

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103858-00003-0000

Fecha: 2012-09-25 16:36:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 24

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación: 444

Referencia: Expediente No. 09.103.858
Asunto: Solicitud de patente para:
METODO PARA LA ACTIVACION DE CELULA T
AUXILIAR Y COMPOSICION PARA USARSE EN EL
METODO
Solicitante: INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
IMMUNOLOGY, INC.
Fecha de Solicitud: 23 de Septiembre de 2009

1. Yo, Luz Clemencia de PAEZ, obrando como apoderada del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. 11489 notificado por fijación en lista del 29 de Junio de 2012.

2. Mediante el Oficio No. 11489 se puso en conocimiento del solicitante el informe del examen de fondo que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las objeciones fueron las siguientes:

- Las reivindicaciones 1-6, 8, 9, 12, 13 hacen referencia a un método de tratamiento el cual no es patentable a la luz del Artículo 20 D486.
- Las reivindicaciones 11, 14, 15 se refieren a un método de diagnostico. De igual manera no son patentables.
- La reivindicación 10 no es clara dado que no define el anticuerpo.
- La reivindicación 7 carece de novedad a la luz del documento D1 (WO 2005/045027)

3. Respuesta a las objeciones

Con el objeto de atender las objeciones, se pone de presente al Despacho las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

3.1 Modificación a una Solicitud en Trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite, mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, hemos efectuado las siguientes modificaciones:

3.1.1 Modificación del capítulo reivindicatorio

Me permito presentar a su Despacho un nuevo pliego reivindicatorio compuesto por 11 reivindicaciones. Así, siguiendo algunas de las diferentes observaciones del Examinador, se han realizado modificaciones sobre la presente solicitud.

Permítame poner a su consideración las siguientes modificaciones:

- Las reivindicaciones 1-5 fueron eliminadas atendiendo la objeción por no-patentabilidad hecha por el examinador.
- La reivindicación 7 fue modificada de tal manera que el péptido es definido alrededor de la secuencia SEQ ID No. 2, tal como esta establecido en la guía para la solicitud de patentes de su despacho. Esta reivindicación corresponde a la nueva reivindicación 1. Para posteriores aclaraciones, por favor remítase a la siguiente sección de este memorial.
- Las reivindicación 8 fue eliminada del nuevo pliego con el fin de superar la objeción por no patentabilidad.
- Se modificó la reivindicación 9 con el fin de mostrar una composición farmacéutica la cual consiste del péptido WT1, un portador y un excipiente farmacéuticamente aceptado. De esta manera se da por superada la objeción por no patentabilidad formulada por el examinador. Esta reivindicación corresponde a la nueva reivindicación 3.
- Las reivindicaciones 12 y 13 fueron eliminadas del nuevo pliego siguiendo la objeción por no patentabilidad hecha por el examinador.

- Respecto a las reivindicaciones 11, 14, 15, dichas reivindicaciones fueron modificadas con el fin de enseñar un método *in vitro* de determinación de la presencia del péptido WT1. Estas reivindicaciones corresponden a las nuevas reivindicaciones 6, 8 y 10.
- La reivindicación 10 fue eliminada del nuevo pliego con el fin de atender la objeción por la no apropiada definición del anticuerpo allí reclamado.

3.2 Respuesta a objeciones hechas por el examinador

Con respecto a la claridad de las reivindicaciones

De acuerdo con lo encontrado por los inventores, el péptido WT1 puede estar definido de dos categorías alrededor de la SEQ ID No. 2. La primera corresponde estrictamente a la secuencia SEQ ID No 2. La segunda corresponde a péptidos de 25 aminoácidos de longitud o menos los cuales conservan el motivo SEQ ID No 2 los cuales presentan la actividad que responde al problema técnico planteado en esta patente. Aquí es importante mencionar que los dichos péptidos están debidamente justificados en la pagina 14 del capitulo descriptivo de la presente solicitud. Adicionalmente, los inventores desean anexar a este memorial resultados experimentales los cuales evidencian la novedad y la altura inventiva de la presente solicitud.

Estos datos experimentales muestran que un péptido de 25 aminoácidos de longitud, que conservan el motivo SEQ ID No: 2, los cuales tienen la habilidad de unirse a cualquiera de las moléculas HLA-DRB1*1501, HLA-DPB1*0901 y HLA-DRB*0501 y así activar la célula T.

Tabla 1. Péptidos

Nombre	Secuencia de Aminoacidos	MW	Distribuidor
OCV-501	<u>KRYFKLSHLQMHSRKH</u>	2086.45	Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Research Institute of Organic Chemistry
5+OCV-501	YPGCNK <u>KRYFKLSHLQMHSRKH</u>	2621.04	
9+OCV-501	FMCAYPGCNK <u>KRYFKLSHLQMHSRKH</u>	3073.63	
OCV-501+5	<u>KRYFKLSHLQMHSRKHT</u> GEKP	2599.01	
OCV-501+9	<u>KRYFKLSHLQMHSRKHT</u> GEKPYQCD	3108.55	
WT1-35	WAPVLDFA ~~PP~~ GASAYGSL	1819.05	

SEQ ID No:2 de OCV-501 esta subrayada. El peso molecular (MW) fue calcluado con "Compute pI/Mw tool (ExPASy)". Los péptidos fueron almacenados a -20°C.

La tabla 1 se refiere a específicamente los péptidos usados. OCV-501 es un péptido que consiste de 16 aminoácidos (SEQ ID No. 2). 5+OCV-501, 9+OCV-501 son péptidos a los que se agrega en el N - terminal 5 y 9 aminoácidos respectivamente. OCV-501+5, OCV-501+9 son péptidos a los que se agrega en el C - terminal 5 y 9 aminoácidos respectivamente. Estos péptidos de 25 aminoácidos o menos corresponden a la categoría 2.

En este caso, el control corresponde al péptido WT1-35 el cual es un péptido que no contiene el motivo SEQ ID No:2.

Tal como lo muestra la figura 6 del documento anexo a este memorial, se evidencia que los péptidos de la tabla 1 (excepto el control) activan las células T para producir IFN –gamma.

3.3. Argumentos a favor de la novedad de la presente solicitud

El péptido WT1 esta limitado a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No.2 o una variante de ella. Tal como se explicó arriba, esta materia esta debidamente justificada en el capitulo descriptivo. El documento (WO 2005/045027) no revela una secuencia tal como la muestra la reivindicación 1, específicamente SEQ ID No. 2 la cual presenta una afinidad hacia unas moléculas HLA-DRB1*1501, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*0501. De esta manera, el documento D1 no revela ni sugiere tal afinidad por dichas moléculas lo que lo hace nuevo con respecto al estado de la técnica.

4. Conclusiones

De esta manera, se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por el Examinador. En consecuencia solicitamos atentamente proceder al otorgamiento de la solicitud de patente que corresponde a 11 reivindicaciones. Respetuosamente, recordamos al Examinador que la patente no podrá ser negada con base en objeciones diferentes a las expuestas en la acción oficial No. **No. 11489**, todas vez que al no haber sido trasladadas a mi representada, dicha decisión violaría tanto el tenor literal del artículo 45 de la Decisión 486 como el derecho constitucional al debido proceso. En este evento, y con base en el inciso 2 del artículo 45, respetuosamente solicitamos al Examinador expedir una nueva acción oficial que permita a mi representada contra argumentar las mismas o modificar la solicitud con el fin de cumplir los requisitos de patentabilidad.

5. Anexos

- 5.1** Formulario para modificaciones.
- 5.2** Nuevo pliego reivindicatorio, conformado por 11 reivindicaciones.
- 5.3** Comprobante de pago por 30.000 correspondiente a 1 reivindicación en exceso de las 10 primeras.
- 5.4** Reporte experimental sobre actividad de péptidos.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén
T.P.A. No. 23.555

 COLO-17075-0841-002-2
DRD\DRD\ID-226290\WPC17075
No. M-2012-226290\DRD

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

**DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES****1. Identificación del Trámite**

- ☐ Error material ☒ Modificación a una Solicitud en trámite
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitantePersona Natural ☐Persona Jurídica ☒**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.**

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Japón	13-9 Enoki-cho, Suita-shi	Osaka 5640053
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

- ☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:Apellidos y Nombre
De Páez Luz ClemenciaDocumento de identificación
C.C. 35.456.344Tarjeta profesional
T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 -35		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11
En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general		

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 09.103.858

Aparece

Debe ser

Modificación:

**Modificación al capítulo reivindicatorio.**

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 11 reivindicaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.

Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

**Modificación al capítulo descriptivo.****Modificación al resumen.****Modificación a los dibujos.****Modificación al solicitante.**

5. Anexos



Poder, si fuere el caso.



Documento que contiene las modificaciones o correcciones.



Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.



Comprobante de pago por 1 reivindicaciones adicional después de la décima reivindicación por \$30.000

6. Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	<i>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</i>
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

c66 DRD\NCA\WPC17075\ID-226336

REIVINDICACIONES

1.- Un péptido para la activación de una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, caracterizado porque el péptido WT1 puede ser seleccionado de:

- 1) Un péptido que consiste en los siguientes aminoácidos Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His que corresponde a la SEQ ID NO:2
- 2) Un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que conserva la región que corresponde a la secuencia SEQ ID No:2

2.- El péptido de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia SEQ ID No: 2 o la región que comprende SEQ ID No: 2 contiene una sustitución, una modificación, o una delección en uno o mas aminoácidos.

3.- El péptido de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado además porque la adición del péptido WT1 a las células presentadoras de antígeno se pone en práctica mediante la adición del péptido WT1, la adición de un vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el péptido WT1 o la adición de una célula que incluye el vector de expresión.

4.- Una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer al activar una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, caracterizado porque comprende el péptido WT1 es seleccionado de

- 1) Un péptido que consiste en los siguientes aminoácidos Lys-Arg-Tyr-Phe-

Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His que corresponde a la SEQ ID NO:2

- 2) Un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que conserva la región que corresponde a la secuencia SEQ ID No:2

un portador y un excipiente farmacéuticamente aceptado.

5.- La composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 4 caracterizado porque la secuencia SEQ ID No: 2 o la región que comprende SEQ ID No: 2 contiene una sustitución, una modificación, o una delección en uno o mas aminoácidos.

6.- Un método *in vitro* para la determinación de la presencia o cantidad de un péptido WT1 en cualquier sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo y HLA-DPB1*0501-positivo, que comprende:

- (a) hacer reaccionar un anticuerpo anti-WT1 con una muestra del sujeto; y
- (b) determinar la presencia o cantidad del anticuerpo anti-WT1 que se une específicamente al péptido WT1 contenido en la muestra donde el péptido WT1 es seleccionado de

- 1) Un péptido que consiste en la los siguientes aminoácidos Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His que corresponde a la SEQ ID NO:2

- 2) Un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que conserva la región que corresponde a la secuencia SEQ ID No:2

7.- El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 6 caracterizado porque la secuencia SEQ ID No: 2 o la región que comprende SEQ ID No: 2 contiene una sustitución, una modificación, o una delección en uno o mas aminoácidos.

8.- Un método *in vitro* para la determinación de la presencia o cantidad de una célula T auxiliar específica de WT1 en cualquier sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo y HLA-DPB1*0501-positivo, que comprende:

(a) hacer reaccionar un complejo de un péptido WT1 y una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 o una molécula de HLA-DPB1*0501 con una muestra del sujeto; y

(b) determinar la presencia o cantidad de una célula T auxiliar que reconoce el complejo contenido en la muestra donde el péptido WT1 es seleccionado de

- 1) Un péptido que consiste en la los siguientes aminoácidos Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His que corresponde a la SEQ ID NO:2
- 2) Un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que conserva la región que corresponde a la secuencia SEQ ID No:2

9.- El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 8 caracterizado porque la secuencia SEQ ID No: 2 o la región que comprende SEQ ID No: 2 contiene una sustitución, una modificación, o una delección en uno o mas aminoácidos.

10.- Un método *in vitro* para la determinación de la presencia o cantidad de una célula T auxiliar específica de WT1 en cualquier sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo, HLA-DPB1*0501-positivo, HLA-DRB1*0405-positivo o HLA-DRB1*1502-positivo, que comprende:

(a) estimular una célula mononuclear de sangre periférica, linfocito invasivo, célula tumoral, célula en fluido ascítico, célula en fluido pleural, célula en fluido cerebroespinal, célula de médula ósea o célula de nodo linfático con un péptido WT1; y

(b) determinar la producción de una citocina o la reacción de la célula T auxiliar, en

donde una presencia o un incremento en la cantidad de la producción de la citocina o la reacción de la célula T auxiliar indica la presencia o cantidad de la célula T auxiliar específica de WT1 donde el péptido WT1 es seleccionado de

- 1) Un péptido que consiste en la los siguientes aminoácidos Lys-Arg-Tyr-Phe-Lys-Leu-Ser-His-Leu-Gln-Met-His-Ser-Arg-Lys-His que corresponde a la SEQ ID NO:2
- 2) Un péptido que consiste de 25 aminoácidos o menos que conserva la región que corresponde a la secuencia SEQ ID No:2

11. Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 10 caracterizado porque la secuencia SEQ ID No: 2 o la región que comprende SEQ ID No: 2 contiene una sustitución, una modificación, o una delección en uno o mas aminoácidos.

EXPERIMENTAL DATA

Abstract

IFN- γ production by the stimulation of the peptide having the amino acid sequence of KRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 2) (herein referred as OCV-501) and longer peptides comprising the sequence of OCV-501 were analyzed by Intracellular Cytokine Staining (ICS) and ELISA. Using OCV-501-specific Th1 clones, OCV-501 and four peptides each of which was prepared by adding 5 or 9 amino acids to N or C-terminus of OCV-501 were analyzed. As control stimulation, 10 mM acetic acid (AcOH) (solvent) and WT1-35 peptide (control peptide) were used.

In four Th1 clones in which OCV-501 induced IFN- γ production, all the peptides tested induced similar IFN- γ production. In three Th1 clones, the C-terminus-added peptides showed lower IFN- γ production, or addition of amino acids resulted in increase of IFN- γ production, implying that addition of amino acids would modify the activity of the peptide. Also, in three Th1 clones in which OCV-501 did not induce IFN- γ production, none of the peptides induced IFN- γ production, in other words, non peptide-specific induction was not observed.

Those results demonstrate that the activity of OCV-501 is maintained even if amino acids up to 9 are added to its N or C-terminus.

Introduction

OCV-501, a peptide consisting of the amino acid sequence of KRYFKLSHLQMHSRKH (SEQ ID NO: 2), binds to MHC class II molecule and induce IFN- γ -producing Th1 cells. While MHC class II binding peptides have 12-15 amino acids in general, OCV-501 has a longer amino acid sequence consisting of 16 amino acids. Further, it has not been demonstrated whether or not peptides longer than OCV-501 show similar activity to OCV-501. In the present study, it was evaluated whether longer peptides each of which was prepared by adding 5 or 9 amino acids to N or C-terminus of OCV-501 had the activity equivalent to OCV-501 using OCV-501-specific Th1 clones and based on IFN- γ production after peptide stimulation determined by Intracellular Cytokine Staining (ICS) and ELISA.

Materials and Methods

Peptides

Table 1 Peptides

name	amino acid sequence	MW	supplier
OCV-501	<u>KRYFKLSHLQMHSRKH</u>	2086.45	Otsuka Pharmaceutic al Co., Ltd., Research Institute of Organic Chemistry
5+OCV-501	YPGCNK <u>KRYFKLSHLQMHSRKH</u>	2621.04	
9+OCV-501	FMCAYPGCNK <u>KRYFKLSHLQMHSRKH</u>	3073.63	
OCV-501+5	<u>KRYFKLSHLQMHSRKHTGEKP</u>	2599.01	
OCV-501+9	<u>KRYFKLSHLQMHSRKHTGEKPYQCD</u>	3108.55	
WT1-35	WAPVLDFAPPGASAYGSL	1819.05	

The amino acid sequence of OCV-501 is underlined. Molecular weight (MW) was calculated with Compute pI/Mw tool (ExPASy). The peptides were stored in a freezer at -20°C.

Preparation of peptide solutions

The peptides except for WT1-35 were dissolved in 10 mM acetic acid (AcOH), respectively, and WT1-35 was in DMSO [WAKO: WKK2830] to prepare stock solutions. Each of the stock solutions was dispensed into 0.5 ml polypropylene tubes and stored at -20°C until just before use. The frozen solutions were thawed and immediately used for the test.

Cells

- 1) Name of cell: Th1 clone cells
- 2) Source: Human PBMC from blood donor (Each Th1 clone cells were established from PBMC from healthy donor obtained with informed consent)
- 3) Number of Th1 clones: 10 clones

Table 2 HLA types of Th1 clones used in the test

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

These experiments were performed according to the Biosafety Guidelines of Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd (Nov.19,2010 revision).

Groups

Table 3 Groups

Group#	Stimulation	Stimulant
1	solvent	10mM Acetic Acid AcOH
2	Parent peptide	OCV-501
3	Comparative peptide 1	5+OCV501
4	Comparative peptide 2	9+OCV501
5	Comparative peptide 3	OCV-501+5
6	Comparative peptide 4	OCV-501+9
7	control peptide	WT1-35

WT1-35 is considered to be a helper peptide which is known to bind to HLA types of Th1 clones used in the experiment (see WO 2010/123065). As shown below, WT1-35 did not induce Th1 response under the present experimental conditions.

Reagents

The reagents used in the test are summarized in Table 4.

Table 4 Reagents for the test

name	Code No.	supplier
human recombinant interleukin-2 (IL-2)	200-02	PeptoTech, Inc.
Brefeldin A Solution (1,000X)	420601	BioLegend
Cytofix Cytoperm Fix/Perm	554723	BD Bioscience
Permeabilization Wash Buffer (10X)	421002	BD Bioscience
FITC-labeled anti-human CD8 antibody	A07756	Beckman Coulter
PE-labeled anti-human CD4 antibody	A07751	Beckman Coulter
PerCPCy5.5-labeled anti-human IFN-γ antibody	502525	BioLegend
OptEIA ELISA set (human IFN-γ)	555142	BD Bioscience
OptEIA Reagent Set B.	550534	BD Bioscience
AIM-V	12055-091	Invitrogen
Human AB serum	2931949	Dainippon Sumitomo Pharma

Preparation of medium and staining buffer

Human AB serum was inactivated at 56°C for 30 min and filtered with 0.22 μm filter (Serum Acrodisc, Gelman). The inactivated Human AB serum (50 mL) was mixed with 500mL AIM-V in a clean bench to prepare the medium (90% AIM-V+10% human serum). The staining buffer was prepared by mixing 500mL PBS(-) with 10 mL inactivated FBS. The medium and staining buffer were stored at 4°C until use.

Test method

Pre-culture of Th1 clone

The Th1 clones stored in a frozen state were thawed in a warm bath at 37°C and immediately washed with 10 mL AIM-V by centrifugal washing at 1,800 rpm for 5 min. After the centrifugation, the supernatant was removed and the cells were re-suspended into 1 mL medium. After that, the cell number of the resulting solution was counted.

The solution was diluted with medium as appropriate and seeded onto 24-well plates (1 mL/well). Further, 1 mL IL-2 containing medium (40U/mL) was added to each well and the cells were cultured for 2 days at 37°C under 5% CO₂.

Collection of cells and stimulation with peptides

After 2 days of culture, the cells were collected by centrifugation and re-suspended into 1 mL medium and the cell number of the resulting solution was counted. After that, the solution was diluted as appropriate and seeded onto a 96-well round-bottom plate (100 µL/well). Then, peptide-containing medium (40 µg/mL) was prepared for each peptide and the medium thus prepared was added to the 96-well round-bottom plate (100 µL/well) (final concentration of peptide: 20 µg/mL). The cells were cultured at 37°C under 5% CO₂. ELISA assay was performed in triplicate for each stimulation.

Intracellular Cytokine Staining (ICS)

After 4 hours of the peptide stimulation, the cells were added with Brefeldin A Solution (1000x) such that the final concentration of Brefeldin A Solution became 1x and further cultured. After 6 hours of the initiation of culture, the cells were collected and the culture supernatant was removed. The collected cells were reacted with PE-labeled anti-human CD4 antibody and FITC-labeled anti-human CD8 antibody (2 µL) for 15 min at 4°C. The cells were washed twice with the staining buffer, added with Cytofix Cytoperm Fix/Perm (250 µL), and reacted for 20 min at 4°C for cell fixation. The cells were washed twice with 1x Perm./Wash Buffer, and reacted with PerCPCy5.5-labeled anti-human IFN-γ antibody (0.5 µL) for 30 min at 4°C. The cells were washed twice with 1x Perm./Wash Buffer, re-suspended with 400 µL staining buffer and analyzed with Gallios [Beckman Coulter].

ELISA

After 24 hours of the peptide stimulation, the culture supernatant (160µL) was gently removed from each well and transferred to a new 96-well round-bottom plate. The plate was sealed and stored in a frozen state at -20°C until measurement. Concentration of IFN-γ in the culture supernatant was measured by ELISA using BD OptEIA ELISA set (human IFN-γ) according to the manufacture's instructions and V-max (Molecular Device).

Evaluation

Th1 ratio after stimulation was determined by Intracellular Cytokine Staining and IFN-γ production was measured by ELISA.

Peptide-specific Th1 ratio (%) = number of CD4-positive and intracellular IFN-γ-positive cells after peptide stimulation/ total number of viable cells x 100

Non peptide-specific Th1 ratio (%) = number of CD4-positive and intracellular IFN-γ-positive cells after stimulation with 10 mM AcOH/ total number of viable cells x 100

Results and Discussion

Peptide specific Th1 ratio in OCV-501-specific Th1 clone after stimulation was determined by ICS of IFN-γ. The Th1 ratio after stimulation is shown in Table 5.

Table 5		Th1 ratio after stimulation determined by ICS (%)						
Exp.	clone	AcOH	OCV-501	5+OCV-501	9+OCV-501	OCV-501+5	OCV-501+9	WT1-35
120410	#106_3D02	0.002	2.432	2.950	4.202	2.856	2.968	NT
	#77_3B08	0.004	0.000	0.006	0.000	0.002	0.010	NT
	#107_1E02	NT						
	#140_1D04	0.002	0.080	0.090	0.100	0.080	0.130	NT
120416	#107_1E04	0.006	6.080	4.768	11.648	5.370	6.314	0.006
	#77_3B08	0.004	0.004	0.004	0.008	0.006	0.006	0.008
	#77_3F05	0.002	0.012	0.006	0.008	0.006	0.012	0.006
	#140_1H05	0.006	10.536	5.600	3.922	7.652	4.834	0.004
120417	#106_1H11	0.006	0.922	0.842	0.892	1.174	1.540	0.002
	#113_1F04	0.000	0.000	0.006	0.006	0.004	0.002	0.004
	#140_3F06	0.002	22.066	18.251	20.452	5.317	5.183	0.009

NT: Not tested due to insufficient cell number.

As shown in Table 5, the following Th1 clones showed increase of Th1 ratio upon OCV-501 stimulation compared to stimulation with AcOH or WT1-35: #106_3D02, #140_1D04 (Exp.120410), #107_1E04, #140_1H05 (Exp.120416), #106_1H11 (Exp.120417). In those five clones, all the peptides containing the sequence of OCV-501 induced Th1 ratio increase, similarly.

Different from the other clones, only in clone #140_3F06 (Exp.120417), the C-terminus-added peptides showed lower Th1 ratio compared to OCV-501 and the N-terminus-added peptides.

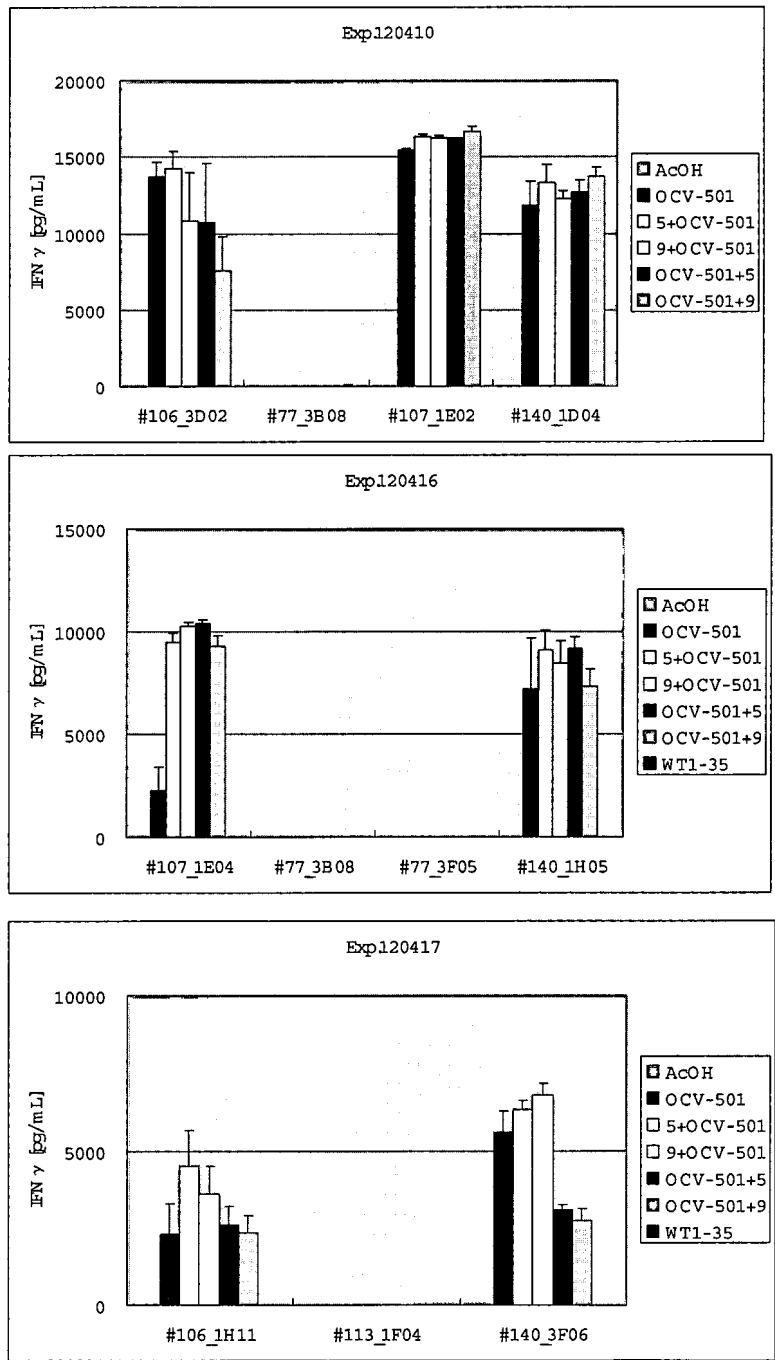
In three clones #77_3B08, #77_3F05, and #113_1F04, increase of Th1 ratio was not observed with OCV-501 nor any of the peptides containing the sequence of OCV-501.

Next, IFN- γ production in OCV-501-specific Th1 clone after stimulation was determined by ELISA. IFN- γ production after 24 hours of stimulation in each clone is shown in Table 6 and Fig 1.

Table 6 IFN-γ production after 24 hours of stimulation determined by ELISA					
Exp.	clone	AcOH	OCV-501	5+OCV-501	9+OCV-501
120410	#106 3D02	4.83±2.7	13716.73±937.32	14223.66±1107.56	10850.58±3135.34
	#77 3B08	0.76±0	16.52±0	3.86±6.38	2.00±0
	#107 1E02	1.12±0	15478.01±55.93	16322.26±193.77	16264.41±87.96
	#140 1D04	10.33±11.1	11877.91±1540.12	13313.63±1153.17	12241.89±507.78
120416	#107 1E04	27.13±0	2243.59±1149.68	9460.86±445.75	10218.31±184.85
	#77 3B08	ND	ND	ND	ND
	#77 3F05	ND	ND	ND	ND
	#140 1H05	ND	7228.09±2458.95	9102.68±951.49	8421.16±1133.13
120417	#106 1H11	ND	2302.70±1001.15	4517.55±1165.76	3593.52±898.22
	#113 1F04	ND	ND	8.12±1.53	ND
	#140 3F06	ND	5594.96±658.74	6297.21±312.43	6771.15±403.97
Exp.	clone	OCV-501+5	OCV-501+9	WT1-35	
120410	#106 3D02	10749.32±3839.2	7544.47±2250.98	NT	
	#77 3B08	3.03±0	36.88±49.26		
	#107 1E02	16233.51±29.21	16614.37±361.26		
	#140 1D04	12691.97±753.57	13718.67±644.33		
120416	#107 1E04	10369.6±220.14	9238.24±548.58	15.46±16.62	
	#77 3B08	0.54±0	3.02±4.08	30.84±0	
	#77 3F05	ND	ND	ND	
	#140 1H05	9153.63±562.07	7342.38±830.53	ND	
120417	#106 1H11	2630.98±604.56	2341.75±563.77	ND	
	#113 1F04	ND	ND	ND	
	#140 3F06	3108.16±146.85	2753.77±397.19	ND	

Unit: pg/mL. NT: Not tested due to insufficient cell number. ND: Under detection limit.

Fig. 1 IFN- γ production after 24 hours of stimulation determined by ELISA



As shown in Table 6 and Fig. 1, AcOH and WT-1 35 did not induce IFN- γ production in all clones.

In 4 clones #107_1E02, #140_1D04 (Exp.120410), #140_1H05 (Exp.120416), #106_1H11 (Exp.120417), OCV-501 and all the peptides containing the sequence of OCV-501 induced similar IFN- γ production.

Similar to the result of ICS, only in clone #140_3F06 (Exp.120417), the C-terminus-added peptides induced lower IFN- γ production compared to OCV-

501 and the N-terminus-added peptides. Also, in clone #106_3D02 (Exp.120410), the C-terminus-added peptides showed slightly lower IFN- γ production compared to OCV-501, and in clone #107_1E04 (Exp.120416), both the N-terminus-added and the C-terminus-added peptides showed higher IFN- γ production compared to OCV-501. Although the mol concentrations of the peptides in the test were not identical to each other, the difference of mol concentration was within twofold in view of MW. The increase and decrease of the activity exceed the difference and thus considered to be a result of change of peptide stability due to amino acid addition.

In three clones #77_3B08, #77_3F05 and #113_1F04, IFN- γ production was not observed with any of the peptides, and non peptide-specific induction was not observed.

Conclusion

The foregoing results demonstrate that the longer peptide (up to 25 amino acids) containing the sequence of OCV-501 can similarly induce IFN- γ production in OCV-501-specific Th1 clone. Additionally, in some clones the activity may be varied by addition of amino acids.

24

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0097961	
				Bogotá D.C., Septiembre 25 de 2012 - 11:18:53	
RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS				NI 860.041.367	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	96241	18/09/2012		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	96242	18/09/2012		5.000.00
RECIBO DE CA	999999999	96245	18/09/2012		20.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO		Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES		30.000.00	30.000.00	
				\$30.000.00	
=====					
SON: **TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 09-103858- -00003-0000					
Fecha: 2012-09-25 16:36:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 523 RESPUESTA Folios: 24					
COLO: 17075- 841-002-2.					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Septiembre 25 de 2012 - 11:18:54					