

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ METODO PARA ACTIVACION DE CELULA T AUXILIAR Y
COMPOSICION EN EL METODO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.

DOMICILIO _____ OSAKA, JAPON

74. APODERADO _____ LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____



No. 09-103858- -00007-0000
Fecha: 2013-07-11 16:26:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 55

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5



No. 13-165216- -00000-0000
Fecha: 2013-07-11 16:26:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

DIRECCIÓN DE NUEV
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y F

1. Identificación del Trámite

- ☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión
- ☒ Patente de Invención
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Registro de Diseño Industrial
- ☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona 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, Japón	Osaka
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 Documento de identificación Tarjeta profesional
De Páez Luz Clemencia C.C. 35.456.344 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

CONVERSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

DIVISION

Expediente : 09.103.858
De: _____
A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

5. Comprobante de Pago No 13-0068325 Fecha : 2013/07/10

6. Anexos

☒

 Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$450.000.

☒

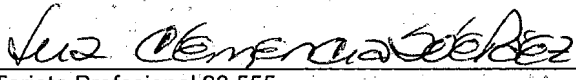
 Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación

☒

 Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud

☐

 Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7: Firma	
Nombre y apellidos	Firma
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 09.103.858 . La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio de la resolución No. 32225 notificado por fijación en lista del 23 de mayo de 2013. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 23 de septiembre de 2009 y la prioridad que allí se reivindica el 27 de febrero de 2007.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 09.103.858

METODO PARA ACTIVACION DE CELULA T AUXILIAR Y COMPOSICION

PARA USARSE EN EL METODO

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la activación de una célula T auxiliar, que comprende añadir un péptido WT1 y una célula presentadora de antígeno, y de esta manera activar la célula T auxiliar, en donde el péptido WT1 tiene una capacidad para cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501 y una composición para el mismo, una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de cáncer mediante la activación de una célula T auxiliar y similar.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El gen WT1 (gen de tumor de Wilms 1) se identificó como un gen responsable para tumor de Wilms que es un cáncer renal en niños (documentos que no son patente 1 y 2). WT1 es un factor de transcripción que tiene un estructura de dedo de zinc. Al principio, el gen WT1 se consideró como un gen supresor de tumor. Sin embargo, estudios posteriores, (documentos que no son patentes 3, 4, 5 y 6) mostraron que el gen WT1 más bien funciona como un

20

oncogén en tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos.

Se mostró que un linfocito T específico de péptido WT1 (CTL) puede ser inducido por estimulación *in vitro* de una célula mononuclear de sangre periférica con un péptido WT1, y dicho CTL daña una célula cancerosa tal como una célula de tumor hematopoyética y célula cancerosa sólida que endógenamente expresa WT1. El CTL reconoce el péptido WT1 como la forma del complejo en el cual el péptido WT1 se une a una molécula de clase I de MHC. Por lo tanto, dicho péptido WT1 es diferente dependiendo de los subtipos de clase I de MHC (Documento de patente 1, documento que no es patente 7, y documento de patente 2, 3 y 4).

La existencia de una célula T auxiliar específica para un antígeno de cáncer es importante para inducir un CTL de manera efectiva (documento que no es patente 8). La célula T auxiliar es inducida y activada por el reconocimiento de un complejo de una molécula de clase II de MHC y un péptido de antígeno en una célula presentadora de antígeno. La célula T auxiliar activada produce una citosina tal como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 o interferón para ayudar al crecimiento, diferenciación o maduración de una célula B. La célula T auxiliar activada también tiene una función para facilitar el crecimiento, diferenciación o maduración de otros subconjuntos de células T (por ejemplo, célula Tc y TD). Por lo tanto, la célula T auxiliar activada tiene una función para activar un sistema inmune al facilitar el crecimiento o activación de una célula B o célula T. Por lo tanto, el mejoramiento de una función de una célula T auxiliar a través de un péptido de antígeno de

unión a clase II de MHC (un péptido auxiliar) en una inmunoterapia de cáncer para incrementar el efecto de una vacuna contra el cáncer se considera que es útil (documento que no es patente 9). Sólo un péptido que se une a una molécula de HLA-DRB1*0401 (documento que no es patente 10), un péptido que se une a una molécula de HLA-DRB1*0405 y un péptido que se une a una molécula HLA-DRB1*1502 (documento de patente 5) se encontraron como péptido auxiliar de WT1 hasta la fecha. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar péptidos que se unan cada uno a una molécula de HLA-DRB1*1501, HLA-DPB1*0901 o HLA-DPB1*0501.

Además, se mostró que entre los péptidos auxiliares hay un péptido auxiliar promiscuo que puede unirse a múltiples moléculas de clase II de MHC e induce células T auxiliares (documentos que no son patente 11 y 12). Sin embargo, es muy difícil identificar un péptido auxiliar promiscuo que se una a tres o más tipos y a moléculas de clase II de MHC y ejerza un efecto suficiente.

Documento de patente 1: WO 2003/106682

Documento de patente 2: WO 2005/095598

Documento de patente 3: WO 2007/097358

Documento de patente 4: Solicitud de patente internacional No. PCT/JP2007/074146

Documento de patente 5: WO 2005/045027

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

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

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

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

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

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

Documento que no es patente 7: Oka Y et al., Immunogenetics. 2000 Feb;51(2):99-107.

Documento que no es patente 8: Gao FG et al., Cancer Res. 2002 Nov 15;62(22):6438-41.

15 Documento que no es patente 9: Zeng G, J Immunother. 2001 May; 24(3):195-204

Documento que no es patente 10: Knights AJ et al., Cancer Immunol Immunother. 2002 Jul;51(5):271-81.

20 Documento que no es patente 11: Sotiriadou R et al., Br J Cancer. 2001 Nov 16;85(10):1527-34.

Documento que no es patente 12: Hural JA et al., J Immunol. 2002 Jul 1;169(1):557-65.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

Problemas que han de ser resueltos por la invención

5 El problema que ha de ser resuelto por la presente invención es proveer un método para la activación de una célula auxiliar T con un péptido WT1 que tiene la capacidad para unirse a una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 o una molécula de HLA-DPB1*0501 y una composición para el mismo, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y/o
10 prevención de un cáncer al activar una célula T auxiliar y similar.

Medios para resolver los problemas

Como un resultado de estudios intensivos en vista de la situación como se describió antes, el inventor de la presente ha encontrado que entre los
15 péptidos WT1 que se unen a una molécula de HLA-DRB1*0405 y una molécula de HLA-DRB1*1502, un péptido WT1 que tiene una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His también se une a una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501. Por lo tanto, la presente invención ha sido
20 completada.

La presente invención provee:

(1) Un método para la activación de una célula T auxiliar, que

comprende añadir un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y de esta manera activar la célula T auxiliar, en donde el péptido WT1 tiene una capacidad para unirse a cualquiera de una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DPB1*0901 y una molécula HLA-DPB1*0501;

5 (2) el método de conformidad con (1), en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a por lo menos dos de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501;

10 (3) el método de conformidad con (1) o (2), en donde el péptido WT1 además tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*0405 y/o una molécula de HLA-DRB1*1502;

(4) el método de conformidad con cualquiera de (1)-(3), en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901, una molécula de HLA-DPB1*0501, una molécula de HLA-DRB1*0405 y una molécula de HLA-DRB1*1502;

15 (5) el método de conformidad con cualquiera de (1)-(4), en donde el péptido WT1 es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID No: 2);

20 (6) el método de conformidad con cualquiera de (1)-(5), en donde la adición del péptido WT1 a la célula presentadora de antígeno se pone en práctica mediante la adición de un 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;

(7) una composición para activar una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende el péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501;

(8) un método para el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto que comprende añadir un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y de esta manera activar una célula T auxiliar, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501;

(9) una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de cáncer al activar una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende el péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501;

(10) un anticuerpo que se une específicamente a un péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501;

(11) un método para la determinación de la presencia o cantidad de un péptido WT1 en cualquiera de un 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;

(12) un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende añadir un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y de esta manera activar una célula T auxiliar, y administrar la célula T auxiliar activada a un sujeto, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 o una molécula de HLA-DPB1*0501;

(13) una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende una célula T auxiliar activada con un péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501;

(14) un método para la determinación de la presencia o cantidad de una célula T auxiliar específica de WT1 en cualquiera de un 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; y

(15) un método para la determinación de la presencia o cantidad de una célula T auxiliar específica de WT1 en un 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 citosina o la reacción de la célula T auxiliar indica la presencia o cantidad de la célula T auxiliar específica de WT1.

Efectos de la invención

La invención provee un método para la activación de una célula T auxiliar con un péptido WT1 que se une a una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901, una molécula de HLA-DPB1*0501, una molécula de HLA-DRB1*0405, y una molécula de HLA-DRB1*1502 y una composición para el

mismo, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer al activar una célula T auxiliar y similar. Por lo tanto, es posible activar *in vivo* e *in vitro* una célula T auxiliar en el sujeto que tiene cualquiera de dichas moléculas de clase II de MHC, tratar y prevenir un cáncer y similar. Puesto que aproximadamente 90% de los japoneses son cubiertos por los cinco tipos de subclases de la clase II de MHC, las células T auxiliares pueden ser activadas para tratar y/o prevenir un cáncer en una gama muy amplia de sujetos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

10

La figura 1 es una gráfica que representa la cantidad de IFN- γ producido por célula TA28.1. En la figura, un eje longitudinal representa la concentración de IFN- γ (pg/ml). Las gráficas corresponden al "caso de cultivar células mononucleares de sangre periférica de un sujeto HLA-DRB1*1501-positivo en ausencia del péptido WT1 ", "el caso de cultivar células TA28.1 en presencia del péptido WT1 (negro)", "el caso de cultivar células mononucleares de sangre periférica de un sujeto HLA-DRB1*1501-negativo en ausencia del péptido WT1 ", "caso de cultivar células mononucleares de sangre periférica de un sujeto HLA-DRB1*1501-negativo en presencia de un péptido WT1 " empezando desde la izquierda, respectivamente.

20

La figura 2 es una gráfica que representa las cantidades de IFN- γ , IL-4 y IL-10 producidas por célula TA28.1. En la figura, un eje longitudinal representa

la concentración (pg/ml). Las gráficas corresponden a los valores de IFN- γ , IL-4 y IL-10 empezando desde la izquierda.

La figura 3 es una gráfica que representa las cantidades de IFN- γ , IL-4 y IL-10 producidas por la célula E15.2. En la figura, un eje longitudinal representa la concentración (pg/ml). Las gráficas corresponden a los valores de IFN- γ , IL-4 y IL-10 empezando desde la izquierda.

La figura 4 representa las producciones de IFN- γ y IL-17 por células mononucleares HLA-DPB1*0501/*0501-positivas. En la figura, un eje horizontal representa IFN- γ , y un eje longitudinal representa IL-17. La figura 4a representa las células sin estimular con el péptido WT1, y la figura 4b representa las células estimuladas con el péptido WT1.

La figura 5 es una gráfica que representa el crecimiento de células TA28.1. En la figura, un eje longitudinal representa cpm ($\times 10^4$). Las gráficas corresponden al "caso de co-cultivar células TA28.1 con células mononucleares de sangre periférica sin pulsar con un péptido WT1 ", "caso de co-cultivar células TA28.1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 (negro)", "caso de cultivar células TA28.1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo de clase I anti-MHC ", "caso de co-cultivar células TA28.1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DR (sombreado)", "caso de co-cultivar células TA28.1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 en presencia

de un anticuerpo anti-HLA-DQ ", "caso de co-cultivar células TA28.1 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DP " empezando desde la izquierda, respectivamente.

La figura 6 es una gráfica que representa el crecimiento de células E15.2. En la figura, un eje longitudinal representa cpm ($\times 10^4$). Las gráficas corresponden a "el caso de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica de un sujeto HLA-DPB1*0901-positivo sin pulsar con un péptido WT1", "el caso de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica de un sujeto HLA-DPB1*0901-positivo pulsadas con un péptido WT1 (negro)", "los casos de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica de un sujeto HLA-DPB1*0901-negativo sin pulsar con un péptido WT1", "el caso de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica de un sujeto HLA-DPB1*0901-negativo pulsadas con un péptido WT1" empezando desde la izquierda, respectivamente.

La figura 7 es una gráfica que representa el crecimiento de células E15.2. En la figura, un eje longitudinal representa cpm. Las gráficas corresponden a "el caso de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica sin pulsar con un péptido WT1", "el caso de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 (negro)", "el caso de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo de clase I anti-MHC", "el caso de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares

de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DR", "el caso de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DQ", y "el caso de co-cultivar células E15.2 con células mononucleares de sangre periférica pulsadas con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DP (sombreado)" empezando desde la izquierda, respectivamente.

La figura 8 es una gráfica que representa el crecimiento de células mononucleares HLA-DPB1*0501/*0501-positivas. En la figura, un eje longitudinal representa cpm. Las gráficas corresponden a "el caso sin estimulación con un péptido WT1" y "el caso con estimulación con un péptido WT1" empezando desde la izquierda, respectivamente.

La figura 9 representa que el crecimiento de células mononucleares HLA-DPB1*0501/*0501-positivas es suprimido por anticuerpos anti-HLA-DP. En la figura, un eje longitudinal representa cpm. Las gráficas corresponden a "el caso sin estimulación con un péptido WT1", "el caso con estimulación con un péptido de control de VIH", "el caso con estimulación con un péptido WT1", "el caso con estimulación con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DR", "el caso con estimulación con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DQ" y "el caso con estimulación con un péptido WT1 en presencia de un anticuerpo anti-HLA-DP" empezando desde la izquierda, respectivamente.

La figura 10 es una gráfica que representa el crecimiento de célula E15.2 en los casos de usar varias concentraciones de un péptido WT1. En la

figura, un eje longitudinal representa cpm ($\times 10^4$), y un eje horizontal representa la concentración del péptido WT1.

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

5

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para la activación de una célula T auxiliar, que comprende añadir un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y de esta manera activar la célula T auxiliar, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501. En la presente invención, el péptido WT1 se refiere a un péptido que consiste de una parte de la secuencia de aminoácidos de proteína WT1 humana mostrada en SEQ ID No: 1, un péptido que tiene una sustitución, modificación o deleción de uno a varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, y tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501, o un péptido en el cual varias sustancias tales como un aminoácido, un péptido o un análogo de las mismas puede ser unido en el N-terminal y/o el C-terminal del péptido. La sustancia puede ser procesada, por ejemplo, por una enzima en un cuerpo vivo o a través de un proceso tal como proceso intracelular, y finalmente el péptido WT1 se convierte en la forma que puede unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-

10

15

20

DPB1*0501. La sustancia puede ser una sustancia que modula la solubilidad del péptido WT1 de la presente invención, o incrementa su estabilidad (resistencia a proteasa, etc.). Alternativamente, puede ser una sustancia que suministra el péptido WT1 de la presente invención específicamente, por ejemplo, a un tejido u
5 órgano dado, o incrementa la eficiencia de absorción por una célula presentadora de antígeno o similar. Alternativamente, puede ser un péptido WT1 que se restrinja al mismo tipo de una molécula de clase I de MHC como el de un sujeto del cual se deriva una célula presentadora de antígeno.

El péptido WT1 de la presente invención tiene la capacidad para
10 unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501. Por lo tanto, el péptido WT1 puede ser un péptido que tiene la capacidad para unirse a por lo menos dos de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501, o un péptido que tiene la capacidad para unirse a
15 una molécula de HLA-DRB1*1501 y/o una molécula de HLA-DPB1*0901 y/o una molécula de HLA-DPB1*0501, y una molécula de clase II de HLA distinta de las moléculas, por ejemplo, un péptido que tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DRB1*0405 y/o una molécula de HLA-DRB1*1502, un péptido que tiene la capacidad para unirse a una molécula
20 de HLA-DPB1*0901, una molécula de HLA-DRB1*0405 y/o una molécula de HLA-DRB1*1502, un péptido que tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DPB1*0501, una molécula de HLA-DRB1*0405 y/o una molécula de HLA-

DRB1*1502, o un péptido que tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901, una molécula de HLA-DPB1*0501, una molécula de HLA-DRB1*0405 y/o una molécula de HLA-DRB1*1502. Debido a que un péptido WT1 que tiene una secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID No: 2) tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901, una molécula de HLA-DPB1*0501, una molécula de HLA-DRB1*0405 y una molécula de HLA-DRB1*1502, el péptido WT1 que tiene dicha secuencia de aminoácidos es preferible. En general, un péptido de unión a clase II de MHC consiste de 10-25 aminoácidos. Por lo tanto, el péptido WT1 preferiblemente tiene una secuencia de aminoácidos que consiste de 10-25 aminoácidos.

El péptido WT1 de la presente invención se puede sintetizar por métodos generalmente usados en la técnica o modificaciones de los mismos. Dichos 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, Maruzen Co., Ltd., 1985; y Iyaku hin No Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide-Gosei, Hirokawa - Book store, 1991.

El péptido WT1 de la presente invención también se puede preparar usando técnicas de ingeniería genética basadas en la información acerca de la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido WT1. Dichas técnicas de

ingeniería genética son bien conocidas por un experto en la técnica.

La célula presentadora de antígeno se refiere a una célula tal como una célula dendrítica que puede presentar el péptido WT1 junto con una molécula de clase II de MHC a una célula T auxiliar o similar. Por lo tanto, un sujeto del cual la célula presentadora de antígeno se deriva debe tener la misma subclase de clase II de MHC (por ejemplo, HLA-DRB1*1501, HLA-DPB1*0901, HLA-DPB1*0501, HLA-DRB1*0405 o HLA-DRB1*1502) como aquella a la cual se une el péptido WT1 añadido.

En general, una célula T auxiliar es activada por el reconocimiento de un péptido de antígeno a través de una molécula de clase II de MHC sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno por complejo TCR-CD3 sobre la superficie de la célula T, y la estimulación de una integrina sobre la superficie de la célula T por un ligando de integrina sobre la superficie de la célula presentadora de antígeno. En la presente invención, la activación de la célula T auxiliar abarca no sólo la activación de la célula T auxiliar sino también la inducción y crecimiento de la célula T auxiliar. Como se describió antes, la célula T auxiliar activada tiene una función para activar un sistema inmunológico al incrementar la inducción, crecimiento o activación de una célula B o célula T. Por lo tanto, el método para la activación de una célula T auxiliar de la presente invención se puede usar como una terapia con adyuvante en el tratamiento de un cáncer o similar. Alternativamente, la célula T auxiliar activada *in vitro* usando el método de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir un cáncer o similar, o se

puede usar como una terapia con adyuvante en el mismo. La activación de la célula T auxiliar se puede determinar midiendo la cantidad de la producción o secreción de una citocina tal como un interferón y una interleucina, y similares.

La adición del péptido WT1 a las células presentadoras de antígeno puede ponerse en práctica directamente mediante a adición del péptido WT1, o indirectamente mediante la adición de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o la adición de una célula que comprende el vector de expresión. El vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el péptido WT1, y la célula que comprende el vector de expresión pueden ser producidos por el método bien conocidos por un experto en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición para activar una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende el péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501. Cuando la composición de la presente invención se administra a un sujeto HLA-DRB1*1501, HLA-DPB1*0901 o HLA-DPB1*0501-positivo, un sistema inmunológico en el sujeto es activado por la activación de la célula T auxiliar en el sujeto. El gen WT1 se expresa a niveles altos en varios cánceres y tumores incluyendo 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 la piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovario. Por lo tanto, la composición de la presente invención se puede usar como una terapia con adyuvante en el tratamiento o prevención de un cáncer. Alternativamente, la célula T auxiliar activada usando la composición de la presente invención se puede usar, por ejemplo, como un adyuvante en el tratamiento de un cáncer.

Como se describió antes, el péptido WT1 de la presente invención puede ser un péptido que tiene la capacidad para unirse a por lo menos dos de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501, o un péptido que tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*1501 y/o una molécula de HLA-DPB1*0901 y/o una molécula de HLA-DPB1*0501, y una molécula de clase II de MHC distinta de las mismas. Por lo tanto, siempre que las células presentadoras de antígeno se deriven de un sujeto positivo para una subclase de clase II de MHC a la cual el péptido WT1 de la presente invención se puede unir, se puede producir el efecto de activar la célula T auxiliar de la composición de la presente invención.

La composición de la presente invención puede comprender además del péptido WT1, por ejemplo, un vehículo, un excipiente, un aditivo o similar. Debido a que el péptido WT1 comprendido en la composición de la presente invención activa el péptido auxiliar específicamente al péptido WT1, la composición puede comprender un péptido WT1 restringido por clase I de MHC, o

se puede usar con el péptido.

El método para usar la composición de la presente invención se puede seleccionar apropiadamente dependiendo de las condiciones tales como la activación deseada de la célula T auxiliar, el estado de la célula presentadora de antígeno. Ejemplos de dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral, y la adición a un medio de cultivo de la célula presentadora de antígeno. La cantidad del péptido WT1 comprendida en la composición de la presente invención, así como la forma, el número de veces de uso y similares de la composición de la presente invención se pueden seleccionar apropiadamente dependiendo de condiciones tales como la activación deseada de la célula T auxiliar, el estado de la célula presentadora de antígeno.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición para activar una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o una célula que comprende el vector de expresión, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501. El vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el péptido WT1 y la célula que comprende el vector de expresión se descrito anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un péptido WT1, o una célula que comprende el vector de expresión para la fabricación de la composición.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un equipo para activar una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende el péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-
10 DPB1*0501. Preferiblemente, el equipo se usa en el método para la activación de una célula T auxiliar. El equipo de la presente invención puede comprender además del péptido WT1, por ejemplo, un medio de obtener una célula presentadora de antígeno, un medio para determinar la actividad de una célula T auxiliar o similar. En general, una instrucción manual se anexa al equipo. Al usar el
15 equipo de la presente invención, las células T auxiliares pueden ser inducidas de manera eficiente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un equipo para activar una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende un vector de expresión que comprende
20 un polinucleótido que codifica un péptido WT1, o una célula que comprende el vector de expresión, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-

DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto, que comprende añadir un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y de esta manera activar una célula T auxiliar, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501. El método de la presente invención es un método en el cual un sistema inmunológico en el sujeto es activado por la activación de una célula T auxiliar, y un cáncer en el sujeto es tratado o prevenido. La adición del péptido WT1 a las células presentadoras de antígeno puede ser puesta en práctica directamente mediante la adición del péptido WT1, o indirectamente mediante la adición de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o la adición de una célula que comprende el vector de expresión.

Como se describió antes, la célula T auxiliar reconoce el complejo de cualquiera de las moléculas de clase II de MHC, particularmente una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 o una molécula de HLA-DPB1*0501 y el péptido WT1. Por lo tanto, el sujeto es un sujeto que tiene una molécula de clase II de MHC a la cual el péptido WT1 se une, por ejemplo, sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo o HLA-DPB1*0501-positivo. Como se describió antes, el péptido WT1 de la presente invención puede ser un péptido que tiene la capacidad para unirse a por lo menos dos de una molécula de

HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501, o un péptido que tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*1501 y/o una molécula de HLA-DPB1*0901 y/o una molécula de HLA-DPB1*0501, y una molécula de clase II de MHC distinta de las mismas. Por lo tanto, en tal caso, es posible tratar o prevenir un cáncer en un sujeto positivo para una subclase de clase II de MHC a la cual el péptido WT1 de la presente invención se puede unir. El cáncer que se ha de tratar o prevenir puede ser cualquiera, y ejemplos del mismo 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 la piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovario. Además, el método de la presente invención se puede usar con un método para el tratamiento o prevención de un cáncer con un péptido WT1 restringido por molécula de clase I de MHC o una composición farmacéutica para el mismo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto al activar una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende el péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501. El gen WT1 se expresa a altos niveles en varios cánceres y tumores

incluyendo 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 la piel, cáncer de vejiga, 5 cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical o cáncer de ovario. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para el tratamiento o prevención de un cáncer.

Como se describió antes, el péptido WT1 de la presente invención puede ser un péptido que tiene la capacidad para unirse a por lo menos dos de 10 una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501, o un péptido que tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*1501 y/o una molécula de HLA-DPB1*0901 y/o una molécula de HLA-DPB1*0501, y una molécula de clase II de MHC distinta de las mismas. Por lo tanto, siempre que la célula presentadora de antígeno se derive de 15 un sujeto positivo para una subclase de la clase II de MHC a la cual el péptido WT1 de la presente invención se puede unir, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para tratar o prevenir un cáncer.

Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra a, por ejemplo, un sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901- 20 positivo o HLA-DPB1*0501-positivo, un sistema inmunológico en un sujeto puede ser activado por la activación de la célula T auxiliar por el péptido WT1 comprendido en la composición farmacéutica, tratando o previniendo así un

cáncer. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se puede usar junto con el método para el tratamiento o prevención de un cáncer o la composición farmacéutica para el mismo.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además del péptido WT1 como un ingrediente activo, por ejemplo, un vehículo, un excipiente o similar. El péptido WT1 comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención se une a una molécula de clase II de MHC sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno y activa una célula T auxiliar. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención además puede comprender un activador, factor de crecimiento, inductor o similar de la célula T auxiliar, o puede comprender un péptido WT1 restringido por clase I de MHC.

El método para administrar la composición farmacéutica de la presente invención se pueden seleccionar apropiadamente dependiendo de condiciones tales como el tipo de enfermedad, la condición del sujeto o sitio objetivo. Ejemplos de dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral. La cantidad del péptido comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención, así como la forma de dosis, el número de veces de la administración y similares de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden seleccionar apropiadamente dependiendo de condiciones

tales como el tipo de enfermedad, la condición del sujeto o el sitio objetivo. La dosis individual del péptido es usualmente, 0.0001 mg - 1000 mg, preferiblemente, 0.001 mg - 1000 mg.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una
5 composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer en un sujeto al activar una célula T auxiliar mediante la adición de un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1, o una célula que comprende el vector de expresión, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad
10 para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un péptido WT1, un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1, o una célula que comprende el vector de expresión para
15 la fabricación de la composición farmacéutica.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a un péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501. El anticuerpo
20 de la presente invención se puede preparar por el medio o método conocido por el experto en la técnica. El anticuerpo de la presente invención se puede usar para el diagnóstico de varios cánceres, pronóstico de los mismos o similar.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la determinación de la presencia o cantidad de un péptido WT1 en un sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo o HLA-DPB1*0501-positivo, que comprende:

5 (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. Por ejemplo, es posible diagnosticar un cáncer, pronosticar el mismo o similar al incubar el anticuerpo anti-WT1 con una muestra de un sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo o HLA-DPB1*0501-positivo, o administrar el anticuerpo anti-WT1 a un sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo o HLA-DPB1*0501-positivo, y determinar, por ejemplo, la posición, sitio o cantidad del mismo. El anticuerpo anti-WT1 de la presente invención se refiere a un anticuerpo que específicamente puede reconocer el péptido WT1 de la presente invención. El anticuerpo anti-WT1 puede ser un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal. El anticuerpo anti-WT1 puede ser marcado. Un marcador conocido tal como un marcador fluorescente o un marcador radioactivo se puede usar como un marcador. Al marcarlo, la presencia o cantidad del péptido WT1 se puede determinar fácilmente y rápidamente.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un equipo para la determinación de la presencia o cantidad de un péptido WT1 que comprende el

anticuerpo anti-WT1 como un componente esencial.

Además, en la determinación de la presencia o cantidad del péptido WT1, cuando el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*0405 y/o una molécula de HLA-DRB1*1502, es posible determinar la presencia o cantidad del péptido WT1 en un sujeto con dicha subclase de la clase II de MHC.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende una célula T auxiliar activada con un péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501. El cáncer es tratado o prevenido por la inducción, crecimiento o activación de una célula B o célula T por la célula T auxiliar activada. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención en este aspecto se puede usar junto con otro método para el tratamiento o prevención de un cáncer o composición farmacéutica para el mismo. La activación de la célula T auxiliar con el péptido WT1 abarca no sólo la activación directa con el péptido WT1 sino también la activación indirecta con un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o una célula que comprende el vector de expresión.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender, además de la célula T auxiliar activada como un ingrediente activo, por ejemplo, un vehículo, un excipiente o similar. El método para administrar 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. Ejemplos de dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración nasal y administración oral. La cantidad de la célula T auxiliar comprendida en la composición farmacéutica de la presente invención, así como la forma de dosis, el número de veces de la administración y similares de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden seleccionar apropiadamente dependiendo de una condición tal como el tipo de enfermedad, la condición del sujeto o el sitio objetivo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de un cáncer, que comprende añadir un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno, y de esta manera activar una célula T auxiliar, y administrar la célula T auxiliar activada a un sujeto, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a cualquiera de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido WT1 para la fabricación de la composición farmacéutica que comprende una célula T auxiliar activada.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método

para determinar la presencia o cantidad de una célula T auxiliar específica de WT1 en cualquiera de un 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. La muestra del sujeto puede ser cualquiera siempre que haya una posibilidad de que contenga un linfocito.

Ejemplos de las muestras incluyen fluidos corporales tales como sangre o linfa y un tejido. El 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 se puede preparar, por ejemplo, como un tetrámero o pentámero usando un método conocido por un experto en la técnica tal como el método de biotina-estreptavidina.

La presencia o cantidad de la célula T auxiliar que reconoce dicho complejo se puede medir mediante un método conocido por un experto en la técnica. En este aspecto de la presente invención, el complejo puede ser marcado. Un marcador conocido tal como un marcador fluorescente o un marcador radioactivo se puede usar como un marcador. Al marcarlo, la presencia o cantidad de la célula T auxiliar se puede determinar fácilmente y rápidamente. El método de la presente invención en este aspecto se puede usar para diagnosticar un cáncer, pronosticar el mismo o similar.

Por lo tanto, la presente invención también provee una composición para la determinación de la presencia o cantidad de una célula T auxiliar en cualquiera de un sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo y HLA-DPB1*0501-positivo, que comprende un complejo de un péptido WT1 y una
5 molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 o una molécula de HLA-DPB1*0501.

Además, la presente invención provee un equipo para la determinación de la presencia o cantidad de una célula T auxiliar en un sujeto HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo o HLA-DPB1*0501-positivo,
10 que comprende 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.

Además, en la determinación de la presencia o cantidad de la célula T auxiliar, cuando el péptido WT1 tiene la capacidad para unirse a una molécula
15 de HLA-DRB1*0405 y/o una molécula de HLA-DRB1*1502 en la determinación de la presencia o cantidad de la célula T auxiliar, es posible determinar la presencia o cantidad de la célula T auxiliar en un sujeto con dicha subclase de la clase II de MHC. En tal caso, se usa un complejo de un péptido WT1 y una molécula de clase II de MHC a la cual se une el péptido WT1.

20 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para obtener una célula T auxiliar usando 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, que comprende:

(a) hacer reaccionar una muestra con el complejo; y

(b) obtener una célula T auxiliar que reconoce el complejo contenido

en la muestra. El complejo se describió anteriormente. La muestra puede ser

5 cualquiera siempre que haya una posibilidad de que contenga un linfocito.

Ejemplos de las muestras incluyen una muestra de un sujeto tal como sangre y un

cultivo de células. La célula T auxiliar que reconoce el complejo se puede obtener

usando un método conocido por un experto en la técnica tal como FACS o MACS.

La presente invención permite cultivar la célula T auxiliar obtenida y usarla para el

10 tratamiento o prevención de varios cánceres.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una célula T

auxiliar que es obtenible por un método para obtener una célula T auxiliar usando

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.

15 Además, la presente invención se refiere a un equipo para obtener

una célula T auxiliar, que comprende 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.

Además, al obtener la célula T auxiliar, cuando el péptido WT1 tiene

20 la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*0405 y/o una molécula de

HLA-DRB1*1502, es posible obtener una célula T auxiliar que reconoce un

complejo de dicha subclase de la clase II de MHC y un péptido WT1. En tal caso,

se usa el complejo del péptido WT1 y una molécula de clase II de MHC a la cual se une.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para la determinación de la presencia o cantidad de una célula T auxiliar específica de WT1 en un 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. Las células tales como la 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 usadas en el método de la presente invención puede ser derivada de un sujeto sano o un paciente con cáncer. Al usar las células de un sujeto sano, es posible determinar si el sujeto padece o no un cáncer, si el sujeto tiene o no predisposición al mismo o similar. Al usar las células de un

paciente con cáncer, es posible predecir si la WT1-inmunoterapia tiene o no un efecto sobre el paciente con cáncer o similar. La estimulación de las células con el péptido WT1 puede ser puesta en práctica *in vitro* o *in vivo*. Debido a la facilidad, es preferible la estimulación *in vitro*. La presencia de la producción de la citocina o la reacción de la célula T auxiliar, o la cantidad de la producción de la citocina o la reacción de la célula T auxiliar se puede determinar por un método conocido.

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

EJEMPLOS

1. Preparación de célula presentadora de antígeno

Células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se separaron de sangre periférica que había sido recolectada de un donador sano (HLA-DRB1*1501-positivo, HLA-DPB1*0901-positivo o HLA-DPB1*0501-positivo). Las PBMCs se sembraron en una placa de plástico de 6 pozos a la densidad de 1×10^7 células/pozo en 1% de suero AB (Nabi, Miami, FL), medio X-VIVO 15 (Cambrex), y se cultivaron durante 2 horas. Después del cultivo, las células en suspensión se removieron y las células adherentes restantes se cultivaron en 1000 IU/ml IL-4 (PeproTech), 1000 IU/ml GM-CSF (PeproTech), 1% de suero AB y medio X-VIVO 15. El día 2 y el día 4, el medio se cambió, y se añadieron IL-4 y GM-CSF. El día 6, 100 IU/ml de FNT- α se añadió a una célula presentadora de

antígenos madura.

2. Inducción de célula T CD4-positiva específica de péptido WT1

Las células T CD4-positivas se separaron de sangre derivada del mismo donador usando RosetteSep para la separación de células T CD4-positivas (células madre). Las células T CD4-positivas (3×10^6 células) se añadieron a cada pozo de una placa de 24 pozos. Fueron estimuladas con células presentadora de antígenos autólogas (3×10^5 células) que habían sido pulsadas con 20 µg/ml de péptido WT1 (SEQ ID No: 2), e irradiadas con 25 Gy de radiación. El día siguiente después de la estimulación, se añadió 20 IU/ml de IL-2. Asimismo, las células T CD4-positivas estimuladas fueron estimuladas usando las células presentadoras de antígeno pulsadas con 20 µg/ml de péptido WT1 cada dos semanas. Además, el medio se cambió al medio que contenía IL-2 cada dos días después de la segunda estimulación. Las células T CD4-positivas inducidas por un total de tres veces de estimulación (células T HLA-DRB1*1501 y HLA-DPB1*0901-positivas se definieron como célula TA28.1 y célula E15.2, respectivamente) se usaron para los siguientes experimentos.

3. Medición de IFN- γ

Células TA28.1 y células mononucleares de sangre periférica de un sujeto del cual se derivaron las células TA28.1 se cultivaron en presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de péptido WT1 durante 24 horas. Después del cultivo, la cantidad de IFN- γ en el sobrenadante se cuantificó usando equipo de ELISA. Como un control, se usó una célula mononuclear de sangre periférica de un sujeto HLA-DRB1*1501-negativo. Los resultados se muestran en la figura 1. Se confirmó que la célula TA28.1 reconoce el péptido WT1 específicamente a una molécula de HLA-DRB1*1501 para incrementar la cantidad producida de IFN- γ (es decir, activación).

Además, se confirmó que la célula TA28.1 y la célula E15.2 no produce IL-4 y IL-10 usando equipo ELISA. Los resultados se muestran en las figuras 2 y 3. Se confirmó que la célula TA28.1 y célula E15.2 son células Th1.

Se usaron células mononucleares HLA-DPB1*0501/*0501-positivas para llevar a cabo los siguientes experimentos. Las células se suspendieron en X-VIVO (1% de suero AB), y se añadieron 20 $\mu\text{g/ml}$ de péptido WT1, 10 $\mu\text{g/ml}$ de Brefeldin A y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de CD28/49d. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 4 horas. Como un control, se usó una célula incubada sin la adición de un péptido WT1. Después de lavarse con regulador de pH, se añadieron un anticuerpo anti-CD3-perCP y un anticuerpo anti-CD4-APC, y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Después de lavarse con regulador de pH, las células se fijaron y se permeabilizaron usando BD Cytofix/Cytoperm (4°C, 20 minutos). Después de lavarse con regulador de pH BD Perm/Wash, se añadieron anti-INF- γ -FITC (BD,

clone: B27) y anti-IL-17-PE (eBioscience, clon: eBio64DEC17), y se incubaron a 4°C durante 30 minutos. Después de lavarse con regulador de pH, las células se analizaron con FACS Aria. Los resultados se muestran en la figura 4. Se confirmó que un crecimiento de células mononucleares HLA-DPB1*0501-positivas, y se produjo IFN- γ y IL-17.

4. Prueba de crecimiento

La prueba de crecimiento se realizó mediante el método de incorporación [^{3} H]-timidina. Células TA28.1 (3×10^4 células) y células mononucleares de sangre periférica (HLA-DRB1*1501-positivas; células 1×10^5) que habían sido pulsadas con el péptido WT1s e irradiadas se co-cultivaron en una placa de 96 pozos. Después de co-cultivarse durante 80 horas, se añadió 37kBq/pozol [^{3} H]-timidina (Amersham Biosciences). Se incubaron durante otras 16 horas, y se midieron usando un contador de β -escintilación. Las mediciones se representaron como conteo/minuto (cpm). Como un control, se usó una célula mononuclear de sangre periférica sin pulsar con un péptido. Además, a fin de confirmar que la señal de activación es específico para una molécula de HLA-DRB1*1501, se usaron un anticuerpo de clase I anti-MHC, anticuerpo anti-HLA-DR, anticuerpo anti-HLA-DQ y anticuerpo anti-HLA-DP. Los resultados se muestran en la figura 5. Se confirmó que las células TA28.1 fueron activadas por una señal a través del péptido WT1 y HLA-DRB1*1501, y crecieron. Además se confirmó que el crecimiento fue específico para HLA-DRB1*1501, porque fue

suprimido por el anticuerpo anti-HLA-DR.

Asimismo, las células E15.2 se usaron para realizar la prueba de crecimiento. Como un control adicional, se usaron células mononucleares de sangre periférica de un sujeto HLA-DPB1*0901-negativo. Los resultados se muestran en las figuras 6 y 7. Se confirmó que las células E15.2 fueron activadas por una señal a través del péptido WT1 y HLA-DPB1*0901, y crecieron. Además se confirmó que el crecimiento es específico para HLA-DPB1*0901, porque es suprimido por el anticuerpo anti-HLA-DP.

Además, se usaron células mononucleares HLA-DPB1*0501/*0501-positivas para realizar la prueba de crecimiento. Como un control, también se usó una célula mononuclear de sangre periférica de un sujeto HLA-DPB1*0501-negativo. Los resultados se muestran en las figuras 8 y 9. Se confirmó que células mononucleares HLA-DPB1*0501/*0501-positivas fueron activadas por una señal a través del péptido WT1 y HLA-DPB1*0501, y crecieron. Además se confirmó que el crecimiento es específico para HLA-DPB1*0501, porque es suprimido por el anticuerpo anti-HLA-DP.

Además, se realizó la prueba de crecimiento de las células E15.2 con varias concentraciones del péptido WT1. La concentración del péptido WT1 usado fue 0.08, 0.4, 2, 10, 50, 100 o 150 µg/ml. Los resultados se muestran en la figura 10. Se confirmó que los péptidos WT1 hacen crecer las células E15.2 de una manera dependiente de la concentración.

Aplicabilidad industrial

La presente invención provee un método para la activación de una célula T auxiliar con un péptido WT1 que tiene la capacidad para unirse a una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 o una molécula de HLA-DPB1*0501 y una composición para el mismo, así como una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de un cáncer al activar una célula T auxiliar y similares. Por lo tanto, la presente invención se puede usar en los campos de medicina y similares, por ejemplo, en los campos de desarrollo y preparación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de varios tumores hematopoyéticos y cánceres sólidos que expresan gen WT1 a niveles elevados.

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

5 1.- 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

10 (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

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

20 2.- El método *in vitro* de acuerdo con 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 más aminoácidos.

3.- 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

4.- El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 3 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.

5.- 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

6.- Un método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 5 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 más aminoácidos.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describe: un método para activar una célula T auxiliar, que comprende el paso de añadir un péptido WT1 a una célula presentadora de antígeno para activar la célula T auxiliar, en donde el péptido WT1 es capaz de unirse a cualquiera seleccionada de una molécula de HLA-DRB1*1501, una molécula de HLA-DPB1*0901 y una molécula de HLA-DPB1*0501; una composición para usarse en el método; un método terapéutico y/o profiláctico para cáncer al activar una célula T auxiliar; una composición farmacéutica para usarse en el método terapéutico y/o profiláctico; y otros.

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

179

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

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

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

International Institute of Cancer Immunology, Inc.

domiciliado (s) en/of 13-9, Enoki-cho, Suita-shi.

Osaka 564-0053 JAPAN

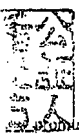
17075
59

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

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

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 Attorney, compromise, conciliate, admit

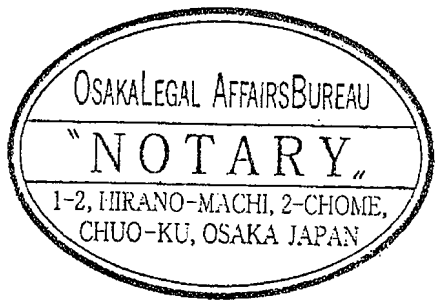


...puedan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan
sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso,
desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes
oficiosos.

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

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

Taiji Takahashi
Firma Signature





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

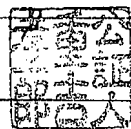
重吉大

重吉大

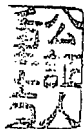
2737



登簿平成21年第334号
嘱託人 株式会社 癌免疫研究所
代表取締役 高橋泰治は、代理人稲本暢子を通じ当公証人の面前で、別紙編綴の証書にある上記嘱託人の署名は同嘱託人がしたものであることを自認する旨陳述した。_____
上記の会社は日本国大阪府吹田市江の木町13番9号第6マイダビル305に所在し日本の法律に基づいて設立された会社であり高橋泰治は同会社の代表取締役である。_____
よってこれを認証する。_____
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



大阪法務局所属 公証人役場



NOTARIAL ATTESTATION

REGISTER NUMBER: 3 3 4 / 2 0 0 9

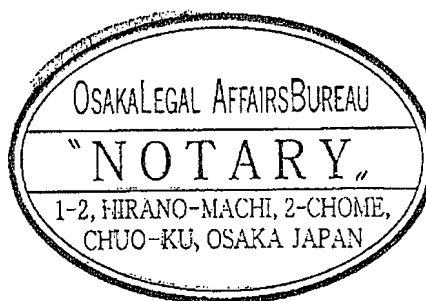
This is to certify that Nobuko INAMOTO, an agent of Taiji TAKAHASHI, has stated in my very presence that said Taiji TAKAHASHI acknowledged himself to have signed the attached Power of Attorney in compliance with the authority bestowed on him as the Representative Director and President of International 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.

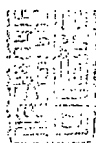
At the Office of Koichiro SHIGEYOSHI, Osaka, Japan
on the 21st day of May, 2009

Koichiro SHIGEYOSHI

Notary attached to
The Osaka Legal Affairs Bureau

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





52

総 第 2239 号

証 明



大阪法務局所属公証人

重吉孝一郎

平成 21 年 5 月 21 日付

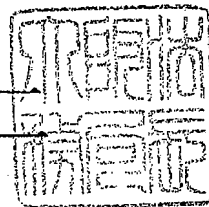
平成 21 年 登簿 第 334 号

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

平成 21 年 5 月 21 日

平成 年 月 日

大阪法務局長 白石 研



CERTIFICATE

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

Date MAY 21, 2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

53

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

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

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

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

NUMERO DE REGISTRO 334/2009

Por la presente se certifica que NOBUKO INAMOTO, agente de
TAIJI TAKAHASHI, ha afirmado en mi presencia que él ha
reconocido haber firmado el poder adjunto 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, Japón hoy 21 de
mayo de 2009.

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

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

2 54

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

SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURIDICOS DE OSAKA

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

CERTIFICACION

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

APOSTILLA

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

1. PAIS: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por KOICHIRO SHIGEYOSHI

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

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

CERTIFICADO

5. en OSAKA

6. el 21 de mayo de 2009

7. por el MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES

8. 2793

9. Sello: MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES, JAPÓN

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

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

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

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0068325
		Bogotá D.C., Julio 10 de 2013 - 12:14:44

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS					NI 860.041.367
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	562582716	10/07/2013	10.505.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	
			Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
			450.000.00 450.000.00
			\$450.000.00
			=====

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-103858- -00007-0000
Fecha: 2013-07-11 16:26:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 55

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5

No. 13-165216- -00000-0000
Fecha: 2013-07-11 16:26:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

0010:17075-841-004-80



No. 09-103858- -00007-0000

Fecha: 2013-07-11 16:26:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 55

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILID

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la p
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO5



No. 13-165216- -00000-0000

Fecha: 2013-07-11 16:26:26 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 55

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐