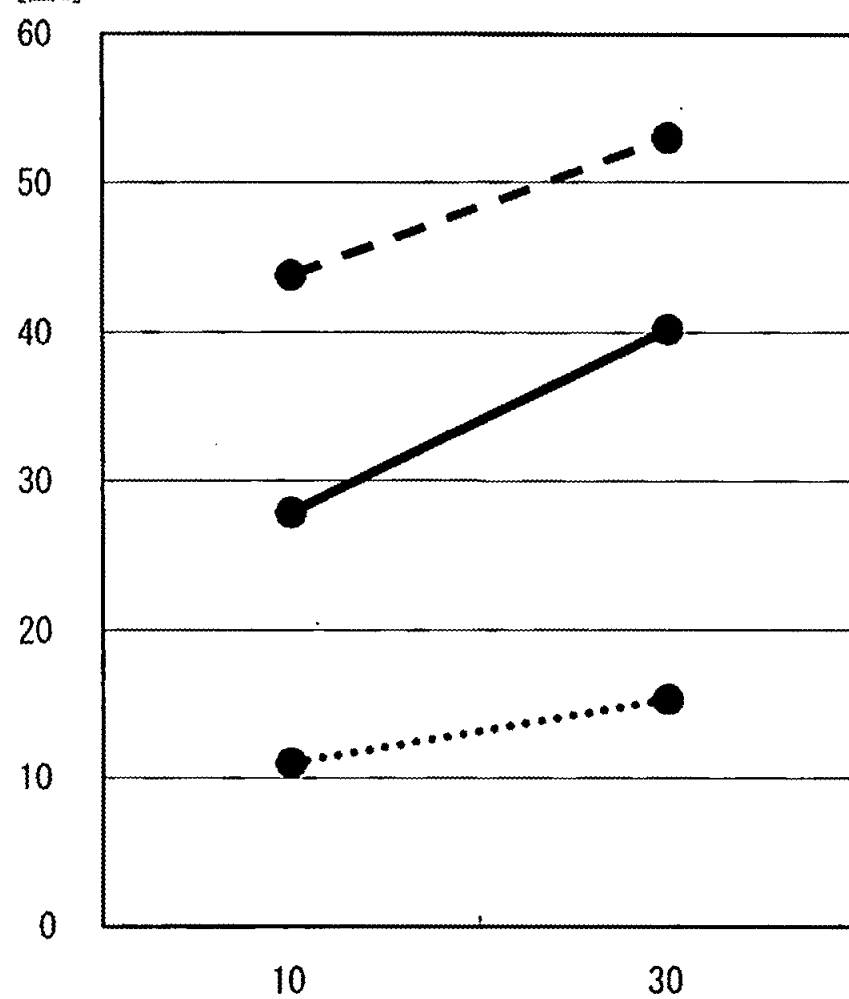
- [1] WT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含むペプチドであって、HLA-A*1101分子との結合能を有し、かつCTL誘導能を有する、ペプチド。
- [2] アミノ酸配列の第9位のアミノ酸がLysまたはArgである、請求項1記載のペプチド。
- [3] アミノ酸配列が以下の群：
Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys(配列番号:2)、
Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(配列番号:3)、
Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys(配列番号:4)、
Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg(配列番号:5)、
Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys(配列番号:6)、
Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys(配列番号:7)、
Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg(配列番号:8)、
Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys(配列番号:9)、
Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys(配列番号:10)、からなる群より選択される、請求項1記載のペプチド。
- [4] アミノ酸配列がAla Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys(配列番号:2)である、請求項3記載のペプチド。
- [5] 少なくとも1個のシステイン残基を含むWT1タンパク質由来の9個の連続するアミノ酸からなるアミノ酸配列を含む2個のペプチド単量体が、ジスルフィド結合により互いに結合しているペプチド二量体であって、HLA-A*1101分子との結合能を有し、かつCTL誘導能を有する、ペプチド二量体。
- [6] ペプチド単量体のアミノ酸配列が、以下の群：
Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg(配列番号:3)、
Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys(配列番号:7)、
Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg(配列番号:8)、
Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys(配列番号:9)、
からなる群より選択される、請求項5記載のペプチド二量体。

- [7] 請求項1記載のペプチドおよび／または請求項5記載のペプチド二量体を含む、癌を治療または予防するための医薬組成物。
- [8] 有効量の請求項1記載のペプチドおよび／または請求項5記載のペプチド二量体をHLA-A*1101陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法。
- [9] 請求項1記載のペプチドをコードするポリヌクレオチド。
- [10] 請求項9記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。
- [11] 請求項9記載のポリヌクレオチドまたは請求項10記載のベクターを含む、癌を治療または予防するための医薬組成物。
- [12] 有効量の請求項9記載のポリヌクレオチドまたは請求項10記載のベクターをHLA-A*1101陽性対象に投与することを特徴とする、癌を治療または予防するための方法。
- [13] 請求項1記載のペプチドおよび／または請求項5記載のペプチド二量体により誘導される、WT1特異的CTL。
- [14] 末梢血単核球を請求項1記載のペプチドおよび／または請求項5記載のペプチド二量体の存在下で培養し、該末梢血単核球からWT1特異的CTLを誘導することを特徴とする、WT1特異的CTLの誘導方法。
- [15] 請求項1記載のペプチドおよび／または請求項5記載のペプチド二量体を必須構成成分として含む、WT1特異的CTLを誘導するためのキット。
- [16] 請求項1記載のペプチドおよび／または請求項5記載のペプチド二量体により誘導される、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞。
- [17] 未熟抗原提示細胞を請求項1記載のペプチドおよび／または請求項5記載のペプチド二量体の存在下で培養し、該未熟抗原提示細胞からWT1ペプチドを提示する抗原提示細胞を誘導することを特徴とする、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞の誘導方法。
- [18] 請求項1記載のペプチドおよび／または請求項5記載のペプチド二量体を必須構成成分として含む、WT1ペプチドを提示する抗原提示細胞を誘導するためのキット。
- [19] 請求項13記載のCTLまたは請求項16記載の抗原提示細胞を用いることを特徴と

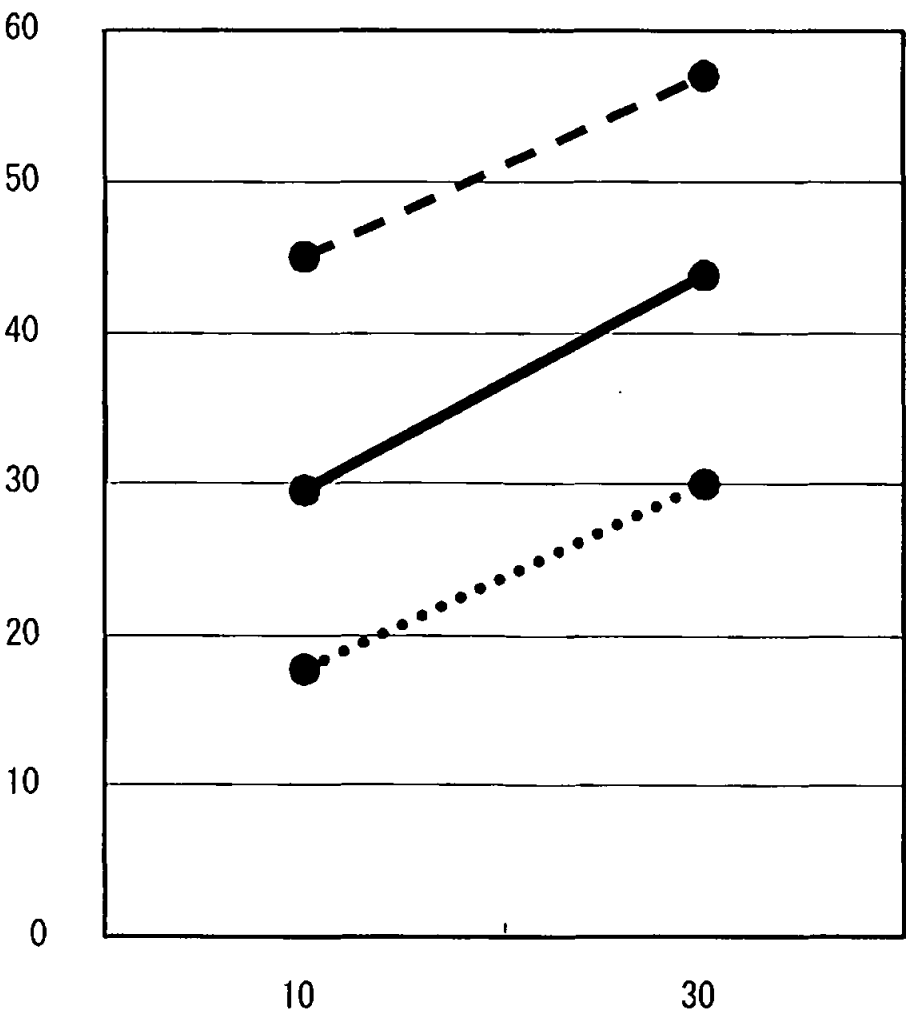
する、癌の診断方法。

46.

[図1]

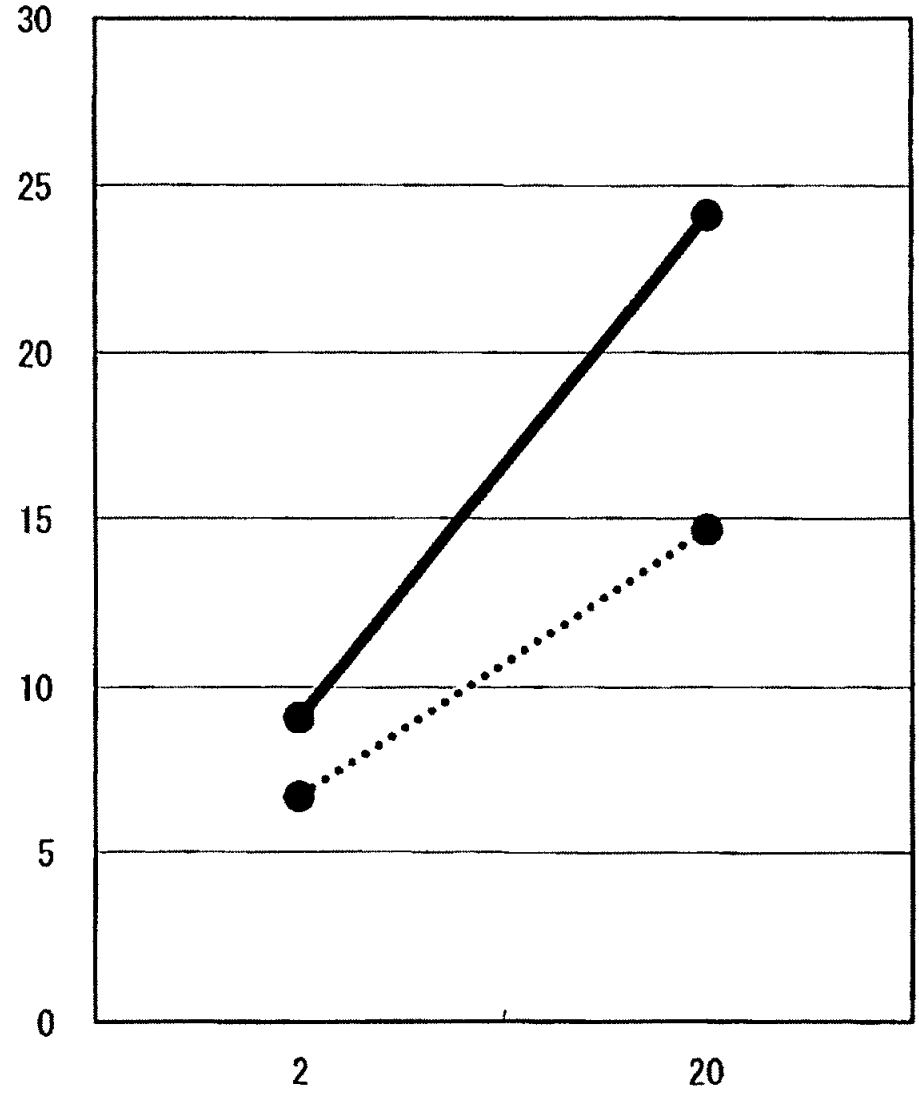


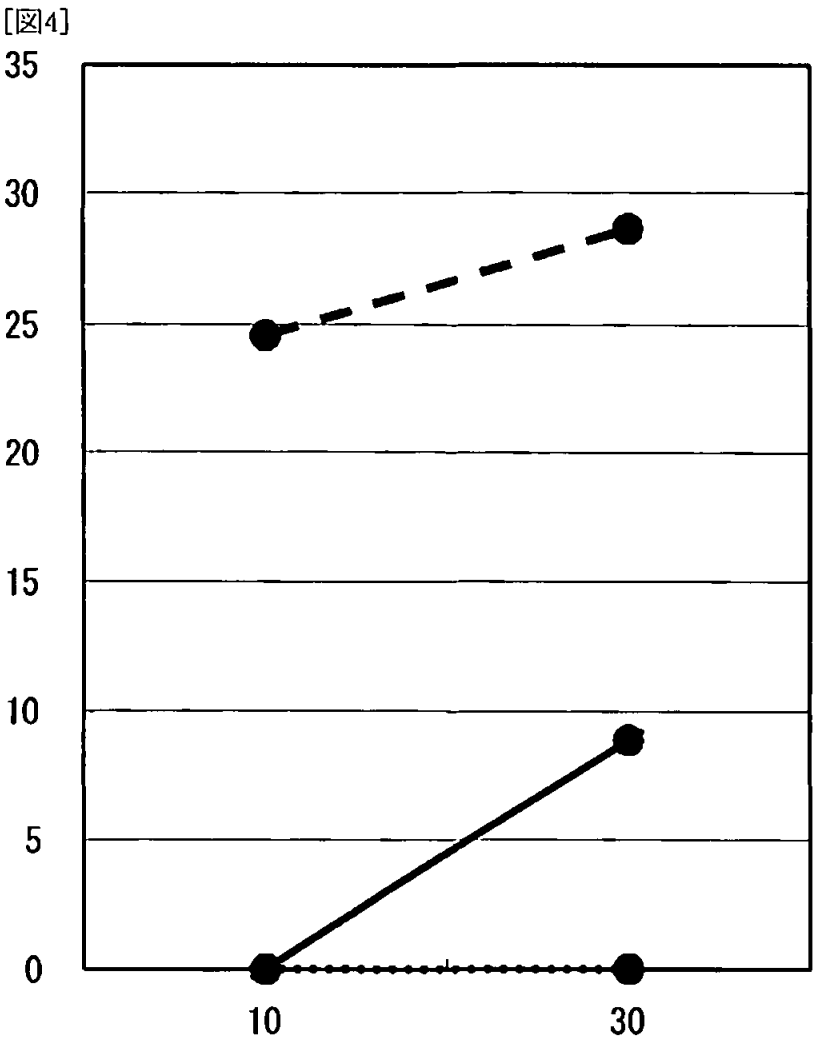
[図2]



48 -

[図3]





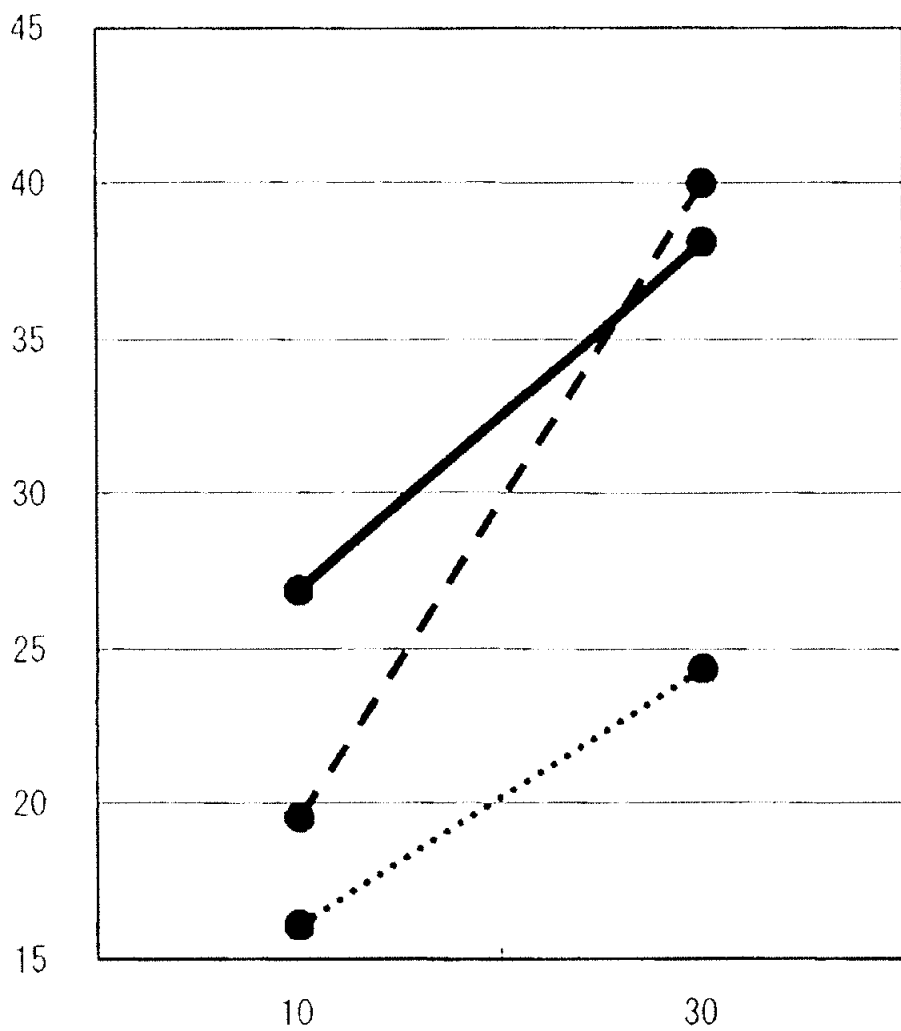
SO

5/14

WO 2008/081701

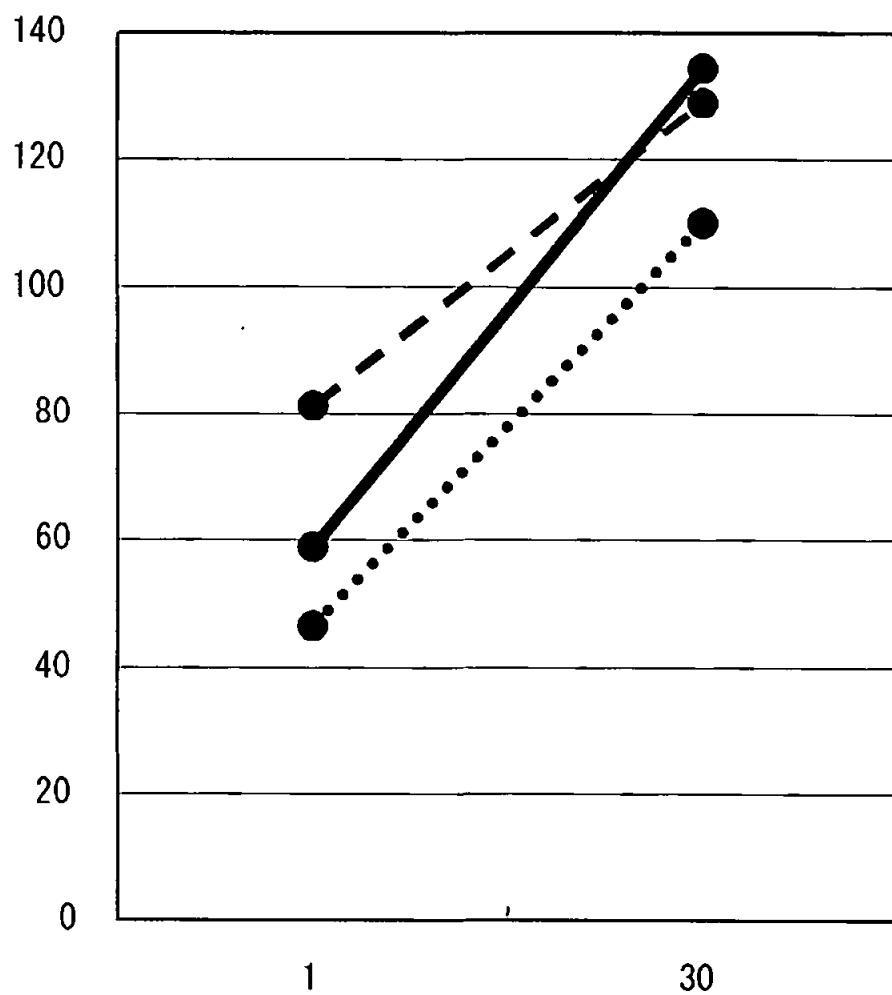
PCT/JP2007/074146

[図5]

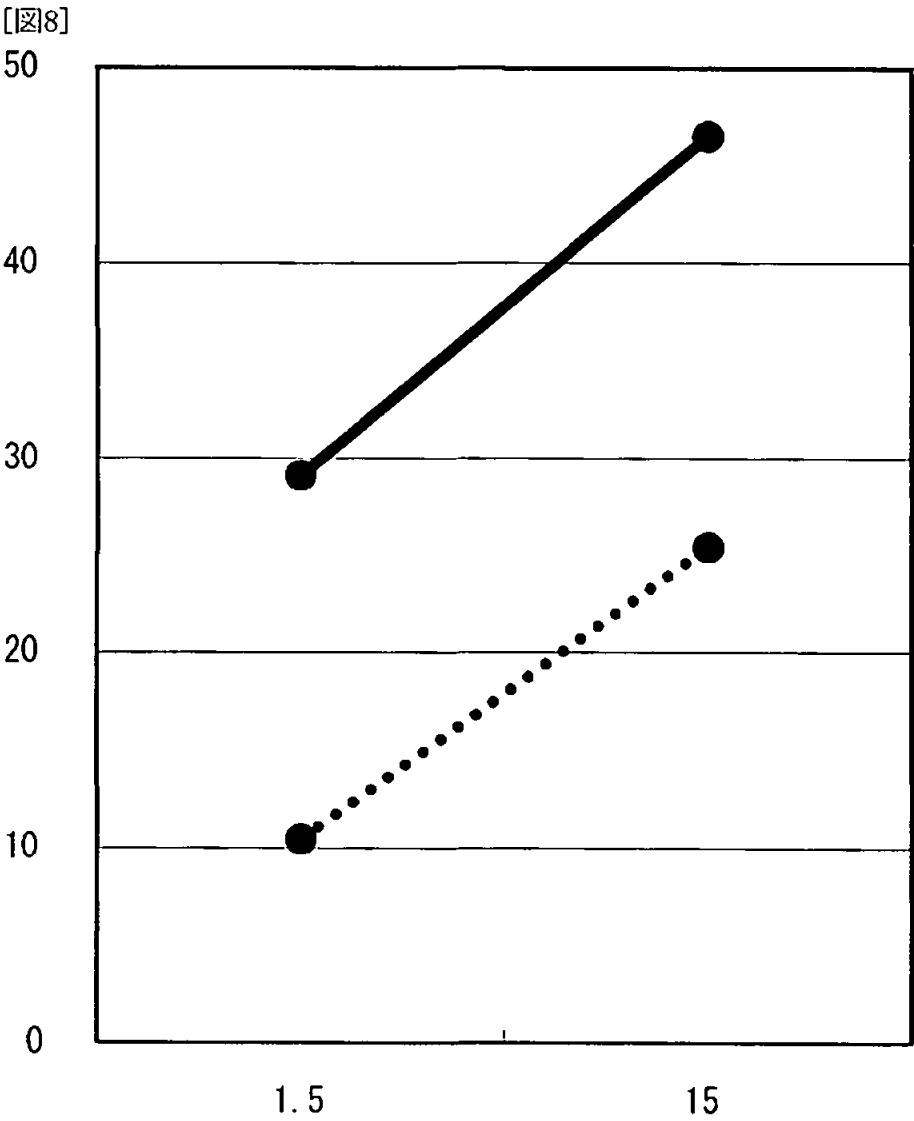


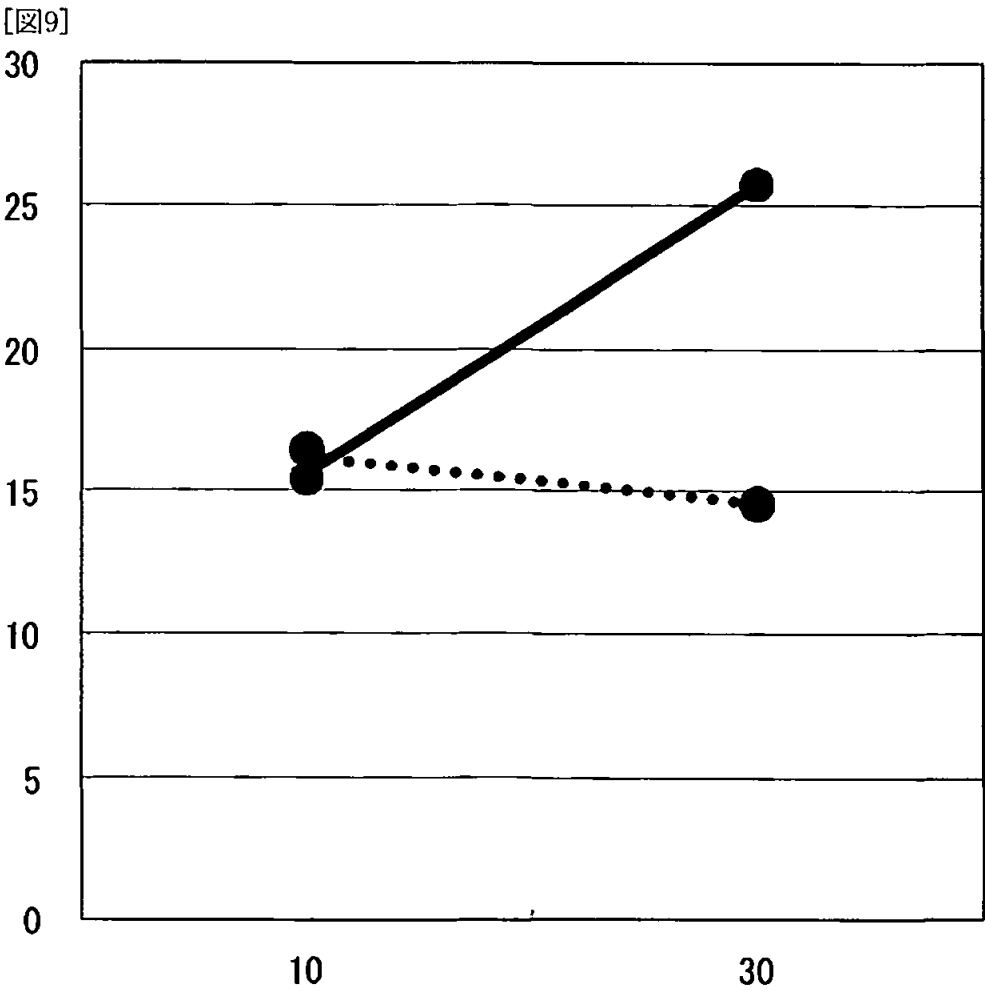
SL

[図7]



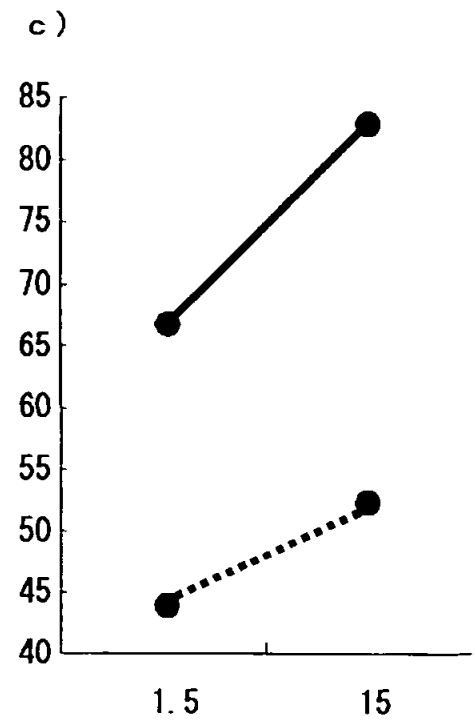
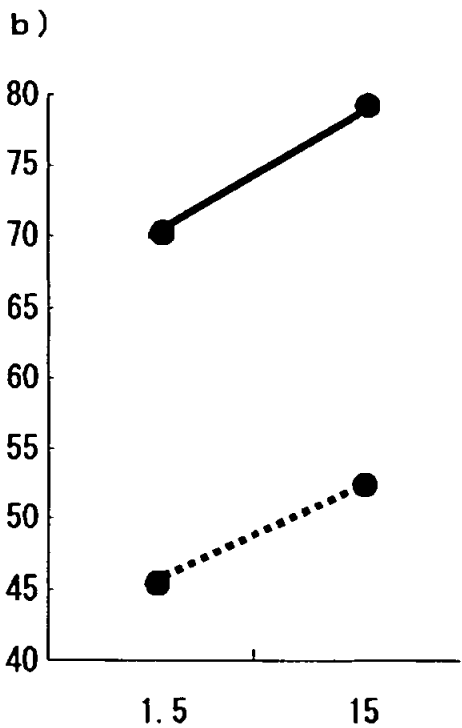
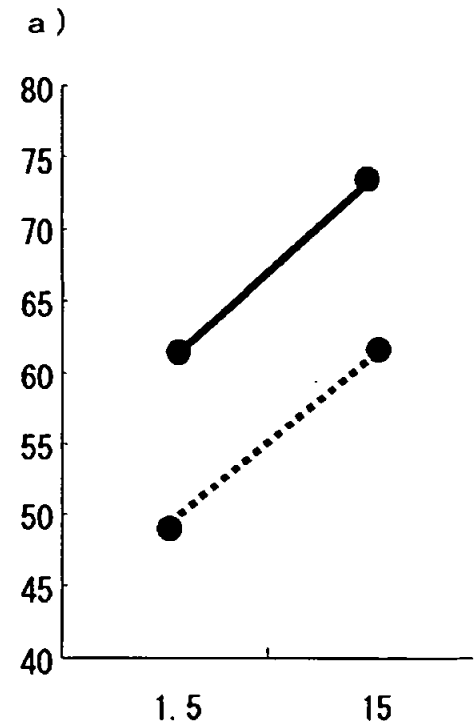
52





SS.

[図10]

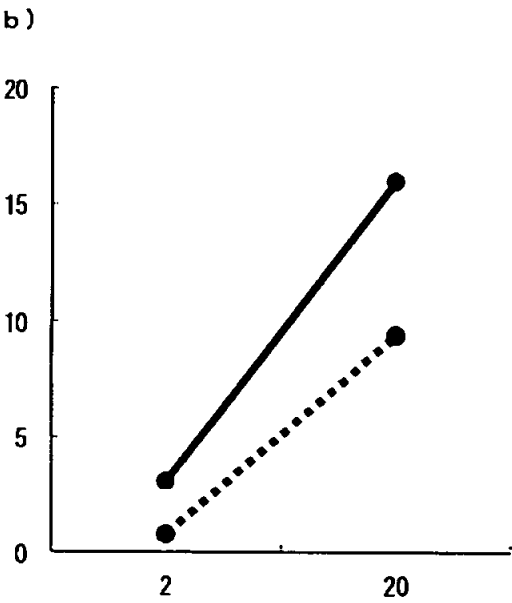
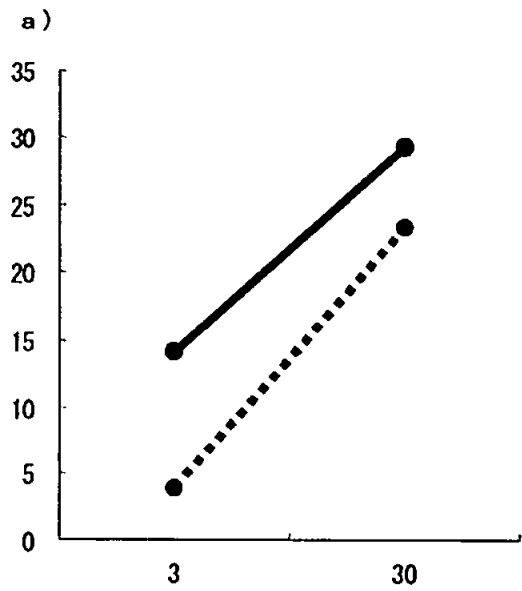


56.

WO 2008/081701

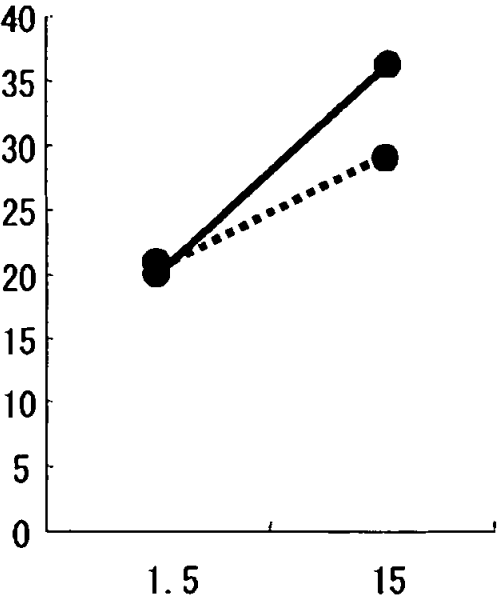
PCT/JP2007/074146

[図11]

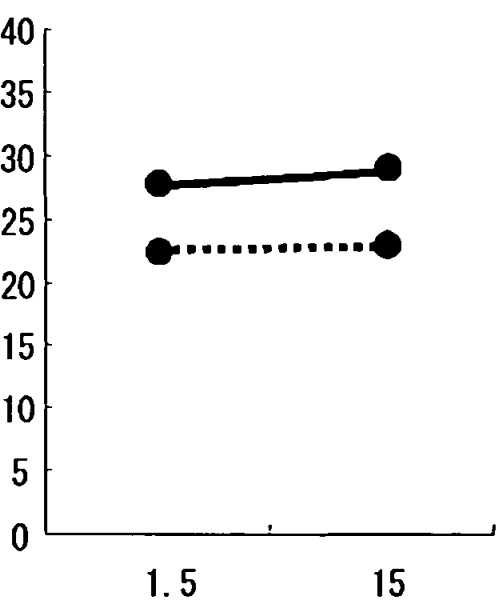


[図12]

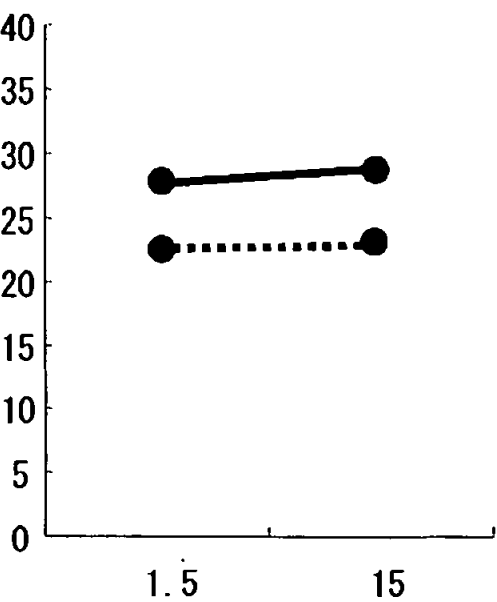
a)



b)

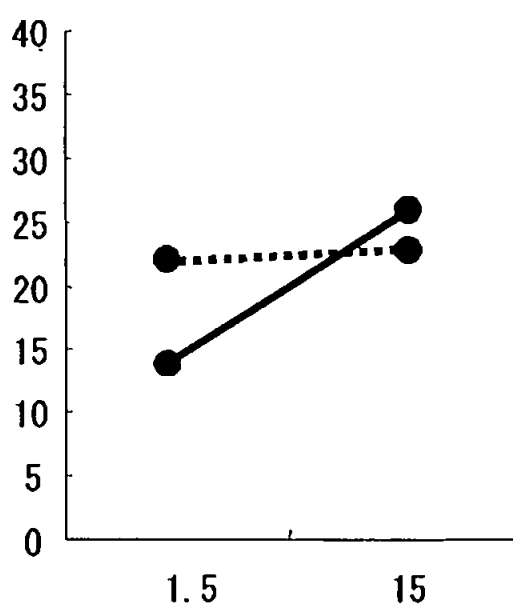


c)

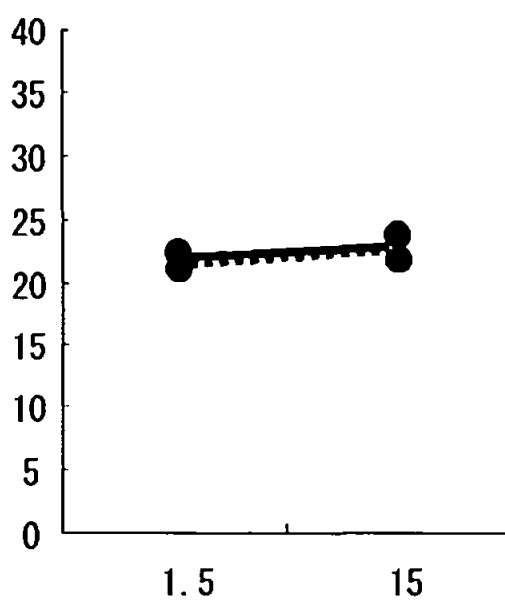


[図13]

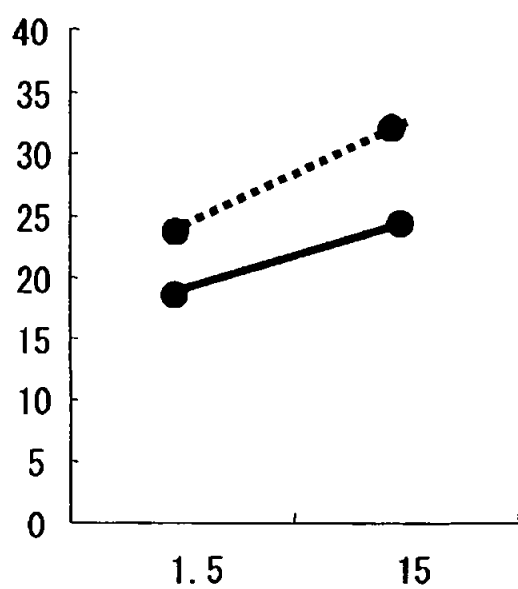
a)



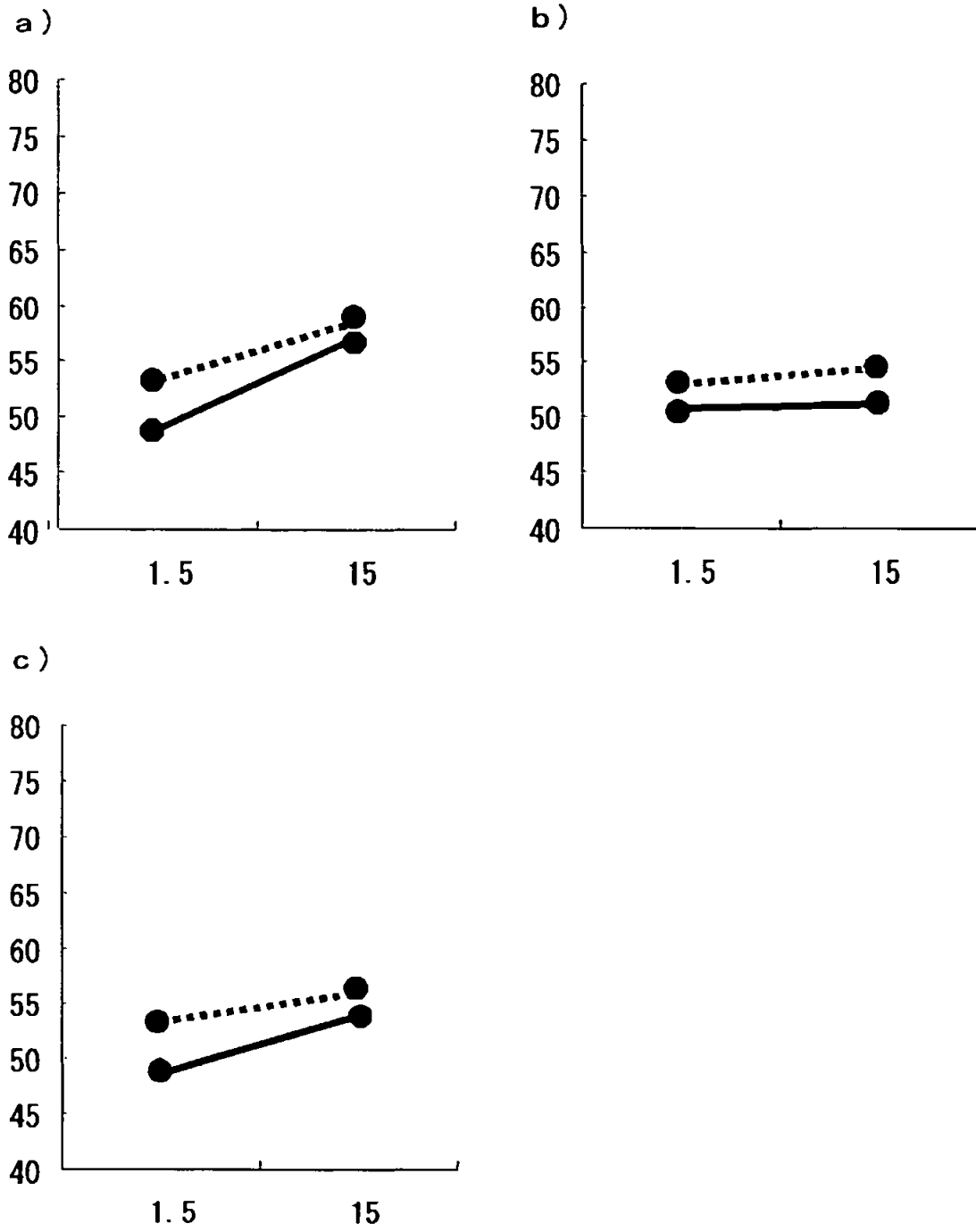
b)



c)



[図14]



60.

667985 Sequence Listing PCT_JP2007_074146.txt
SEQUENCE LISTING

<110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.
<120> HLA-A*1101 restricted WT1 peptide and pharmaceutical composition
comprising the same
<130> 667985
<150> JP 2006-355356
<151> 2006-12-28

<160> 13
<170> PatentIn version 3.2

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

<400> 1

```

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

```

61

667985 Sequence Listing PCT_JP2007_074146.txt

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
210 215 220
Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
225 230 235 240
Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
245 250 255
Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
260 265 270
Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
275 280 285
His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
290 295 300
Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
305 310 315 320
Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
325 330 335
Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
340 345 350
Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
355 360 365
Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
370 375 380
Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
385 390 395 400
His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
405 410 415
Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
420 425 430
Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
435 440 445
Leu

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

<400> 2

Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys
1 5

<210> 3

62

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg
1 5

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

<400> 4

Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
1 5

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

<400> 5

Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg

63

1

5

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

<400> 9

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys
1 5

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

<400> 10

Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified WT1 peptide

<400> 11

Thr Ile Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified WT1 peptide

<400> 12

Thr Val Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr
1 5

PEPTIDO WT1 RESTRINGIDO A HLA-A*1101 Y COMPOSICION

FARMACEUTICA QUE COMPRENDE EL MISMO

CAMPO TECNICO

5

La presente invención se refiere a un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101, específicamente, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, donde el péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101, y

10 tiene la capacidad de inducir un CTL. La presente invención también se refiere a un dímero de péptidos que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 y que tiene la capacidad de inducir un CTL, donde dos monómeros peptídicos que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1 y

15 que comprende por lo menos un residuo de cisteína, se unen entre sí mediante un enlace bisulfuro. Además, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido, una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer que comprende el mismo, y similares.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se identificó el gen WT1 (gen del tumor de Wilms 1) como un gen responsable del tumor de Wilms, que es un cáncer renal en niños (Documentos no patente 1 y 2). El WT1 es un factor de transcripción que tiene una estructura de dedos de zinc. En el comienzo, el gen WT1 se consideró un gen supresor del tumor. No obstante, estudios posteriores (Documentos no patente 3, 4, 5 y 6) demostraron que el gen WT1 más bien actúa como un oncogén en tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos.

El gen WT1 se expresa en altos niveles en muchos tipos de tumores malignos. Entonces, se ha examinado si el producto del gen WT1 libre de mutaciones, que es una proteína antóloga, tiene o no inmunogenicidad en un cuerpo vivo. Los resultados revelaron que la proteína derivada del gen WT1 que se expresa en altos niveles en las células tumorales se fragmenta a través del procesamiento intracelular, los péptidos resultantes forman complejos con moléculas MHC clase I y los complejos se presentan en las superficies celulares y que los CTL que reconocen tales complejos pueden ser inducidos por la vacunación con péptidos (Documentos no patente 7, 8 y 9). Se demostró también que en un ratón inmunizado con un péptido WT1 o un ADNc de WT1, las células tumorales trasplantadas que expresan un gen WT1 son rechazadas con una alta probabilidad (Documentos no patente 7 y 10), mientras que los tejidos normales que expresan fisiológicamente el gen WT1 no son dañados por los CTL inducidos

(Documento no patente 7). Se demostró en experimentos *in vitro* que usan células humanas que cuando el péptido Db126 o el péptido WH187 (aminoácidos 187-195 de la SEC ID No: 1, SLGEQQYSV) que tienen una gran capacidad para unirse a una molécula HLA-A*0201, que es una de las moléculas de MHC clase I, se usa para estimular células mononucleares sanguíneas periféricas humanas que tienen HLA-A*0201, se inducen CTL específicos de WT1, los CTL específicos tienen una actividad citotóxica específica para células tumorales que expresan en forma endógena un gen de WT1 a altos niveles y la actividad citotóxica de tales CTL está restringida en HLA-A2 (Documento no patente 11). Se demostró en experimentos *in vitro* en células humanas utilizando el péptido WT1 que se aparea a HLA-A*2402 (que se halla con máxima frecuencia en individuos japoneses entre los alelos de HLA-A) (WT1235; aminoácidos 235-243 de la SEC ID No: 1, CMTWNQMNL) que se inducen CTL específicos de WT1 (TAK-1)(Documento no patente 12) y los CTL inducidos no suprimen la actividad formadora de colonias de las células madre hematopoyéticas normales que parcialmente expresan en forma fisiológica un gen WT1 (Documentos no patente 12 y 13). Estos informes sugieren fuertemente que no sólo en ratones sino también en seres humanos, se pueden inducir los CTL específicos de WT1, tales CTL tienen una actividad citotóxica contra las células tumorales que expresan un gen WT1 a altos niveles, pero no tienen actividad citotóxica frente a las células normales que expresan fisiológicamente un gen WT1 (Documentos no patente 7, 10, 11, 12 y 13).

El producto génico WT1 está presente como una proteína nuclear, y es procesado por proteasomas en el citoplasma para fragmentarse en péptidos. Los péptidos fragmentados son transportados al lumen del retículo endoplásmico por moléculas TAP (transportador asociado con el procesamiento de antígeno), forman complejos con moléculas de MHC de clase I y se presentan en las superficies de las células. Los CTL específicos de WT1 son inducidos como resultado del reconocimiento de complejos péptido WT1-molécula MHC de clase I por células precursoras de CTL por medio de TCR, ejerciendo de este modo un efecto citotóxico sobre las células tumorales que presentan un producto génico de WT1 a través de moléculas de MHC de clase I (Documentos no patente 7, 8 y 9). Entonces, se requiere por lo menos que un péptido WT1 usado en la inmunoterapia del cáncer que se dirige a un producto génico WT1 esté en la forma que se une a una molécula de MHC de clase I en un ser vivo. Sin embargo, las moléculas de MHC de clase I son diversas y las secuencias de aminoácidos de los péptidos WT1 que se unen a las respectivas moléculas MHC de clase I son diferentes entre sí. En consecuencia, se requiere proporcionar un péptido que se combine con cada subtipo de MHC de clase I. No obstante, hasta la fecha sólo los péptidos restringidos en la molécula HLA-A*2402, la molécula HLA-A*0201, la molécula HLA-A*2601 y la molécula HLA-A*3303 son conocidos como péptidos WT1 restringidos en moléculas HLA (Documento de Patente 1, Documento no patente 11, Documento de Patente 2 y Documento de Patente

3, respectivamente). En consecuencia, se necesita hallar un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101.

Documento de Patente 1: WO 2003/106682.

Documento de Patente 2: WO 2005/095598.

5 Documento de Patente 3: Solicitud de patente japonesa No. 2006-45287.

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

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

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

Documento no patente 4: Yamagami T et al., Blood. 1 de abril de 1996; 87(7):2878-84.

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

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

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

Documento no patente 8: Melief CJ et al., Immunol Rev. junio de 1995; 145:167-77.

Documento no patente 9: Ritz J, J Clin Oncol. Febrero de 1994; 12(2):237-8.

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

5 Documento no patente 11: Oka Y et al., Immunogenetics. Febrero de 2000; 51(2):99-107.

Documento no patente 12: Ohnishi H et al., Blood. 1 de enero de 2000; 95(1):286-93.

10 Documento no patente 13: Gao L et al., Blood. 1 de abril de 2000; 95(7):2198-203.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Problemas a ser resueltos por la invención

15 Los problemas a ser resueltos por la presente invención son proporcionar un péptido que sea una molécula restringida en HLA-A*1101 y comprenda una secuencia de aminoácidos de una proteína WT1, y un polinucleótido que codifique el mismo, además de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer, que comprenda
20 el mismo y similares.

Medios para resolver los problemas

Como resultado de estudios intensivos en vista de la situación descrita anteriormente, el presente inventor ha hallado que entre los péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, los péptidos que tienen una capacidad de unión a una molécula HLA-A*1101 pueden inducir un CTL específico de WT1 con una tasa alta. De este modo, la presente invención se ha completado.

La presente invención proporciona:

10 (1) un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, donde el péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un CTL.

15 (2) el péptido de conformidad con (1), donde el aminoácido de la posición 9 de la secuencia de aminoácidos es Lys o Arg.

(3) el péptido de conformidad con (1), donde una secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en:

- Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID No: 2),
- Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID No: 3),
- 20 Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys (SEC ID No: 4),
- Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg (SEC ID No: 5),
- Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys (SEC ID No: 6),
- Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7),

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (SEC ID No: 8),

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (SEC ID No: 9) y

Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys (SEC ID No: 10);

(4) el péptido de conformidad con (3), donde la secuencia de
5 aminoácidos es Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID No: 2);

(5) un dímero de péptidos que tiene la capacidad de unirse a una
molécula HLA-A*1101 y que tiene la capacidad de inducir un CTL, donde dos
péptidos monómeros que comprenden cada uno una secuencia de
aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1 y
10 que comprenden por lo menos un residuo de cisteína, se unen entre sí
mediante un enlace bisulfuro;

(6) el dímero de péptidos de conformidad con (5), donde la
secuencia de aminoácidos del péptido monómero se selecciona del grupo que
consiste en:

15 Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID No: 3),

Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7),

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (SEC ID No: 8) y

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (SEC ID No: 9);

(7) una composición farmacéutica para el tratamiento o
20 prevención de un cáncer, que comprende el péptido de conformidad con (1)
y/o el dímero de péptidos de conformidad con (5);

(8) un método para el tratamiento o prevención de un cáncer,
que comprende la administración de una cantidad efectiva del péptido de

conformidad con (1) y/o el dímero de péptidos de conformidad con (5) a un sujeto positivo para HLA-A*1101;

(9) un polinucleótido que codifica el péptido de conformidad con (1);

5 (10) un vector de expresión que comprende el polinucleótido de conformidad con (9);

(11) una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el polinucleótido de conformidad con (9) o el vector de conformidad con (10);

10 (12) un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad efectiva del polinucleótido de conformidad con (9) o el vector de conformidad (10) a un sujeto positivo para HLA-A*1101;

(13) un CTL específico de WT1, que es inducido por el péptido de conformidad con (1) y/o el dímero de péptidos de conformidad con (5);

15 (14) un método para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear sanguínea periférica en presencia del péptido de conformidad con (1) y/o del dímero de péptidos de conformidad con (5) para inducir el CTL específico de WT1 de la célula
20 mononuclear sanguínea periférica;

(15) un equipo para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende el péptido de conformidad con (1) o el dímero de péptidos de conformidad con (5) como componente esencial;

13

(16) una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, que es inducida por el péptido de conformidad con (1) y/o el dímero de péptidos de conformidad con (5);

5 (17) un método para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, que comprende cultivar una célula presentadora de antígenos inmadura en presencia del péptido de conformidad con (1) y/o el dímero de péptidos de conformidad con (5) para inducir a la célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1 de la célula presentadora de antígenos inmadura;

10 (18) un equipo para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, que comprende el péptido de conformidad con (1) y/o el dímero de péptidos de conformidad con (5) como componente esencial; y

(19) un método para el diagnóstico de un cáncer, que comprende
15 usar el CTL de conformidad con (13) o la célula presentadora de antígenos de conformidad con (16).

Efectos de la invención

La presente invención proporciona un péptido que es restringido
20 a HLA-A*1101 y comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos provenientes de una proteína WT1, y un polinucleótido que codifica la misma, además de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer, que comprende el mismo, y

similares. En consecuencia, es posible inducir *in vivo* e *in vitro* CTL
específicos de WT1 en sujetos que tienen HLA-A*1101. Dado que la tasa de
HLA-A*1101 positivos en la población Japonesa es alta (aproximadamente
17.9%), se pueden inducir CTL específicos para WT1 en una amplia gama de
5 sujetos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con
10 WT1₂₅₁.

La Fig. 2 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con
WT1₂₇₉.

La Fig. 3 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con
WT1₃₁₂.

La Fig. 4 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con
15 WT1₃₁₃.

La Fig. 5 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con
WT1₃₃₈.

La Fig. 6 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con
20 WT1₃₇₈.

La Fig. 7 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con
WT1₃₈₆.

La Fig. 8 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₄₁₅.

La Fig. 9 representa la actividad citotóxica del CTL inducido con WT1₄₃₆.

5 Las Figs. 10A–10C representan la actividad citotóxica del CTL inducido con el péptido WT1₃₇₈ (10A, 10B y 10C representan las actividades citotóxicas observadas usando las PBMC de los dadores sanos HLA-A*1101-positivos 1, 2 y 3, respectivamente).

10 Las Figs. 11A-11B representan la actividad citotóxica del CTL inducido con el dímero de péptidos WT1₃₇₈ (11A y 11B representan las actividades citotóxicas observadas usando las PBMC de los dadores sanos HLA-A*1101-positivos 1 y 2, respectivamente).

15 Las Figs. 12A-12C representan la actividad citotóxica del CTL inducido con el péptido WT1₃₇₈ modificado (G → I) (12A, 12B y 12C representan las actividades citotóxicas observadas usando las PBMC de los dadores sanos HLA-A*1101-positivos 1, 2 y 3, respectivamente).

20 Las Figs. 13A-13C representan la actividad citotóxica del CTL inducido con el péptido WT1₃₇₈ modificado (G → V) (13A, 13B y 13C representan las actividades citotóxicas observadas usando las PBMC de los dadores sanos HLA-A*1101-positivos 1, 2 y 3, respectivamente).

Las Figs. 14A-14C representan la actividad citotóxica del CTL inducido con el péptido WT1₃₇₉ (14A, 14B y 14C representan las actividades

citotóxicas observadas usando las PBMC de los dadores sanos HLA-A*1101-positivos 1, 2 y 3, respectivamente).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

5

Modo óptimo de llevar a cabo la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, donde el péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un CTL (en la presente memoria denominado "péptido WT1"). La secuencia de aminoácidos de la proteína WT1 humana se muestra en la SEC ID No: 1. El péptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC ID No: 1. Cuando el péptido de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que comprende cisteína(s) tal como la secuencia de aminoácidos de la SEC ID No: 3, 7, 8 o 9 que se describe a continuación, se puede aumentar la estabilidad por sustitución de la(s) cisteína(s) en la secuencia de aminoácidos con otra sustancia tal como otro aminoácido, por ejemplo serina, alanina y ácido α -aminobutírico) o por modificación del grupo SH de la(s) cisteína(s) con un grupo protector conocido en el técnica (por ejemplo, grupo carboximetilo o grupo piridiletilo). El péptido de la presente invención es un péptido antigénico del cáncer que puede

inducir un CTL como resultado de la presentación, por una célula presentadora de antígeno, de un péptido generado por el procesamiento del péptido de la presente invención en una célula.

Como se describió anteriormente, es un objeto de la presente invención obtener un péptido restringido a HLA-A*1101. De este modo, el péptido de la presente invención tiene una capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101. Se puede determinar la capacidad de unión por un método conocido en la técnica. Los ejemplos de tales métodos incluyen un método basado en computadora tal como Rankpep, BIMAS o SYFPEITHI y un ensayo de unión competitiva con un péptido conocido que tiene capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101. Por ejemplo, la capacidad determinada para unirse se puede comparar con la de un péptido restringido a HLA-A*1101 conocido para juzgar si el péptido de la presente invención tiene o no capacidad para unirse. Los ejemplos de péptidos que tienen capacidad para unirse de conformidad con la presente invención incluyen un péptido cuya puntuación de afinidad a una molécula HLA-A*1101 determinada por el método descrito en el ejemplo 1 es 4 o mayor, con preferencia 5 o mayor, con más preferencia 6 o mayor.

El péptido de la presente invención además tiene una capacidad de inducir un CTL. El gen WT1 se expresa en su forma nativa en altos niveles, por ejemplo en tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama,

cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer de ovario. En consecuencia, el péptido de la presente invención puede inducir un CTL con elevado índice en un sujeto que sufre de tal enfermedad. La capacidad de
 5 inducir un CTL se refiere a la capacidad de inducir un CTL *in vivo* o *in vitro*. Tal capacidad se puede determinar mediante un método general tal como un método en el que se determina la actividad citotóxica de un CTL mediante un ensayo de liberación de Cr.

El péptido de la presente invención puede tener Lys o Arg en la
 10 posición 9 de la secuencia de aminoácidos. Se considera que al tener tal aminoácido, la capacidad del péptido de unirse a una molécula HLA-A*1101 es mayor.

La secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos comprendidos en el péptido de la presente invención es con preferencia, Ala
 15 Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID No: 2), Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID No: 3), Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys (SEC ID No: 4), Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg (SEC ID No: 5), Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys (SEC ID No: 6), Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7), Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (SEC ID No: 8), Ser Cys Arg Trp Pro
 20 Ser Cys Gln Lys (SEC ID No: 9) o Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys (SEC ID No: 10). Con máxima preferencia, es Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7). Además, puede tener una sustitución de uno a varios, con preferencia uno a cinco aminoácidos con otros aminoácidos en los nueve

aminoácidos de cualquiera de las SEC ID Nos: 2-10. Cualquiera de los 9 aminoácidos u otros aminoácidos sustituidos pueden estar modificados en forma apropiada. En cualquier caso, el péptido de la presente invención retiene la capacidad para unirse a una molécula HLA-A*1101.

5 Como se describió anteriormente, el péptido de la presente invención puede ser cualquiera, siempre que comprenda una secuencia de aminoácidos que derive de una proteína WT1 y consista en 9 aminoácidos contiguos. De este modo, el péptido de la presente invención puede ser, por ejemplo, un péptido que consiste sólo en una secuencia de aminoácidos que
10 se muestra en cualquiera de las SEC ID Nos: 2-10, o una proteína WT1 o una parte de esta que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEC ID Nos: 2-10. La cantidad de aminoácidos comprendidos en el péptido de la presente invención no está limitada específicamente y el número es, por ejemplo, 9-500, 9-300, 9-200, 9-100, 9-
15 50, 9-30 y 9-12 aminoácidos. Diversas sustancias se pueden unir al extremo N-terminal y/o extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos en el péptido de la presente invención. Por ejemplo, se puede unir un aminoácido, un péptido o un análogo de estos. Si tal sustancia está unida al péptido de la presente invención, la sustancia
20 puede ser procesada, por ejemplo, por una enzima en un cuerpo vivo o a través de un proceso tal como procesamiento intracelular, y finalmente la secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos se puede producir y presentar como complejo con una molécula HLA-A*1101 en la

superficie de una célula, produciendo de este modo el efecto de inducir un CTL. La sustancia puede ser una sustancia que modula la solubilidad del péptido de la presente invención o aumenta su estabilidad (resistencia a proteasas, etc.). Alternativamente, puede ser una sustancia que libera el

5 péptido de la presente invención específicamente, por ejemplo, a un tejido u órgano dado o puede ejercer una acción para aumentar la eficiencia de captación por una célula presentadora de antígeno o similar. La sustancia puede ser una sustancia que aumenta la capacidad para inducir un CTL, tal como un péptido ayudante o similar.

10 El péptido de la presente invención se puede sintetizar por métodos generalmente usados en la técnica o sus modificaciones. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide-Gosei, Maruzen Co., Ltd., 1975; Peptide-Gosei No Kiso To Jikken,

15 Maruzen Co., Ltd., 1985; e Iyaku hin No Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide-Gosei, Hirokawa - Book store, 1991.

El péptido de la presente invención también se puede preparar mediante técnicas de manipulación genética basadas en la información acerca de la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido de la presente

20 invención. Tales técnicas de manipulación genética son bien conocidas por los expertos en la técnica.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un dímero de péptidos que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-

A*1101 y que tiene la capacidad de inducir un CTL, en el que dos péptidos monómeros que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1 y que comprenden por lo menos un residuo de cisteína, se unen entre sí mediante un enlace bisulfuro (de aquí en adelante denominado "dímero de péptidos WT1"). La estabilidad del dímero de péptidos de la presente invención está aumentada en comparación con la del péptido monómero por formación de un dímero. El dímero de péptidos de la presente invención es un dímero de péptidos antigénico de tumor que puede inducir un CTL como resultado de la presentación, por una célula presentadora de antígeno, de un péptido generado por un procesamiento de péptido de la presente invención en una célula.

El dímero de péptidos de la presente invención está formado por la unión de dos péptidos monómeros a través de un enlace bisulfuro entre los residuos de cisteína presentes en los monómeros. De este modo, cada uno de los péptidos monómeros comprendido en el dímero de péptidos WT1 de la presente invención es el péptido WT1 descrito anteriormente y comprende por lo menos un residuo de cisteína. El dímero de péptidos WT1 de la presente invención puede ser un homodímero o un heterodímero.

En el dímero de péptidos WT1 de la presente invención, la secuencia de aminoácidos comprendida por el péptido monómero es con preferencia Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID No: 3), Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7), Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser

Arg (SEC ID No: 8) o Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (SEC ID No: 9). Con máxima preferencia, es Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7).

El dímero de péptidos WT1 de la presente invención se puede
5 preparar mediante un método conocido en la técnica. Por ejemplo, si los péptidos monómeros comprenden un par de residuos de cisteína, se puede preparar el dímero de péptidos WT1 de la presente invención, por ejemplo, por eliminación de todos los grupos protectores que incluyen algunos de las cadenas laterales de cisteína y luego se somete la solución del monómero
10 resultante a oxidación con aire en condiciones alcalinas, o agregado de un oxidante en condiciones alcalinas o ácidas para formar un enlace bisulfuro. Los ejemplos de oxidantes incluyen yodo, dimetilsulfóxido (DMSO) y ferricianuro de potasio.

Cuando cada uno de los péptidos monómeros comprende dos o
15 más residuos de cisteína, el dímero de péptidos WT1 de la presente invención también se puede preparar por el método descrito anteriormente. En este caso, los isómeros se obtienen debido a diferentes tipos de enlaces bisulfuro. Alternativamente, el dímero de péptidos WT1 de la presente invención se puede preparar por selección de una combinación de grupos protectores para
20 cadenas laterales de cisteína. Los ejemplos de combinaciones de grupos protectores incluyen las combinaciones del grupo MeBzl (metilbencilo) y AcM (acetamidometilo), grupo Trt (tritulo) y grupo AcM, Npys (3-nitro-2-piridiltio) y grupo AcM y grupo S-Bu-t (S-ter-butilo) y grupo AcM. Por ejemplo, en el caso

de la combinación del grupo MeBzl y grupo Acm, el dímero de péptidos WT1 se puede preparar por eliminación de grupos protectores diferentes del grupo MeBzl y el grupo protector de la cadena lateral de cisteína, luego se somete la solución del monómero resultante a oxidación con aire para formar un enlace
5 bisulfuro entre los residuos de cisteína protegida y luego se desprotege y oxida con yodo para formar un enlace bisulfuro entre los residuos de cisteína previamente protegidos por Acm.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer que
10 comprende el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1. El gen WT1 se expresa en altos niveles en diversos cánceres y tumores que incluyen tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón,
15 cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer de ovario. En consecuencia, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para el tratamiento o prevención de un cáncer. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se
20 administra a un sujeto HLA-A*1101-positivo, los CTL específicos de WT1 son inducidos por el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 o el dímero de péptidos WT1 comprendido en la composición farmacéutica y las células cancerosas del sujeto son dañadas por tales CTL.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además del péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1 como componente activo, por ejemplo, un vehículo, un excipiente o similares. El péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 o el dímero de péptidos WT1 comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención induce un CTL específico de WT1. De este modo, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un adyuvante apropiado o se puede administrar conjunto con un adyuvante apropiado para aumentar la eficiencia de inducción. Los ejemplos de adyuvantes preferidos incluyen, pero sin limitación, adyuvante completo o incompleto de Freund e hidróxido de aluminio.

El método de administración de la composición farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, la condición del sujeto o el sitio objetivo. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero sin limitación, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral. La cantidad del péptido o el dímero de péptidos comprendidos en la composición farmacéutica de la presente invención, además de la forma de dosificación, el número de veces de la administración y similares de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden seleccionar apropiadamente de conformidad con condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio objetivo. La dosis

única del péptido es usualmente 0.0001 mg-1000 mg, con preferencia 0.001 mg-1000 mg.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende administrar
5 una cantidad efectiva del péptido WT1 1 y/o el dímero de péptidos WT1 a un sujeto HLA-A*1101-positivo. El cáncer tratado o prevenido puede ser cualquiera, y sus ejemplos incluyen tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y
10 cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer de ovario.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL específico
15 de WT1 en un sujeto HLA-A*1101-positivo, que comprende:

(a) hacer reaccionar un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*1101 con una muestra del sujeto; y

(b) determinar la presencia o cantidad de un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra. La muestra de un sujeto puede ser
20 cualquiera siempre que haya una posibilidad que esta contenga un linfocito. Los ejemplos de las muestras incluyen un fluido corporal tal como sangre o linfa y un tejido. El complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*1101 se puede preparar, por ejemplo, como un tetrámero o pentámero mediante un

método conocido por un experto en el técnica tal como un método de biotina-estreptavidina. La presencia o proporción del CTL que reconoce tal complejo se puede medir por un método conocido por los expertos en la técnica. En este aspecto de la presente invención, el complejo puede estar marcado. Se
5 puede usar un marcador conocido tal como un marcador fluorescente o un marcador radiactivo. La marcación permite la determinación fácil y rápida de la presencia o cantidad de un CTL.

De este modo, la presente invención también proporciona una composición para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL
10 específico de WT1 en un sujeto HLA-A*1101-positivo que comprende un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101.

Además, la presente invención proporciona un equipo para la determinación de la presencia o cantidad de un CTL específico de WT1 en un sujeto HLA-A*1101-positivo, que comprende un péptido WT1 restringido a
15 HLA-A*1101.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la producción de un CTL específico de WT1 mediante un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*1101, que comprende:

- (a) hacer reaccionar el complejo con una muestra y
20 (b) obtener un CTL que reconoce el complejo contenido en la muestra. El complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*1101 se describió anteriormente. La muestra puede ser cualquiera siempre que haya una posibilidad de que contenga un linfocito. Los ejemplos de muestras

incluyen una muestra del sujeto tal como sangre y un cultivo celular. El CTL que reconoce el complejo se puede obtener mediante un método conocido por los expertos en el técnica tal como FACS o MACS. La presente invención permite cultivar el CTL específico de WT1 obtenido y usar este para el

5 tratamiento o prevención de diversos cánceres.

De este modo, la presente invención también se refiere a un CTL específico de WT1 que se puede obtener por un método para la producción de un CTL específico de WT1 usando un complejo de un péptido de WT1 y una molécula HLA-A*1101.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101. El polinucleótido de la presente invención puede ser ADN o ARN. La secuencia de bases del polinucleótido de la presente invención se puede determinar sobre la base de la secuencia de aminoácidos del péptido WT1 restringido a

15 HLA-A*1101. El polinucleótido se puede preparar por un método conocido para la síntesis de ADN o ARN (por ejemplo, método de síntesis química), método de PCR o similares.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende el polinucleótido. El tipo de vector de expresión, la

20 secuencia comprendida diferente del polinucleótido y similares se puede seleccionar en forma apropiada de conformidad con el tipo de un huésped en el que se introduce el vector de expresión de la presente invención, el propósito de uso o similares. Es posible tratar o prevenir tumores

hematopoyéticos o cánceres sólidos por administración del vector de expresión de la presente invención a un sujeto HLA-A*1101-positivo para producir un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 en un ser vivo e inducir un CTL específico de WT1 y dañar células tumorales hematopoyéticas o células de cáncer sólido en el sujeto.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el polinucleótido o el vector de expresión. La composición, método de administración y similares de la composición farmacéutica de la presente invención en este aspecto se describieron anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende administrar una cantidad efectiva del polinucleótido o el vector de expresión a un sujeto HLA-A*1101-positivo. Los ejemplos de cánceres a tratar o prevenir incluyen tumores hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple o linfoma maligno y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de células germinales, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical o cáncer de ovario.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula que comprende el vector de expresión. La célula de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, por transformación de una célula huésped tal como *E. coli*, levadura, célula de insecto o célula de animal con el vector de

expresión. El método para la introducción del vector de expresión en una célula huésped se puede seleccionar apropiadamente de diversos métodos. El péptido de la presente invención se puede preparar por cultivo de la célula transformada y recuperación y purificación del péptido WT1 producido.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un CTL específico de WT1, que es inducido por el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1. El CTL de la presente invención reconoce un complejo de un péptido WT1 y una molécula HLA-A*1101. De este modo, el CTL de la presente invención se puede usar para dañar
10 específicamente una célula tumoral positiva para HLA-A*1101 y que expresa WT1 a alto nivel.

 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende administrar un CTL específico de WT1 a un sujeto HLA-A*1101-positivo. El método de
15 administración del CTL específico de WT1 se puede seleccionar en forma apropiada de conformidad con condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio objetivo. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero sin limitación, administración intravenosa, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración nasal
20 y administración oral.

 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear sanguínea periférica en presencia del péptido WT1

restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1 para inducir el CTL específico de WT1 de la célula mononuclear sanguínea periférica. El sujeto del que deriva la célula mononuclear sanguínea periférica puede ser cualquiera siempre que sea positivo para HLA-A*1101. Por cultivo de las
5 células mononucleares sanguíneas periféricas en presencia del péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1, se inducen CTL específicos de WT1 a partir de células precursoras de CTL contenidas en las células mononucleares sanguíneas periféricas. Es posible tratar o prevenir tumores hematopoyéticos o cánceres sólidos en un sujeto HLA-A*1101-
10 positivo por administración del CTL específico de WT1 obtenido de conformidad con la presente invención al sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un equipo para la inducción de un CTL específico de WT1, que comprende un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1 como
15 componente esencial. Con preferencia, el equipo se usa en el método para la inducción de un CTL específico de WT1. El equipo de la presente invención puede comprender además del péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1, por ejemplo, un medio de obtención de una célula mononuclear sanguínea periférica, un adyuvante, un recipiente de reacción o
20 similares. En general, se adjunta un manual de instrucciones en el equipo. Por medio del equipo de la presente invención, se pueden inducir en forma eficiente CTL específicos de WT1.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una célula presentadora de antígeno (tal como una célula dendrítica) que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*1101, que es inducida por el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1.

- 5 Utilizando la célula presentadora de antígeno de la presente invención, se inducen en forma eficiente CTL específicos de WT1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende administrar la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de
10 una molécula HLA-A*1101 a un sujeto HLA-A*1101-positivo. El método de administración de la célula presentadora de antígeno se puede seleccionar en forma apropiada de conformidad con condiciones tales como el tipo de enfermedad, el estado del sujeto o el sitio objetivo. Los ejemplos de tales métodos incluyen, pero sin limitación, administración intravenosa,
15 administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración nasal y administración oral.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la inducción de una célula presentadora de antígeno de un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*1101, que comprende cultivar una célula
20 presentadora de antígeno inmadura en presencia de un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1 para inducir la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*1101 a partir de la célula presentadora de antígeno

inmadura. La célula presentadora de antígeno inmadura se refiere a una célula tal como una célula dendrítica inmadura que puede madurar a una célula presentadora de antígeno. Un sujeto del cual deriva la célula presentadora de antígeno inmadura puede ser cualquiera que sea positivo
5 para HLA-A*1101. Debido a que las células presentadoras de antígeno inmaduras están contenidas, por ejemplo, en células mononucleares sanguíneas periféricas, tales células se pueden cultivar en presencia del péptido WT1 y/o el dímero de péptidos WT1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un equipo
10 para la inducción de una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*1101, que comprende el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 y/o el dímero de péptidos WT1 como componente esencial. Con preferencia, se usa el equipo en el método para la inducción de una célula presentadora de antígeno. Otros componentes que
15 pueden estar comprendidos en el equipo de la presente invención y similares se describieron anteriormente. El equipo de la presente invención se puede usar para inducir en forma eficiente una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*1101.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo
20 contra un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 o un polinucleótido que codifica el péptido. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de un cáncer, que comprende utilizar el CTL específico de WT1, la célula presentadora de antígeno que presenta un péptido WT1 a través de una molécula HLA-A*1101 o el anticuerpo contra el péptido WT1 restringido a HLA-A*1101 o un polinucleótido que codifica el péptido. Con preferencia, se usa el CTL específico de WT1 en el método para el diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, es posible diagnosticar un cáncer por incubación del CTL, la célula presentadora de antígeno o el anticuerpo con una muestra de un sujeto HLA-A*1101-positivo, o administrarlo a un sujeto HLA-A*1101-positivo y determinar, por ejemplo, la posición, sitio o cantidad de este. El CTL, la célula presentadora de antígeno o el anticuerpo pueden ser marcados. Por unión de un marcador, se puede practicar en forma eficiente el método para el diagnóstico de la presente invención.

15

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención con más detalle, pero no deben considerarse limitantes del alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Selección del péptido WT1

RANKPEP (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/rankpep.html>) se usó para seleccionar WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ y WT1₄₃₆, que tienen una gran capacidad para unirse a una molécula HLA-A*1101 derivada de péptidos de una proteína WT1 (SEC ID No: 1). Las secuencias de aminoácidos, números de aminoácidos en la SEC ID No: 1 y puntuación de afinidad a una molécula HLA-A*1101 de estos péptidos se muestran en el Cuadro 1.

CUADRO 1

Péptido	Números de aminoácidos	Secuencia de aminoácidos	Puntuación de afinidad
WT1 ₂₅₁ (SEC ID No: 2)	251-259	AAGSSSSVK	15.18
WT1 ₂₇₉ (SEC ID No: 3)	279-287	PILCGAQYR	11.47
WT1 ₃₁₂ (SEC ID No: 4)	312-320	RSASETSEK	14.96
WT1 ₃₁₃ (SEC ID No: 5)	313-321	SASETSEKR	6.87
WT1 ₃₃₈ (SEC ID No: 6)	338-346	SHLQMHSRK	13.72
WT1 ₃₇₈ (SEC ID No: 7)	378-386	TGVKPFQCK	11.33
WT1 ₃₈₆ (SEC ID No: 8)	386-394	KTCQRKFSR	13.82
WT1 ₄₁₅ (SEC ID No: 9)	415-423	SCRWPSCQK	10.29
WT1 ₄₃₆ (SEC ID No: 10)	436-444	NMHQRNMTK	14.19

Preparación de células B-LCL

Se separaron células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) por el método de centrifugación por gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque a partir de sangre periférica que había sido recolectada de un donador sano HLA-A*1101-positivo. Las PBMC luego se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 1×10^7 en medio RPMI 1640 que contenía 10% de FCS, y a un sobrenadante de cultivo de células B95-8 (células que producen virus EB). Se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂ durante aproximadamente 1 mes. Se obtuvieron células B-LCL transformadas con virus EB, que con células tumorales de células B. Se confirmó que las células B-LCL resultantes no expresaban el gen WT1. Las células B-LCL se pulsaron incubándolas con 20 µg/ml de WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ o WT1₄₃₆ durante 2 horas y se irradiaron con 80 Gy de radiación. Se usaron las células B-LCL resultantes (de aquí en adelante denominadas células B-LCL pulsadas con un péptido WT1) como células presentadoras de antígeno para los siguientes experimentos.

Inducción de CTL específico de WT1

Se cultivaron 3×10^6 PBMC autólogas en una placa de cultivo celular de 24 pocillos en medio completo (45% de RPMI, 45% de medio AMI-V y 10% de suero AB humano) que contenía 20 µg/ml de WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ o WT1₄₃₆ a 37°C con 5% de

CO₂ durante 1 semana para obtener células respondedoras. Se co-cultivaron 2 x 10⁶ de las células respondedoras resultantes con 1 x 10⁶ de las células B-LCL pulsadas con el mismo péptido WT1 en medio completo durante 1 semana (primera estimulación). Las PBMC se co-cultivaron con las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1 tres veces más (segunda a cuarta estimulaciones) en las condiciones en las que se agregaron 20 IU/ml (concentración final) de IL2 de la siguiente manera: segunda estimulación: dos veces cada dos días desde 3 días después de la iniciación de la estimulación; tercera y cuarta estimulaciones: tres veces a intervalos de un día desde el día 10 después de la iniciación de la estimulación. Las células resultantes se concentraron utilizando el Equipo Negative Selection Columns Gravity Feed (StemSp) de modo que la relación de células T CD8-positivas se convirtió en aproximadamente 80%, y se co-cultivaron con las células B-LCL pulsadas con el péptido WT1 (quinta estimulación). Se usaron las células T CD8-positivas (CTL) obtenidas 5 días después de la estimulación final para la medición de la actividad citotóxica.

Actividad citotóxica de los CTL

Se midió la actividad citotóxica de los CTL mediante el ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Las células CTL (de aquí en adelante denominadas células efectoras) se mezclaron en una relación (relación E/T) de 1:1 a 30:1 en 200 µl de medio con células objetivo en las que se había incorporado ⁵¹Cr y se cultivaron en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 37°C con 5% de

CO₂ durante 4 horas. Las células B-LCL pulsadas con el mismo péptido WT1 que el usado para la inducción de los CTL (BLCL-Ps) y células B-LCL sin pulsado con un péptido WT1 (BLCL-NPs) se utilizaron como células objetivo. Después del cultivo, los sobrenadantes se recogieron por centrifugación. Las
5 cantidades de ⁵¹Cr liberado en los sobrenadantes se midieron con un contador de centelleo líquido. La actividad citotóxica (%) se determinó mediante la siguiente fórmula:

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

10

donde la liberación espontánea de ⁵¹Cr es la liberación de ⁵¹Cr observada cuando las células objetivo en las que se había incorporado ⁵¹Cr se cultivaron solas en las mismas condiciones y la liberación máxima de ⁵¹Cr es la liberación de ⁵¹Cr observada cuando las células objetivo en las que se
15 había incorporado ⁵¹Cr se lisaron completamente empleando Triton X-100 1%. Los resultados se muestran en las Figs. 1-9. En las figuras, los ejes verticales representan la lisis específica (%), y los ejes horizontales representan relaciones de E/T. Las BLCL-P se representan mediante líneas completas y las BLCL-NP se representan con líneas punteadas. Se confirmó que los CTL
20 inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₂, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈, WT1₃₇₈, WT1₃₈₆, WT1₄₁₅ o WT1₄₃₆ dañan específicamente las BLCL-P que presentan el péptido WT1 como un complejo con una molécula HLA-A*1101 en comparación con

las BLCL-NP. Los CTL inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈ o WT1₃₈₆ se usaron para los siguientes experimentos adicionales.

Actividad citotóxica de los CTL contra células que expresan WT1

5 en forma endógena

La actividad citotóxica de los CTL inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₃, WT1₃₃₈ o WT1₃₈₆ contra las B-LCL que expresan WT1 se determinó mediante el método descrito anteriormente. Una célula que expresa WT1 se refiere a una B-LCL en la cual se introduce un gen humano WT1 y
10 que expresa una proteína WT1 en la célula y presenta un péptido que consiste en aproximadamente 9 aminoácidos provenientes del procesamiento en una molécula HLA-A*1101. Los resultados se muestran en las Figs. 1, 2, 4, 5 y 7. En las figuras, las B-LCL que expresan WT1 se representan con líneas discontinuas. Se confirmó que los CTL inducidos con WT1₂₅₁, WT1₂₇₉, WT1₃₁₃,
15 WT1₃₃₈ o WT1₃₈₆ tienen una actividad citotóxica contra células que expresan el gen WT1 en forma endógena.

Preparación del dímero de péptidos WT1

Una mezcla de 227.5 mg del péptido monómero WT1₃₇₈, 227.5
20 mg de N-metilglucamina (NMG) y 23 ml de agua se oxidó al aire por agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 días. A la mezcla resultante, se agregó una solución acuosa de 2 g de acetato de sodio en 5 ml de agua y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante

aproximadamente 20 minutos. A la solución resultante, se agregaron 200 ml de agua y aproximadamente 200 ml de acetonitrilo y la mezcla se filtró a través de un embudo Kiriama (papel de filtro No. 5C) y lavó con agua (aproximadamente 50 ml x 3). Al residuo se agregaron aproximadamente 200
5 ml de agua y el residuo se liofilizó para obtener 158 mg de dímero de péptidos WT₁₃₇₈ bruto.

Purificación de dímero de péptidos WT1 bruto

Se disolvieron 158 mg del dímero de péptidos WT₁₃₇₈ bruto en 9
10 ml de DMSO y se inyectaron en una columna ODS C₁₈ (5 cm Φ x 50 cm L, YMC Co., LTD.) unida a HPLC (Shimadzu, tipo LC8AD) y equilibrada con la solución 1 (H₂O/1% de AcOH) mediante una bomba de HPLC. La columna se dejó durante aproximadamente 30 minutos, y se eluyó con gradiente de concentración de 0% a 40% de la solución 2 (CH₃CN/1% AcOH) durante 360
15 minutos. Las fracciones que contenían el dímero de péptidos WT1 se recogieron mediante un colector de fracciones automático mientras se monitoreaba la absorbancia a 220 nm. Las fracciones recogidas se combinaron, inyectaron en una columna ODS C₁₈ (4.6 mm Φ x 25 cm L, YMC Co., LTD.) unida a HPLC (Hitachi, tipo L-4000) y equilibrada con 17% de la
20 solución 2, y se eluyeron con gradiente de concentración de 0% a 47% de la solución 2 durante 30 minutos para obtener 46.6 mg del dímero de péptidos WT₁₃₇₈ purificado con un tiempo de retención de 20.51 minutos.

FAB.MS 2365.0 (valor teórico: 2342.70) Na⁺ F = 0.25%

Inducción del CTL por dímero de péptidos WT1

Las capacidades del dímero de péptidos WT1₃₇₈, péptido WT1₃₇₈, péptido WT1₃₇₈ modificado (G → I) (SEC ID No: 11) y péptido WT1₃₇₈ modificado (G → V) (SEC ID No: 12) además del péptido WT1₃₇₉ (SEC ID No: 13, descrito en WO 2002/28414) para inducir un CTL se examinaron mediante PBMC de los donadores sanos HLA-A*1101-positivos 1-3 de conformidad con el método descrito anteriormente. Los resultados se muestran en las Figs. 10A-14C. En las Figs., los ejes verticales representan la lisis específica (%), y los ejes horizontales representan las relaciones E/T. Las BLCL-P se representan usando líneas completas y las BLCL-NP se representan con líneas punteadas. Se confirmó que el dímero de péptidos WT1₃₇₈ tiene capacidad para inducir un CTL. Además, se halló que la capacidad de cada péptido WT1₃₇₉ del cual la secuencia de aminoácidos es diferente del péptido WT1₃₇₈ en un aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la proteína WT1 para inducir un CTL, es mucho menor que la del péptido WT1₃₇₈ y, de este modo, el péptido WT1 de la presente invención tiene un excelente e inesperado efecto en comparación con el péptido conocido.

Aplicación industrial

La presente invención proporciona un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101, un polinucleótido que codifica el péptido, una composición farmacéutica que comprende el mismo y similares. En consecuencia, la presente invención se puede usar en los campos de la medicina y similares,

por ejemplo en los campos de desarrollo y preparación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de diversos tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos que expresan el gen WT1 a altos niveles.

5

Texto libre de listado de secuencias

SEC ID NO: 11: Péptido WT1 modificado

SEC ID NO: 12: Péptido WT1 modificado

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, donde el péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un CTL.

10 2.- El péptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el aminoácido de la posición 9 de la secuencia de aminoácidos es Lys o Arg.

3.- El péptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque una secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en:

15 Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID No: 2),
Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID No: 3),
Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys (SEC ID No: 4),
Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg (SEC ID No: 5),
Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys (SEC ID No: 6),
20 Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7),
Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (SEC ID No: 8),
Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (SEC ID No: 9), y
Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys (SEC ID No: 10).

4.- El péptido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque la secuencia de aminoácidos es Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID No: 2).

5.- Un dímero de péptidos que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 y que tiene la capacidad de inducir un CTL, caracterizado porque dos péptidos monómeros que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1 y que comprenden por lo menos un residuo de cisteína, se unen entre sí mediante un enlace bisulfuro.

6.- El dímero del péptido de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque la secuencia de aminoácidos del péptido monómero se selecciona del grupo que consiste en:

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID No: 3),

Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7),

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (SEC ID No: 8) y

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (SEC ID No: 9).

7.- Una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5.

8.- Un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad efectiva del péptido de

conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5 a un sujeto positivo para HLA-A*1101.

9.- Un polinucleótido que codifica el péptido de conformidad con la reivindicación 1.

5 10.- Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 9.

11.- Una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 9 o el vector de conformidad con la reivindicación 10.

10 12.- Un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad efectiva del polinucleótido de conformidad con la reivindicación 9 o el vector de conformidad con la reivindicación 10 a un sujeto positivo para HLA-A*1101.

13.- Un CTL específico de WT1, que es inducido por el péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5.

14.- Un método para la inducción de una CTL específica de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear sanguínea periférica en presencia del péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o del dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5 para inducir el CTL específico de WT1 de la célula mononuclear sanguínea periférica.

15.- Un equipo para la inducción de una CTL específica de WT1, que comprende el péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero

de péptidos de conformidad con la reivindicación 5 como componente esencial.

16.- Una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, que es inducida por el péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5.

17.- Un método para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, que comprende cultivar una célula presentadora de antígenos inmadura en presencia del péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5 para inducir a la célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1 de la célula presentadora de antígenos inmadura.

18.- Un equipo para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, que comprende el péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5 como componente esencial.

19.- Un método para el diagnóstico de un cáncer, que comprende usar el CTL de conformidad con la reivindicación 13 o la célula presentadora de antígenos de conformidad con la reivindicación 16.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un péptido WT1 restringido a HLA-A*1101, específicamente un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos provenientes de una proteína WT1, donde el péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un CTL; la presente invención también se refiere a un dímero de péptidos que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 y que tiene la capacidad de inducir un CTL, donde dos péptidos monómeros que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1 y que comprenden por lo menos un residuo de cisteína, se unen entre sí mediante un enlace bisulfuro; además, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica el péptido, a una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer que comprende el mismo y similares.

41B

P09/726F

WPC17075/ID.152805

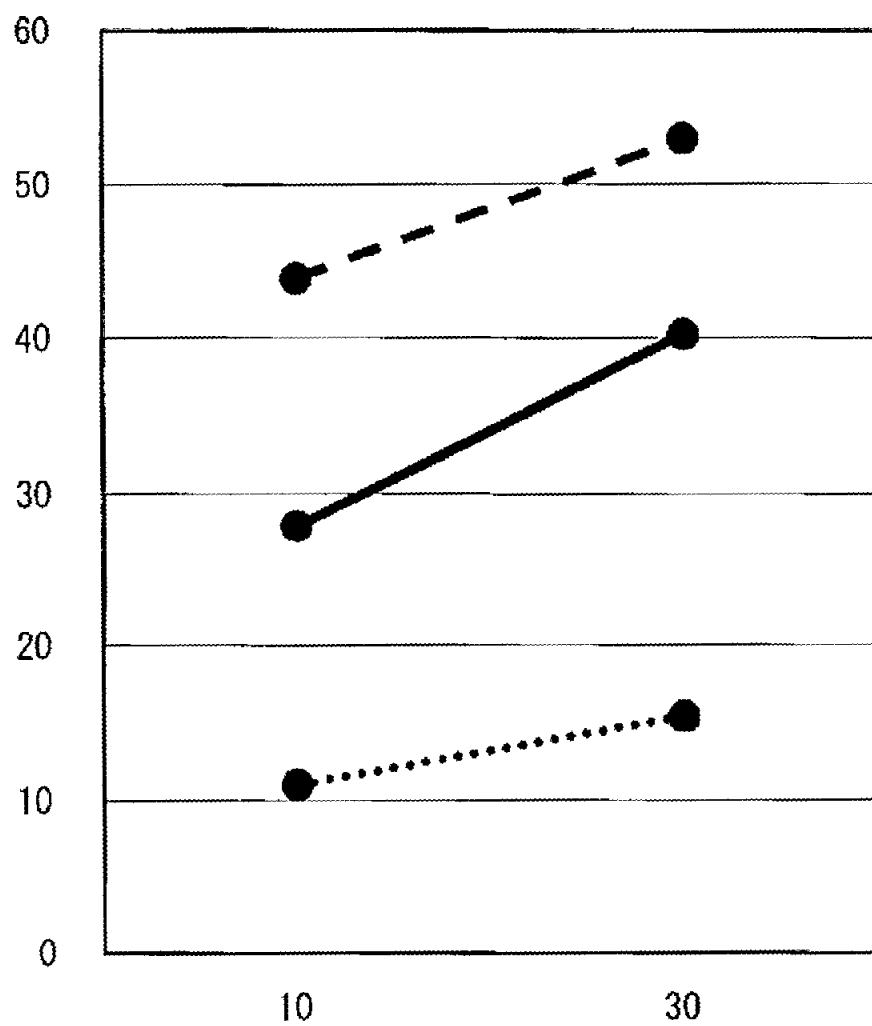
104

1/14

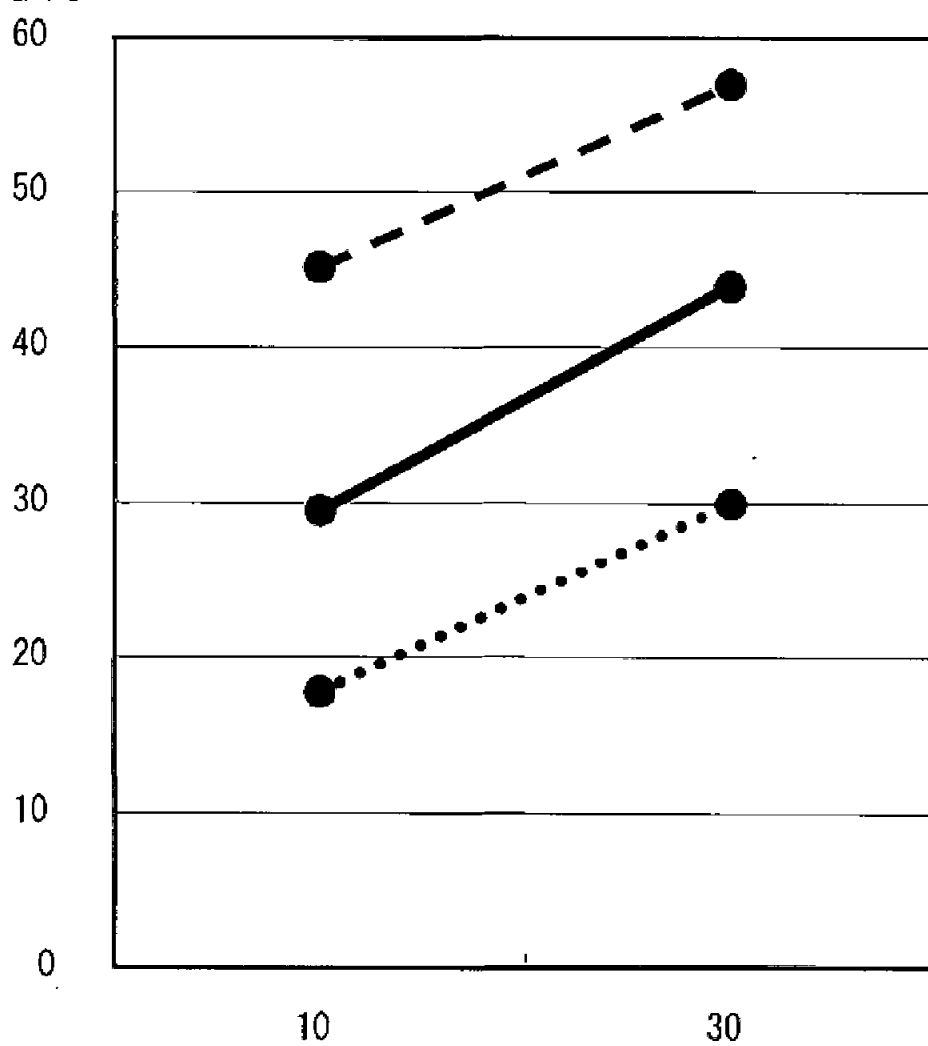
WO 2008/081701

PCT/JP2007/074146

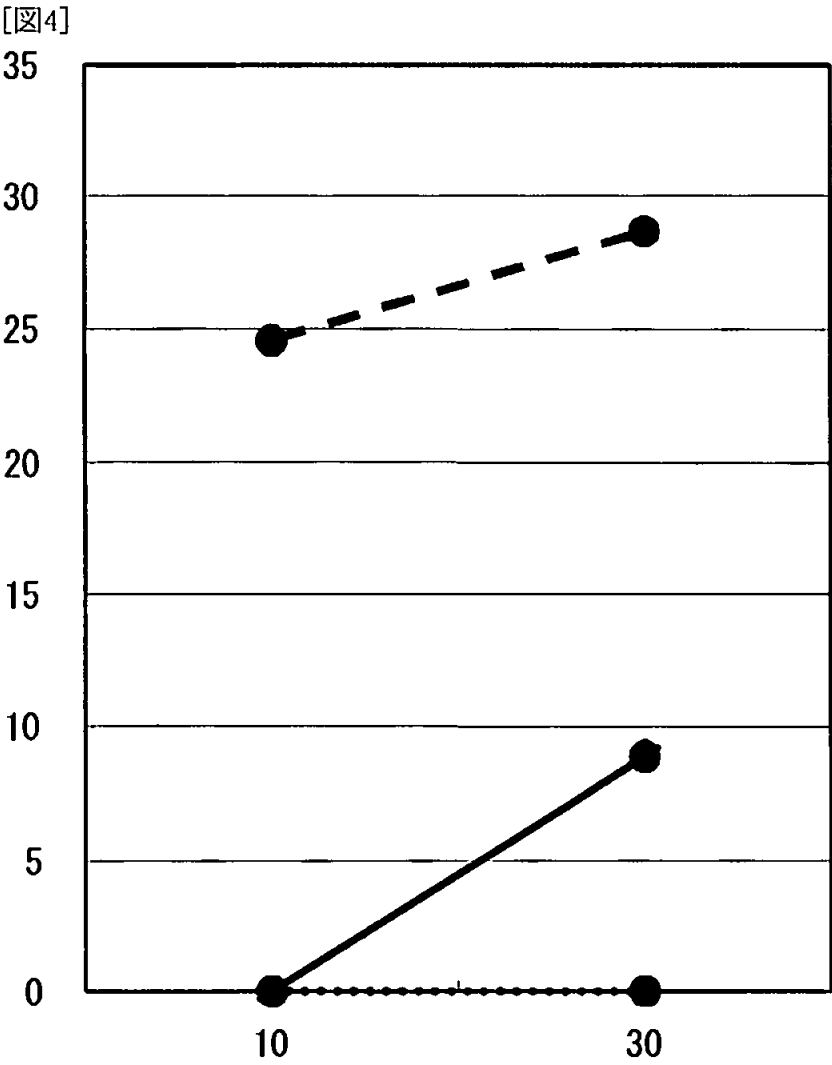
[図1]



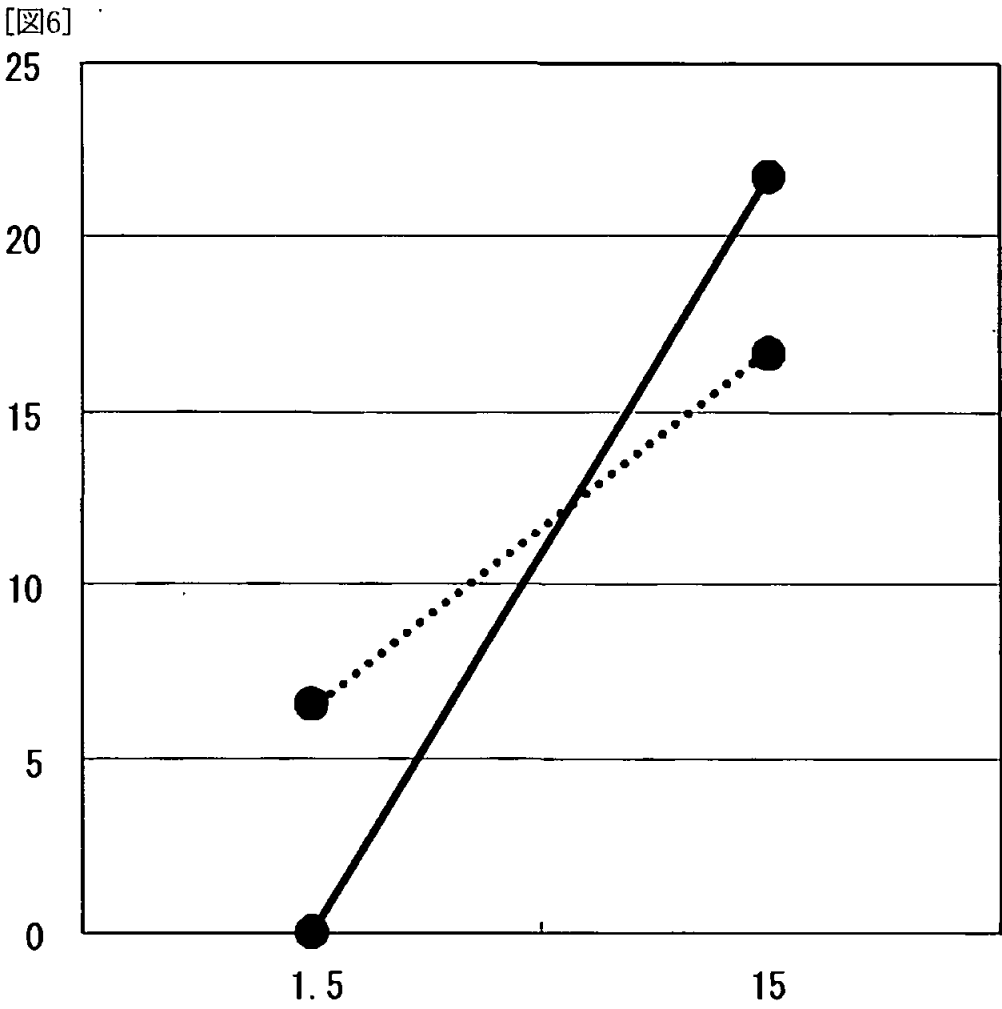
[図2]



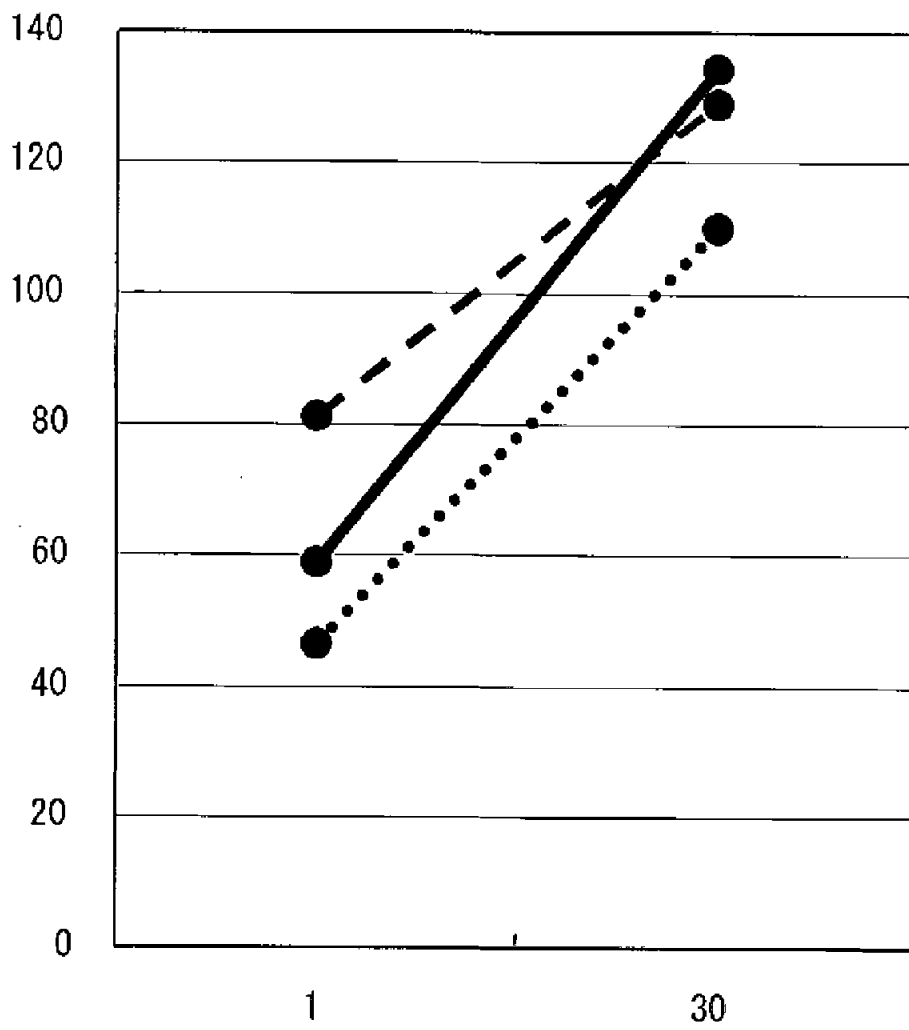
110

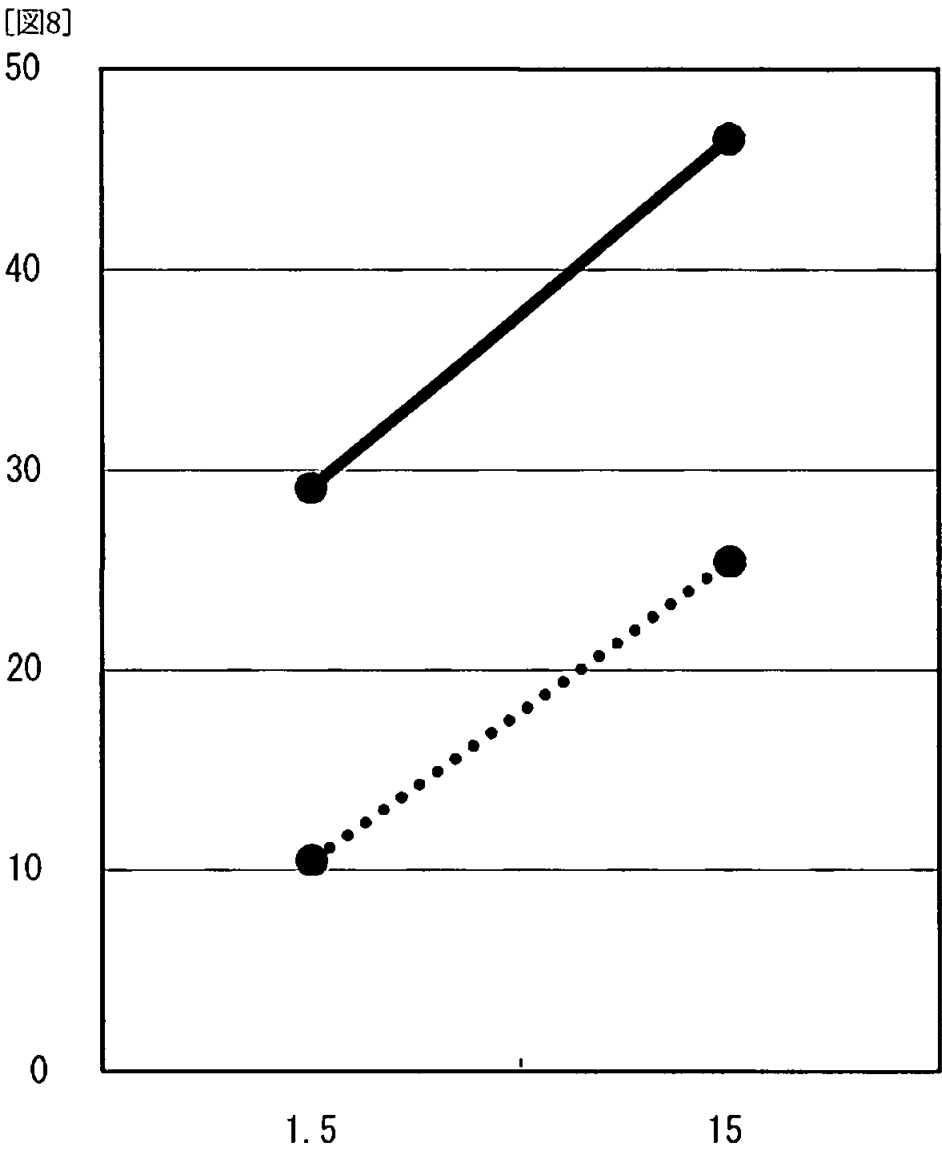


112



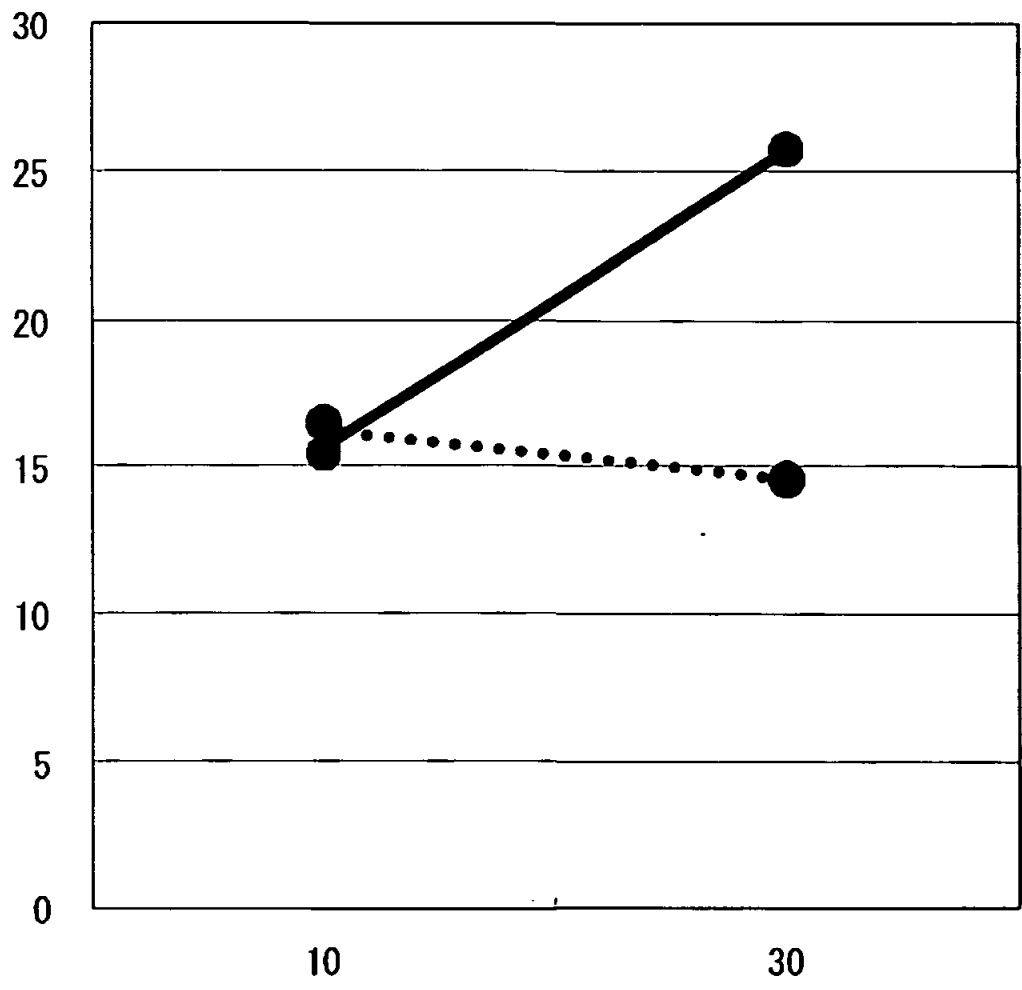
[図7]





110

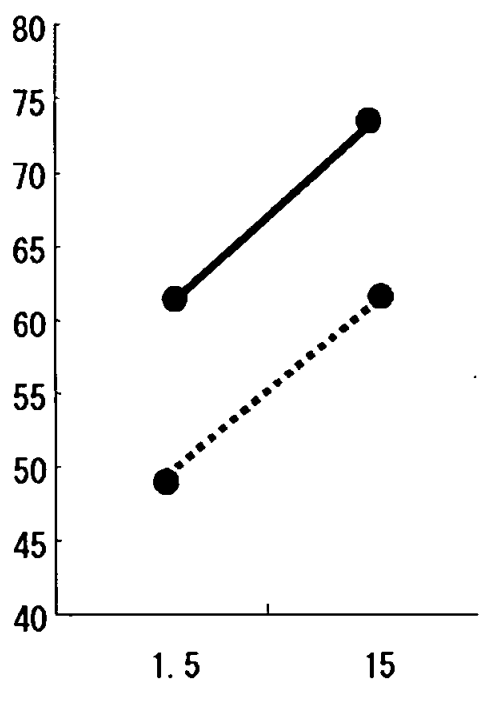
[図9]



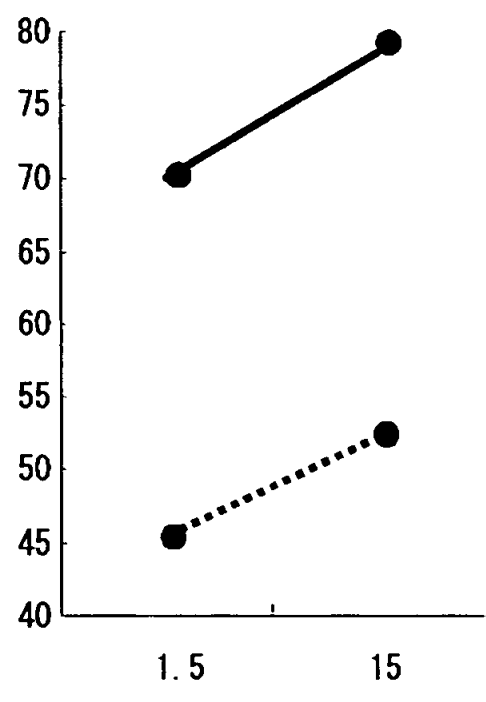
226

[10]

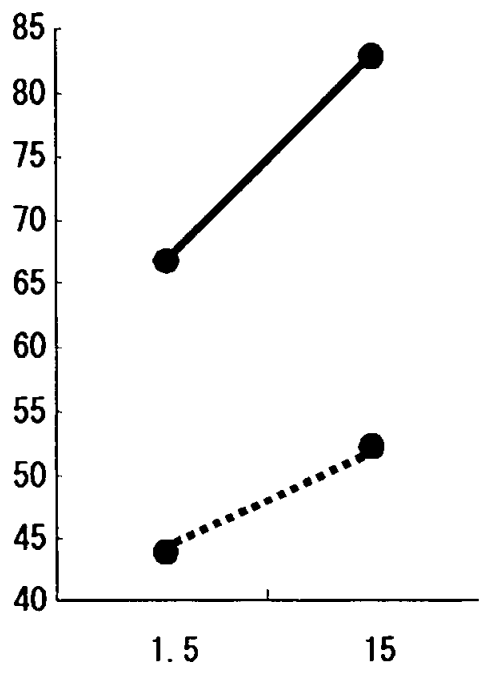
a)



b)



c)



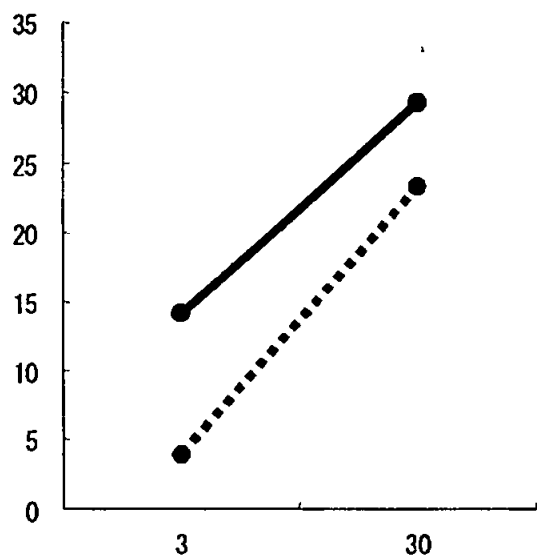
11/14

WO 2008/081701

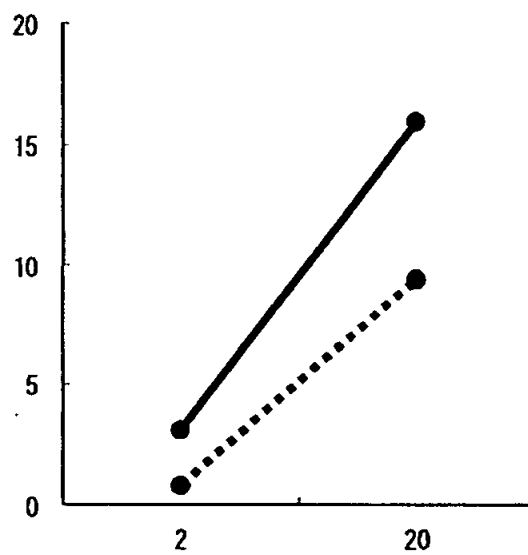
PCT/JP2007/074146

[ 11]

a)

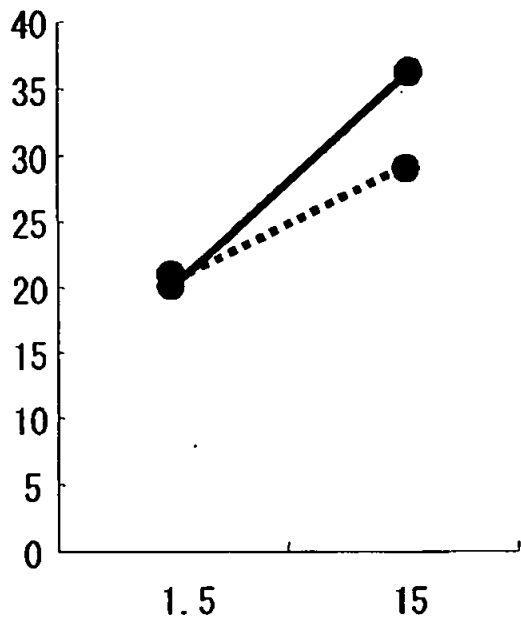


b)

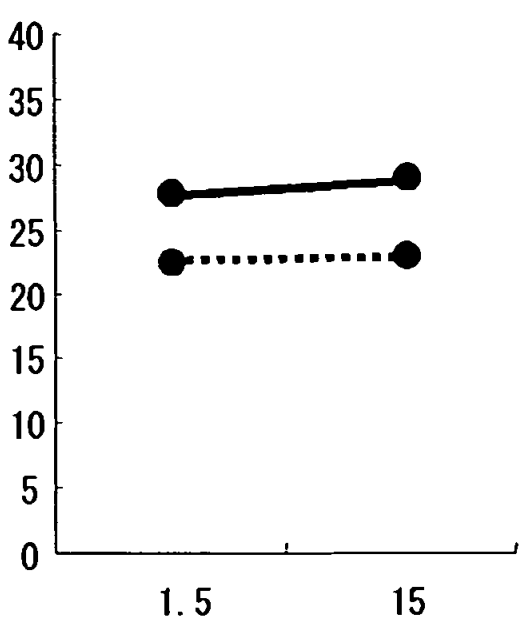


[図12]

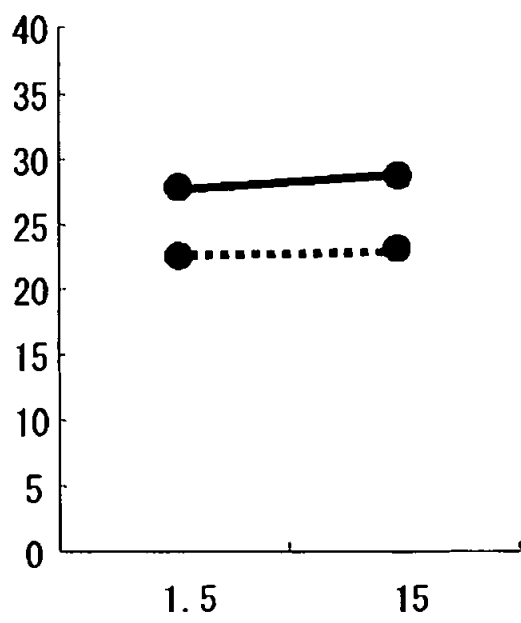
a)



b)

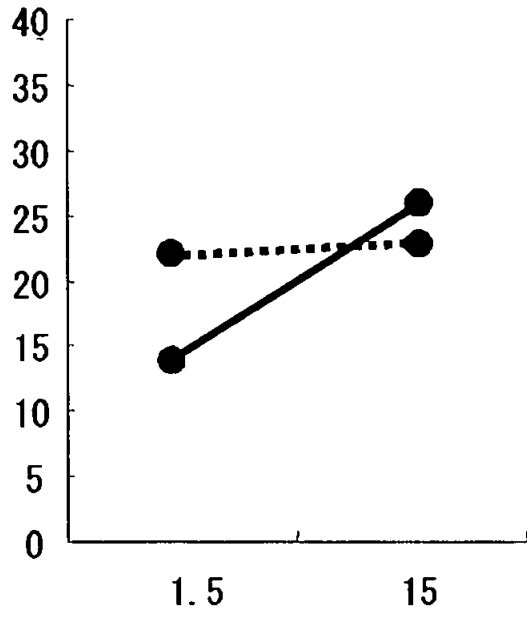


c)

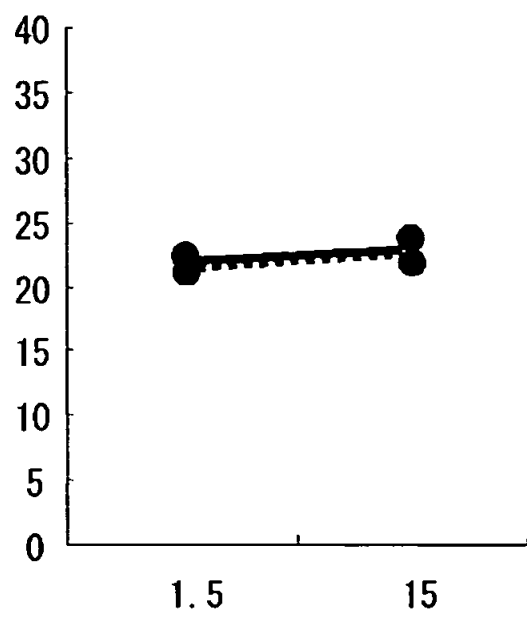


[図13]

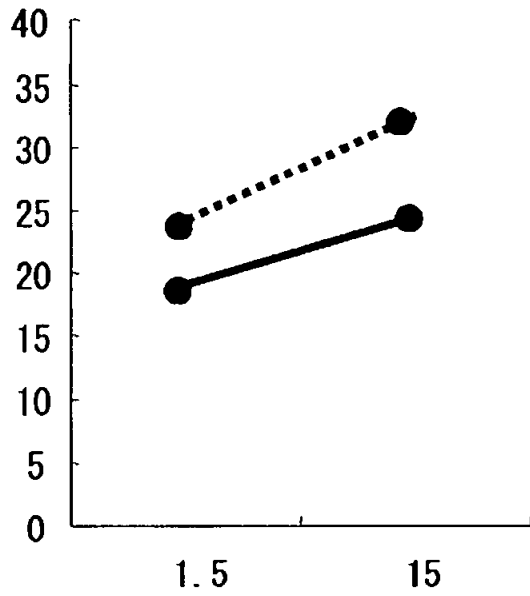
a)



b)

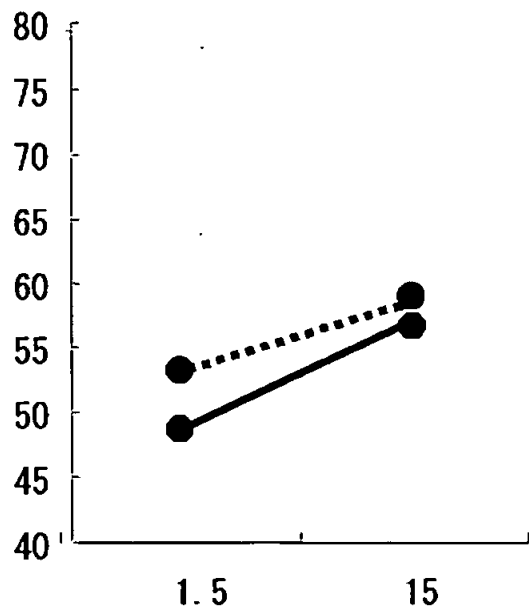


c)

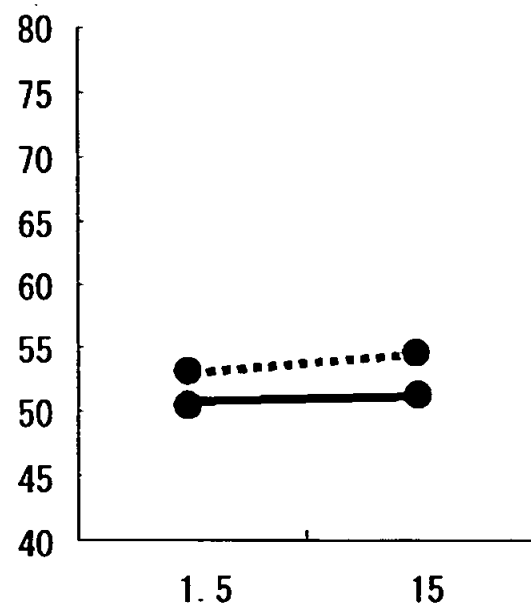


[図14]

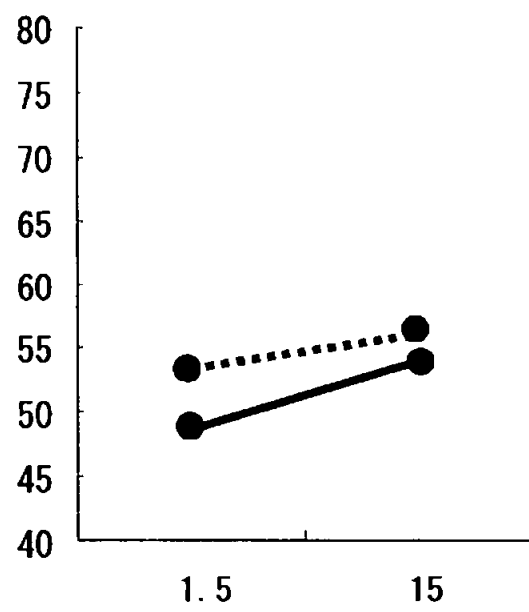
a)



b)



c)



121

667985 Sequence Listing PCT_JP2007_074146.txt
SEQUENCE LISTING

<110> International Institute of Cancer Immunology, Inc.
<120> HLA-A*1101 restricted WT1 peptide and pharmaceutical composition
comprising the same
<130> 667985
<150> JP 2006-355356
<151> 2006-12-28

<160> 13
<170> PatentIn version 3.2

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

<400> 1

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

122

667985 Sequence Listing PCT_JP2007_074146.txt

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395 400
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445

Leu

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

<400> 2

Ala Ala Gly Ser Ser Ser Ser Val Lys
 1 5

<210> 3

123

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg
1 5

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

<400> 4

Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
1 5

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

<400> 5

Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys
1 5

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg

1

5

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

<400> 9

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys
1 5

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

<400> 10

Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified WT1 peptide

<400> 11

Thr Ile Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Modified WT1 peptide

<400> 12

Thr Val Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys
1 5

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr
1 5

125

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/074146

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/12(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C07K14/82(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/574(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)

C12N15/12, A61K31/7088, A61K38/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P35/02, C07K14/82, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/574

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

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

CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS/WPI (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 (23.06.05)	1-7, 9-11, 13-18
X	JP 2003-524021 A (Corixa Corp.), 12 August, 2003 (12.08.03)	1-7, 9-11, 13-18
X A	JP 2004-510425 A (Corixa Corp.), 08 April, 2004 (08.04.04)	1-4 5-7, 9-11, 13-18
X A	JP 2006-280324 A (Ehime University), 19 October, 2006 (19.10.06), (Family: none)	1-3 4-7, 9-11, 13-18

☐ 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
04 March, 2008 (04.03.08)

Date of mailing of the international search report
18 March, 2008 (18.03.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

126

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2007/074146

JP 2005-518192 A	2005.06.23	WO 2003/037060 A2 EP 1468014 A2 US 2003/0095971 A1 US 2003/0039635 A1 US 2003/0198622 A1 US 2003/0235557 A1 US 2004/0126362 A1
JP 2003-524021 A	2003.08.12	WO 2001/062920 A2 EP 1261711 A2 US 2003/0082194 A1
JP 2004-510425 A	2004.04.08	WO 2002/028414 A1 EP 1328287 A1 US 2003/0082196 A1 US 2003/0072767 A1 US 7115272 B1 US 7144581 B2 US 2007/0026008 A1

127

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/074146

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.: 8, 12, 19 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 8 and 12 describes "a method for the treatment or prevention of cancer", and claim 19 describes "a method for the diagnosis of cancer". Therefore, these claims relate to "a method for the treatment or diagnosis of the human body by surgery or therapy". 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 ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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.	

128

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 7 4 1 4 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/12(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C07K14/82(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/12, A61K31/7088, A61K38/00, A61K48/00, A61P35/00, A61P35/02, C07K14/82, C12N5/06, C12Q1/02, G01N33/574			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS/WPI (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2005-518192 A (コリクサ コーポレイション) 2005.06.23		1-7, 9-11, 13-18
X	JP 2003-524021 A (コリクサ コーポレイション) 2003.08.12		1-7, 9-11, 13-18
X A	JP 2004-510425 A (コリクサ コーポレイション) 2004.04.08		1-4 5-7, 9-11, 13-18
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 04.03.2008		国際調査報告の発送日 18.03.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 長谷川 茜 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 3 2 2 8

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号 PCT/JP2007/074146

JP 2005-518192 A	2005. 06. 23	WO 2003/037060 A2 EP 1468014 A2 US 2003/0095971 A1 US 2003/0039635 A1 US 2003/0198622 A1 US 2003/0235557 A1 US 2004/0126362 A1
JP 2003-524021 A	2003. 08. 12	WO 2001/062920 A2 EP 1261711 A2 US 2003/0082194 A1
JP 2004-510425 A	2004. 04. 08	WO 2002/028414 A1 EP 1328287 A1 US 2003/0082196 A1 US 2003/0072767 A1 US 7115272 B1 US 7144581 B2 US 2007/0026008 A1

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8, 12, 19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 8、12には「癌を治療または予防するための方法。」と記載され、請求の範囲 19には「癌の診断方法。」と記載され、「人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法」に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

PC 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 015/012	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 2006-355356	(32) Fecha 28-12-2006	(33) País JP
		(72) Inventor(es) HARUO SUGIYAMA	
		(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 28/07/2009		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 10/07/2008	
Fecha de presentación de la solicitud: 14/12/2007		N° publicación: WO 2008/081701 A1	
No. de solicitud PCT/JP2007/074146			
(54) Título: PEPTIDO WT1 RESTRINGIDO A HLA-A*1101 Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE EL MISMO			

Reivindicación(es):

- 1.- Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1, donde el péptido tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 y tiene la capacidad de inducir un CTL
- 2.- El péptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el aminoácido de la posición 9 de la secuencia de aminoácidos es Lys o Arg.
- 3.- El péptido de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque una secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en:
Ala Ala Gly Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID No: 2),
Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID No: 3),
Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys (SEC ID No: 4),
Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys Arg (SEC ID No: 5),
Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys (SEC ID No: 6),
Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7),
Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (SEC ID No: 8),
Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (SEC ID No: 9), y
Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys (SEC ID No: 10).
- 4.- El péptido de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque la secuencia de aminoácidos es Ala Ala Gly Ser Ser Ser Val Lys (SEC ID No: 2).
- 5.- Un dímero de péptidos que tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-A*1101 y que tiene la capacidad de inducir un CTL, caracterizado porque dos péptidos monómeros que comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos que consiste en 9 aminoácidos contiguos de una proteína WT1 y que comprenden por lo menos un residuo de cisteína, se unen entre sí mediante un enlace disulfuro.
- 6.- El dímero del péptido de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque la secuencia de aminoácidos del péptido monómero se selecciona del grupo que consiste en:
Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg (SEC ID No: 3),
Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys (SEC ID No: 7),
Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg (SEC ID No: 8) y
Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys (SEC ID No: 9).
- 7.- Una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5.

- 8.- Un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad efectiva del péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5 a un sujeto positivo para HLA-A*1101.
- 9.- Un polinucleótido que codifica el péptido de conformidad con la reivindicación 1.
- 10.- Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 9.
- 11.- Una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 9 o el vector de conformidad con la reivindicación 10.
- 12.- Un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende la administración de una cantidad efectiva del polinucleótido de conformidad con la reivindicación 9 o el vector de conformidad con la reivindicación 10 a un sujeto positivo para HLA-A*1101.
- 13.- Un CTL específico de WT1, que es inducido por el péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5.
- 14.- Un método para la inducción de una CTL específica de WT1, que comprende cultivar una célula mononuclear sanguínea periférica en presencia del péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o del dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5 para inducir el CTL específico de WT1 de la célula mononuclear sanguínea periférica.
- 15.- Un equipo para la inducción de una CTL específica de WT1, que comprende el péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5 como componente esencial.
- 16.- Una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, que es inducida por el péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5.
- 17.- Un método para la inducción de una célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1, que comprende cultivar una célula presentadora de antígenos inmadura en presencia del péptido de conformidad con la reivindicación 1 y/o el dímero de péptidos de conformidad con la reivindicación 5 para inducir a la célula presentadora de antígenos que presenta un péptido WT1 de la célula presentadora de antígenos inmadura.

1125

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800178027-1

RECIBO OFICIAL DE CABA : 09 - 51,366
FECHA : JULIO 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-078403- -00000-0000

Fecha: 2009-07-28 16:22:08 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 133

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	VAL. PAGO	FECHA PAGO	VAL. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	RECIBO DE CABA			51366	14/07/2009	-51,366,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-02 PRORRUBAS Y RENOVACIONES	30 PRORRUBAS Y RENOVACIONES	513,660.00
	TOTAL :	5

SON: SEISCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CABA APLICADO AL EXPEDIENTE NO. _____

Cdo 17075-841-0014



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 ☐

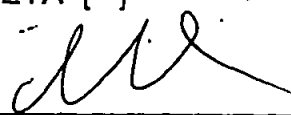
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha _____



Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Commutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: Info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 135

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC

REFERENCIA	Radicación No.	9 78403
	Solicitud internacional	PCT/JP2007/074146
	Fecha inicio fase nacional	28/07/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	8659
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

25 AGO 2009

ALIX CARMENZA OLSPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand