

23



Organización y
Digitalización CSA Ltda

BT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO**

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

09-103858

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TÍTULO**

METODO PARA ACTIVACION DE CELULA T AUXILIAR Y

COMPOSICION PARA USARSE 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.,**



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103858-00000-0000

Fecha: 2009-09-23 16:54:23 Dep 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

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

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC. sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón. Dirección: 13-9 Enoki-cho, Suita-shi, Osaka 5640053, Japón Domicilio: Osaka, Japón	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
--------------------------	--	---

3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 35.456.344 T. P. 23.555
-----------------------------------	--	--

4 INVENTOR (ES) (72)	1. Haruo SUGIYAMA 13-9 Enoki-cho, Suita-shi, Osaka 5640053, Japón
----------------------------	---

5 PCT (86)	Solicitud Internacional No. <u>PCT/JP2008/053417</u> Fecha: <u>27 de febrero de 2008</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2008/105462 A1</u> Fecha: <u>4 de septiembre de 2008</u>
---------------	--

6 Título (54)	<u>MÉTODO PARA ACTIVACIÓN DE CÉLULA T AUXILIAR Y COMPOSICIÓN PARA USARSE EN EL MÉTODO</u>
------------------	---

7 Clasificación Internacional (51)	<u>C12N 015/009</u>
---------------------------------------	---------------------

8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	<u>JP</u>	<u>27 de febrero de 2007</u>	<u>2007-047317</u>

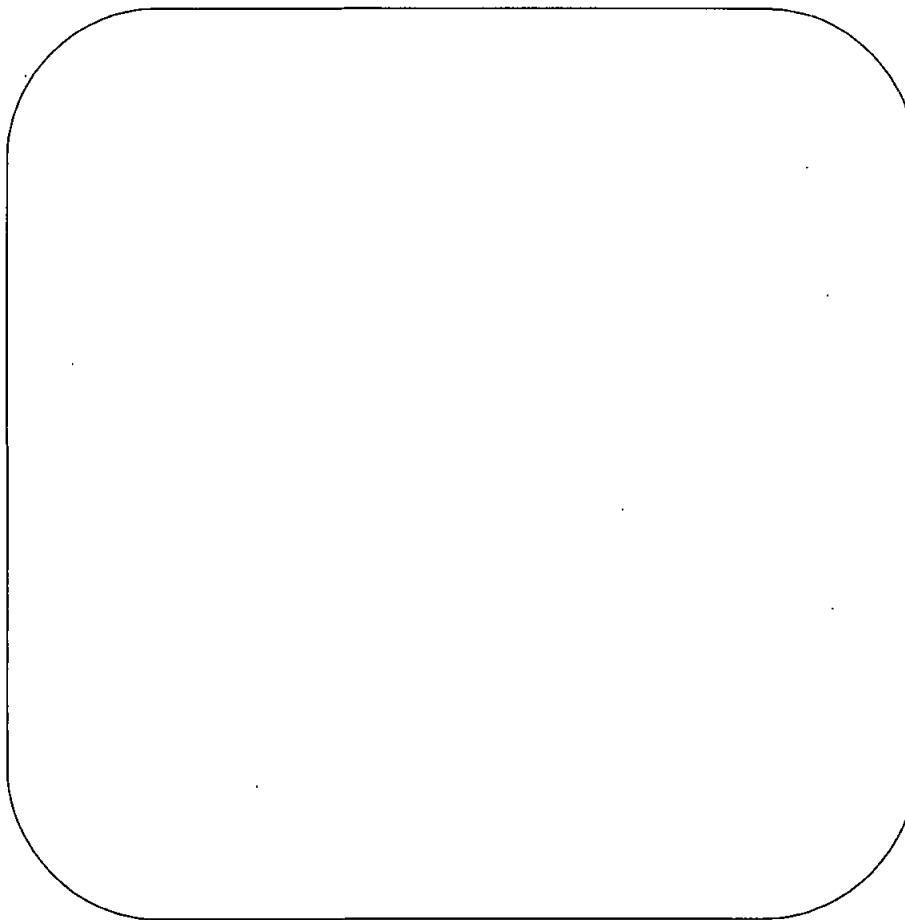
9 Comprobante de pago No.:	<u>09-68,550</u>	Fecha: <u>14 de septiembre de 2009</u>
-------------------------------	------------------	--

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ**FIRMA :**Luz Clemencia de Páez

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



DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/105462 A1

Descripción:

Páginas 22 en el idioma original

Páginas 35 en español

Reivindicaciones: Número (s) 15

Figuras: Número (s) 10

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Listado de Secuencias.
4. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de solicitante.
5. ☒ Extracto de publicación.

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

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

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

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

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

International Institute of Cancer Immunology, Inc.

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

Osaka 564-0053 JAPAN

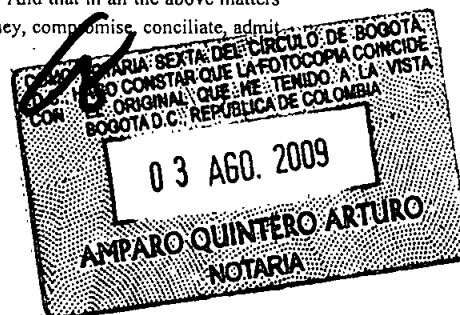
por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como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

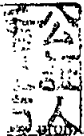
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos abogados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no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

© CAVELIER ABOGADOS
WPPDE01-179 (MINUTA 12.1.1.2.5)

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

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



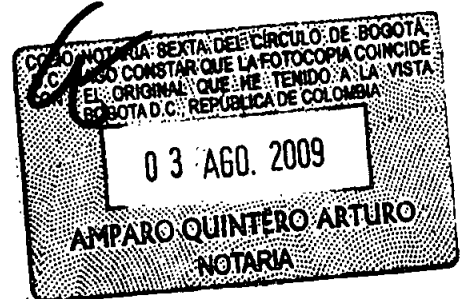
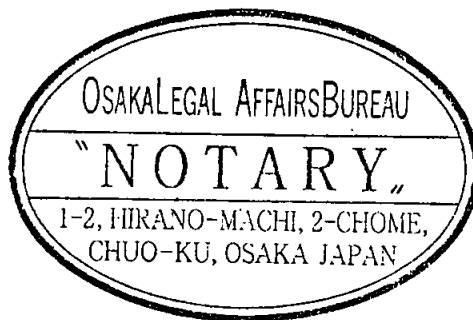


Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan
sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso,
desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes
oficiosos.

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:

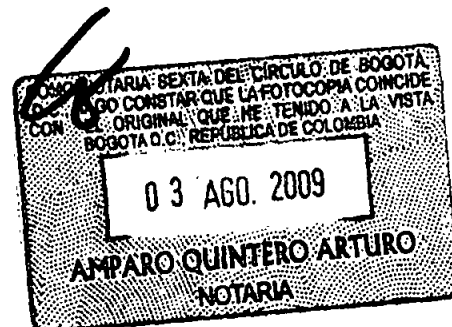


✓ 10. Signature:

Noriko KAWAHITO

Noriko KAWAHITO

For the Minister for Foreign Affairs



重吉孝一郎

重吉孝一郎



2737

登簿平成21年第334号

嘱託人 株式会社癌免疫研究所

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

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

よってこれを認証する。_____

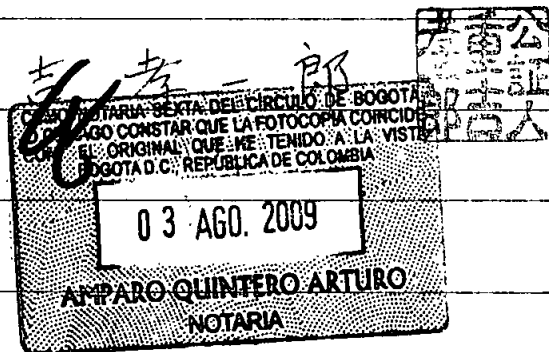
平成21年5月21日 _____

公証人重吉孝一郎役場において。_____

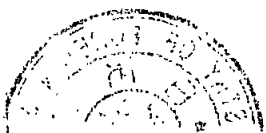
大阪府中央区平野町2丁目1番2号（沢の鶴ビル内）

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



Acta de la Sesión No. 12 de 2009

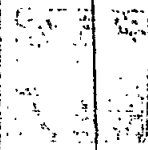
Señor Presidente del Comité de Vigilancia

En la ciudad de Bogotá, D.C., a las 10:00 horas del día 03 de Agosto de 2009, se reunió el Comité de Vigilancia en sesión ordinaria, para tratar el orden del día siguiente:

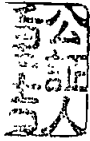
COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ, D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA. BOGOTÁ D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA.

03 AGO. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



Acta de la Sesión No. 12 de 2009



8

NOTARIAL ATTESTATION

REGISTER NUMBER: 3 3 4 / 2 0 0 9

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

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

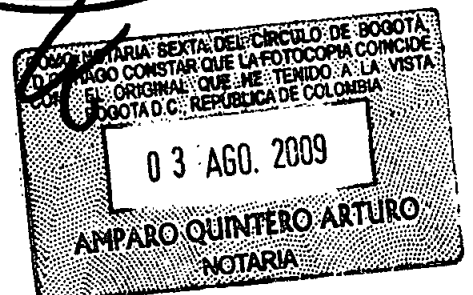
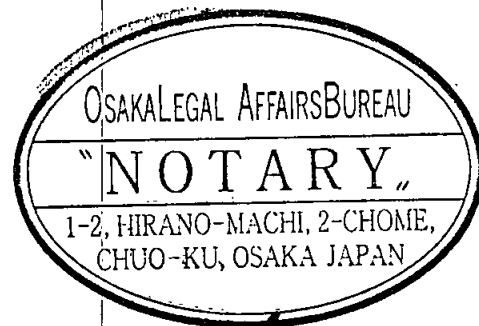
Koichiro Shigeyoshi

Koichiro SHIGEYOSHI

Notary attached to

The Osaka Legal Affairs Bureau

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



BOGOTÁ D.C.
REPUBLICA DE COLOMBIA

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

03 AGO. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA



総 第 2239 号

証 明



大阪法務局所属公証人

重吉孝一郎

平成 21 年 5 月 21 日付

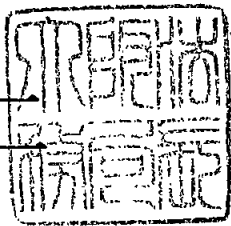
平成 21 年 登簿 第 334 号

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

平成 21 年 5 月 21 日

平成 年 月 日

大阪法務局長 白石 研

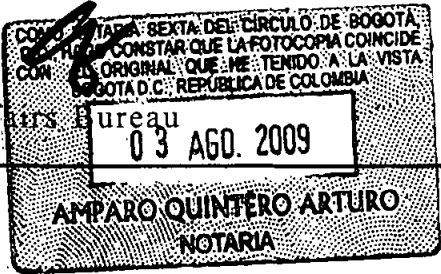


CERTIFICATE

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

Date MAY 21. 2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau



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

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

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

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

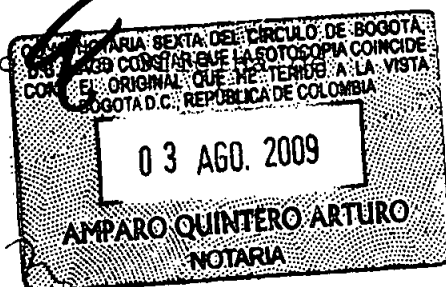
NUMERO DE REGISTRO 334/2009

Por la presente se certifica que NOBUKO INAMOTO, agente de TAIJI TAKAHASHI, ha afirmado en mi presencia que él ha reconocido haber firmado el poder adjunto 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 Asuntos jurídicos de Osaka.

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



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

SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURIDICOS DE OSAKA

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

CERTIFICACION

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

APOSTILLA

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

1. PAIS: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por KOICHIRO SHIGEYOSHI

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

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

CERTIFICADO

5. en OSAKA

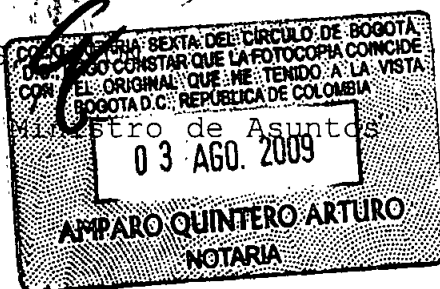
6. el 21 de mayo de 2009

7. por el MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES

8. 2793

9. Sello: MINISTERIO DE ASUNTOS EXTERIORES

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



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

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

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

SECRETARÍA DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 AGO 03

000000

EDUARDO CAGADO

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]
NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
DEBO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
03 AGO. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

2-2-12

P A T E N T S

CESION

El (los) suscrito (s)

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

una compañía constituida de conformidad con las
leyes de

con oficinas en

todos los derechos y títulos sobre la invención
denominada

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

Dado y firmado hoy

en

ASSIGNMENT

The undersigned

Haruo SUGIYAMA

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

International Institute of Cancer Immunology, Inc.

a corporation organized under the laws of
Japan

having a place of business at

13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka 564-0053 JAPAN

all rights and title to the invention related to

"METHOD FOR ACTIVATION OF HELPER T CELL
AND COMPOSITION FOR USE IN THE METHOD"

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

Given and signed this 2nd day of July, 2009

in Osaka, Japan

Inventors

Haruo Sugiyama

Haruo SUGIYAMA

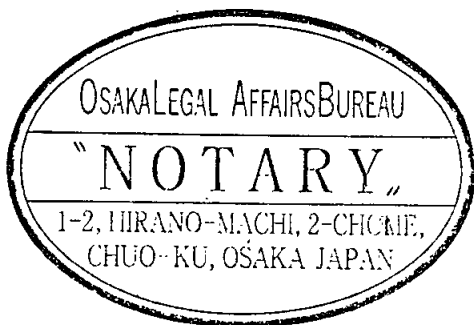
International Institute of Cancer Immunology, Inc.

Assignee

Taiji Takahashi

Taiji TAKAHASHI

Representative Director and President

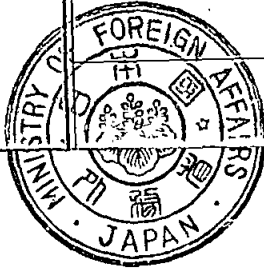


郎吉大

公証人

13

登簿平成21年第448号



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. JUL. 17. 2009

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. No. **3957**

9. Seal/stamp:



10. Signature:

Noriko KAWAHITO

Noriko KAWAHITO

For the Minister for Foreign Affairs

公証人

重吉孝一郎

公証人

大阪法務局所属 公証人役場

録証人等 山崎 夫 必 科 会

証人等 外 弟 謝 泰 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

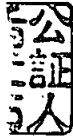
証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等

証人等 謝 泰 証人等 証人等 証人等



124

NOTARIAL ATTESTATION

REGISTER NUMBER: 448/2009

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

At the Office of Koichiro SHIGEYOSHI, Osaka, Japan
on the 17th day of July, 2009

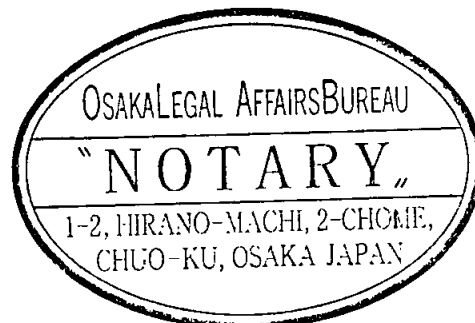
Koichiro Shigeyoshi

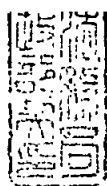
Koichiro SHIGEYOSHI

Notary attached to

The Osaka Legal Affairs Bureau

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





75

総 第 3150 号

証 明



大阪法務局所属公証人

重吉孝一郎

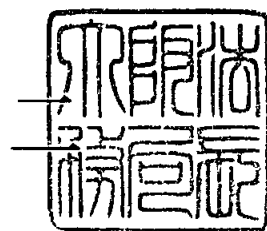
平成 21 年 7 月 17 日付

平成 21 年 登簿 第 448 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 7 月 17 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 JUL. 17. 2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

16

TRADUCCION OFICIAL NO. 567/2009-.

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, Y LLEVA EL SELLO Y LA FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL. SEGÚN RESOLUCIÓN No 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

CESION

El suscrito HARUO SUGIYAMA

En consideración al pago de la suma de US\$10.00 que he recibido, por el presente documento cedo a **INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.**, una compañía constituida de conformidad con las leyes de Japón, con oficinas en 13-9 Enoki-cho, Suita-Shi, Osaka 564 0053 JAPON, todos los derechos y títulos sobre la invención denominada "METODO PARA ACTIVACION DE LA CELULA HELPER T Y COMPUESTO PARA USO EN EL METODO".

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

Dado y firmado hoy 2 de Julio de 2009 en Osaka, Japón

Inventor: HARUO SUGIYAMA

FIRMADO: HARUO SUGIYAMA

INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.

CESIONARIO

FIRMADO: TAIJI TAKAHASHI, Director Representante y Presidente

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

REGISTRO NO. 448/2009

Por medio del presente documento certifico que **NOBUKO INAMOTO**, Agente de HARUO SUGIYAMA y TAIJI TAKAHASHI ha declarado en mi presencia que los mencionados HARUO SUGIYAMA y TAIJI TAKAHASHI reconocieron que firmaron la cesión adjunta; y adicionalmente que el mencionado TAIJI TAKAHASHI ha firmado dicho documento en cumplimiento de la autorización que le fue otorgada como representante director y presidente del **INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.**, una sociedad organizada que existe bajo las leyes del Japón y que tiene su oficina principal en 13-9 Enoki-cho, Suita-Shi, Osaka Japón.

En la Oficina de KOICHIRO SHIGEYOSHI, en Osaka, Japón, el 17 de julio, 2009.

FIRMADO: KOICHIRO SHIGEYOSHI, NOTARIO ADJUNTO A LA OFICINA DE ASUNTOS LEGALES DE OSAKA. HAY SELLO DEL NOTARIO

C/O SAWANOTSURU BUILDING - 1-2 HIRANO MACHI 2 CHOME,
CHUO-KU, OSAKA, JAPON.



17

TRADUCCION OFICIAL NO. 567/2009-.

Certificación

Certifico que el Certificado Notarial Anexo ha sido ejecutado por el Notario, debidamente autorizado y practicante en Osaka, Japón, y que el Sello Oficial que aparece en el mismo es genuino

Fecha: 17 de julio de 2009

Director de la oficina de Asuntos Legales de Osaka

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAÍS: JAPON

EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: **KOICHIRO SHIGEYOSHI**

3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO DE LA OFICINA DE ASUNTOS LEGALES DE OSAKA

4. LLEVA EL SELLO DE: KOICHIRO SHIGEYOSHI, NOTARIO PUBLICO

CERTIFICADO

5. EN: OSAKA

6. EL: 17 DE JULIO DE 2009

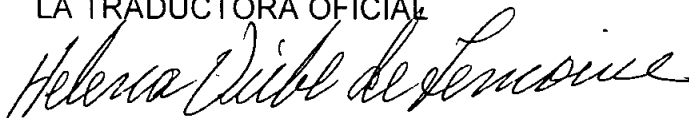
7. POR: EL MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES

8. BAJO EL NO.: **3957**

9. SELLO: MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES DE JAPON

10. FIRMADO: NORIKO KAWAHITO, POR EL MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES.

LA TRADUCTORA OFICIAL



HELENA URIBE DE LEMOINE



NO SE CONVE
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

020279

2009 AGO 14 A 8:48

Hdccc vive
CUYA FIRMADA PRECE-EL
DOCUMENTO DESENTA
LAS FUNCIONES INDICADAS

USA
RECEPCION
BOGOTA D.C.

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008 年 9 月 4 日 (04.09.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/105462 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C07K 14/82 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C07K 16/32 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

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

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2008/053417

(22) 国際出願日:

2008 年 2 月 27 日 (27.02.2008)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

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

(30) 優先権データ:

特願2007-047317 2007 年 2 月 27 日 (27.02.2007) JP

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

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

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 杉山 治夫
(SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田
市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka
(JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: METHOD FOR ACTIVATION OF HELPER T CELL AND COMPOSITION FOR USE IN THE METHOD

(54) 発明の名称: ヘルパー T 細胞の活性化方法およびそのための組成物

(57) Abstract: Disclosed are: a method for activating a helper T cell, which comprises the step of adding a WT1 peptide to an antigen-presenting cell to activate the helper T cell, wherein the WT1 peptide is capable of binding to any one selected from an HLA-DRB1 1501 molecule, an HLA-DPB1 0901 molecule and an HLA-DPB1 0501 molecule; a composition for use in the method; a therapeutic and/or prophylactic method for cancer by activating a helper T cell; a pharmaceutical composition for use in the therapeutic and/or prophylactic method; and others.

(57) 要約: 本発明は、WT1 ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパー T 細胞を活性化する工程を含む、ヘルパー T 細胞の活性化方法であって、該 WT1 ペプチドが HLA-DRB1*1501 分子、HLA-DPB1*0901 分子、または HLA-DPB1*0501 分子のいずれかに結合する能力を有するものである方法およびそのための組成物、ヘルパー T 細胞を活性化することによる癌の治療および/または予防方法およびそのための医薬組成物などに関するものである。

WO 2008/105462 A1

明 細 書

ヘルパーT細胞の活性化方法およびそのための組成物

技術分野

- [0001] 本発明は、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化する工程を含む、ヘルパーT細胞の活性化方法であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである方法およびそのための組成物、ヘルパーT細胞を活性化することによる癌の治療および／または予防用医薬組成物などに関する。

背景技術

- [0002] WT1遺伝子(Wilms' tumor 1 gene)は、小児の腎癌であるウイルムス腫瘍の責任遺伝子として同定された遺伝子であり(非特許文献1および2)、ジンクフィンガー構造を有する転写因子である。当初、WT1遺伝子は癌抑制遺伝子であるとされたが、その後の研究(非特許文献3、4、5および6)により、造血器腫瘍や固形癌においてはむしろ癌遺伝子として働くことが示された。
- [0003] WT1ペプチドを用いて末梢血単核球をインビトロで刺激することにより、ペプチド特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)が誘導され、これらのCTLは、内因性にWT1を発現する造血器腫瘍や固形癌の癌細胞を傷害することが示された。CTLはWT1ペプチドをMHCクラスI分子に結合した複合体の形で認識するので、かかるWT1ペプチドはMHCクラスIのサブタイプにより異なる(特許文献1、非特許文献7、特許文献2、3および4)。
- [0004] CTLが有効に誘導されるためには、癌抗原に特異的なヘルパーT細胞の存在が重要である(非特許文献8)。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞のMHCクラスII分子と抗原ペプチドとの複合体を認識して誘導・活性化される。活性化されたヘルパーT細胞は、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、あるいはインターフェロンなどのサイトカインを産生し、B細胞の増殖、分化、成熟を助ける。また、活性化ヘルパーT細胞は、T細胞の他のサブセット(Tc、TD細胞など)の増殖、分化、成熟を促進する機能を有する

20

。このように、活性化ヘルパーT細胞は、B細胞、T細胞の増殖・活性化を促進することにより免疫系を活性化する機能を有することから、癌免疫療法においてMHCクラスII結合性の抗原ペプチド(ヘルパーペプチド)を介してヘルパーT細胞の機能を増強し、癌ワクチンの効果を増強することが有用であると考えられている(非特許文献9)。WT1に関して現在分かっているヘルパーペプチドは、HLA-DRB1*0401分子に結合するもの(非特許文献10)、ならびにHLA-DRB1*0405分子に結合するものおよびHLA-DRB1*1502分子に結合するもの(特許文献5)であり、HLA-DRB1*1501、HLA-DPB1*0901、HLA-DPB1*0501分子に結合するWT1ペプチドを見出す必要があった。

[0005] また、ヘルパーペプチドには、複数のMHCクラスII分子に結合し、ヘルパーT細胞を誘導し得るpromiscuous helper peptideが存在することが示されている(非特許文献11および12)。しかしながら、3種類以上のMHCクラスII分子に結合し、十分な効果を示すpromiscuous helper peptideを同定するのは大変困難であった。

特許文献1:国際公開2003/106682号公報

特許文献2:国際公開2005/095598号公報

特許文献3:国際公開2007/097358号公報

特許文献4:国際出願PCT/JP2007/074146

特許文献5:国際公開2005/045027号公報

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

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

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

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

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

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

非特許文献7:Oka Y et al., Immunogenetics. 2000 Feb;51(2):99-107.

非特許文献8:Gao FG et al., Cancer Res. 2002 Nov 15;62(22):6438-41.

非特許文献9:Zeng G, J Immunother. 2001 May;24(3):195-204

非特許文献10:Knights AJ et al., Cancer Immunol Immunother. 2002 Jul;51(5):271-

81.

非特許文献11:Sotiriadou R et al., Br J Cancer. 2001 Nov 16;85(10):1527-34.

非特許文献12:Hural JA et al., J Immunol. 2002 Jul 1;169(1):557-65.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明の解決課題は、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子またはHLA-DPB1*0501分子に結合する能力を有するWT1ペプチドを用いて、ヘルパーT細胞を活性化する方法およびそのための組成物、ならびにヘルパーT細胞を活性化することによる癌の治療および／または予防用医薬組成物などを提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者は、上記事情に鑑み鋭意研究を重ねた結果、HLA-DRB1*0405分子およびHLA-DRB1*1502分子に結合するWT1ペプチドのうち、アミノ酸配列:Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys Hisを有するWT1ペプチドが、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子およびHLA-DPB1*0501分子にも結合することを見出し、本発明を完成するに至った。
- [0008] すなわち、本発明は、
- (1)WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化する工程を含む、ヘルパーT細胞の活性化方法であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、方法、
 - (2)WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子およびHLA-DPB1*0501分子のうちの少なくとも2つに結合する能力を有するものである、(1)記載の方法、
 - (3)WT1ペプチドがさらにHLA-DRB1*0405分子および／またはHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有するものである、(1)または(2)記載の方法、
 - (4)WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、HLA

- 22
- DPB1*0501分子、HLA—DRB1*0405分子、およびHLA—DRB1*1502分子に結合する能力を有するものである、(1)から(3)のいずれか記載の方法、
- (5)WT1ペプチドがアミノ酸配列:Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His(配列番号:2)を含むペプチドである、(1)から(4)のいずれか記載の方法、
- (6)WT1ペプチドの抗原提示細胞への添加が、WT1ペプチドの添加、WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの添加、または該発現ベクターを含む細胞の添加により行われる、(1)から(5)のいずれか記載の方法、
- (7)WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化するための、WT1ペプチドを含む組成物であって、該WT1ペプチドがHLA—DRB1*1501分子、HLA—DPB1*0901分子、またはHLA—DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、組成物、
- (8)WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化する工程を含む、対象における癌の治療または予防方法であって、該WT1ペプチドがHLA—DRB1*1501分子、HLA—DPB1*0901分子、またはHLA—DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、方法、
- (9)WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化することにより、癌を治療または予防するための、WT1ペプチドを含む医薬組成物であって、該WT1ペプチドがHLA—DRB1*1501分子、HLA—DPB1*0901分子、またはHLA—DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、医薬組成物、
- (10)WT1ペプチドに特異的に結合する抗体であって、該WT1ペプチドがHLA—DRB1*1501分子、HLA—DPB1*0901分子、またはHLA—DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、抗体、
- (11)HLA—DRB1*1501陽性、HLA—DPB1*0901陽性、またはHLA—DPB1*0501陽性対象のいずれかにおけるWT1ペプチドの存在または量を決定する方法であって、
- (a)抗WT1抗体を該対象由来試料と反応させ、次に、

(b) 該試料に含まれるWT1ペプチドと特異的に結合する該抗WT1抗体の存在または量を調べる、

工程を含む、方法、

(12) WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加してヘルパーT細胞を活性化し、活性化したヘルパーT細胞を対象に投与する工程を含む、癌の治療または予防方法であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子に結合する能力を有するものである、方法、

(13) 癌を治療または予防するための、WT1ペプチドを用いて活性化されたヘルパーT細胞を含む医薬組成物であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、医薬組成物、

(14) HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象のいずれかにおけるWT1特異的ヘルパーT細胞の存在または量を決定する方法であって、

(a) WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子との複合体を該対象由来試料と反応させ、次に、

(b) 該試料に含まれる該複合体を認識するヘルパーT細胞の存在または量を調べる、

工程を含む、方法、

(15) HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、HLA-DPB1*0501陽性、HLA-DRB1*0405陽性、またはHLA-DRB1*1502陽性対象におけるWT1特異的ヘルパーT細胞の存在または量を決定する方法であって、

(a) WT1ペプチドを用いて末梢血単核球、浸潤性リンパ球、腫瘍細胞、腹水中の細胞、胸水中の細胞、脳脊髄液中の細胞、骨髓細胞、またはリンパ節細胞を刺激し、

(b) サイトカイン産生またはヘルパーT細胞の反応の存在または量を調べる、

工程を含み、サイトカイン産生またはヘルパーT細胞の反応の存在または量の増大がWT1特異的ヘルパーT細胞の存在または量を示す、方法、
を提供するものである。

23

発明の効果

- [0009] 本発明により、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、HLA-DPB1*0501分子、HLA-DRB1*0405分子、およびHLA-DRB1*1502分子に結合するWT1ペプチドを用いて、ヘルパーT細胞を活性化する方法およびそのための組成物、ならびにヘルパーT細胞を活性化することによる癌の治療および／または予防用医薬組成物などが得られるので、かかるMHCクラスII分子を有する対象におけるインビボおよびインビトロでのヘルパーT細胞の活性化、さらには癌の治療および予防などが可能となる。上記5種類のMHCクラスIIサブクラスにより、日本人の約90%がカバーされるので、非常に広範囲の対象においてヘルパーT細胞を活性化し、癌を治療および／または予防できる。

図面の簡単な説明

- [0010] [図1]図1は、TA28.1細胞により産生されたIFN- γ の量を示すグラフである。図の縦軸はIFN- γ 濃度(pg/ml)を示す。グラフは、左より、「HLA-DRB1*1501陽性対象由来末梢血単核球をWT1ペプチド不存下で培養した場合」、「TA28.1細胞をWT1ペプチド存在下で培養した場合(黒色)」、「HLA-DRB1*1501陰性対象由来末梢血単核球をWT1ペプチド不存下で培養した場合」、「HLA-DRB1*1501陰性対象由来末梢血単核球をWT1ペプチドの存在下で培養した場合」にそれぞれ対応する。
- [図2]図2は、TA28.1細胞により産生されたIFN- γ 、IL-4およびIL-10の量を示すグラフである。図の縦軸は濃度(pg/ml)を示す。グラフは、左より、IFN- γ 、IL-4、IL-10の値である。
- [図3]図3は、E15.2細胞により産生されたIFN- γ 、IL-4およびIL-10の量を示すグラフである。図の縦軸は濃度(pg/ml)を示す。グラフは、左より、IFN- γ 、IL-4、IL-10の値である。
- [図4]図4は、HLA-DPB1*0501/*0501陽性単核球によるIFN- γ およびIL-17の産生を示す。図の横軸はIFN- γ を、縦軸はIL-17を示す。図4aは、WT1ペプチドを用いて刺激しなかった細胞、図4bは、WT1ペプチドを用いて刺激した細胞をそれぞれ表す。

[図5]図5は、TA28. 1細胞の増殖を示すグラフである。図の縦軸はcpm($\times 10^4$)を示す。グラフは、左より、「TA28. 1細胞をWT1ペプチドでパルスしていない末梢血単核球と共培養した場合」、「TA28. 1細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と共培養した場合(黒色)」、「TA28. 1細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と抗MHCクラスI抗体の存在下で共培養した場合」、「TA28. 1細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と抗HLA-DR抗体の存在下で共培養した場合(斜線)」、「TA28. 1細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と抗HLA-DQ抗体の存在下で共培養した場合」、「TA28. 1細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と抗HLA-DP抗体の存在下で共培養した場合」にそれぞれ対応する。

[図6]図6は、E15. 2細胞の増殖を示すグラフである。図の縦軸はcpm($\times 10^4$)を示す。グラフは、左より、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスしていないHLA-DPB1*0901陽性対象由来末梢血単核球と共培養した場合」、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスしたHLA-DPB1*0901陽性対象由来末梢血単核球と共培養した場合(黒色)」、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスしていないHLA-DPB1*0901陰性対象末梢血単核球と共培養した場合」、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスしたHLA-DPB1*0901陰性対象由来末梢血単核球と共培養した場合」にそれぞれ対応する。

[図7]図7は、E15. 2細胞の増殖を示すグラフである。図の縦軸はcpmを示す。グラフは、左より、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスしていない末梢血単核球と共培養した場合」、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と共培養した場合(黒色)」、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と抗MHCクラスI抗体の存在下で共培養した場合」、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と抗HLA-DR抗体の存在下で共培養した場合」、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と抗HLA-DQ抗体の存在下で共培養した場合」、「E15. 2細胞をWT1ペプチドでパルスした末梢血単核球と抗HLA-DP抗体の存在下で共培養した場合(斜線)」にそれぞれ対応する。

[図8]図8は、HLA-DPB1*0501/*0501陽性単核球の増殖を示すグラフである

。図の縦軸はcpmを示す。グラフは、左より、「WT1ペプチドを用いた刺激を行わなかった場合」、「WT1ペプチドを用いた刺激を行った場合」にそれぞれ対応する。

[図9]図9は、HLA-DRB1*0501/*0501陽性単核球の増殖が抗HLA-DP抗体で抑制されることを示す。図の縦軸はcpmを示す。グラフは、左より、「WT1ペプチドを用いた刺激を行わなかった場合」、「HIV由来対照ペプチドを用いて刺激を行った場合」、「WT1ペプチドを用いて刺激を行った場合」、「抗HLA-DR抗体の存在下でWT1ペプチドを用いて刺激を行った場合」、「抗HLA-DQ抗体の存在下でWT1ペプチドを用いて刺激を行った場合」、および「抗HLA-DP抗体の存在下でWT1ペプチドを用いて刺激を行った場合」にそれぞれ対応する。

[図10]図10は、種々の濃度のWT1ペプチドを用いたときのE15.2細胞の増殖を示すグラフである。図の縦軸はcpm($\times 10^4$)を、横軸はWT1ペプチドの濃度を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0011] 本発明は、1の態様において、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化する工程を含む、ヘルパーT細胞の活性化方法であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、方法に関するものである。本発明において、WT1ペプチドとは、配列番号:1に示されるヒトWT1タンパク質のアミノ酸配列の一部分からなるペプチド、かかるアミノ酸配列の一部分を構成するアミノ酸のうち1個ないし数個が置換、修飾、または欠失されたアミノ酸配列からなるペプチドであってHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するペプチド、あるいはそれらのペプチドのN末端および/またはC末端にアミノ酸、ペプチド、またはそれらのアナログのような種々の物質の結合したペプチドをいう。上記種々の物質は、例えば、生体内酵素などにより、あるいは細胞内プロセッシングなどの過程により処理され、最終的にWT1ペプチドは、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合できる形態となる。また、かかる種々の物質は、本発明のWT1ペプチドの溶解性を調節するもの、耐プロテアーゼ作用等その安定性を向上させるもの、所定の組織・器官に特異的に本発明の

27

WT1ペプチドをデリバリーするもの、抗原提示細胞の取り込み効率を増強させるものであってもよく、あるいは抗原提示細胞が由来する対象が有するMHCクラスI分子と同じサブタイプのクラスI分子に拘束性のWT1ペプチドであってもよい。

- [0012] 本発明のWT1ペプチドは、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである。従って、上記WT1ペプチドは、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子およびHLA-DPB1*0501分子の少なくとも2つに結合する能力を有するもの、またはHLA-DRB1*1501分子および／またはHLA-DPB1*0901分子および／またはHLA-DPB1*0501分子とそれらの分子以外のHLAクラスII分子にさらに結合する能力を有するもの、例えば、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DRB1*0405分子および／またはHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有するもの、HLA-DPB1*0901分子、HLA-DRB1*0405分子および／またはHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有するもの、HLA-DPB1*0501分子、HLA-DRB1*0405分子および／またはHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有するもの、あるいはHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、HLA-DPB1*0501分子、HLA-DRB1*0405分子および／またはHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有するものなどであってもよい。アミノ酸配列:Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His(配列番号:2)を有するWT1ペプチドは、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、HLA-DPB1*0501分子、HLA-DRB1*0405分子、およびHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有するので、かかるアミノ酸配列を有するWT1ペプチドが好ましい。一般に、MHCクラスII結合性ペプチドは10～25個のアミノ酸からなることから、WT1ペプチドは、好ましくは、10～25個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を有する。

- [0013] 本発明のWT1ペプチドは、当該技術分野において通常用いられる方法またはそれらの変法を用いて合成することができる。かかる合成方法は、例えば、Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成、丸善(株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)

28
、1985;医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成、広川書店、1991などに記載されている。

- [0014] 本発明のWT1ペプチドはまた、WT1ペプチドをコードするヌクレオチド配列情報に基づき、遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。かかる遺伝子工学的手法は、当業者に周知のものである。
- [0015] 抗原提示細胞とは、樹状細胞などのMHCクラスII分子と共に上記WT1ペプチドをヘルパーT細胞などに提示することができる細胞をいう。従って、抗原提示細胞が由来する対象は、添加されるWT1ペプチドが結合するMHCクラスIIのサブクラスと同じサブクラス(例えば、HLA-DRB1*1501、HLA-DPB1*0901、HLA-DPB1*0501、HLA-DRB1*0405、またはHLA-DRB1*1502)を有するものでなければならない。
- [0016] 一般的に、ヘルパーT細胞は、T細胞表面のTCR・CD3複合体が抗原提示細胞表面のMHCクラスII分子を介して抗原ペプチドを認識すること、およびT細胞表面のインテグリンが抗原提示細胞表面のインテグリンリガンドで刺激されることにより、活性化される。本発明において、ヘルパーT細胞の活性化とは、ヘルパーT細胞の活性化ばかりでなく、ヘルパーT細胞の誘導・増殖を含むものとする。上述の通り、活性化ヘルパーT細胞は、B細胞およびT細胞の誘導・増殖・活性化を促進することにより、免疫系を活性化する機能を有することから、本発明のヘルパーT細胞の活性化方法を、癌などの治療の補助療法として用いることもできる。あるいは、インビトロにおいて本発明の方法を用いて活性化されたヘルパーT細胞を癌などの治療または予防において用いることもでき、あるいはこれらの補助剤として用いることもできる。ヘルパーT細胞の活性化は、インターフェロン、インターロイキンなどのサイトカインの産生、分泌量を測定することなどにより、評価することができる。
- [0017] WT1ペプチドの抗原提示細胞への添加は、WT1ペプチドを添加することにより直接的に、あるいはWT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの添加により、または該発現ベクターを含む細胞の添加により間接的に行われてもよい。WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、および該発現ベクターを含む細胞は、当業者によく知られた方法により得られる。

- [0018] 本発明は、もう1つの態様において、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化するための、WT1ペプチドを含む組成物であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、組成物に関するものである。本発明の組成物が、HLA-DRB1*1501、HLA-DPB1*0901またはHLA-DPB1*0501陽性対象に投与されると、対象のヘルパーT細胞が活性化されることにより、対象の免疫系が活性化される。また、WT1遺伝子は、各種の癌や腫瘍、例えば、白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌において高発現しているので、本発明の組成物を癌の治療または予防の補助剤として用いることもできる。あるいは、本発明の組成物を用いて活性化されたヘルパーT細胞を例えば、上記の癌の治療の補助剤として用いることもできる。
- [0019] 本発明のWT1ペプチドは上述の通り、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、およびHLA-DPB1*0501分子の少なくとも2つに結合する能力を有するもの、またはHLA-DRB1*1501分子および／またはHLA-DPB1*0901分子および／またはHLA-DPB1*0501分子とそれらの分子以外のMHCクラスII分子にさらに結合する能力を有するものなどであってもよい。従って、抗原提示細胞が、本発明のWT1ペプチドが結合できるMHCクラスIIサブクラス陽性の対象由来のものであれば、本発明の組成物によるヘルパーT細胞の活性化効果を得ることができる。
- [0020] 本発明の組成物は、上記WT1ペプチド以外に、例えば、担体、賦形剤、あるいは添加剤などを含んでもよい。本発明の組成物に含まれるWT1ペプチドは、WT1ペプチド特異的にヘルパーT細胞を活性化することから、MHCクラスI拘束性WT1ペプチドを含むか、あるいはこれらと共に適用されてもよい。
- [0021] 本発明の組成物の適用方法は、所望のヘルパーT細胞の活性化程度、抗原提示細胞の状態などの条件に応じて適宜選択することができる。当該適用方法は、例えば、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、経鼻投与、経口投与などによ

り対象に投与すること、あるいは抗原提示細胞培養液に添加することなどが挙げられるが、これらに限らない。本発明の組成物に含まれるWT1ペプチドの量、組成物の形態、適用回数などは、所望のヘルパーT細胞の活性化程度、抗原提示細胞の状態などの条件に応じて適宜選択することができる。

- [0022] 本発明は、さらなる態様において、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化するための、WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、または該発現ベクターを含む細胞を含む組成物であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、組成物に関するものである。WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、または該発現ベクターを含む細胞については上述の通りである。
- [0023] 本発明は、別の態様において、上記組成物を製造するためのWT1ペプチド、WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、または該発現ベクターを含む細胞の使用に関するものである。
- [0024] 本発明は、なおさらなる態様において、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化するための、WT1ペプチドを含むキットであって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、キットに関するものである。好ましくは、該キットは上記ヘルパーT細胞の活性化方法に用いられる。本発明のキットは、WT1ペプチドの他に、例えば、抗原提示細胞の取得手段、ヘルパーT細胞の活性の評価手段などを含んでもよい。一般的には、キットには取扱説明書を添付する。本発明のキットを用いて、ヘルパーT細胞を効率よく活性化することができる。
- [0025] 本発明は、別の態様において、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化するための、WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、または該発現ベクターを含む細胞を含むキットであって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、キットに関するものである。

- 。
- [0026] 本発明は、もう1つの態様において、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化する工程を含む、対象における癌の治療または予防方法であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、方法に関するものである。本発明の方法は、ヘルパーT細胞を活性化することにより対象の免疫系を活性化し、対象における癌を治療または予防する方法である。WT1ペプチドの抗原提示細胞への添加は、WT1ペプチドを添加することにより直接的に、あるいはWT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの添加により、または該発現ベクターを含む細胞の添加により間接的に行われてもよい。
- [0027] 上述の通り、ヘルパーT細胞は、MHCクラスII分子であるHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかとWT1ペプチドとの複合体を認識するので、対象は、WT1ペプチドが結合するMHCクラスII分子を有する対象、例えば、HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象である。また、上述の通り本発明のWT1ペプチドは、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子およびHLA-DPB1*0501分子の少なくとも2つに結合する能力を有するもの、またはHLA-DRB1*1501分子および／またはHLA-DPB1*0901分子および／またはHLA-DPB1*0501分子とそれらの分子以外のMHCクラスII分子にさらに結合する能力を有するものなどであってもよい。従って、このような場合、本発明のWT1ペプチドが結合できるMHCクラスIIサブクラス陽性の対象において癌を治療または予防することもできる。治療または予防される癌は、いずれのものであってもよく、例えば、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌を含む。また、本発明の方法は、MHCクラスI分子拘束性WT1ペプチドを用いた癌の治療または予防方法またはそのための医薬組成物と併用されてもよい。
- [0028] 本発明は、なお別の態様において、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、へ

ヘルパーT細胞を活性化することにより、対象における癌を治療または予防するための、WT1ペプチドを含む医薬組成物であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、医薬組成物に関するものである。WT1遺伝子は、各種の癌や腫瘍、例えば、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌などの固形癌において高発現しているため、本発明の医薬組成物を癌の治療または予防のために用いることができる。

[0029] 本発明のWT1ペプチドは上述の通り、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、およびHLA-DPB1*0501分子の少なくとも2つに結合する能力を有するもの、またはHLA-DRB1*1501分子および／またはHLA-DPB1*0901分子および／またはHLA-DPB1*0501分子とそれらの分子以外のMHCクラスII分子にさらに結合する能力を有するものなどであってもよい。従って、抗原提示細胞が、本発明のWT1ペプチドが結合できるMHCクラスIIサブクラス陽性の対象由来のものであれば、本発明の医薬組成物により癌を治療または予防することができる。

[0030] 本発明の医薬組成物が、例えば、HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象のいずれかに投与されると、該医薬組成物に含まれるWT1ペプチドにより、ヘルパーT細胞が活性化されることにより、対象の免疫系が活性化され、癌を治療または予防することができる。従って、本発明の医薬組成物は、上記癌の治療または予防方法またはそのための医薬組成物と併用されてもよい。

[0031] 本発明の医薬組成物は、有効成分として上記WT1ペプチド以外に、例えば、担体、賦形剤などを含んでもよい。本発明の医薬組成物に含まれるWT1ペプチドは、抗原提示細胞表面のMHCクラスII分子と結合して、ヘルパーT細胞を活性化することから、本発明の医薬組成物は、さらにヘルパーT細胞の活性化剤、増殖剤、誘導剤などを含んでもよく、あるいはMHCクラスI拘束性WT1ペプチドを含んでもよい。

[0032] 本発明の医薬組成物の投与方法は、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの

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

- [0033] 本発明は、さらなる態様において、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化することにより、対象における癌を治療または予防するための、WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、または該発現ベクターを含む細胞を含む医薬組成物であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、医薬組成物に関するものである。
- [0034] 本発明は、さらなる態様において、上記医薬組成物を製造するためのWT1ペプチド、WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、または該発現ベクターを含む細胞の使用に関するものである。
- [0035] 本発明は、もう1つの態様において、WT1ペプチドに特異的に結合する抗体であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、抗体に関するものである。本発明の抗体は、当業者に既知の手段・方法を用いて製造され得る。本発明の抗体を、種々の癌の診断、予後診断等に使用することができる。
- [0036] 本発明は、別の態様において、HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象におけるWT1ペプチドの存在または量を決定する方法であって、
- (a) 抗WT1抗体を該対象由来試料と反応させ、次に、
 - (b) 該試料に含まれるWT1ペプチドと特異的に結合する該抗WT1抗体の存在または量を調べる、
- 工程を含む、方法に関するものである。例えば、上記抗WT1抗体をHLA-DRB1*

1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象由来試料とインキュベーションする、あるいはHLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象に投与し、次に該抗WT1抗体の例えば、位置、部位、量等を決定することで、癌の診断、予後診断などが可能になる。本発明の抗WT1抗体は、本発明のWT1ペプチドを特異的に認識することができる抗体をいう。抗WT1抗体は、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。また、抗WT1抗体は標識されていてもよい。標識としては、蛍光標識、放射性標識などの公知のものを使用することができる。標識することで、WT1ペプチドの存在または量の決定が容易かつ迅速になる。

- [0037] 本発明は、なお別の態様において、上記抗WT1抗体を必須構成成分として含む、WT1ペプチドの存在または量を決定するためのキットに関するものである。
- [0038] また、上述のWT1ペプチドの存在または量の決定において、WT1ペプチドがHLA-DRB1*0405分子および／またはHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有する場合、かかるMHCクラスIIサブクラスを有する対象において、WT1ペプチドの存在または量を決定することも可能となる。
- [0039] 本発明は、もう1つの態様において、癌を治療または予防するための、WT1ペプチドを用いて活性化されたヘルパーT細胞を含む医薬組成物であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、医薬組成物に関するものである。活性化ヘルパーT細胞によってB細胞およびT細胞が誘導・増殖・活性化されることにより、癌が治療または予防される。従って、本発明のこの態様の医薬組成物を、他の癌の治療または予防方法またはそのための医薬組成物と併用してもよい。また、WT1ペプチドを用いたヘルパーT細胞の活性化とは、WT1ペプチドによる直接的な活性化ばかりでなく、WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター、または該発現ベクターを含む細胞による間接的な活性化を含む。
- [0040] 本発明の医薬組成物は、有効成分として活性化ヘルパーT細胞以外に、例えば、担体、賦形剤などを含んでいてもよい。本発明の医薬組成物の投与方法は、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択することができる。当該

35

方法は、例えば、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、経鼻投与、経口投与などが挙げられるが、これらに限らない。本発明の医薬組成物に含まれるヘルパーT細胞の量、医薬組成物の剤形、投与回数などは、疾患の種類、対象の状態、標的部位などの条件に応じて適宜選択することができる。

- [0041] 本発明は、別の態様において、WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加してヘルパーT細胞を活性化し、活性化したヘルパーT細胞を対象に投与する工程を含む、癌の治療または予防方法であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、方法に関するものである。
- [0042] 本発明は、別の態様において、上記活性化ヘルパーT細胞を含む医薬組成物の製造におけるWT1ペプチドの使用に関するものである。
- [0043] 本発明は、さらなる態様において、HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象のいずれかにおけるWT1特異的ヘルパーT細胞の存在または量を決定する方法であって、
- (a) WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子との複合体を該対象由来試料と反応させ、次に、
- (b) 該試料に含まれる該複合体を認識するヘルパーT細胞の存在または量を調べる、
- 工程を含む、方法に関するものである。対象由来試料は、リンパ球が含まれている可能性があればいずれのものであってもよく、例えば、血液、リンパ液などの体液、組織などが挙げられる。WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子との複合体は、例えば、ビオチンストレプトアビジン法などの当業者に既知の方法を用いて、例えば、テトラマー、ペンタマーなどの形態にされていてもよい。かかる複合体を認識するヘルパーT細胞の存在または量は、当業者に既知の方法により測定することができる。本発明のこの態様において、上記複合体は標識されたものであってもよい。標識としては、蛍光標識、放射性標識などの公知のものを使用することができる。標識することで、ヘルパーT細胞の存在または量の決定が容易かつ迅速になる。本発明のこの態様の方法を用いて、癌

の診断、予後診断などが可能になる。

- [0044] 従って、本発明はまた、HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象のいずれかにおけるヘルパーT細胞の存在または量を決定するための、WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子との複合体を含む組成物を提供する。
- [0045] さらに、本発明は、WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子との複合体を含む、HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象におけるヘルパーT細胞の存在または量を決定するためのキットを提供する。
- [0046] また、上述のヘルパーT細胞の存在または量の決定において、WT1ペプチドがHLA-DRB1*0405分子および／またはHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有する場合、かかるMHCクラスIIサブクラスを有する対象において、ヘルパーT細胞の存在または量を決定することも可能となる。このような場合、WT1ペプチドとWT1ペプチドが結合するMHCクラスII分子との複合体が用いられる。
- [0047] 本発明は、さらなる態様において、WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子との複合体を用いて、ヘルパーT細胞を得る方法であって、
(a) 試料と該複合体を反応させ、次に、
(b) 該試料中に含まれる該複合体を認識するヘルパーT細胞を得る、
工程を含む、方法に関するものである。複合体については上述の通りである。試料は、リンパ球が含まれている可能性があればいずれのものであってもよく、例えば、血液などの対象由来試料、細胞培養液などが挙げられる。複合体を認識するヘルパーT細胞の取得は、例えば、FACS、MACSなど当業者に既知の方法を用いて行うことができる。得られたヘルパーT細胞を培養し、種々の癌の治療または予防に用いることも可能になる。
- [0048] 従って、本発明はまた、WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子との複合体を用いて、ヘルパーT

37

細胞を得る方法により得ることのできる、ヘルパーT細胞に関するものである。

[0049] さらに、本発明は、WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子との複合体を含む、ヘルパーT細胞を得るためのキットに関するものである。

[0050] また、上述のヘルパーT細胞の取得において、WT1ペプチドがHLA-DRB1*0405分子および／またはHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有する場合、かかるMHCクラスIIサブクラスとWT1ペプチドの複合体を認識するヘルパーT細胞の取得も可能となる。このような場合、WT1ペプチドとWT1ペプチドが結合するMHCクラスII分子との複合体が用いられる。

[0051] 本発明は、別の態様において、HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、HLA-DPB1*0501陽性、HLA-DRB1*0405陽性、またはHLA-DRB1*1502陽性対象におけるWT1特異的ヘルパーT細胞の存在または量を決定する方法であって、

(a) WT1ペプチドを用いて末梢血単核球、浸潤性リンパ球、腫瘍細胞、腹水中の細胞、胸水中の細胞、脳脊髄液中の細胞、骨髓細胞、またはリンパ節細胞を刺激し、

(b) サイトカイン産生またはヘルパーT細胞の反応の存在または量を調べる、

工程を含み、サイトカイン産生またはヘルパーT細胞の反応の存在または量の増大がWT1特異的ヘルパーT細胞の存在または量を示す、方法に関するものである。本発明の方法において用いる末梢血単核球、浸潤性リンパ球、腫瘍細胞、腹水中の細胞、胸水中の細胞、脳脊髄液中の細胞、骨髓細胞、およびリンパ節細胞などの細胞は健常人由来であっても、あるいは癌患者由来であってもよい。健常人由来のこれらの細胞を用いることにより、例えば、癌に罹患しているかどうか、あるいはその素因を有するかどうかを診断することなどが可能になる。また、癌患者由来のこれらの細胞を用いることにより、例えば、癌患者においてWT1免疫療法が効果を有するかどうかを予測することなどが可能になる。WT1ペプチドを用いたこれらの細胞の刺激は、インビトロまたはインビボのいずれにおいて行われてもよいが、簡便であるなどの理由から、インビトロが好ましい。サイトカイン産生またはヘルパーT細胞の反応が存在するか、あるいはサイトカイン産生量またはヘルパーT細胞の反応の量は既知の方法に

より調べることができる。

- [0052] 以下に実施例を示して本発明を具体的かつ詳細に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

実施例

- [0053] 1. 抗原提示細胞の調製

健康人の血液提供者 (HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性)の末梢血から末梢血単核球(PBMC)を分離し1% AB型血清 (Nabi, Miami, FL)、X-VIVO 15培養液 (Cambrex社)を用いて6穴プラスチックプレートに 1×10^7 細胞/ウェルの密度にて播種し、2時間培養した。その後、浮遊細胞を除去し、残った付着細胞を1000 IU/ml IL-4 (PeproTech社)、1000 IU/ml GM-CSF (PeproTech社)、1% AB型血清、X-VIVO 15培養液で培養した。2日目と4日目に培養液を交換し、IL-4とGM-CSFを添加し、6日目に100 IU/ml TNF- α を加え、抗原提示細胞を成熟化させた。

- [0054] 2. WT1ペプチド特異的CD4陽性T細胞の誘導

同じ血液提供者からCD4陽性T細胞分離用RosetteSep (StemCell社)を用いてCD4陽性T細胞を分離した。24穴プレートの各ウェルに、このCD4陽性T細胞 (3×10^6 個)を入れ、これを20 μ g/ml WT1ペプチド (配列番号:2)でパルスし25Gy放射線照射した自己抗原提示細胞 (3×10^5 個)で刺激し、刺激の次の日に20IU/ml IL-2を添加した。刺激したCD4陽性T細胞を、同じように一週間おきに、20 μ g/ml WT1ペプチドでパルスした抗原提示細胞を用いて刺激した。また、2回目の刺激以降は1日おきにIL-2入りの培地に交換した。計3回の刺激により誘導されたCD4陽性T細胞 (HLA-DRB1*1501、HLA-DPB1*0901陽性T細胞を、それぞれTA28.1細胞、E15.2細胞とする)を実験に用いた。

- [0055] 3. IFN- γ の測定

TA28.1細胞、およびTA28.1細胞が由来する人から得た末梢血単核球を、20 μ g/ml WT1ペプチドの存在下で24時間培養した。培養後、上清中のIFN- γ の量をELISAキットを用いて定量した。対照として、HLA-DRB1*1501陰性対象由来の末梢血単核球を用いた。結果を図1に示す。TA28.1細胞が、WT1ペプチ

ドをHLA-DRB1*1501分子特異的に認識し、IFN- γ 産生量を増大する(活性化する)ことが確認できた。

[0056] さらに、TA28.1細胞およびE15.2細胞がIL-4およびIL-10を産生しないことをELISAキットを用いて確認した。結果を図2および3に示す。TA28.1およびE15.2細胞がTh1細胞であることを確認した。

[0057] HLA-DPB1*0501/*0501陽性単核球を用いて以下の実験を行った。細胞をX-VIVO(1% AB型血清)に懸濁し、20 μ g/ml WT1ペプチド、10 μ g/ml Brefeldin Aおよび0.5 μ g/ml CD28/49dを添加して、37°C、5% CO₂にて4時間インキュベートした。対照として、WT1ペプチドを添加しないでインキュベートした細胞を用いた。バッファーで洗浄後、抗CD3-perCP抗体および抗CD4-APC抗体を添加し、4°Cで30分間インキュベートした。バッファーで洗浄後、BD Cytofix/Cytopermを用いて細胞を固定・透過処理した(4°C、20分間)。BD perm/wash bufferで洗浄後、抗INF- γ -FITC(BD, clone: B27)および抗IL-17-PE(eBioscience, clone: eBio64DEC17)を添加して4°Cにて30分間インキュベートした。バッファーで洗浄後、FACSAriaを用いて細胞の解析を行った。結果を図4に示す。HLA-DPB1*0501陽性単核球が増殖し、かつIFN- γ およびIL-17を産生することを確認した。

[0058] 4. 増殖アッセイ

増殖アッセイは[³H]-チミジン取り込み法により行った。TA28.1細胞(3×10⁴個)と、WT1ペプチドでパルスし放射線照射した末梢血単核球(HLA-DRB1*1501陽性;1×10⁵個)を96穴プレートで共培養した。共培養して80時間後に、37kBq/ウェル [³H]-チミジン(Amersham Biosciences社)を添加し、さらに16時間インキュベーションして β シンチレーションカウンターで測定した。測定値は、カウント/分(cpm)で表す。対照としてペプチドでパルスしていない末梢血単核球を用いた。また、活性化シグナルがHLA-DRB1*1501分子特異的であることを確認するために、抗MHCクラスI抗体、抗HLA-DR抗体、抗HLA-DQ抗体、抗HLA-DP抗体を用いた。結果を図5に示す。TA28.1細胞が、WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501を介したシグナルにより活性化されて、増殖することを確認した。かかる増殖は、抗H

LA-DR抗体により抑制されることから、HLA-DRB1*1501特異的であることをさらに確認した。

- [0059] 同様に、E15.2細胞を用いて増殖アッセイを行った。対照として、さらにHLA-DPB1*0901陰性対象由来の末梢血単核球も用いた。結果を図6および7に示す。E15.2細胞が、WT1ペプチドとHLA-DPB1*0901を介したシグナルにより活性化されて増殖することを確認した。かかる増殖は、抗HLA-DP抗体により抑制されることから、HLA-DPB1*0901特異的であることをさらに確認した。
- [0060] さらに、HLA-DPB1*0501/*0501陽性単核球を用いて増殖アッセイを行った。対照として、HLA-DPB1*0501陰性対象由来の末梢血単核球も用いた。結果を図8および9に示す。HLA-DPB1*0501/*0501陽性単核球が、WT1ペプチドとHLA-DPB1*0501を介したシグナルにより活性化されて増殖することを確認した。かかる増殖は、抗HLA-DP抗体により抑制されることから、HLA-DPB1*0501特異的であることをさらに確認した。
- [0061] さらに、E15.2細胞の増殖アッセイを種々の濃度のWT1ペプチドを用いて行った。用いたWT1ペプチドの濃度は、0.08、0.4、2、10、50、100および150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。結果を図10に示す。WT1ペプチドが濃度依存性にE15.2細胞を増殖させることを確認した。

産業上の利用可能性

- [0062] 本発明により、HLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子に結合する能力を有するWT1ペプチドを用いて、ヘルパーT細胞を活性化する方法およびそのための組成物、ならびにヘルパーT細胞を活性化することによる癌の治療および／または予防用医薬組成物などが提供されるので、医薬品等の分野、例えば、WT1遺伝子を高発現している種々の造血器腫瘍、固形癌の予防薬または治療薬の開発、製造分野において利用可能である。

請求の範囲

- [1] WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化する工程を含む、ヘルパーT細胞の活性化方法であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、方法。
- [2] WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子およびHLA-DPB1*0501分子のうちの少なくとも2つに結合する能力を有するものである、請求項1記載の方法。
- [3] WT1ペプチドがさらにHLA-DRB1*0405分子および／またはHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有するものである、請求項1または2記載の方法。
- [4] WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、HLA-DPB1*0501分子、HLA-DRB1*0405分子、およびHLA-DRB1*1502分子に結合する能力を有するものである、請求項1から3のいずれか1項記載の方法。
- [5] WT1ペプチドがアミノ酸配列:Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His(配列番号:2)を含むペプチドである、請求項1から4のいずれか1項記載の方法。
- [6] WT1ペプチドの抗原提示細胞への添加が、WT1ペプチドの添加、WT1ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターの添加、または該発現ベクターを含む細胞の添加により行われる、請求項1から5のいずれか1項記載の方法。
- [7] WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化するための、WT1ペプチドを含む組成物であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、組成物。
- [8] WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化する工程を含む、対象における癌の治療または予防方法であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、方法。
- [9] WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加して、ヘルパーT細胞を活性化することにより

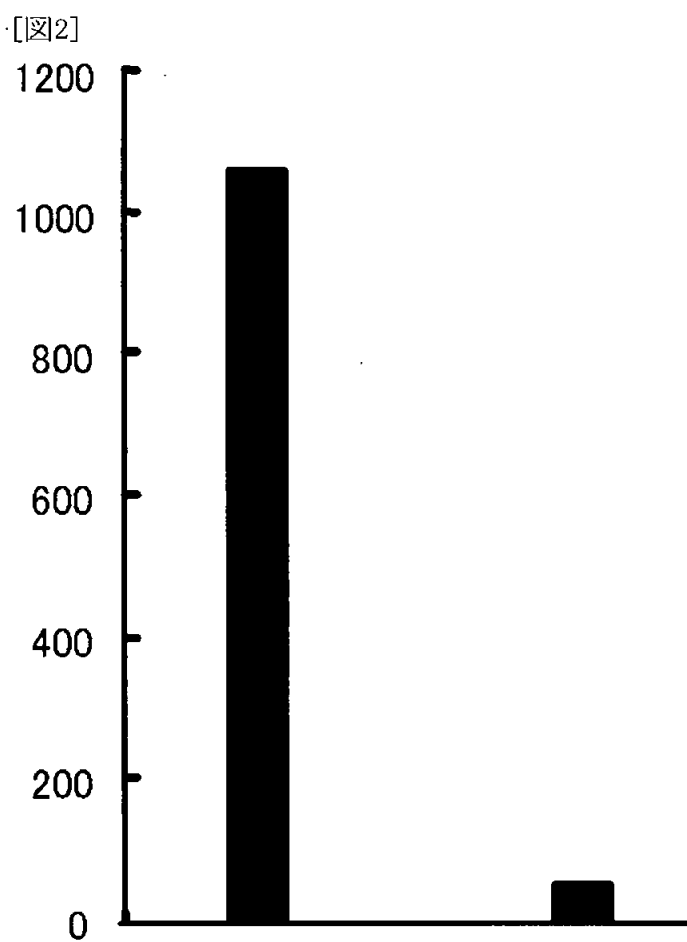
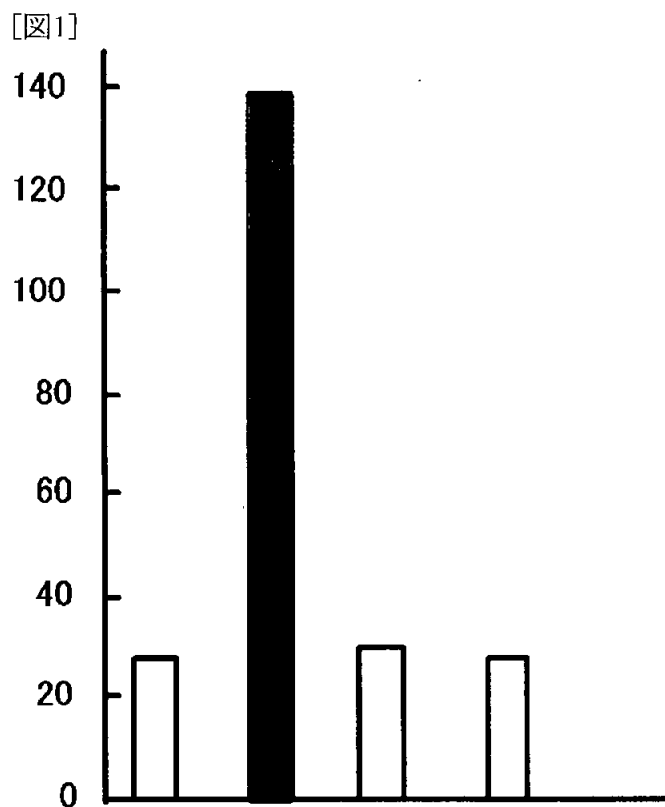
- 、癌を治療または予防するための、WT1ペプチドを含む医薬組成物であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、医薬組成物。
- [10] WT1ペプチドに特異的に結合する抗体であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、抗体。
- [11] HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象のいずれかにおけるWT1ペプチドの存在または量を決定する方法であって、
- (a) 抗WT1抗体を該対象由来試料と反応させ、次に、
- (b) 該試料に含まれるWT1ペプチドと特異的に結合する該抗WT1抗体の存在または量を調べる、
- 工程を含む、方法。
- [12] WT1ペプチドを抗原提示細胞に添加してヘルパーT細胞を活性化し、活性化したヘルパーT細胞を対象に投与する工程を含む、癌の治療または予防方法であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子に結合する能力を有するものである、方法。
- [13] 癌を治療または予防するための、WT1ペプチドを用いて活性化されたヘルパーT細胞を含む医薬組成物であって、該WT1ペプチドがHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子のいずれかに結合する能力を有するものである、医薬組成物。
- [14] HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、またはHLA-DPB1*0501陽性対象のいずれかにおけるWT1特異的ヘルパーT細胞の存在または量を決定する方法であって、
- (a) WT1ペプチドとHLA-DRB1*1501分子、HLA-DPB1*0901分子、またはHLA-DPB1*0501分子との複合体を該対象由来試料と反応させ、次に、
- (b) 該試料に含まれる該複合体を認識するヘルパーT細胞の存在または量を調べる、

工程を含む、方法。

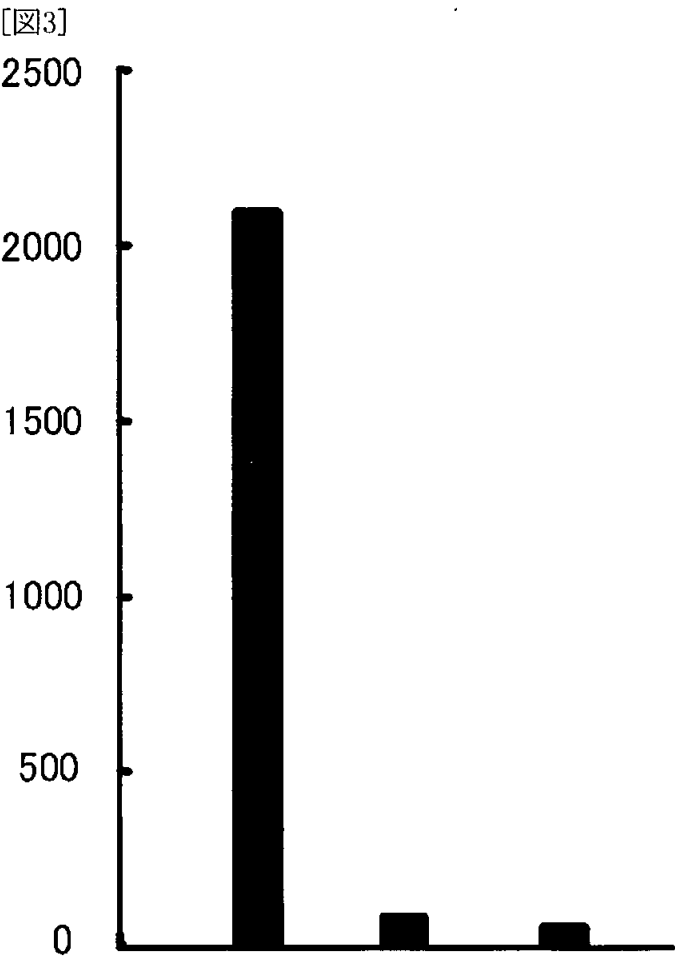
- [15] HLA-DRB1*1501陽性、HLA-DPB1*0901陽性、HLA-DPB1*0501陽性、HLA-DRB1*0405陽性、またはHLA-DRB1*1502陽性対象におけるWT1特異的ヘルパーT細胞の存在または量を決定する方法であって、
- (a) WT1ペプチドを用いて末梢血単核球、浸潤性リンパ球、腫瘍細胞、腹水中の細胞、胸水中の細胞、脳脊髄液中の細胞、骨髄細胞、またはリンパ節細胞を刺激し、
- (b) サイトカイン産生またはヘルパーT細胞の反応の存在または量を調べる、
- 工程を含み、サイトカイン産生またはヘルパーT細胞の反応の存在または量の増大がWT1特異的ヘルパーT細胞の存在または量を示す、方法。

WO 2008/105462

PCT/JP2008/053417



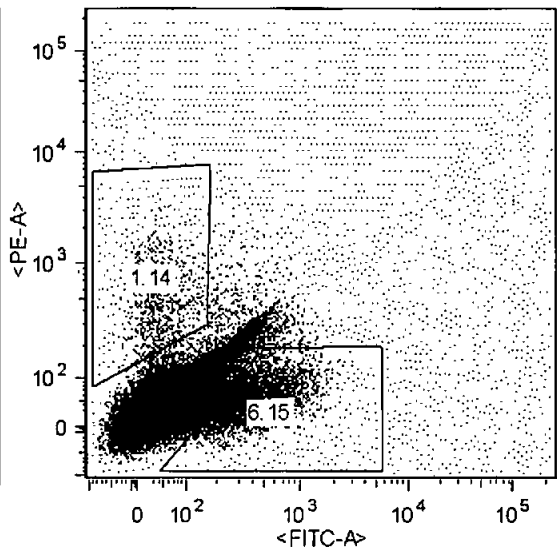
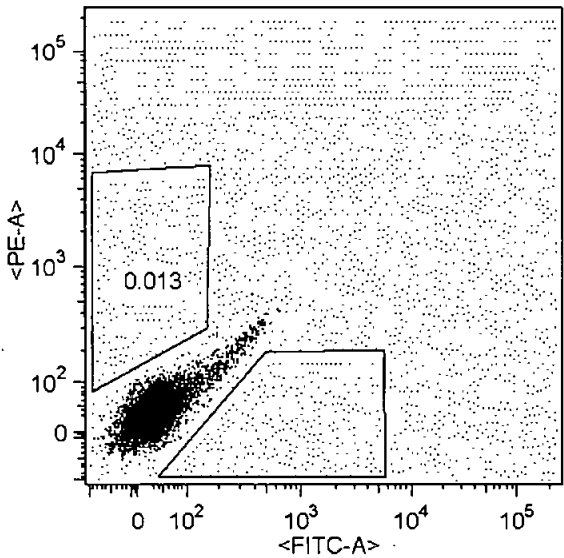
45



[X]4

a)

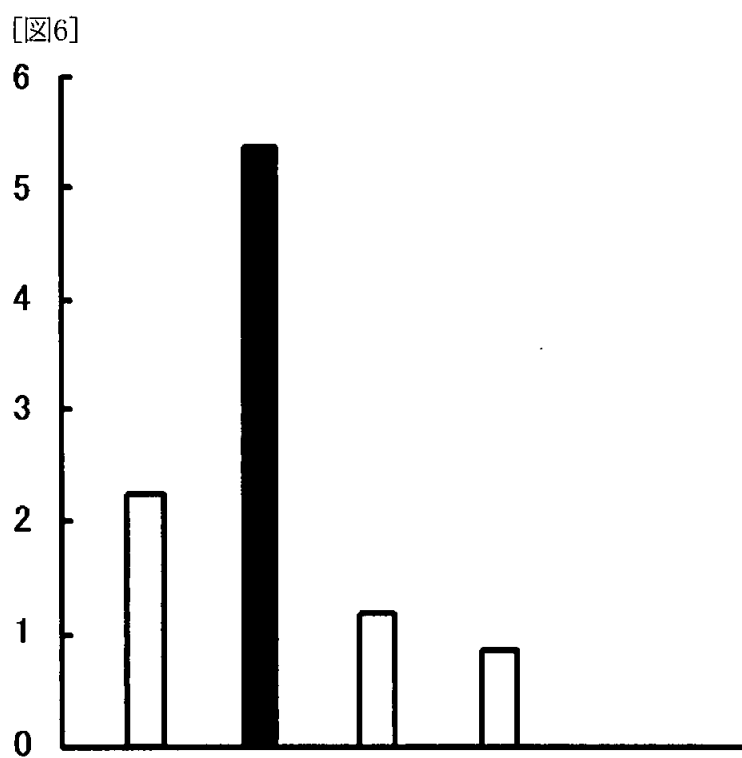
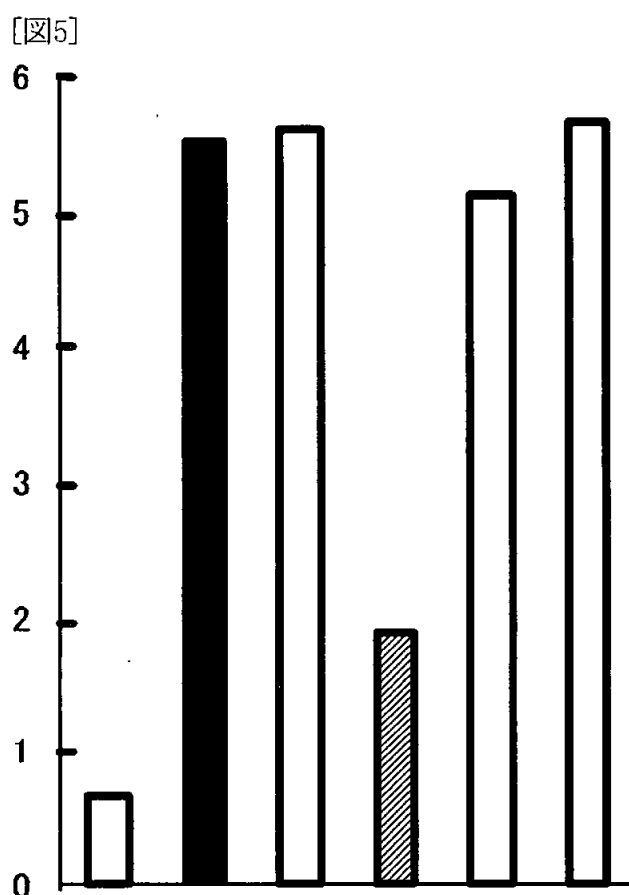
b)



46

WO 2008/105462

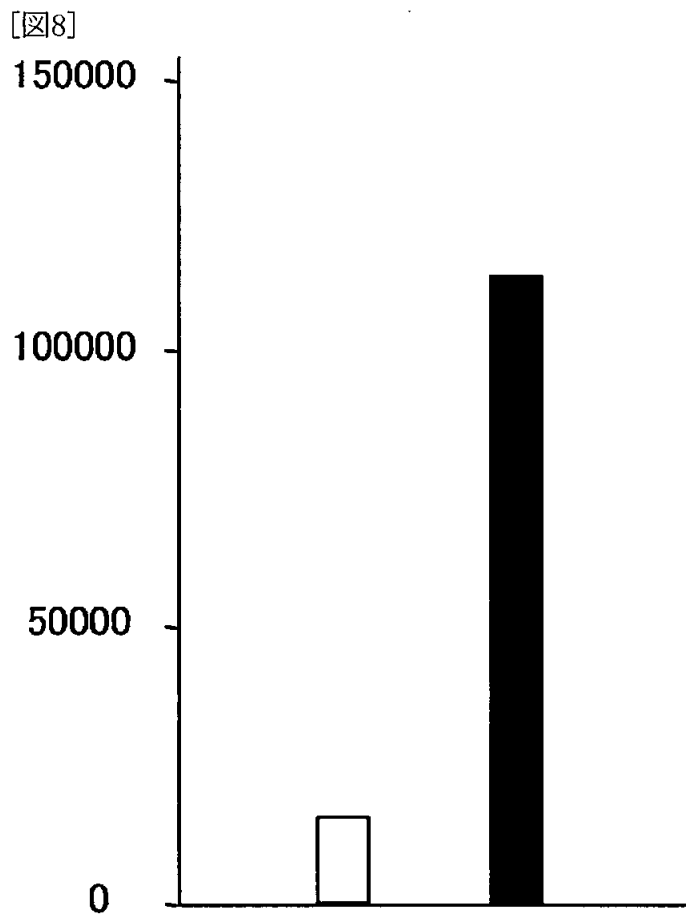
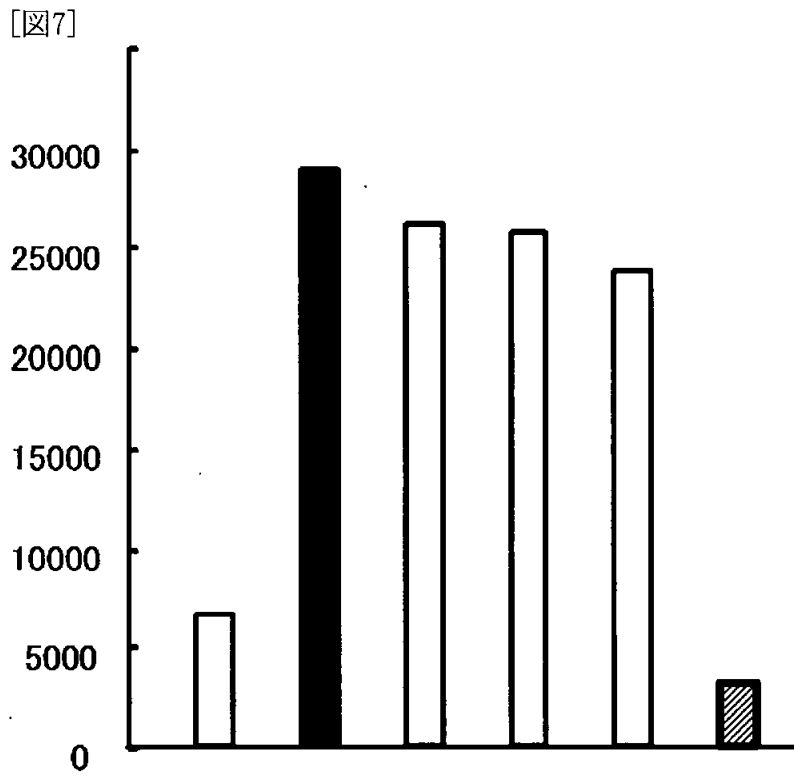
PCT/JP2008/053417



47

WO 2008/105462

PCT/JP2008/053417

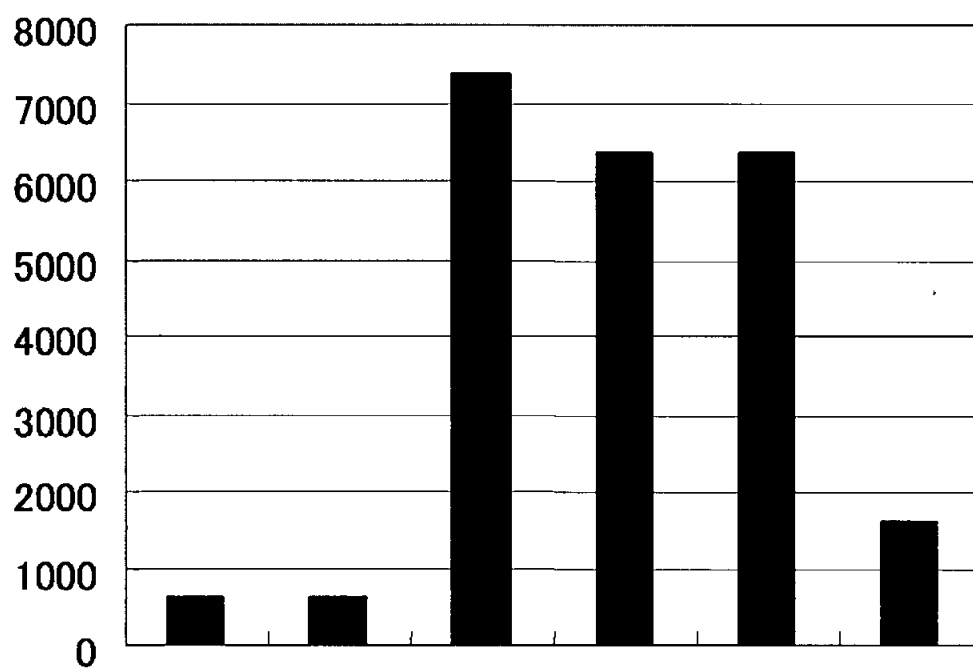


48

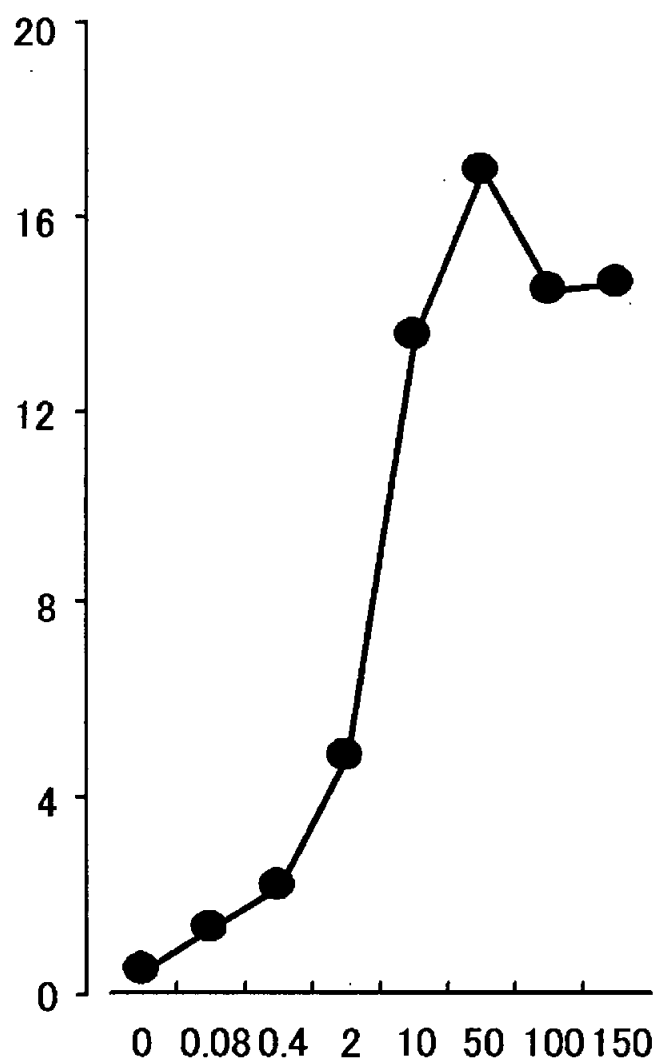
WO 2008/105462

PCT/JP2008/053417

[図9]



[図10]



19

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka University
<120> Method and pharmaceutical composition for activating helper
T cell
<130> 668070
<150> JP 2007-047317
<151> 2007-02-27

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

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

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15
Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
20 25 30
Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
35 40 45
Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
50 55 60
Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
65 70 75 80
Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
85 90 95
Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
100 105 110
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
115 120 125
Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
130 135 140
Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
145 150 155 160
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
165 170 175
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
180 185 190
Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
195 200 205
Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
210 215 220
Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
225 230 235 240
Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser

80

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

Leu

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg	Lys	His
1				5					10					15	

51

METODO PARA ACTIVACION DE CELULA T AUXILIAR Y COMPOSICION PARA

USARSE EN EL METODO

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.

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 una 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 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.

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

54

15;91(8):2969-76.

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.

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.

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

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

SS

como una composición farmacéutica para el tratamiento y/o 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 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 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;

(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;

(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;

(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);

(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 un 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 u 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

9

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

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.

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

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 delección 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-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 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 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 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 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 Iyakuhin 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 describió 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.

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-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 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 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

71

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, 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 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 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-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 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 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 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 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:

(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,

56

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

77

(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 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, 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 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.

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 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 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

21

una molécula de HLA-DPB1*0501.

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 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 μ g/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 μ g/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 Cytotfix/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 FACSaria. 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

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 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.

2.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque 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.

3.- El método de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado además porque 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 las reivindicaciones 1-3, caracterizado además porque 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.

5.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado además porque 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).

6.- El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, 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.

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 un 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.

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 citocina o la reacción de la célula T auxiliar indica la presencia o cantidad de la célula T auxiliar específica de WT1.

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.

9B

P09/1073F

WPC17075 / ID.156359

1/5

Fig. 1

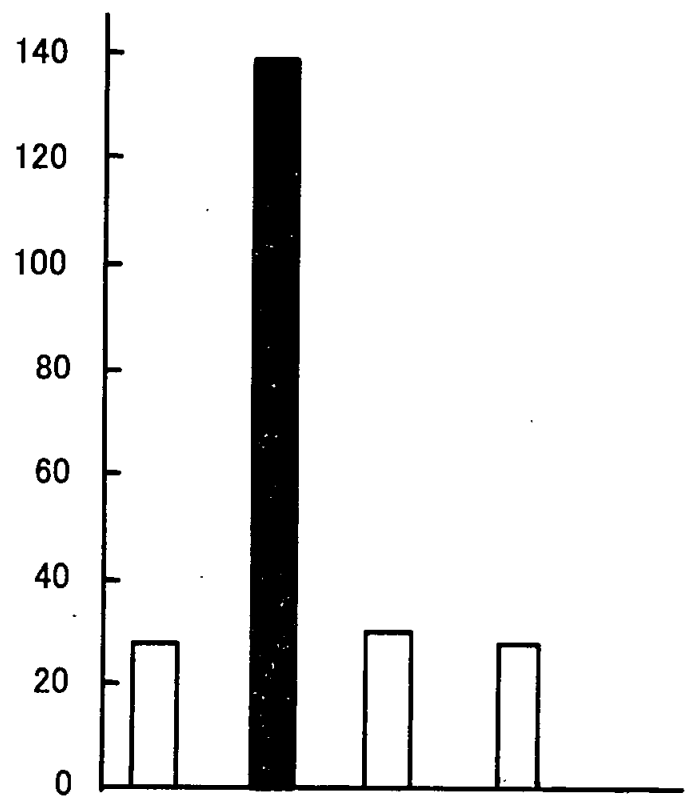


Fig. 2

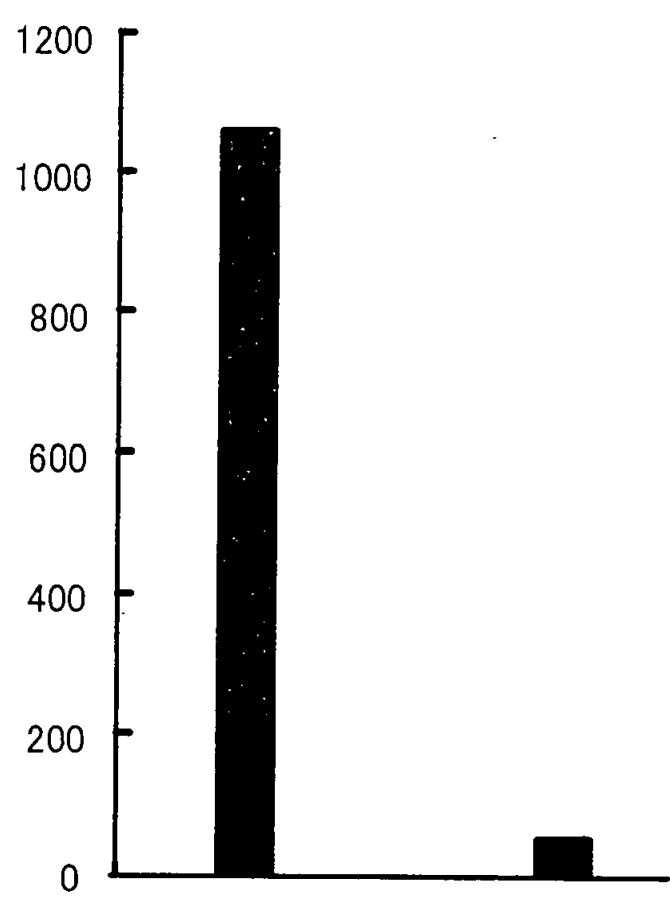


Fig. 3

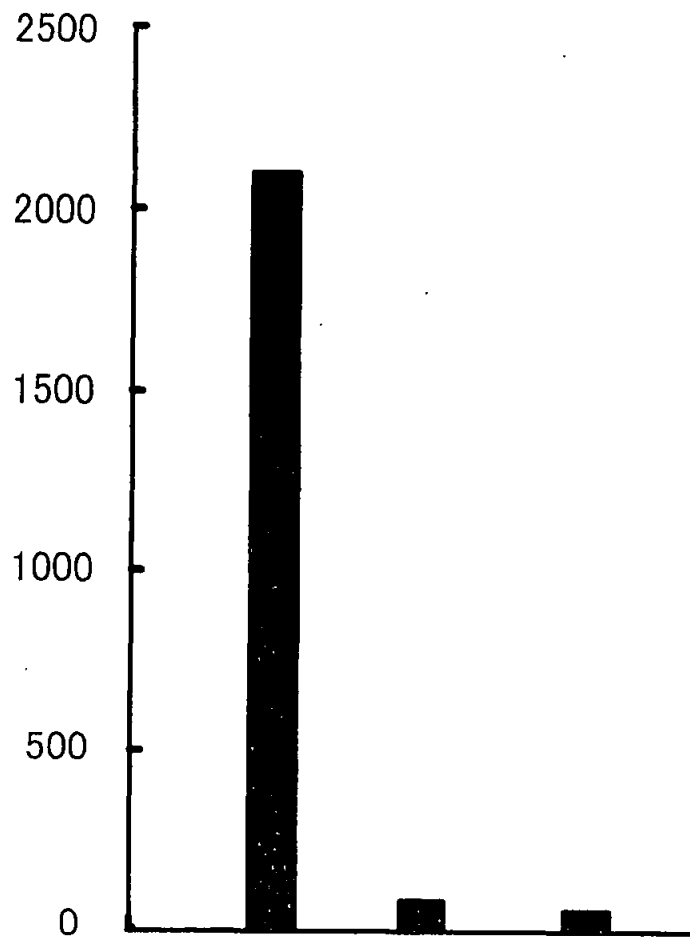
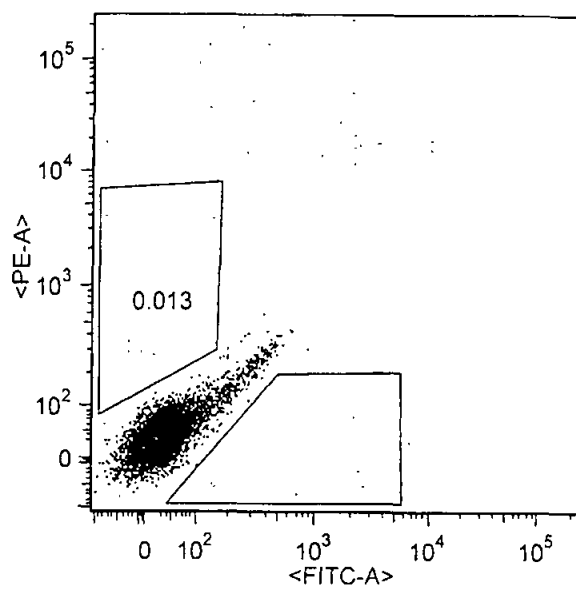


Fig. 4

a)



b)

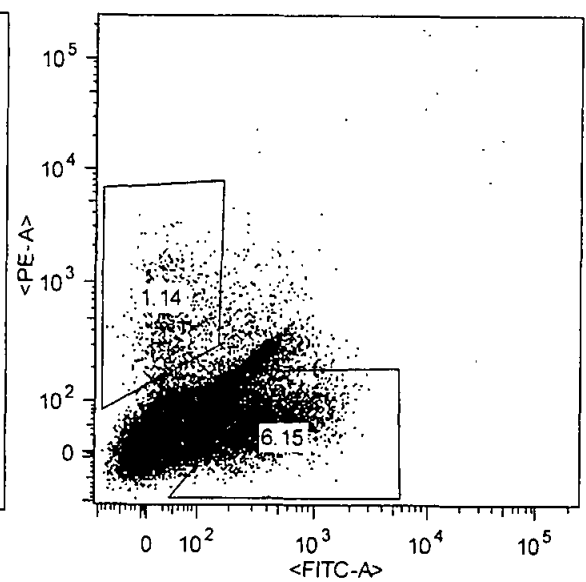


Fig. 5

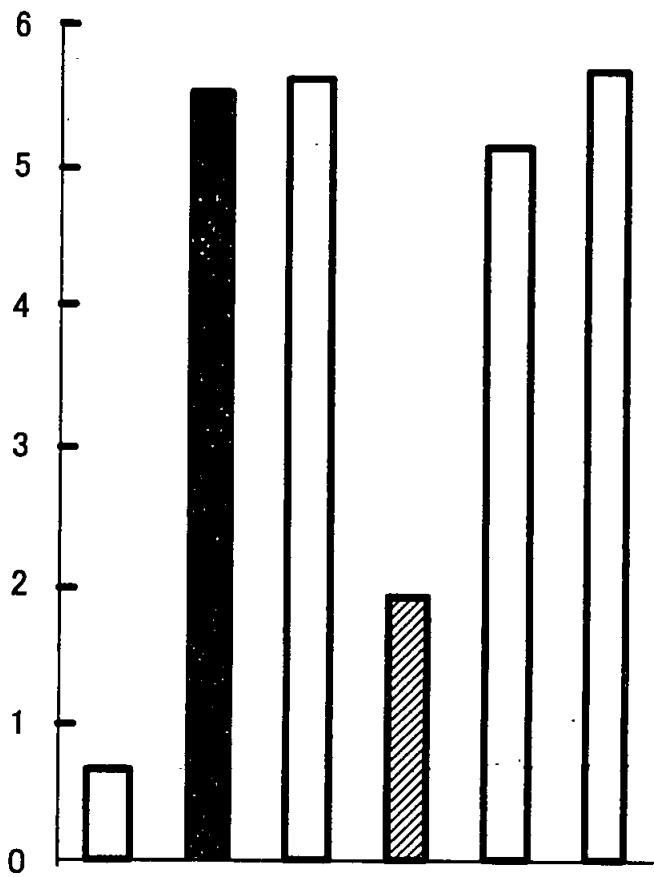
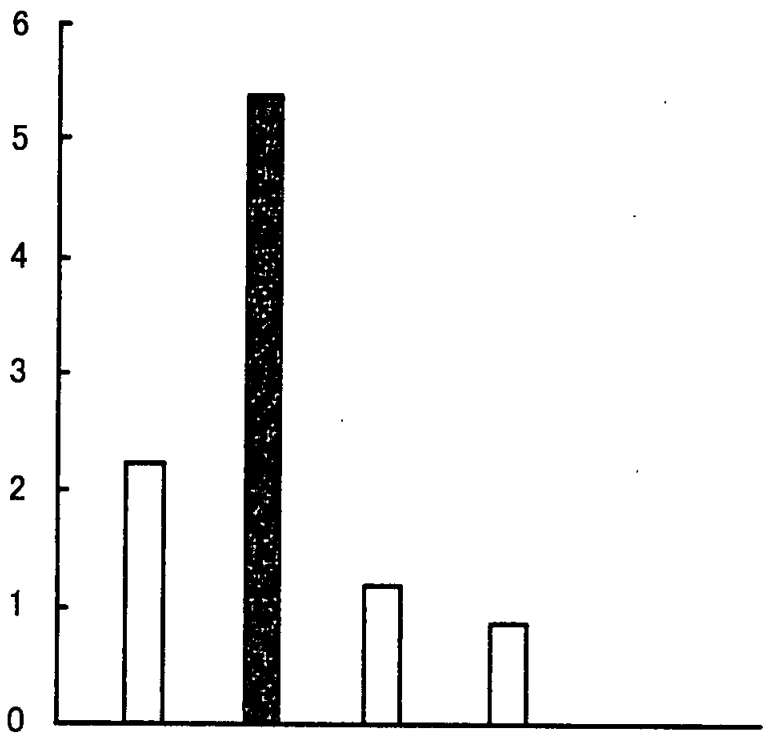


Fig. 6



84

4/5

Fig. 7

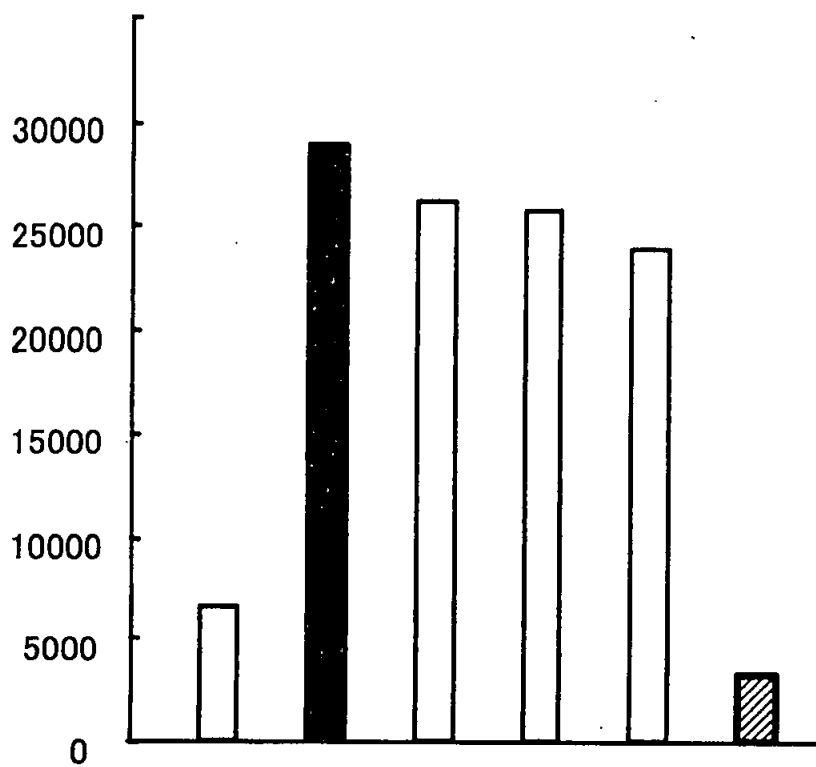
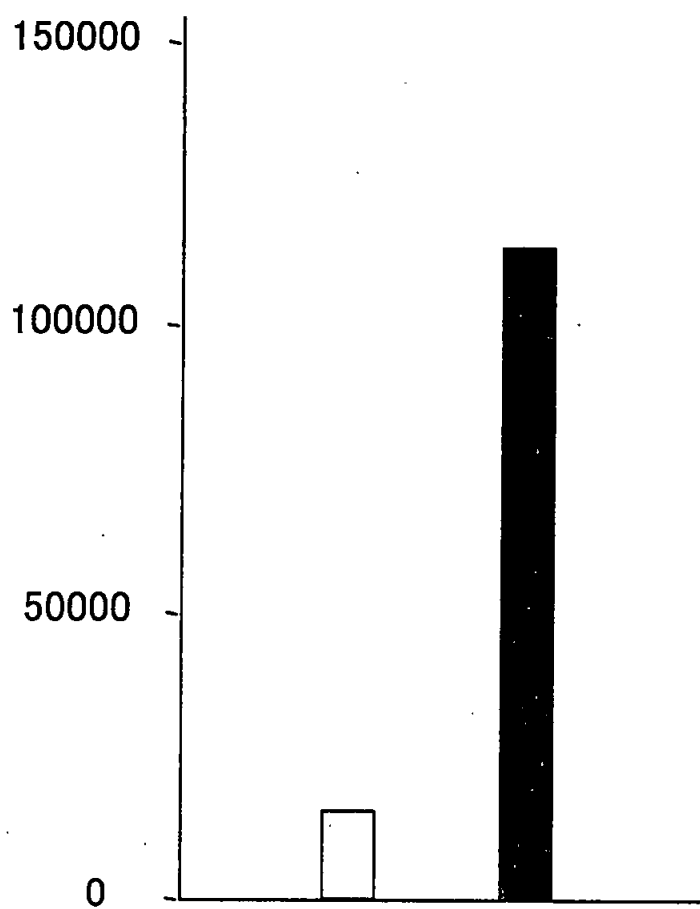


Fig. 8



95

5/5

Fig. 9

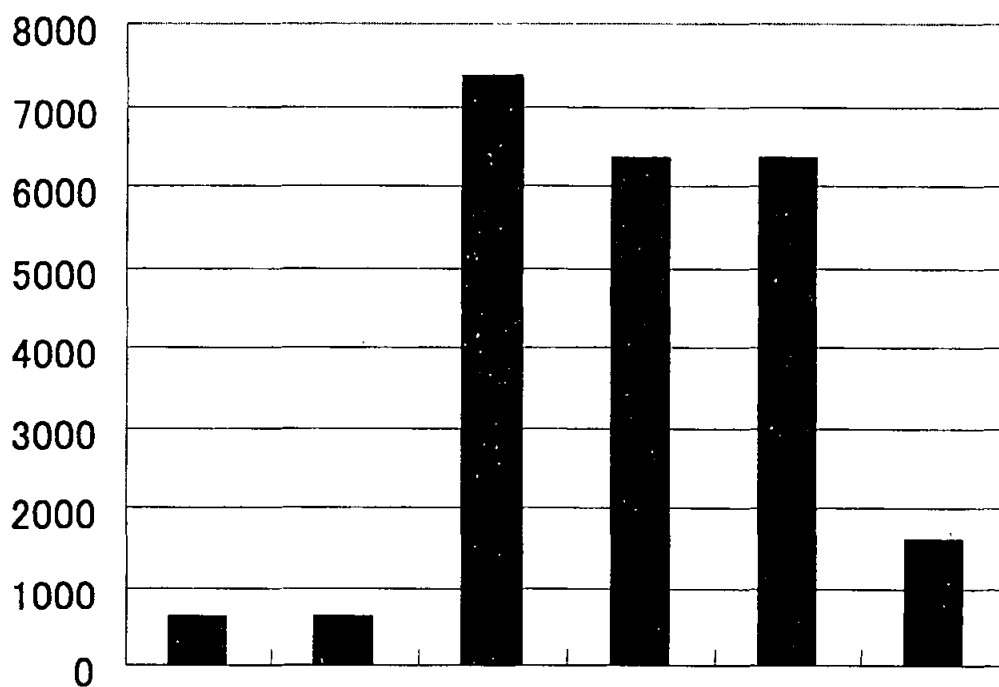
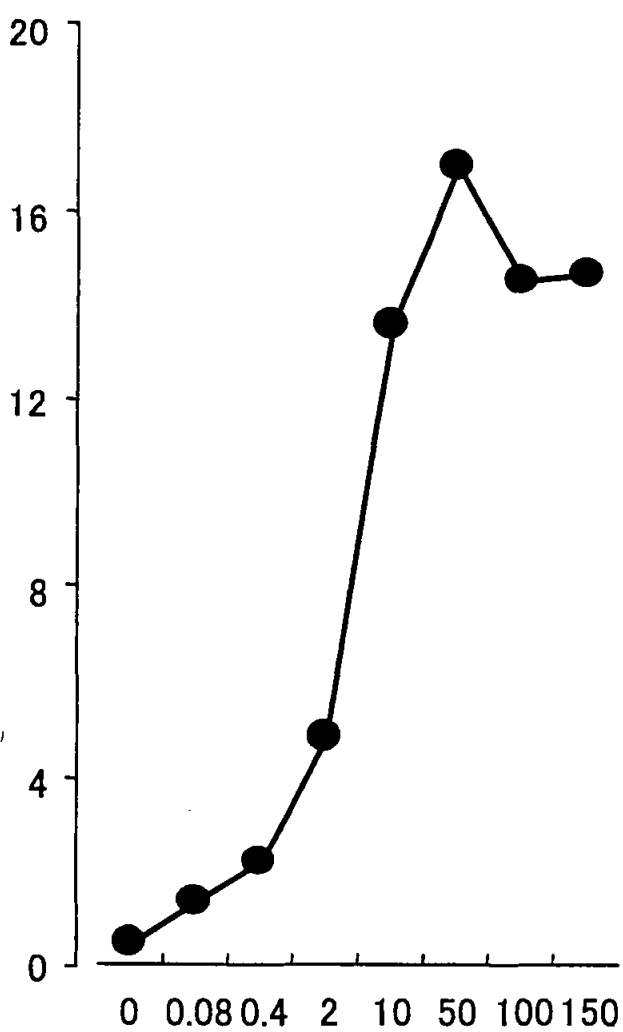


Fig. 10



96

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka University

<120> Method and pharmaceutical composition for activating helper
T cell

<130> 668070

<150> JP 2007-047317

<151> 2007-02-27

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro
1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala
20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro
50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly
65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe
100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe
115 120 125

Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile
130 135 140

Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr
145 150 155 160

Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe
165 170 175

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
195 200 205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
210 215 220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
225 230 235 240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser

97

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

Leu

- <210> 2
- <211> 16
- <212> . PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 2

Lys	Arg	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Gln	Met	His	Ser	Arg	Lys	His
1				5					10					15	

98

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/053417

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/82(2006.01)i, C07K16/32(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K38/00, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00, C07K14/82, C07K16/32, C12N15/00, C12Q1/02, G01N33/53

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), PubMed, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/045027 A1 (SUGIYAMA, Haruo), 19 May, 2005 (19.05.05), Full text & EP 1696027 A1	1-7, 9-11, 13-15
A	SOTIRIADOU, R. et al, Peptide HER2(776-788) represents a naturally processed broad MHC class II-restricted T cell epitope, Br. J. Cancer, 2001, Vol.85, No.10, pp.1527-1534	1-7, 9-11, 13-15
A	HURAL, J.A. et al, Identification of naturally processed CD4 T cell epitopes from the prostate-specific antigen kallikrein 4 using peptide-based in vitro stimulation, J. Immunol., 2002, Vol.169, No.1, pp.557-565	1-7, 9-11, 13-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 April, 2008 (23.04.08)

Date of mailing of the international search report
13 May, 2008 (13.05.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

99

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/053417

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 8, 12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions in claims 8 and 12 pertain to methods for treatment of cancer and methods for treatment of the human body by therapy, thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

300

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 3 4 1 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K14/82(2006.01)i, C07K16/32(2006.01)i, C12N15/00(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09, A61K38/00, A61P35/00, A61P35/02, A61P43/00, C07K14/82, C07K16/32, C12N15/00, C12Q1/02, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), PubMed, JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	WO 2005/045027 A1 (SUGIYAMA, Haruo) 2005.05.19, 全文 & EP 1696027 A1	1-7, 9-11, 13-15	
A	SOTIRIADOU, R. et al, Peptide HER2(776-788) represents a naturally processed broad MHC class II-restricted T cell epitope, Br. J. Cancer, 2001, Vol.85, No.10, pp.1527-1534	1-7, 9-11, 13-15	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー			
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		の日の後に公表された文献	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 23.04.2008		国際調査報告の発送日 13.05.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 森井 隆信	4 B 3 6 3 3
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

101

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 3 4 1 7
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	HURAL, J. A. et al, Identification of naturally processed CD4 T cell epitopes from the prostate-specific antigen kallikrein 4 using peptide-based in vitro stimulation, J. Immunol., 2002, Vol.169, No.1, pp.557-565	1-7, 9-11, 13-15

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

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

- 1. ☒ 請求の範囲 8, 12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 8, 12に係る発明は、癌を治療する方法であって、ヒトの治療方法に関するものであるから、国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
- 2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
- 3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

103

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2008/053417

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To.
TANAKA, Mitsuo AOYAMA & PARTNERS IMP Building 3-7, Shiromi 1-chome Chuo-ku, Osaka-shi Osaka 5400001 JAPON

Date of mailing (day/month/year)
02 July 2008 (02.07.2008)

Applicant's or agent's file reference
668070

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/JP2008/053417

International filing date (day/month/year)
27 February 2008 (27.02.2008)

The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address SAKA UNIVERSITY 1, Yamadaoka Ito-shi, Osaka 5650871 Japan Applicant for all designated States except US)	State of Nationality	State of Residence
	JP	JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
Teleprinter No.		

The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☒ the person	☐ the name	☐ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address International Institute of Cancer Immunology, Inc. -9, Enoki-cho Ito-shi, Osaka 5640053 Japan	State of Nationality	State of Residence
	JP	JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
Teleprinter No.		

Further observations, if necessary.
The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for all designated States except the United States of America.

A copy of this notification has been sent to:	
☒ the receiving Office	☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority	☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Calcagno Remy e-mail pt07.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 07
---	---

105

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

IBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 68,550
HA : SEPTIEMBRE 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103858- -00000-0000

Fecha 2009-09-23 16:54:23 Dep 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

***** CONSIGNACION *****

OSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	17854546	14/09/2009	33,365,000.00

***** C O N C E P T O *****

T. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
	TOTAL :	\$ 540,000.00

: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

PONSABLE :

IBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

17075-841-002-2



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PCT

ATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒

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

Descripción de la invención ☒

Dibujos de ser estos pertinentes ☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐

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

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

Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐

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

Representación gráfica del esquema trazado ☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103858-00000-0000

Fecha: 2009-09-23 16:54:23 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

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

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 107

020
Bogotá D.C.,

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

REFERENCIA	Radicación No.	9 103858
	Solicitud internacional	PCT/JP2008/053417
	Fecha inicio fase nacional	27/09/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	8943
	Folios	1

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

Úmplase
Bogotá DC,

05 OCT. 2009

LIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

dpall