

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SOLICITANTE
PATENTE DE



No. 13-111246-00007-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: ~~93~~ 94

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-004047-00000-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: ~~93~~ 94

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO METODO PARA ACTIVAR CELULAS T AUXILIARES

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC.
Y OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

DOMICILIO OSAKA, JAPON y TOKYO, JAPON, Respectivamente

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 15-004047- -00000-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: **95 94**

**DIRECCIÓN DE N°
CONVERSIÓN, DIVISIÓN**

1. Identificación del Trámite

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-111246- -00007-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: **95 94**

2. Datos del solicitante

Persona Natural

☐

Persona Jurídica

☒

**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC. y OTSUKA
PHARMACEUTICAL CO., LTD.**

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
Japón	13-9, Enoki-cho, Suita-shi, Osaka 5640053, Japón	Osaka
y	y	y
Japón	9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japón	Tokyo
Respectivamente	Respectivamente	Respectivamente
Dirección electrónica		No. Fax
clientes@cavelier.com		2 11 86 50
		Número telefónico
		3 47 36 11

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

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre De Páez Luz Clemencia	Documento de identificación C.C. 35.456.344	Tarjeta profesional T.P.A. 23.555
---	--	--------------------------------------

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
cavelier@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

CONVERSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

DIVISION

Expediente : **13.111.246**
De: _____
A: _____

FUSION

Expediente _____

De: _____
A: _____

5. Comprobante de pago No. 15-000088 Fecha: 2015/01/05
Comprobante de pago No. 15-002206 Fecha: 2015/01/07

6. Anexos

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación solicitud por \$478.000.

☒

Comprobante de pago por 2 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$64.000

☒

Poderes de **INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER IMMUNOLOGY, INC. y OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.**

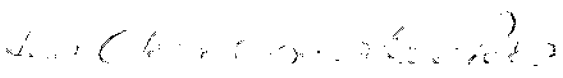
☒

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

☐

Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma

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

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. **13.111.246**. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. **10826** notificado por fijación en lista del 02 de septiembre de 2014. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 03 de mayo de 2013 y la prioridad que allí se reivindica el 05 de octubre de 2010.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. **13.111.246**

MÉTODO PARA ACTIVAR CÉLULAS T AUXILIARES

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a un método para activar células T auxiliares, que incluye el paso de activar las células T auxiliares agregando un péptido WT1 a las células que presentan antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula

10 HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901,

15 una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, una composición del mismo, un método para activar células T citotóxicas, un inductor de activación de las células T citotóxicas (CTL), una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir un cáncer activando las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas, y similares.

20

TÉCNICA ANTERIOR

El gen WT1 (Gen-1 del tumor de Wilms) se identificó como el gen que causa el tumor de Wilms el cual es un cáncer de riñón en la niñez, y

25 el gen codifica un factor de transcripción que tiene una estructura del dedo de zinc (Documentos no patentes 1 y 2). Los estudios subsiguientes mostraron que el gen anterior sirve como gen del cáncer en tumores de órganos hematopoyéticos o cánceres sólidos (Documentos no Patentes 3 a 6).

Se mostró que las células T citotóxicas (CTLs) específicas al péptido se inducen estimulando células mononucleares periféricas *in vitro* utilizando un péptido que tiene una porción de la secuencia de aminoácidos que codifica la proteína WT1, y estas CTLs lesionan las células cancerosas de los tumores de órganos hematopoyéticos o cánceres sólidos que expresan la WT1 en forma endógena. Las CTLs reconocen el péptido anterior en la forma de un complejo unido a una molécula MHC clase I, y de este modo el péptido difiere dependiendo de los subtipos de la MHC Clase I (Documentos de patentes 1 a 4, Documento no patente 7).

Por otro lado, la presencia de células T auxiliares específicas a un antígeno contra el cáncer es importante para inducir las CTLs en forma efectiva (Documento no patente 8). Las células T auxiliares son inducidas y activadas por el reconocimiento de un complejo de una molécula MHC Clase II con un péptido antigénico sobre las células que presentan antígenos. Las células T auxiliares activadas ayudan a la proliferación, diferenciación y maduración de las células B produciendo citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, o interferones. Dado que estas células T auxiliares cumplen la función de activar un sistema inmune promoviendo la proliferación y la activación de las células B y las células T, se sugiere que es útil la mejora de una función de las células T auxiliares a través de un péptido antigénico que se une a una MHC clase II en la inmunoterapia contra el cáncer para mejorar los efectos de una vacuna contra el cáncer. (Documento no patente 9).

Se ha demostrado recientemente que un péptido auxiliar promiscuo que puede unirse a las moléculas MHC Clase II múltiples y activar las células T auxiliares está presente entre los péptidos particulares que tienen una porción de una secuencia de aminoácidos que codifica una proteína WT1 (en adelante, también denominados péptidos WT1 en la presente memoria descriptiva) (documentos de patente 5 y 6). Sin embargo,

fue muy difícil verificar si los péptidos WT1 tienen o no efectos sobre otras moléculas MHC Clase II, debido a la existencia de muchas clases de moléculas MHC Clase II.

5 Documentos de la técnica anterior

Documentos de patentes

Documento de patente 1: Publicación Internacional No. WO
2003/106682

10 Documento de patente 2: Publicación Internacional No. WO
2005/095598

Documento de patente 3: Publicación Internacional No. WO
2007/0973587

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

Documento de patente 5: Publicación Internacional No. WO
2005/0045027

Documento de patente 6: Publicación Internacional No. WO
2008/105462

20

Documentos no patentes

[0007]

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

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

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

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

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

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

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

Documento no patente 8: Gao FG et al., Cancer Res. 2002 Nov
10 15; 62(22):6438-41

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15

Problemas a ser resueltos por la invención

En consecuencia, el objetivo a ser obtenido por la presente
invención consiste en proporcionar un método para activar las células T
auxiliares, un método para activar las células T citotóxicas, aplicando un
20 péptido WT1 particular a una amplia gama de sujetos positivos a la molécula
MHC clase II, un inductor de activación de células T citotóxicas, una
composición farmacéutica para tratar/prevenir un cáncer, y similares.

Medios para resolver los problemas

25

En estas circunstancias, los actuales inventores han estudiado
intensamente y hallado que un péptido tiene la secuencia de aminoácidos: Lys
Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His se une a una
molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula

HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, y activa las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas. De este modo, la presente invención se ha completado.

La presente invención proporciona:

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

20 (2) El método de acuerdo con (1), en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse al menos a dos moléculas MHC Clase II de una HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, y una molécula HLA-DPB1*0301;

25 (3) El método de acuerdo con (1) o (2), en donde el péptido WT1 además tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula DRB1*1502, una molécula HLA-

DPB1*0501, y/o una molécula HLA-DPB1*0901;

(4) El método de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en donde la adición de un péptido WT1 a las células que presentan antígenos se lleva a cabo agregando un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polipéptido, o células que
5 contienen el vector de expresión;

(5) El método de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2),
10 una variante o una modificación de la misma;

(6) Una composición que contiene un péptido WT1 para activar las células T auxiliares, agregando un péptido WT1 a las células que presentan antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una
15 molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301;

(7) La composición de acuerdo con (6), en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse al menos a dos moléculas MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101,
20 una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, y una molécula HLA-DPB1*0301;

(8) La composición de acuerdo con (6) o (7), en donde el péptido WT1 además tiene la capacidad de unirse a una molécula HLA-DRB1*0405,

una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, y/o una molécula HLA-DPB1*0901;

(9) La composición de acuerdo con cualquiera de (6) a (8), en donde la adición de un péptido WT1 a las células que presentan antígenos se
5 lleva a cabo agregando un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polipéptido, o células que contienen el vector de expresión;

(10) La composición de acuerdo con cualquiera de (6) a (9), en donde el péptido WT1 es un péptido que contiene la secuencia de
10 aminoácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2), una variante o una modificación de la misma;

(11) Las células que presentan antígenos las cuales presentan un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula MHC clase II, en donde la molécula MCH Clase II es cualquier
15 molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-
20 DPB1*0301;

(12) Las células T auxiliares las cuales reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula MHC clase II, en donde la molécula MCH Clase II es cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una
25 molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301;

(13) Las células T citotóxicas las cuales son activadas por las células T auxiliares de acuerdo con (11);

(14) Una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer, que incluye, como ingrediente activo, cualquiera de la composición de acuerdo con (6) a (10), las células que presentan antígenos de acuerdo con (11), las células T auxiliares de acuerdo con (12), o las células T citotóxicas de acuerdo con (13);

(15) Una composición farmacéutica para activar las células T citotóxicas, que incluye, como ingrediente activo un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido, o células que contienen el vector de expresión, y la cual se administra a un sujeto que tiene cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, una molécula HLA-DPB1*0301, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101;

(16) Un anticuerpo que se une específicamente a un péptido WT1, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, y una molécula HLA-DPB1*0301;

(17) Un método para determinar la presencia o la cantidad de

células T auxiliares específicas de WT1 en un sujeto positivo con respecto a cualquier molécula MHC Clase II de molécula HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0403, HLA-DRB1*0406, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB3*0202, HLA-DRB4*0101, HLA-
 5 DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, el método incluye los pasos de:

(a) estimular una muestra que se obtiene del sujeto utilizando un péptido WT1, y

(b) determinar la presencia o la cantidad de citoquinas o células
 10 T auxiliares, en donde el aumento de la presencia o cantidad de citoquinas o células T auxiliares muestra la presencia o cantidad de las células T auxiliares específicas del WT1.

Efectos de la invención

15 De acuerdo con la presente invención, un método para activar las células T auxiliares, una composición para el mismo, un método para activar las células T citotóxicas, una composición para las mismas, un inductor de activación de las células T citotóxicas, una composición farmacéutica para tratar y/o prevenir un cáncer activando las células T auxiliares y las células T
 20 citotóxicas, y similares se obtienen aplicando un péptido WT1 a una amplia gama de sujetos que tienen cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula
 25 HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, permitiendo de este modo

la activación de las células T auxiliares y las células T citotóxicas e *in vitro* en sujetos que tienen esta molécula MHC Clase II, y el tratamiento y prevención de un cáncer, y similar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados que se obtienen midiendo la cantidad de IFN- γ después de co-cultivar las células T inducidas a partir de PBMCs que derivan del donante 1 (HLA-DRB1*0406/1201-, DRB3*0101-, y DRB4*0103-positivo) con los PBMCs que derivan de varios donantes impulsados con WT1-332. En el dibujo, la ordenada denota la cantidad de IFN- γ (pg/ml) en un líquido sobrenadante después del co-cultivo. En el dibujo, la abscisa denota los tipos de moléculas HLA-DRB1, 3 y 4 las cuales son positivas en los diversos donantes.

La figura 2 muestra los resultados que se obtienen midiendo la cantidad de IFN- γ después de co-cultivar las células T inducidas a partir de PBMCs que derivan del donante 2 (HLA-DRB1*0901/1101-, DRB3*0202-, y DRB4*0103-positivo) con los PBMCs que derivan de varios donantes impulsados con WT1-332. En el dibujo, la ordenada denota la cantidad de IFN- γ (pg/ml) en un líquido sobrenadante después del co-cultivo. La abscisa denota los tipos de moléculas HLA-DRB1, 3 y 4 las cuales son positivas en los diversos donantes.

La figura 3 muestra los resultados que se obtienen midiendo la cantidad de IFN- γ después de co-cultivar las células T inducidas a partir de 25 PBMCs que derivan del donante 3 (HLA-DRB1*0401/0405-, y DRB3*0102,0103-positivo) con los PBMCs que derivan de varios donantes impulsados con WT1-332. En el dibujo, la ordenada denota la cantidad de IFN- γ (pg/ml) en un líquido sobrenadante después del co-cultivo. La abscisa

denota los tipos de moléculas HLA-DRB1 y 4 las cuales son positivas en los diversos donantes positivos.

La figura 4 muestra los resultados que se obtienen midiendo la cantidad de IFN- γ después de co-cultivar las células T inducidas a partir de PBMCs que derivan del donante 4 (HLA-DRB1*0901/1101-, DRB3*0202-, y DRB4*0103-positivo) con los PBMCs que derivan de varios donantes impulsados con WT1-332. En el dibujo, la ordenada denota la cantidad de IFN- γ (pg/ml) en un líquido sobrenadante después del co-cultivo. La abscisa denota los tipos de moléculas HLA-DRB1, 3 y 4 las cuales son positivas en los diversos donantes positivos.

La figura 5 muestra que las proteínas monómeras HLC Clase II (DRB1*0101, DRB1*0405, DRB1*1501, DRB1*1502, DRB1*0803, DRB1*0901 y DRB4*0101) estuvieron asociadas específicamente con varios péptidos. En el dibujo, la ordenada denota el grado de cambio del tiempo de retención (minutos). La abscisa denota los tipos de proteínas monómeras HLC Clase II. Además, los gráficos de barra muestran los tipos de péptidos que se agregan [desde la izquierda, control negativo ($\square$), control positivo ($\blacksquare$), y WT1-332 ($\square$ sombreado)].

La figura 6 muestra que la proporción de Th1 específica de WT1-332 (la proporción de células CD4 positivas/células IFN- γ positivas intracelulares) aumenta dependiendo del tiempo y significativamente cuando las células T inducidas de los PBMCs que derivan de donantes sanguíneos saludables (en total 42 donantes que tienen al menos una de HLA-DRB1*1501, 1502, 0405, HLA-DPB1*0501, y 0901) se estimularon con WT1-332. En el dibujo, la ordenada denota la proporción (%) del número de células CD4 positivas /el número de células IFN- γ positivas intracelulares en células vivas, y la abscisa denota los días de cultivo (días). Además, el símbolo “●” denota la proporción en muestras inducidas por la adición de WT1-332 (grupo

de inducción WT1-332), y el símbolo "O" denota la proporción en muestras inducidas por la adición de un solvente (control) (grupo de inducción de solvente).

La figura 7 muestra el número de células CTL específicas de WT1-332 (la proporción de células CD8 positivas/células IFN- γ positivas) aumenta dependiendo del tiempo y significativamente cuando las células T inducidas de los PBMCs que derivan de donantes sanguíneos saludables (en total 42 donantes que tienen al menos una de HLA-DRB1*1501, 1502, 0405, HLA-DPB1*0501, y 0901) se estimularon con WT1-332. En el dibujo, la ordenada denota la proporción (%) del número de células CD8 positivas /el número de células IFN- γ positivas intracelulares en células vivas, y la abscisa denota los días de cultivo (días). Además, el símbolo "●" denota la proporción en muestras inducidas por la adición de WT1-332 (grupo de inducción WT1-332), y el símbolo "O" denota la proporción en muestras inducidas por la adición de un solvente (control) (grupo de inducción de solvente).

La figura 8 muestra la restricción de HLA-DR de 17 muestras (donantes 21 a 37) en las cuales la Th1 específica de WT1-332 estuvo inducida en la figura 6 y la figura 7. En cada muestra, una producción de IFN- γ específica de WT1-332 se reconoció cuando las células T el día 14 después de la inducción por la adición de WT1-332 se estimularon con WT1-332, y la producción de IFN- γ se inhibió cuando las células se cultivaron con la adición de un anticuerpo anti-HLA-DR. Esto muestra que las células T inducidas por WT1-332 se restringen por HLA-DR. En el dibujo, la ordenada denota el número de donante (donantes 21 a 37), y la abscisa denota la cantidad de IFN- γ producida (pg/ml). Además, el símbolo "■" denota la cantidad de IFN- γ producida después de la estimulación del WT1-332, el símbolo "□ sombreado" denota la cantidad de IFN- γ producida después de la estimulación del WT1-332 +anticuerpo anti-HLA-DR, y el símbolo "□" denota la cantidad de IFN- γ

producida después de la estimulación del solvente (control).

La figura 9 muestra que la proporción del número de células Th1 específicas del WT1-332 (células CD4 positivas/ células IFN- γ positivas intracelulares) aumenta cuando las células T el día 14 después de la inducción por la adición de WT1-332 son estimuladas con WT1-332 en cada una de las 17 muestras (donantes 21 a 37) que tiene Th1 específica de WT1-332 restringida por HLA-DR inducida en la figura 6 y la figura 7. En el dibujo, la ordenada denota el número de donantes (donantes 21 a 37), y la abscisa denota la proporción (%) del número de células CD4 positivas/el número de células IFN- γ positivas intracelulares en células vivas. Además, el símbolo "■" denota la proporción después de la estimulación del WT1-332, y el símbolo "□" denota la proporción después de la estimulación del solvente (control).

La figura 10 muestra que la proporción del número de células CTL específicas del WT1-332 (células CD8 positivas/ células IFN- γ positivas intracelulares) aumenta cuando las células T el día 14 después de la inducción por la adición de WT1-332 son estimuladas con WT1-332 en cada una de las 17 muestras (donantes 21 a 37) que tiene Th1 específica de WT1-332 restringida por HLA-DR inducida en la figura 6 y la figura 7. En el dibujo, la ordenada denota el número de donantes (donantes 21 a 37), y la abscisa denota la proporción (%) del número de células CD8 positivas/el número de células IFN- γ positivas intracelulares en células vivas. Además, el símbolo "■" denota la proporción después de la estimulación del WT1-332, y el símbolo "□" denota la proporción después de la estimulación del solvente (control).

La figura 11 muestra la restricción de HLA-DP de 9 muestras (donantes 38 a 46) en las cuales la Th1 específica de WT1-332 estuvo inducida en la figura 6 y la figura 7. En cada muestra, una producción de IFN- γ específica de WT1-332 se reconoció cuando las células T el día 14 después de la inducción por la adición de WT1-332 se estimularon con WT1-332, y la

producción de IFN- γ se inhibió cuando las células se cultivaron con la adición de un anticuerpo anti-HLA-DR, y además cuando las células se cultivaron con la adición de un anticuerpo anti-HLA-DQ. Esto muestra que las células T inducidas por WT1-332 se restringen por HLA-DP. En el dibujo, la ordenada denota el número de donante (donantes 38 a 46), y la abscisa denota la cantidad de IFN- γ producida (pg/ml). Además, el símbolo "■" denota la cantidad de IFN- γ producida después de la estimulación del WT1-332, el símbolo "□ sombreado" denota la cantidad de IFN- γ producida después de la estimulación del WT1-332 + anticuerpo anti-HLA-DR, y el símbolo "□" sombreado denota la cantidad de IFN- γ producida después de la estimulación del WT1-332 + anticuerpo anti-HLA-DQ, y el símbolo "□" denota la cantidad de IFN- γ producida después de la estimulación del solvente (control).

La figura 12 muestra que la proporción del número de células Th1 específicas del WT1-332 (células CD4 positivas/ células IFN- γ positivas intracelulares) aumenta cuando las células T el día 14 después de la inducción por la adición de WT1-332 son estimuladas con WT1-332 en cada una de las 9 muestras (donantes 38 a 46) que tiene Th1 específica de WT1-332 restringida por HLA-DP inducida en la figura 6 y la figura 7. En el dibujo, la ordenada denota el número de donantes (donantes 38 a 46), y la abscisa denota la proporción (%) del número de células CD4 positivas/el número de células IFN- γ positivas intracelulares en células vivas. Además, el símbolo "■" denota la proporción después de la estimulación del WT1-332, y el símbolo "□" denota la proporción después de la estimulación del solvente (control).

La figura 13 muestra que la proporción del número de células CTL específicas del WT1-332 (células CD8 positivas/ células IFN- γ positivas intracelulares) aumenta cuando las células T el día 14 después de la inducción por la adición de WT1-332 son estimuladas con WT1-332 en cada una de las 9 muestras (donantes 38 a 46) que tiene Th1 específica de WT1-

332 restringida por HLA-DP inducida en la figura 6 y la figura 7. En el dibujo, la ordenada denota el número de donantes (donantes 38 a 46), y la abscisa denota la proporción (%) del número de células CD8 positivas/el número de células IFN-γ positivas intracelulares en células vivas. Además, el símbolo "■" denota la proporción después de la estimulación del WT1-332, y el símbolo "□" denota la proporción después de la estimulación del solvente (control).

Modos para llevar a cabo la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para activar las células T auxiliares o las células T citotóxicas, que incluye el paso de activar las células T auxiliares o las células T citotóxicas agregando un péptido WT1 a las células que presentan antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a una molécula MHC Clase II. En la presente invención, el paso de activar las células T citotóxicas puede llevarse a cabo pasando a través del paso de activar las células T auxiliares. Además, el péptido WT1 que se utiliza en la presente invención es uno que tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC clase II de una molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301. Además, el péptido WT1 que se utiliza en la presente invención puede ser uno que tiene la capacidad de unirse al menos a dos o más moléculas MHC clase II de las moléculas MHC clase II anteriores. Además, el péptido WT1 que se utiliza en la presente invención puede tener la capacidad

de unirse a cualquier molécula MHC clase II, por ejemplo de las moléculas HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP.

En la presente invención, el péptido WT1 puede ser un péptido que tiene una porción de una secuencia de aminoácidos de una proteína WT1 humana que se describe en la SEQ ID NO: 1. El péptido de acuerdo con la presente invención no tiene limitación particular en su secuencia de aminoácidos y en la longitud en la medida que tenga la característica anterior. Sin embargo, un péptido demasiado largo es susceptible a una acción de proteasa, y un péptido demasiado corto no puede unirse bien a un surco que acomoda al péptido. La longitud del péptido de acuerdo con la presente invención es con preferencia una de 10 a 25 aminoácidos, con mayor preferencia 15 a 21 aminoácidos, con mayor preferencia 16 a 20 aminoácidos, por ejemplo, de 16 aminoácidos, 17 aminoácidos, 18 aminoácidos, o 19 aminoácidos. Los ejemplos específicos del péptido de acuerdo con la presente invención son aquéllos que contienen la secuencia de aminoácidos. Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO: 2).

Además, el péptido WT1 que se utiliza en la presente invención incluye las variantes del péptido anterior. Las variantes pueden contener, por ejemplo, un péptido seleccionado el grupo integrado por péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos en la cual varios aminoácidos, por ejemplo 1 a 9, con preferencia 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, con mayor preferencia 1 a 2 aminoácidos, con máxima preferencia un aminoácido en la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO: 2 está/están sustituidos, suprimidos o agregados. La sustitución de aminoácidos en los péptidos se puede llevar a cabo en cualquier posición y con cualquier tipo de aminoácidos, y se prefiere la sustitución de aminoácidos conservadores. Los ejemplos de la sustitución de aminoácidos conservadores incluyen la sustitución de un residuo Glu con un residuo Asp, un residuo Phe con un residuo Tyr, un

residuo Leu con un residuo Ile, un residuo Ala con un residuo Ser, un residuo His con un residuo Arg y similares. Con preferencia, la adición o la supresión de aminoácidos se pueden llevar a cabo en el terminal N y el terminal C en los péptidos, pero se puede llevar a cabo en una secuencia interior. Los ejemplos

5 específicos preferidos de los péptidos de acuerdo con la presente invención son aquéllos que tienen la SEQ ID NO: 2. En esta conexión, cualquiera de los péptidos puede tener la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC clase II de una cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula

10 HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201,

15 o una molécula HLA-DPB1*030, y debe activar las células T auxiliares o las células T citotóxicas (en la presente, también denominadas CTL). En la presente memoria descriptiva, el péptido WT1 anterior también se denomina "WT1-332". Además, las moléculas MHC humanas se denominan en general moléculas HLA, y por lo tanto, la MHC se utiliza como sinónimo de HLA en la

20 presente memoria descriptiva.

Además, los péptidos de acuerdo con la presente invención pueden ser aquéllos que se obtienen por la modificación de la secuencia de aminoácidos anterior. Los residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos anterior se pueden modificar mediante un método conocido. Esta

25 modificación puede ser, por ejemplo, la esterificación, alquilación, halogenación, fosforilación y similar sobre un grupo funcional en una cadena lateral de un residuo de aminoácidos. Además, es posible unir varias sustancias al terminal N y/o terminal C de un péptido que contiene la

secuencia de aminoácidos anterior. Por ejemplo, un aminoácido, un péptido, un análogo del mismo y similar puede unirse al péptido. Por ejemplo, se puede agregar una marca de histidina, o se puede formar una proteína de fusión junto con una proteína tal como tioredoxina. En forma alternativa, una

5 etiqueta detectable se puede unir al péptido WT1. En caso de que estas sustancias se unan al péptido de acuerdo con la presente invención, éstas se pueden tratar, por ejemplo, mediante una enzima *in vivo* y similar, o mediante un procedimiento tal como un procesamiento intracelular para generar finalmente un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos anterior,

10 la cual está presente sobre la superficie celular en forma de un complejo con una molécula MHC clase II, pudiendo de este modo obtener un efecto de inducción de las células T auxiliares y/o células T citotóxicas. Estas sustancias pueden las que regulan la solubilidad del péptido de acuerdo con la presente invención, las que mejoran la estabilidad del péptido tal como la resistencia de

15 la proteasa, las que permiten la entrega específica del péptido de la presente invención, por ejemplo, a un tejido u órgano dado, o las que tienen una acción mejorada de la eficiencia de recaptación de las células que presentan antígenos y otra acción. Además, estas sustancias pueden ser las que aumentan la capacidad de inducir las CTL, por ejemplo, los péptidos auxiliares

20 que no son el péptido de acuerdo con la presente invención.

El péptido WT1 que se utiliza en la presente invención se puede sintetizar utilizando un método que se utiliza usualmente en la técnica o un método modificado del mismo. Este tipo de método de síntesis se divulga, por ejemplo, en Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins,

25 Vol. 2, Academic Press Inc., New York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1975; Basis and Experiments of Peptide Synthesis, Maruzen Co., Ltd., 1985; Development of Medicines (continuación), Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa Shoten Co., 1991, y similares. Además, el péptido que se

utiliza en la presente invención se puede preparar utilizando una técnica de ingeniería genética sobre la base de la información de una secuencia nucleotídica que codifica el péptido. Este tipo de técnica de ingeniería genética es bien conocida por los expertos en la técnica. Esta técnica se puede conducir de acuerdo con los métodos tales como los que se describen en las literaturas (Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983); DNA Cloning, DM. Glover, IRL PRESS (1985)).

Además, la presente invención se refiere a un secuencia polinucleotídica que codifica el péptido WT1 que se describió anteriormente.

- 10 La secuencia polinucleotídica que codifica el péptido WT1 puede ser una secuencia de ADN o una secuencia ARN. En la presente invención, esta secuencia polinucleotídica se puede utilizar en lugar del péptido WT1. Esta secuencia polinucleotídica se puede utilizar integrándola a un vector adecuado. El vector incluye plásmidos, vectores fago, vectores virus y similares, por ejemplo, pUC118, pUC119, pBR322, pCR3, pYES2, pYEUra3, pKCR, pCDM8, pGL2, pcDNA3.1, pRc/RSV, pRc/CMV, pAcSGHisNT-A, λZAPII, λgt11 y similares. El vector puede contener, según sea necesario, factores tales como un promotor que induce de expresión, un gen que codifica una secuencia de señal, un gen marcador para selección, y un terminador. Un método para introducir estos genes en células o cuerpos vivos, un método para expresarlos y similares son conocidos por los expertos en la técnica.

- 25 Las células que presentan antígenos que se utilizan en la presente invención son aquéllas que pueden presentar un péptido antigénico que contiene el péptido WT1 anterior junto con una molécula MHC Clase II a las células T auxiliares, y significan, por ejemplo, células dendríticas, células mononucleares de sangre periférica y similares. En consecuencia, los sujetos de los cuales derivan las células que presentan antígenos en la presente invención deben tener la misma molécula que una molécula MHC clase II a la

cual el péptido WT1 agregado puede unirse (por ejemplo, cualquiera o más moléculas MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, una molécula HLA-DPB1*0301, etc.).

10 En la presente invención, la adición del péptido WT1 a las células que presentan antígenos puede llevarse a cabo directamente por la adición del péptido WT1, o indirectamente por la adición de un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o por la adición de células que

15 contienen el vector de expresión. La adición anterior se puede llevar a cabo mediante un método conocido en la técnica. El polinucleótido anterior que codifica el péptido WT1, el vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el péptido WT1, y las células que contienen el vector de expresión se puede obtener mediante una técnica bien conocida por los

20 expertos en la técnica. Específicamente, el polinucleótido que se utiliza en la presente invención se puede determinar sobre la base de una secuencia de aminoácidos del péptido WT1 anterior (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO: 2). El polinucleótido anterior se puede preparar, por ejemplo, mediante una síntesis de ADN o ARN, un

25 método PCR y similar. Además, los tipos de vectores de expresión que contienen el polinucleótido anterior, las secuencias contenidas además de la secuencia polinucleotídica anterior y similar se pueden seleccionar en forma apropiada dependiendo de los fines, los tipos y similares de anfitriones dentro

de los cuales se introducen los vectores de expresión. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, vectores fago, vectores virus y similares. Las células que contienen un vector de expresión se pueden preparar, por ejemplo, transformando las células anfitrionas. Las células anfitrionas incluyen

5 células de *Escherichia coli*, células de levadura, células de insectos, células de animales, y similares. Un método para transformar las células anfitrionas puede ser un método convencional, y es posible utilizar, por ejemplo, un método de fosfato de calcio, un método de DEAE-dextrano, un método de electroporación, y un lípido para transferencia génica.

10 En general, las células T auxiliares se activan cuando un complejo TCR-CD3 sobre una superficie de la célula T reconoce un péptido antigénico a través de una molécula MHC clase II sobre una superficie de células que presentan antígenos, y la integrina sobre una superficie de células T se estimula mediante un ligando de integrina sobre una superficie de células

15 que presentan antígenos. La activación de las células T auxiliares en la presente memoria descriptiva incluye no sólo la activación de las células T auxiliares sino además la inducción y la proliferación de las células T auxiliares. Además, las células T auxiliares que se activan en la presente invención pueden ser células T no diferenciadas (por ejemplo, células T

20 intactas) y similares. Las células T auxiliares activadas tienen una función que activa un sistema inmune promoviendo la inducción, la proliferación y la activación de las células B y las células T citotóxicas. En consecuencia, el método de la presente invención se puede utilizar en forma de terapia adyuvante para tratar un cáncer y similar. Además, las células T anfitrionas

25 que se activan *in vitro* utilizando el método de la presente invención se pueden utilizar para tratar o prevenir un cáncer y similar, o en forma de un agente adyuvante para el mismo. La activación de las células T auxiliares se puede evaluar, por ejemplo, midiendo la producción o la secreción de citoquinas tales

como interferones (por ejemplo, interferón- γ , etc.) e interleuquinas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición para activar las células T auxiliares o las células T citotóxicas agregando un péptido WT1 a las células que presentan antígenos. En la presente invención, la activación de las células T citotóxicas puede llevarse a cabo pasando a través de la activación de las células T auxiliares. Si bien un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector que contiene el polinucleótido, y las células que contienen el vector se pueden ejemplificar en la composición de la presente invención, se puede utilizar cualquier molécula siempre que sean factores capaces de presentar un péptido WT1 en forma de péptido antigénico sobre una superficie de células que presentan antígenos. Estos factores se pueden obtener mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica como se describió anteriormente.

El péptido WT1 que se utiliza en la presente invención tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC clase II de una molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, como se describió anteriormente. Además, el péptido WT1 que se utiliza en la presente invención puede tener la capacidad de unirse al menos a dos o más moléculas MHC clase II de las moléculas MHC clase II anteriores. Además, el péptido WT1 que se utiliza en la presente invención puede tener la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC clase II de las

moléculas HLA-DR, HLA-DQ o HLA-DP.

Cuando la composición de la presente invención se administra a un sujeto que tiene una o más moléculas MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, un sistema inmune se activa por la activación de las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas en el sujeto. Además, el gen WT1 se expresa altamente en varios cánceres y tumores, por ejemplo, en malignidades hematológicas tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, como también en cánceres sólidos tales como cáncer de estómago, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vesícula, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, y cáncer de ovarios, y por lo tanto, la composición de la presente invención se puede utilizar como agente adyuvante para tratar o prevenir un cáncer. En forma alternativa, las células T auxiliares, las células citotóxicas y similares, las cuales se activan utilizando la composición de la presente invención, se pueden utilizar, por ejemplo, en forma de un agente adyuvante para tratar los cánceres anteriores.

Además del péptido WT1, el polinucleótido que codifica el péptido WT1, el vector que contiene el polinucleótido, y las células que contienen el vector, la composición de la presente invención puede contener, por ejemplo, un vehículo, un excipiente, un aditivo y similares. El péptido WT1 anterior y similar que está contenido en la composición de la presente

invención activa las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas de una manera específica del péptido WT1, y por lo tanto, la composición puede contener un péptido WT1 restrictivo de la MHC Clase I conocido, o se puede aplicar junto con este péptido.

5 Un método para aplicar la composición de la presente invención se puede seleccionar en forma apropiada dependiendo de las condiciones tales como el grado deseado de activación de las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas, y el estado de las células que presentan los antígenos. El método de aplicación incluye, por ejemplo, la administración a un sujeto por

10 medio de administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración transnasal, administración oral, y similares, o la adición a un fluido de cultivo de las células que presentan antígenos, pero no está limitado a las mismas. La cantidad del péptido WT1 anterior y similar contenido en la composición de

15 la presente invención, la forma de la composición, la frecuencia de aplicación de la composición y similar se puede seleccionar en forma apropiada dependiendo de las condiciones tales como el grado deseado de activación de las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas, y el estado de las células que presentan antígenos.

20 Incluso en otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto, que incluye el paso de activar las células T auxiliares o las células T citotóxicas agregando un péptido WT1 a las células que presentan antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a cualquier moléculas MHC Clase II de una molécula

25 HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-

DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301. El método de la presente invención activa un sistema inmune en un sujeto activando las células T

5 auxiliares y/o las células T citotóxicas, tratando o previniendo de este modo un cáncer en un sujeto. En el método de la presente invención, el paso de activar las células T citotóxicas puede llevarse a cabo pasando a través del paso de activar las células T auxiliares. La adición del péptido WT1 a las células que presentan antígenos puede llevarse a cabo directamente por la adición del

10 péptido WT1, o indirectamente por la adición de un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el péptido WT1 o por la adición de células que contienen el vector de expresión. El polinucleótido anterior que codifica el péptido WT1, el vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el péptido WT1, y las

15 células que contienen el vector de expresión se puede obtener mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica, como se describió anteriormente. Los sujetos a quienes se puede aplicar el método de la presente invención son aquéllos positivos con respecto a cualquier molécula MHC clase II de una molécula MHC Clase II de una molécula HLA-

20 DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula

25 HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301. Los cánceres a los cuales se puede aplicar la presente invención pueden ser cualquier tipo de cáncer, e incluyen, por ejemplo, tumores de órganos hematopoyéticos tales como

leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, como también cánceres tales como cáncer de estómago, cáncer de intestinos, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vesícula, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, y cáncer de ovarios. Además, el método de la presente invención se puede utilizar junto con un método para tratar o prevenir un cáncer que utiliza un péptido WT1 restrictivo de la molécula MHC Clase I o una composición farmacéutico para el mismo.

Incluso en otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un péptido WT1 para preparar la composición anterior, de un polinucleótido que codifica el péptido WT1, de un vector que contiene el polinucleótido, y de las células que contienen el vector.

Incluso en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que contiene el péptido WT1 anterior, el polinucleótido que codifica el péptido WT1, el vector que contiene el polinucleótido, o las células que contienen el vector, para activar las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas agregando el péptido WT1 a las células que presentan antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301. Con preferencia, el kit se utiliza en el método anterior para activar las células T auxiliares o las células T citotóxicas. El kit de la presente invención puede contener, por ejemplo, un medio de obtención de las células

que presentan antígenos, un medio de evaluación de la actividad de las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas y similares, además del péptido WT1. En general, el kit está acompañado de un manual de instrucciones. Es posible active en forma efectiva las células T auxiliares o las

5 células T citotóxicas utilizando el kit de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona células que presentan antígenos que presentan un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula MHC clase II. En este caso, la molécula MHC Clase II puede ser cualquier molécula de una molécula HLA-

10 DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula

15 HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, o puede ser al menos dos o más moléculas de las moléculas MHC Clase II anteriores. Las células que presentan antígenos de la presente invención se pueden preparar utilizando una técnica conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden

20 preparar aislando las células que tienen la capacidad de presentar antígenos de un paciente con cáncer, y luego impulsando las células aisladas con el péptido WT1 anterior (por ejemplo, el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2) o con un polinucleótido que codifica el péptido WT1, o introduciendo un vector de expresión que

25 contiene el polinucleótido en las células, permitiendo de este modo un complejo de péptido antigénico que contiene el péptido WT1 con una molécula MHC Clase II para presentar sobre la superficie celular (Cancer Immunol. Immunother. 46:82, 1998, J. Immunol., 158: págs.1796, 1997, Cancer Res.,

59: págs.1184, 1999, Cancer Res., 56: págs. 5672, 1996, J. Immunol., 161: pág. 5607, 1998, J. Exp. Med., 184: pág. 465, 1996). En la presente memoria descriptiva, las células que tienen la capacidad de presentar un antígeno no se limitan en la medida que expresen una molécula MHC Clase II capaz de

5 presentar un péptido WT1 sobre la superficie celular, y se prefieren las células mononucleares de sangre periférica o las células dendríticas que tienen una elevada capacidad de presentar antígenos. Además, la presencia de células que presentan antígenos de la presente invención está confirmada mediante un incremento de la actividad de las células citotóxicas, la cual está

10 confirmada por un incremento de una cantidad de interferón- γ , como se muestra en los ejemplos. Las células que presentan antígenos de la presente invención se utilizan en forma efectiva en una terapia celular (por ejemplo, terapia de células dendríticas) como ingrediente activo de una composición farmacéutica.

15 Incluso en otro aspecto, la presente invención proporciona células T auxiliares que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula MHC clase II. En este caso, la molécula MHC Clase II puede ser cualquier molécula de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403,

20 una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-

25 DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, o puede ser al menos dos o más moléculas de las moléculas MHC Clase II anteriores. Las células T auxiliares de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquéllas que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido que

consiste en la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO: 2 con cualquier molécula MHC clase II de una molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente y obtener las células T auxiliares de la presente invención utilizando una técnica conocida en el arte (Iwata, M. et al., Eur. J. Immunol, 26, 2081 (1996)).

Incluso en otro aspecto, la presente invención proporciona células T citotóxicas que se activan mediante las células T auxiliares que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula MHC clase II. Las células T citotóxicas de la presente invención incluyen, por ejemplo, aquellas que se activan mediante las células T auxiliares que reconocen un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 con cualquier molécula MHC clase II de una molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301. Las células T citotóxicas de la presente invención pueden ser

preparadas fácilmente por los expertos en la técnica utilizando una técnica conocida. Por ejemplo, se preparan aislando los linfocitos de sangre periférica de un paciente, y estimulándolas *in vitro* con un péptido (por ejemplo, un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID

5 NO: 2), un polinucleótido que codifica el péptido, o un vector de expresión que contiene el polinucleótido (Journal of Experimental Medicine 1999, 190:1669). Las células T citotóxicas preparadas de este modo se pueden utilizar en forma de un principio activo de una composición farmacéutica para tratar o prevenir un cáncer y similar. En los ejemplos de la presente memoria descriptiva, se

10 reconoció una actividad para inducir las células T citotóxicas por la administración de WT-332 en una muestra que deriva de un sujeto que tiene una cierta molécula de clase MHC. Esto muestra que las células que presentan antígenos las cuales presentan un complejo de un péptido antigénico que consiste en un péptido WT1 con una molécula MHC Clase II

15 están presentes en las células mononucleares de sangre periférica, y muestra la presencia de células que presentan antígenos las cuales presentan el complejo, las células T auxiliares que las reconocen específicamente y las células T citotóxicas inducidas por las células T auxiliares.

Incluso en otro aspecto, la presente invención proporciona un

20 tetrámero HLA que tiene el péptido antigénico anterior que contiene un péptido WT1 y una molécula MHC Clase II. La molécula MHC Clase II puede ser cualquier molécula de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula

25 HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, o una molécula HLA-DPB1*0901, o puede ser al menos dos o más moléculas de las

moléculas MHC Clase II anteriores. En la presente memoria descriptiva, el tetrámero HLA significa un producto tetramerizado que se obtiene por biotinilación de un complejo (monómero HLA) que se obtiene por la asociación de una proteína HLA con un péptido, y luego uniendo el producto biotinilado al

5 avidin. Los tetrámeros HLA que contienen varios péptidos antigénicos están disponibles en el comercio, y es posible preparar el tetrámero HLA de la presente invención fácilmente (Science 279: 2103-2106 (1998), Science 274: 94-96 (1996)). El tetrámero de la presente invención se marca con preferencia con fluorescencia de modo que las células T auxiliares y las células citotóxicas

10 ligadas de la presente invención se pueden seleccionar o detectar fácilmente mediante un medio de detección conocido tal como citometría de flujo y microscopia de fluorescencia. El tetrámero HLA en la presente invención no está limitado a un tetrámero, y además es posible utilizar un multímero tal como un pentámero y un dendrímero, según sea necesario. En la presente

15 memoria descriptiva, el multímero significa un producto multimerizado el cual se obtiene ligando dos o más complejos (monómeros HLA) que se obtienen por la asociación de una proteína HLA con un péptido que utiliza una técnica conocida.

En otro aspecto, la presente invención provee una composición

20 farmacéutica para activar las células T auxiliares o las células T citotóxicas, la cual contiene, como principio activo, cualquiera de la composición antes mencionada, las células que presentan antígenos, las células T auxiliares, las células T citotóxicas o el tetrámero. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener, como principio activo, una o más de la

25 composición mencionada anteriormente, las células que presentan antígenos, las células T auxiliares, las células T citotóxicas o el tetrámero. La composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar para tratar o prevenir un cáncer. La composición farmacéutica de la presente

invención se puede aplicar a varios cánceres y tumores que expresan el WT1, por ejemplo, tumores de órganos hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, como también cánceres tales como cáncer de estómago, cáncer de intestinos, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vesícula, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, y cáncer de ovarios. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar para administrar a un sujeto que tiene una molécula MHC clase II tal como una molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301. La composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar junto con otro método para tratar o prevenir un cáncer o composición farmacéutica para la misma. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener un agente de activación, un agente de proliferación, un agente de inducción y similar de las células T auxiliares o las células T citotóxicas, o puede contener un péptido WT1 restrictivo de la MHC Clase I conocido.

Además de un principio activo, la composición farmacéutica de la presente invención puede contener, por ejemplo, un vehículo, un excipiente y similares. El método de administración de la composición farmacéutica de la presente invención se puede seleccionar en forma apropiada dependiendo de las condiciones tales como un tipo de enfermedad, un estado de los sujetos y

un sitio blanco. El método incluye, por ejemplo, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intravenosa, administración transnasal, administración oral, y similares, pero no se limita a la misma. La cantidad del principio activo anterior contenido en la composición farmacéutica de la presente invención, la forma de dosificación de la composición, la frecuencia de administración de la composición y similar se puede seleccionar en forma apropiada dependiendo de las condiciones tales como un tipo de enfermedades, un estado de los sujetos, un sitio blanco y similar.

10 Incluso en otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar o prevenir un cáncer en un sujeto, que incluye el paso de administrar cualquiera de la composición antes mencionada, las células que presentan antígenos, las células T auxiliares, las células T citotóxicas o el tetramero a un sujeto en una cantidad efectiva, en donde el sujeto tiene

15 cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula

20 HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301. Los cánceres que se pueden tratar o prevenir mediante el método de la presente invención son varios cánceres y tumores que expresan el WTI, por ejemplo, tumores de órganos

25 hematopoyéticos tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, como también cánceres tales como cáncer de estómago, cáncer de intestinos, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, cáncer de células germinales, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de vesícula,

cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, y cáncer de ovarios. El método de la presente invención se puede utilizar junto con otro método para tratar o prevenir un cáncer, por ejemplo, un método para tratar o prevenir un cáncer que utiliza un péptido WT1 restrictivo de la molécula MHC

5 Clase I conocido.

Incluso en otro aspecto, la presente invención provee el uso de cualquier composición antes mencionada, las células que presentan antígenos, las células T auxiliares, las células T citotóxicas o el tetrámero para preparar la composición farmacéutica anterior.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al péptido WT1 anterior o al polinucleótido que codifica el péptido WT1 (en adelante, el anticuerpo además se denomina un anticuerpo anti-WT1). El anticuerpo de la presente invención puede ser o bien un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Específicamente, se
15 puede mencionar un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y similar. Un método para preparar este anticuerpo ya se conoce, y el anticuerpo de la presente invención se puede preparar de acuerdo con este método convencional también (Protocolos corrientes en Molecular Biology,
20 Ausubel et al. (ed.), 1987, John Wiley and Sons (pub.), Sección 11.12-11.13, Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D. et al. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (pub.), New York, 1989). Por ejemplo, un animal no humano como ser un conejo doméstico se inmuniza utilizando un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO: 2 en forma de
25 un inmunógeno, y un anticuerpo policlonal se puede obtener a partir del suero del animal mediante un método convencional. Por otro lado, en el caso de un anticuerpo monoclonal, un animal no humano tal como un ratón se inmuniza utilizando el péptido que se utiliza en la presente invención (un péptido que

tiene la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO: 2), y las células del bazo resultantes y las células del mieloma se fusionan para preparar las células de hibridoma, de las cuales se puede obtener el anticuerpo monoclonal (Protocolos corrientes en Molecular Biology, Ausubel et al. (ed.), 1987, John Wiley and Sons (pub.), Sección 11.4-11.11). Además, la preparación del anticuerpo anti-WT1 de la presente invención se puede llevar a cabo estimulando una reacción inmunológica que utiliza varios adyuvantes que dependen de un anfitrión. Estos adyuvantes incluyen un gel mineral (por ejemplo, el adyuvante de Freund, hidróxido de aluminio, etc.), un tensioactivo, un adyuvante humano, y similares. El anticuerpo anti-WT1 de la presente invención se puede utilizar para cromatografía por afinidad, diagnóstico inmunológico, y similares. Un método para el diagnóstico inmunológico se puede seleccionar en forma apropiada a partir de la inmunotransferencia, el ensayo radioinmunológico (RIA), el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), la medición fluorescente o luminiscente y similares.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para determinar la presencia o la cantidad de un péptido WT1 en un sujeto positivo con respecto a cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0403, HLA-DRB1*0406, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB3*0202, HLA-DRB4*0101, o HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201 o una molécula HLA-DPB1*0301, incluyendo el método los pasos de:

(a) hacer reaccionar una muestra que se obtiene del sujeto con el anticuerpo anti-WT1 anterior, y luego

(b) determinar la presencia o la cantidad del anticuerpo anti-WT1

anterior contenido en la muestra.

Una muestra que se obtiene de un sujeto que tiene cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0403, HLA-DRB1*0406, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB3*0202, HLA-DRB4*0101, o HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201 o una molécula HLA-DPB1*0301, se puede utilizar como muestra que se utiliza en el paso anterior (a). Las muestras que se utilizan en el paso (a) anterior incluyen, por ejemplo, fluido corporal y tejidos tales como sangre y linfocitos. Los expertos en la técnica pueden obtener muestras en forma apropiada, hacerlas reaccionar con un anticuerpo y llevar a cabo los procedimientos que utilizan una técnica conocida. El paso (b) en la presente invención incluye, por ejemplo, la determinación de la localización, el sitio, la cantidad y similar el anticuerpo anti-WT1 anterior, y por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para diagnóstico, pronóstico y similar de un cáncer. El anticuerpo anti-WT1 anterior puede ser marcado. Como etiqueta, se pueden utilizar etiquetas tales como una etiqueta fluorescente y una etiqueta radioactiva. Al etiquetar, resulta posible llevar a cabo la determinación de la presencia o la cantidad de un péptido WT1 en forma simple y rápida.

Incluso en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para determinar la presencia o la cantidad de un péptido WT1, el cual contiene el anticuerpo anti-WT1 en forma de un constituyente esencial. El kit de la presente invención puede contener, por ejemplo, medios para obtener el anticuerpo anti-WT1 y medios para evaluar el anticuerpo anti-WT1, y similar, además del anticuerpo anti-WT1 anterior. En general, el kit está acompañado de un manual de instrucciones. Al utilizar el kit de la presente invención, resulta posible determinar la presencia o la cantidad de un péptido WT1 en

forma simple y rápida en el método anterior para determinar la presencia o la cantidad de un péptido WT1.

Incluso en otro aspecto, la presente invención provee un método para determinar la presencia o la cantidad de las células T auxiliares específicas del WT1 o las células T citotóxicas específicas del WT1 en un sujeto positivo con respecto a cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0403, HLA-DRB1*0406, HLA-DRB1*0803, HLA-DRB1*0901, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB3*0202, HLA-DRB4*0101, o HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201 o una molécula HLA-DPB1*0301, incluyendo el método los pasos de:

(a) estimular una muestra que se obtiene del sujeto utilizando un péptido WT1, y

(b) determinar la presencia o la cantidad de citoquinas, células T auxiliares o células T citotóxicas, y en donde el incremento de la presencia o la cantidad de citoquinas, células T auxiliares o células T citotóxicas muestra la presencia o la cantidad de células T auxiliares específicas del WT1 o células T citotóxicas específicas del WT1.

Las muestras en la presente invención pueden ser cualquier muestra en la medida que contengan las células que presentan antígenos, e incluyen, por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica, linfocitos invasivos, células tumorales, células en fluido de ascitis, células en derrame pleural, células en fluido cefalorraquídeo, células de la médula ósea, células del ganglio linfático, y similares. La muestra que se utilizó en la presente invención puede derivar de donantes saludables o de pacientes con cáncer. Al utilizar esas células que derivan de donantes saludables, por ejemplo, resulta posible diagnosticar si los donantes están afectados por un

cáncer, o si los donantes tienen una predisposición al cáncer, u otras afecciones. Al utilizar esas células que derivan de pacientes con cáncer, por ejemplo, resulta posible predecir si una inmunoterapia de WT1 tiene un efecto en los pacientes con cáncer, u otras afecciones. En el método de la presente invención, las muestras que se obtuvieron se pueden cultivar antes y después de la estimulación con un péptido WT1, y las condiciones del cultivo se pueden determinar en forma apropiada por parte de los expertos en la técnica. La estimulación de estas células con un péptido WT1 se puede llevar a cabo utilizando una técnica conocida tal como electroporación, y se puede llevar a cabo o bien *in vitro* o *in vivo*. La producción de una citoquina, la presencia de una reacción de las células T auxiliares o las células T citotóxicas, la cantidad de citoquina producida, o la cantidad de células T auxiliares o células T citotóxicas se puede determinar mediante un método conocido.

Incluso en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para determinar la presencia o la cantidad de un péptido WT1, el cual contiene el péptido WT1 anterior en forma de un componente esencial. El kit de la presente invención puede contener, por ejemplo, un medio de obtención de muestras, un medio de evaluación tales como citoquinas, además del péptido WT1 anterior. En general, el kit está acompañado de un manual de instrucciones. Al utilizar el kit de la presente invención, resulta posible determinar la presencia o la cantidad de un péptido WT1 en forma simple y rápida en el método anterior para determinar la presencia o la cantidad de un péptido WT1.

La presente invención se describirá en detalle y específicamente por medio de ejemplos, pero no debe considerarse como limitante de la presente invención.

EJEMPLO 1

1. Inducción de células T auxiliares del tipo I específicas del

WT1-332

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se separaron de la sangre periférica de donantes de sangre saludables (donante 1: HLA-DRB1*0406/1201-, DRB3*0101-, y DRB4*0103-positivo, donante 2: HLA-DRB1*0901/1101-, DRB3*0202-, y DRB4*0103-positivo, donante 3: HLA-DRB1*0401/0405-, y DRB4*0102/0103-positivo, donante 4: HLA-DRB1*0901/1101-, DRB3*0202-, y DRB4*0103-positivo). Las PBMCs separadas ($1,5 \times 10^7$ células) se suspendieron en un medio compuesto del 45% de RPMI-1640 (SIGMA), 45% de AIM-V (Invitrogen), y 10% de suero humano del tipo AB (MP Biomedicals), y se sembraron sobre una placa de 24 pocillos a $1,5 \times 10^6$ células (día 0). A los pocillos que se sembraron con PBMCs, se agregó el WT1-332 (un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO: 2) a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ e IL-7 (PeproTech) a una concentración de 10 ng/ml y las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ durante una semana. Además, una porción de las PBMCs separadas se preservaron congeladas para las células que presentan el antígeno en caso de re-estimulación.

Después de una semana (el día séptimo), se llevó a cabo la re-estimulación. Primero, las PBMCs preservadas congeladas se descongelaron, se impulsaron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de WT1-332, se trataron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), y se sembraron sobre una nueva placa de 24 pocillos a $1,0 \times 10^6$ hasta $1,6 \times 10^6$ células /pocillo. A continuación, las células que se cultivaron durante una semana se recuperaron, y se sembraron sobre pocillos sembrados con células que presentan antígenos a $1,0 \times 10^6$ hasta $1,6 \times 10^6$ células /pocillo. Finalmente, IL-7 se agregó a cada pocillo a una concentración de 10 ng/ml, y las células se cultivaron a 37°C en

5% de CO₂. Después de 2 días (el día noveno), la mitad del fluido de cultivo en cada pocillo se eliminó suavemente, y en su lugar un medio que contiene 40 U/ml de IL-2 (PeproTech) se agregó al pocillo, y se continuó con el cultivo. Posteriormente, el procedimiento de reemplazo de la mitad del fluido de cultivo se llevó a cabo día por medio utilizando un medio que contiene 20 U/ml de IL-2, y las células se recuperaron en forma apropiada entre el día 14 y el día 21 y se utilizaron para experimentos.

2. Preparación de células que presentan antígenos que se utilizan en el experimento para la determinación del alelo restrictivo

Las PBMCs se separaron de la sangre periférica de donantes de sangre saludables (donante 5: HLA-DRB1*0406/1201-, DRB3*0101-, y DRB4*0103-positivo, donante 6: HLA-DRB1*0403/1405-, DRB3*0202-, y DRB4*0103-positivo, donante 7: HLA-DRB1*0403/1201-, DRB3*0101-, y DRB4*0103-positivo, donante 8: HLA-DRB1*0101/0901-, y DRB4*0103-positivo, donante 9: HLA-DRB1*1401/1406-, y DRB3*0202-positivo, donante 10: HLA-DRB1*0803/0901-, y DRB4*0103-positivo, donante 11: HLA-DRB1*1101/1502-, y DRB3*0202-positivo, donante 12: HLA-DRB1*0405/1406-, DRB3*0202-, y DRB4*0103-positivo, donante 13: HLA-DRB1*0401/0405-, y DRB4*0102/0103-positivo, donante 14: HLA-DRB1*0401/1502-, y DRB4*0102-positivo, donante 15: HLA-DRB1*0101/0405-, y DRB4*0103-positivo, donante 16: HLA-DRB1*0901/1501-, y DRB4*0103-positivo, donante 17: HLA-DRB1*0405/1501-, y DRB4*0103-positivo, donante 18: HLA-DRB1*1401/1502-, y DRB3*0202-positivo, donante 19: HLA-DRB1*1403/1502-, y DRB3*0101-positivo, donante 20: HLA-DRB1*0803/1302-, y DRB3*0301-positivo), y se utilizó como células que presentan antígenos que se utilizaron en experimentos para la determinación

del alelo restrictivo. Las PBMCs de cada donante se preservaron congeladas a -80°C hasta su uso.

3. Medición del IFN-γ (Inhibición de la reacción en presencia del anticuerpo anti-HLA-DR

Las células T inducidas a partir de las PBMCs de donantes 1 a 4 se cultivaron durante 24 horas en ausencia de WT1-332, en presencia de 10 µg/ml de WT1-332, y en presencia de 10 µg/ml de WT1-332 y 10 µg/ml de anticuerpo anti-HLA-DR (BD Co.). Después del cultivo, la cantidad de IFN-γ en el sobrenadante se cuantificó por ELISA (BD Co.). Como resultado de ello, se mostró que todas las células T inducidas reconocen el WT1-332 y producen el IFN-γ, y que la reacción está restringida por la molécula HLA-DR.

4. Medición de IFN-γ (Determinación del alelo restrictivo)

Las células T inducidas a partir de las PBMCs de donantes 1 a 4 se hicieron reaccionar con cada una de las células que presentan antígenos adecuadas impulsadas con WT1-332, y se determinó un alelo restrictivo de las células T inducidas.

4-1. Células T que derivan del donante 1

Las células T inducidas a partir de las PMBCs del donante 1 se co-cultivaron durante 24 horas con las células que presentan antígenos que derivan de los donantes 5, 6, 7, 8 y 9, las cuales se impulsaron con 10 µg/ml de WT1-332. Después del co-cultivo, la cantidad de IFN-γ en el sobrenadante se cuantificó por ELISA. Los resultados se muestran en la figura 1. Las células T que derivan del donante 1 produjeron el IFN-γ cuando se co-cultivaron con células que presentan el antígeno HLA-DR4 (DRB1*0403, 0406)-positivo, las cuales revelaron que el alelo restrictivo era HLA-DRB1*0406. Además, se

mostró que la HLA-DRB1*0403 puede presentar el WT1-332 y estimular las células T.

4-2. Células T que derivan del donante 2

- 5 Las células T inducidas a partir de las PMBCs del donante 2 se co-cultivaron durante 24 horas con las células que presentan antígenos que derivan de los donantes 10, 11, 12, y 9, las cuales se impulsaron con 10 µg/ml de WT1-332. Después del co-cultivo, la cantidad de IFN-γ en el sobrenadante se cuantificó por ELISA. Los resultados se muestran en la figura 2. Las células
- 10 T que derivan del donante 2 produjeron el IFN-γ cuando se co-cultivaron con las células que presentan el antígeno HLA-DRB3*0202-positivo, las cuales revelaron que el alelo restrictivo era HLA-DRB3*0202.

4-3. Células T que derivan del donante 3

- 15 Las células T inducidas a partir de las PMBCs del donante 3 se co-cultivaron durante 24 horas con las células que presentan antígenos que derivan de los donantes 10, 13, 14, y 15, las cuales se impulsaron con 10 µg/ml de WT1-332. Después del co-cultivo, la cantidad de IFN-γ en el sobrenadante se cuantificó por ELISA. Los resultados se muestran en la figura
- 20 3. Las células T que derivan del donante 3 produjeron el IFN-γ cuando se co-cultivaron con células que presentan el antígeno HLA-DR4 (DRB1*0401, 0405)-positivo, las cuales revelaron que tanto la HLA-DRB1*0401 como la 0405 pueden presentar el WT1-332 y estimular las células T.

4-4. Células T que derivan del donante 4

Las células T inducidas a partir de las PMBCs del donante 4 se co-cultivaron durante 24 horas con las células que presentan antígenos que derivan de los donantes 16, 11, 17, 18, 19 y 20, las cuales se impulsaron con 10 µg/ml de WT1-332. Después del co-cultivo, la cantidad de IFN-γ en el sobrenadante se cuantificó por ELISA. Los resultados se muestran en la figura 4. Las células T que derivan del donante 4 produjeron el IFN-γ cuando se co-cultivaron con las células que presentan el antígeno HLA-DRB1* 1101-positivo, las cuales revelaron que el alelo restrictivo era HLA-DRB1* 1101.

10

EJEMPLO 2

A continuación, a fin de evaluar la capacidad de unión del WT1-332 con las moléculas MHC Clase II, se llevó a cabo una prueba de plegamiento de 7 tipos de proteínas monómeras HLA clase II (DRB1* 1501, 0101, 0405, 0803, 0901, 1502, o DRB4* 0101) con WT1-332 utilizando HPLC. En breve, una solución de reacción de plegamiento se preparó mezclando una proteína monómera HLA Clase II, un péptido [un péptido que se liga a cada proteína (control positivo), un péptido que no se liga a cada proteína (control negativo), y WT1-332], y un regulador de pH de plegamiento. Después de hacer reaccionar la solución a 37°C, el tiempo de retención se analizó utilizando HPLC. El plegamiento con WT1-332 se evaluó utilizando un cambio del tiempo de retención debido a la unión de una proteína monómera HLA clase II con un péptido. Los reactivos que se utilizan en este ensayo se muestran en la siguiente tabla.

25

TABLA 1

Reactivos que se utilizan en el ensayo)

4^x

5

	Proveedor
Superdex200	GE Healthcare Sciences
Regulador de pH de plegamiento	MBL
Regulador de pH de equilibramiento	MBL
Péptido control positivo: PVSKMRMATPLLMQA (SEQ ID NO:3)	MBL
Péptido control negativo: KAERADLLAYLKQATA (SEQ ID NO:4)	MBL

Preparación de las proteínas monómeras HLA Clase II

Las proteínas monómeras HLA Clase II que habían sido preservadas congeladas a -80°C se descongelaron sobre hielo. Las proteínas monómeras HLA Clase II descongeladas se ajustaron utilizando un regulador de pH de dilución de modo que estuvieron contenidas en una cantidad de 0,05 mg (1×10^{-9} mol) en 83 µl.

15

Preparación de soluciones peptídicas

Aproximadamente 1 mg de cada péptido se pesó mediante una balanza electrónica, se transfirió a un recipiente de vidrio, y se disolvió en DMSO para dar una concentración de 20 mg/ml.

20

Cálculo de la cantidad de solución peptídica en 50 veces de cantidad molar.

La cantidad de un péptido que es unas 50 veces la cantidad molar con relación a una proteína monómera HLA Clase II se calculó utilizando la siguiente fórmula de cálculo.

25

Cantidad de péptido necesaria: 1×10^{-9} mol $\times$ 50 = 5×10^{-8} mol
(cantidad necesaria de péptido)

$5 \times 10^{-8} \times$ (peso molecular del péptido) $\times$ 1.000 = (cantidad de péptido necesaria) (mg)

(Cantidad de péptido necesaria)/[pureza del péptido/100] =
(cantidad de péptido agregada) (mg)

[(Cantidad de péptido agregado)/20 mg/ml] x 1.000 = (cantidad
de solución peptídico agregada) (μl).

5

Cálculo de la cantidad de regulador de pH de plegamiento
agregada

Como regulador de pH de plegamiento, se agregó un 10% de la
cantidad de solución mezcla de una proteína monómera HLA Clase II y un
10 péptido. La cantidad de regulador de pH de plegamiento agregada se calculó
utilizando la siguiente ecuación de cálculo.

[83 μL (cantidad de proteína monómera HLA Clase II) +
(cantidad de solución peptídico en 50 veces la cantidad molar)] x 0,1 =
cantidad de regulador de pH de plegamiento agregada.

15

Análisis de plegamiento utilizando HPLC

A un recipiente de vidrio que se cargó con una proteína
monómera HLA Clase II, se agregaron una solución peptídico y un regulador
de pH de plegamiento en una cantidad calculada, y la mezcla se dejó asentar
20 a 37°C durante toda la noche. Se inició la HPLC (modulo de separación
Waters 2695), y una columna Seperdex 200 se equilibró con un regulador de
pH de equilibramiento. A todas las muestras, se agregaron 300 μl del
regulador de pH de equilibramiento y se mezcló bien, y una porción de 100 μl
de la mezcla se utilizó como volumen de inyección de la muestra para calcular
25 el tiempo de retención. El tiempo de análisis fue de 50 minutos. El criterio para
el plegamiento de una proteína monómera HLA Clase II con un péptido es un
cambio del tiempo de retención no inferior a 0,1 minuto en comparación con
un control (solvente sólo). Como resultado de ello, se halló que el grado de

419

cambio del tiempo de retención aumentó en no menos de 0,1 minuto en 7 tipos de proteínas monómeras HLA Clase II ensayadas (DRB1* 1501, 0101, 0405, 0803, 0901, 1502, o DRB4* 0101) (Fig. 5), por lo que resultó claro que el WT1-332 se une específicamente a estas proteínas y se puede presentar como antígeno.

EJEMPLO 3

Inducción de células T específicas del WT1-332

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se separaron de la sangre periférica de donantes de sangre saludables (en total 42 donantes que tienen al menos una de HLA-DRB1* 1501, 1502, 0405, HLA-DPB1* 0501, y 0901). Las PBMCs separadas se dividieron en porciones de $1,2 \times 10^7$ células, se suspendieron en un medio compuesto del 45% de RPMI-1640 (SIGMA), 45% de AIM-V (Invitrogen), y 10% de suero humano del tipo AB (MP Biomedicals), y se sembraron sobre una placa de 24 pocillos a $1,5 \times 10^6$ células/pocillo (el día 0). A los pocillos sembrados con las PBMCs, se agregó el WT1-332 a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ e IL-7 (PeproTech) a una concentración de 10 ng/ml, y las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ durante una semana. Un grupo en el cual se agregó solvente (10 mM de ácido acético) en lugar de WT1-332 a una concentración final de 10 μM (grupo de inducción de solvente) se fijó como grupo control. Además, una porción de las PBMCs separadas se preservaron congeladas para las células que presentan el antígeno en el momento de la re-estimulación.

Después de una semana (el día séptimo), se llevó a cabo la re-estimulación. Primero, las PBMCs preservadas congeladas se descongelaron, se impulsaron con 20 $\mu\text{g/ml}$ de WT1-332, o 10 μM de solvente de ácido acético, se trataron con 50 $\mu\text{g/ml}$ de mitomicina C (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), y se sembraron sobre una nueva placa de 24 pocillos a $1,0 \times 10^6$ hasta $1,6 \times 10^6$ células /pocillo. A continuación, las células que se cultivaron durante una semana se recuperaron, y se sembraron sobre pocillos sembrados con células que presentan antígenos a $1,0 \times 10^6$ hasta $1,6 \times 10^6$ células /pocillo. Finalmente, IL-7 se agregó a cada pocillo a una concentración de 10 ng/mL, y las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂. Después de 2 días (el día

noveno), la mitad del fluido de cultivo en cada pocillo se eliminó suavemente, y en su lugar un medio que contiene 40 U/ml de IL-2 (PeproTech) se agregó al pocillo, y se continuó con el cultivo. Posteriormente, el procedimiento de reemplazo de la mitad de la cantidad del fluido de cultivo se llevó a cabo día por medio utilizando un medio que contiene 20 U/ml de IL-2.

Las células se recuperaron el día 0, el día 7, y el día 14, y se utilizaron en experimentos para la medición del IFN- γ .

Medición del IFN- γ [Tinción de citoquina intracelular (ICS)]

La re-estimulación del antígeno se llevó a cabo sembrando las PBMCs el día 0 después de la preparación y una vez recuperadas las células vivas el día 7 y el día 14 del grupo de inducción WT1-332 y un grupo de inducción de solvente sobre una placa de base en U de 96 pocillos, y agregando un medio que contiene WT1-332 a una concentración final de 20 μ g/ml. Además, se agregó un medio que contiene solvente a una concentración final de 10 μ M como control. Después de cultivar las células a 37°C en 5% de CO₂ durante 4 horas, se agregó Brefeldin A (BioLegend) y se continuó con el cultivo. Después de 6 horas del inicio del cultivo, las células se recuperaron y se tiñeron con un anticuerpo CD4 anti-humano marcado con PE y un anticuerpo CD8 anti-humano marcado con FITC. La tinción del IFN- γ intracelular se llevó a cabo utilizando un kit de fijación/permeabilización BD Cytotfix/Cytoperm (Becton Dickinson) y un anticuerpo IFN- γ anti-humano marcado con PerCP/Cy5.5. EPICS-XL MCL (Beckman Coulter) se utilizó para análisis. Los resultados se muestran en las figuras 6 y 7. A partir de la figura 6, se confirmó que, en el grupo de inducción del WT1-332, la Th1 específica del WT1-332 aumentó en forma remarcable y con dependencia del tiempo el día 7 y el día 14. El aumento fue significativo con relación al grupo de inducción de solvente ($P < 0,0001$). A partir de la figura 7, se confirmó que, en

el grupo de inducción de WT1-332, la CTL específica del WT1-332 aumentó con dependencia del tiempo el día 7 y el día 14, y el aumento fue significativo con relación al grupo de inducción del solvente ($P < 0,0001$).

5 Medición del IFN- γ (Inhibición de la reacción en presencia del anticuerpo anti-HLA-DR y el anticuerpo anti-HLA-DQ).

El día 14, las células T inducidas a partir de las PBMCs de los donantes 21 a 37 se cultivaron durante 24 horas en presencia de 10 μ M de un solvente, en presencia de 20 μ g/ml de WT1-332 y en presencia de 20 μ g/ml de WT1-332 y 10 μ g/ml de un anticuerpo anti-HLA-DR (L243[G46-6], BD Co.). Después del cultivo, la cantidad de IFN- γ en el sobrenadante se cuantificó por ELISA (BD Co.). Los resultados se muestran en la figura 8. En las muestras de los donantes 21 a 37, se mostró que las células T inducidas reconocen el WT1-332 y producen el IFN- γ , y que la reacción está restringida por la HLA-DR.

Además, el día 14, las células T inducidas a partir de las PBMCs de los donantes 38 a 46 se cultivaron durante 24 horas en presencia de 10 μ M de un solvente, en presencia de 20 μ g/ml de WT1-332 y en presencia de 20 μ g/ml de WT1-332 y 10 μ g/ml de un anticuerpo anti-HLA-DR (L243[G46-6], BD Co.) o 10 μ g/ml de un anticuerpo anti-HLA-DQ (SPVL3, BC Co.). Después del cultivo, la cantidad de IFN- γ en el sobrenadante se cuantificó por ELISA (BD Co.). Los resultados se muestran en la figura 11. En las muestras de los donantes 38 a 46, las células T inducidas reconocieron el WT1-332 y el IFN- γ producido, y la reacción no se inhibió por el anticuerpo anti-HLA-DR y el anticuerpo anti-HLA-DQ. Como es evidente a partir de estos hechos, las células T inducidas por el WT1-332 que derivan de los donantes 38 a 46 son restringidas por la molécula HLA-DP:

Inducción de células T específicas del WT1-332 (relación con el nuevo alelo)

Con respecto a cada una de las 17 muestras (donantes 21 a 37) las cuales fueron restringidas por la HLA-DR y tuvieron la Th1 específica del WT1-332 inducida, en los resultados que utilizan los donantes de sangre saludables (en total 42 donantes que tienen al menos una de HLA-DRB1*1501, 1502, 0405, HLA-DPB1*0501, y 0901) en las figuras 6 y 7, el resultado en el día 14 se muestra en las figuras 9 y 10. Además, la HLA del tipo Clase II (tipo de alelo HLA-DRB1 y alelo HLA-DPB1) de cada una de las 17 muestras (donantes 21 a 37) se muestra en la siguiente Tabla 2. En esta conexión, la DRB3*0202 está en desequilibrio de enlace con las DRB1*1101, DRB1*1401 y DRB1*1405 (alelo DRB1 que se denota mediante el símbolo “Δ” en la tabla), y la DRB4*0101 está en desequilibrio de enlace con las DRB1*0403, DRB1*0405 y DRB1*0901 (alelo DRB1 que se denota mediante el símbolo “▲” en la tabla). En la tabla, los alelos que se indican mediante negrita, letra itálica representan un nuevo alelo HLA-DRB1 compatible.

TABLA 2

Donante No.	HLA del tipo clase II			
	Alelo DRB1		Alelo DPB1	
21	0901▲	1401Δ	0501	0501
22	0101	0901▲	0402	0501
23	0401	0405▲	0501	0501
24	0406▲	1501	0201	0501
25	1401Δ	1502	0201	0901
26	0901▲	1101Δ	0501	0501
27	1101Δ	1502	0401	0901
28	0803	0901▲	0201	0501
29	1401Δ	1502	0501	0901
30	0405▲	1501	0501	0501
31	0405▲	1405Δ	0501	0501
32	0403▲	1501	0402	0501
33	0101	0405▲	0402	0501
34	1403	1501	0201	0501
35	1202	1501	0201	0501
36	0405▲	0406▲	0201	0501
37	0101	1501	0402	0501

Además, con respecto a cada una de las 9 muestras (donantes 38 a 46) las cuales fueron restringidas por la HLA-DR y tuvieron la Th1 específica del WT1-332 inducida, en los resultados que utilizan los donantes de sangre saludables (en total 42 donantes que tienen al menos una de HLA-DRB1*1501, 1502, 0405, HLA-DPB1*0501, y 0901) en las figuras 6 y 7, el resultado en el día 14 se muestra en las figuras 12 y 13. Además, la HLA del tipo clase II (tipo de alelo HLA-DRB1 y alelo HLA-DPB1) de cada una de las 9 muestras (donantes 38 a 46) se muestra en la siguiente tabla 3. En la tabla, el símbolo “*” indica los alelos HLA-DPB1 compatibles previamente conocidos.

15

20

25

Aplicabilidad industrial

La presente invención provee un método para activar las células

T auxiliares y/o las células T citotóxicas utilizando un péptido WT1 que tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula
5 HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301 y una composición para las
10 mismas para tratar y/o prevenir un cáncer activando las células T auxiliares y/o las células T citotóxicas, y similares. De este modo, la presente invención se puede aplicar al campo de los productos farmacéuticos y similares, por ejemplo, los campos de desarrollo y producción de productos para la prevención y solución de varios tumores de órganos hematopoyéticos y
15 cáncer sólido que expresan un gen WT1.

REIVINDICACIONES SOLICITUD DIVISIONAL

1.- Un método para activar las células T auxiliares, que comprende el paso de activar las células T auxiliares agregando un péptido
 5 WT1 a las células que presentan antígenos y evaluando la activación de las células T auxiliares, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-
 10 DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, donde el péptido WT1 es una variante o modificación del péptido que contiene la secuencia de amino ácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2) .

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

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

4.- Una composición que contiene un péptido WT1 para activar
 30 las células T auxiliares, agregando un péptido WT1 a las células que presentan antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-
 35 DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una

molécula HLA-DPB1*0301, donde el péptido WT1 es una variante o modificación del péptido que contiene la secuencia de amino ácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2) .

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

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

7.- Células que presentan antígenos, las cuales presentan un complejo de un péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una
20 molécula MHC clase II, en donde la molécula MCH Clase II es cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-
25 DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, donde el péptido WT1 es una variante o modificación del péptido que contiene la secuencia de amino ácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2) .

8.- Células T auxiliares, las cuales reconocen un complejo de un
30 péptido antigénico que contiene un péptido WT1 con una molécula MHC clase II, en donde la molécula MCH Clase II es cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula
35 HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301, donde el péptido WT1 es una variante o modificación del péptido que contiene la secuencia de amino

ácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2) .

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

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

11.- Una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo un péptido WT1, un polinucleótido que codifica el péptido WT1, un vector de expresión que contiene el polinucleótido, o células que contienen el vector de expresión, y la cual se administra a un sujeto que tiene
15 cualquier molécula MHC Clase II de una molécula HLA-DPB1*0501, una molécula HLA-DPB1*0901, una molécula HLA-DPB1*0201, una molécula HLA-DPB1*0301, una molécula HLA-DRB1*1501, una molécula HLA-DRB1*1502, una molécula HLA-DRB1*0405, una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula
20 HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, donde el péptido WT1 es una variante o modificación del péptido que contiene la secuencia de amino ácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2) .

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

T auxiliares específicas del WT1, donde el péptido WT1 es una variante o modificación del péptido que contiene la secuencia de amino ácidos: Lys Arg Tyr Phe Lys Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His (SEQ ID NO. 2) .

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para activar las células T auxiliares, que comprende el paso de activar las células T auxiliares
5 agregando un péptido WT1 a las células que presentan antígenos, en donde el péptido WT1 tiene la capacidad de unirse a cualquier moléculas MHC Clase II de una molécula HLA-DRB1*0101, una molécula HLA-DRB1*0401, una molécula HLA-DRB1*0403, una molécula HLA-DRB1*0406, una molécula HLA-DRB1*0803, una molécula HLA-DRB1*0901, una molécula HLA-
10 DRB1*1101, una molécula HLA-DRB3*0202, una molécula HLA-DRB4*0101, una molécula HLA-DPB1*0201, o una molécula HLA-DPB1*0301.

WPC20188/ID.240366

1A*c

P13/362F

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Solicitante: Osaka University
Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Título de la invención: MÉTODO PARA ACTIVAR CÉLULAS T AUXILIARES

<130> Número de referencia: 561550

<150> Número de solicitud previa: JP 2010-225806

<151> Fecha de presentación de la solicitud previa: 2010-10-05

<160> Número de secuenacia: 4

<170> Software: PatentIn version 3.2

<210> SEQ ID NO: 1

<211> Longitud: 449

<212> Tipo: PRT

<213> Organismo: Homo sapiens

<400> Secuencia: 1

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

Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln
 180 185 190
 Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser
 195 200 205
 Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp
 210 215 220
 Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln
 225 230 235
 240
 Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
 245 250 255
 Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
 260 265 270
 Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
 275 280 285
 His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
 290 295 300
 Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
 305 310 315
 320
 Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
 325 330 335
 Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
 340 345 350
 Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
 355 360 365
 Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
 370 375 380
 Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
 385 390 395
 400
 His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
 405 410 415
 Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
 420 425 430
 Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
 435 440 445
 Leu

<210> SEQ ID NO: 2
 <211> Longitud: 16
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Homo sapiens

<400> Secuencia: 2

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

<210> SEQ ID NO: 3
 <211> Longitud: 15
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: péptido de control positivo para unirse a la
 proteína
 monómera de clase II

<400> Secuencia: 3

Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met Gln Ala
 1 5 10 15

<210> SEQ ID NO: 4
 <211> Longitud: 16
 <212> Tipo: PRT
 <213> Organismo: Artificial

<220> Característica:

<223> Otra información: péptido de control negativo para unirse a la
 proteína
 monómera de clase II

<400> Secuencia: 4

Lys Ala Glu Arg Ala Asp Leu Ile Ala Tyr Leu Lys Gln Ala Thr Ala
 1 5 10 15

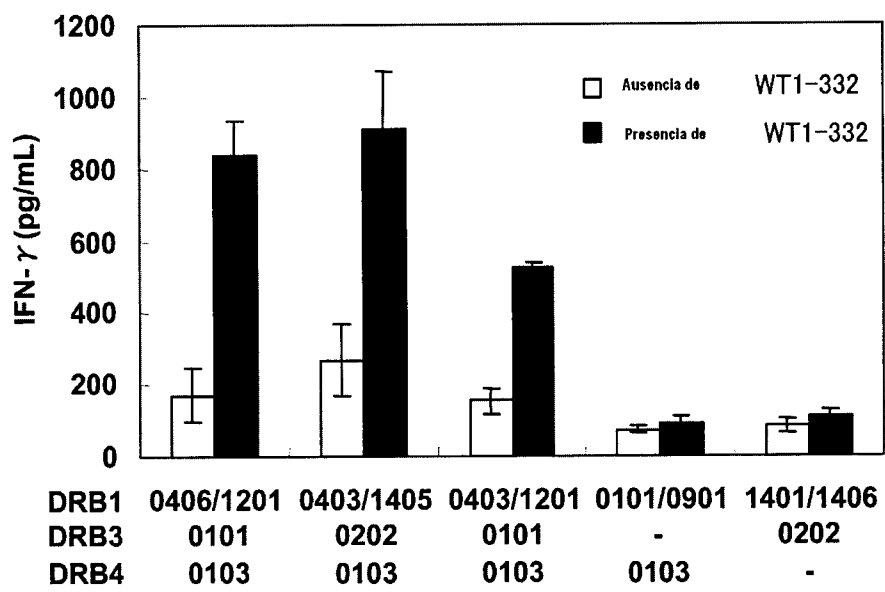


FIGURA 1

56

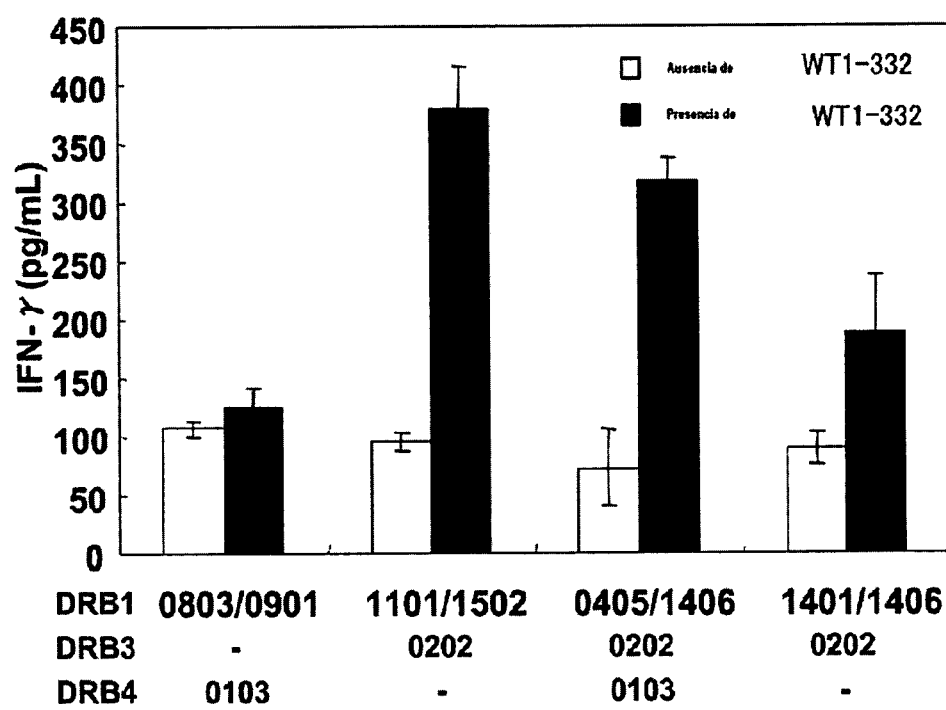


FIGURA 2

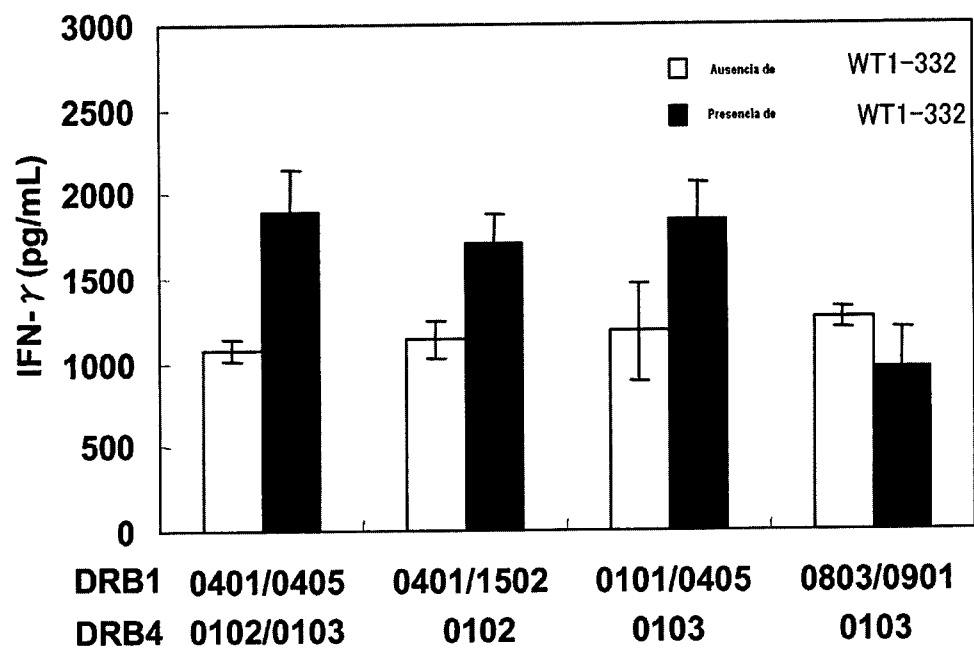


FIGURA 3

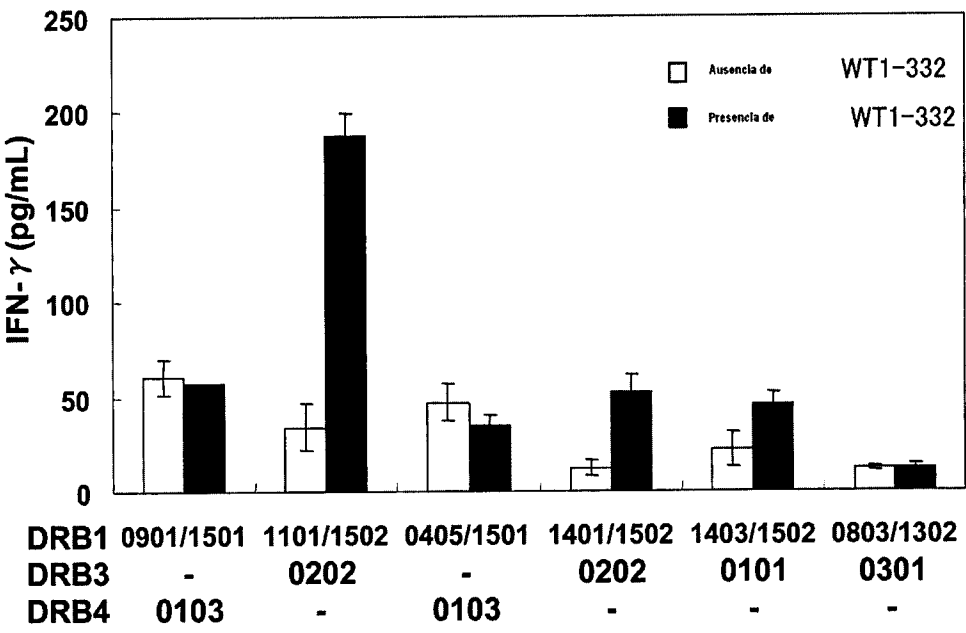


FIGURA 4

64

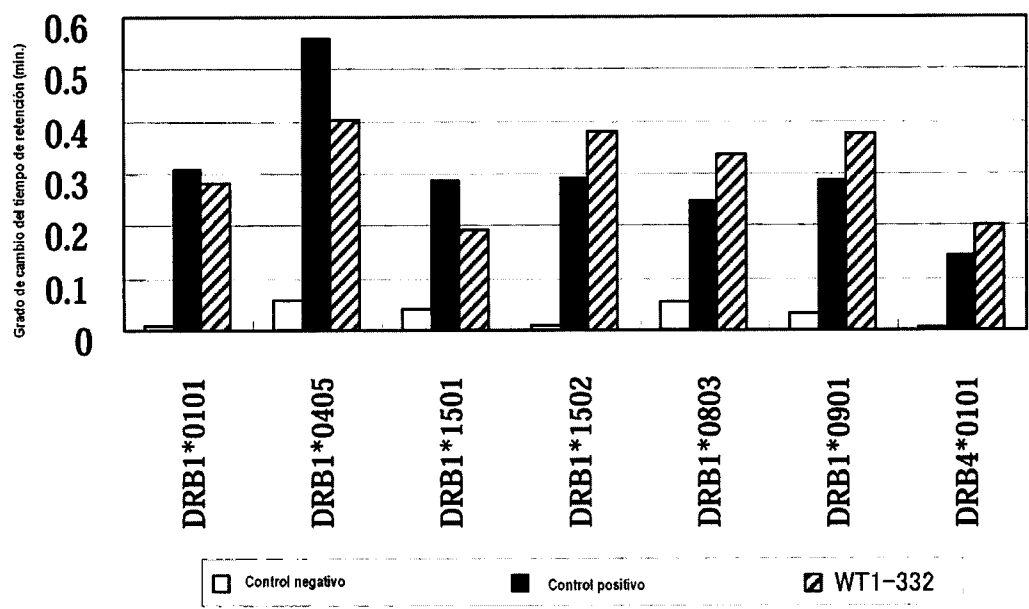


FIGURA 5

69

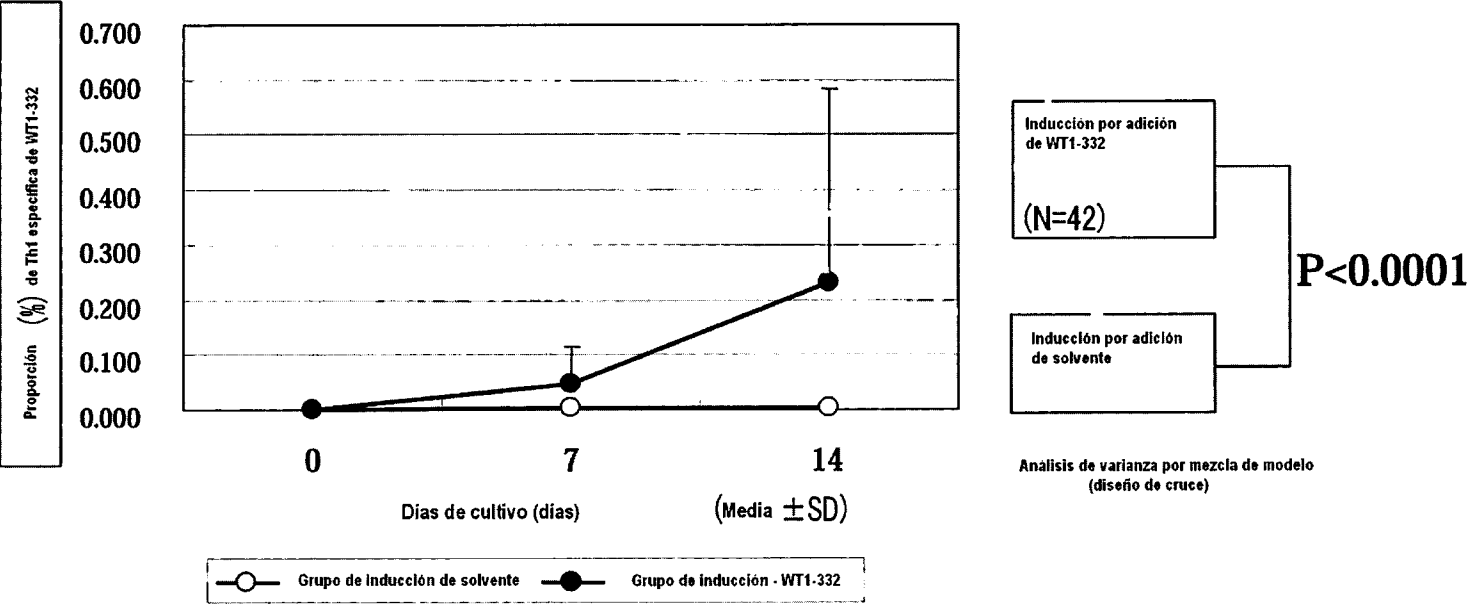


FIGURA 6

69

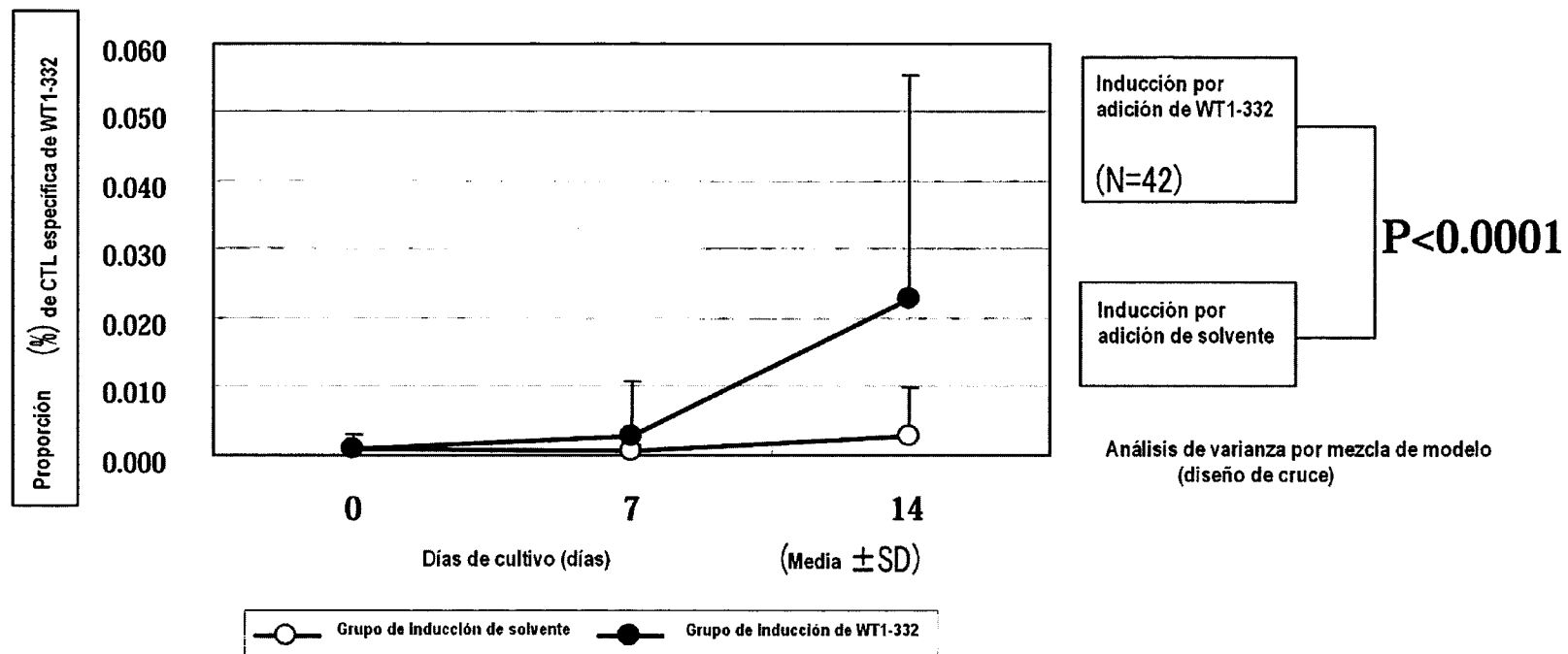


FIGURA 7

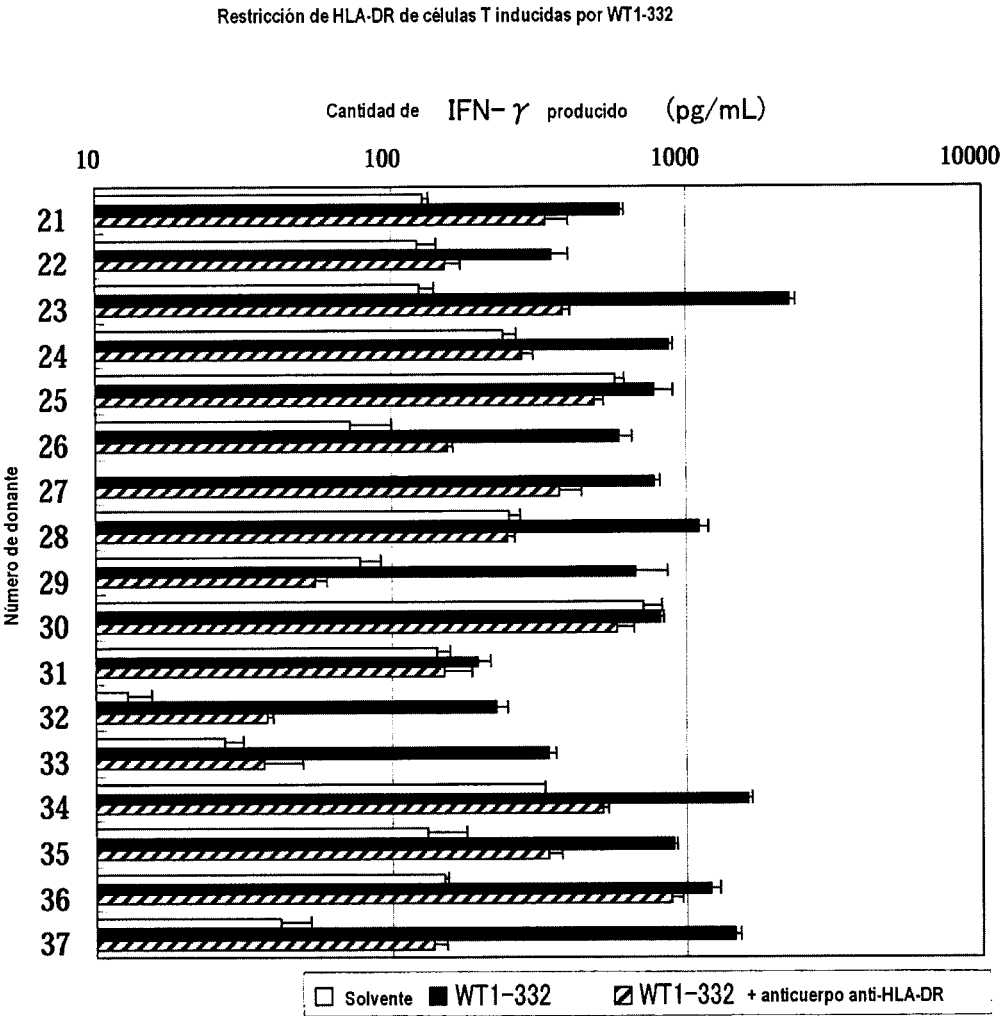


FIGURA 8

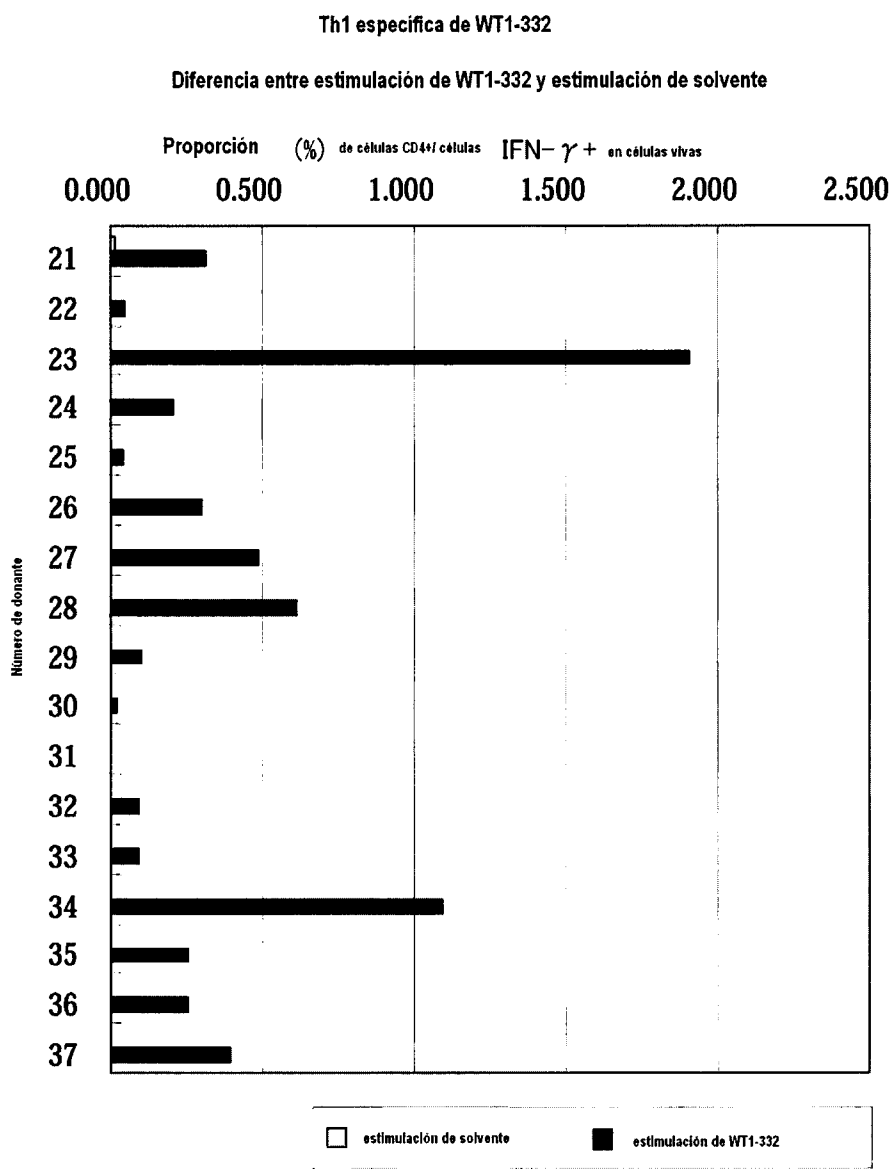


FIGURA 9

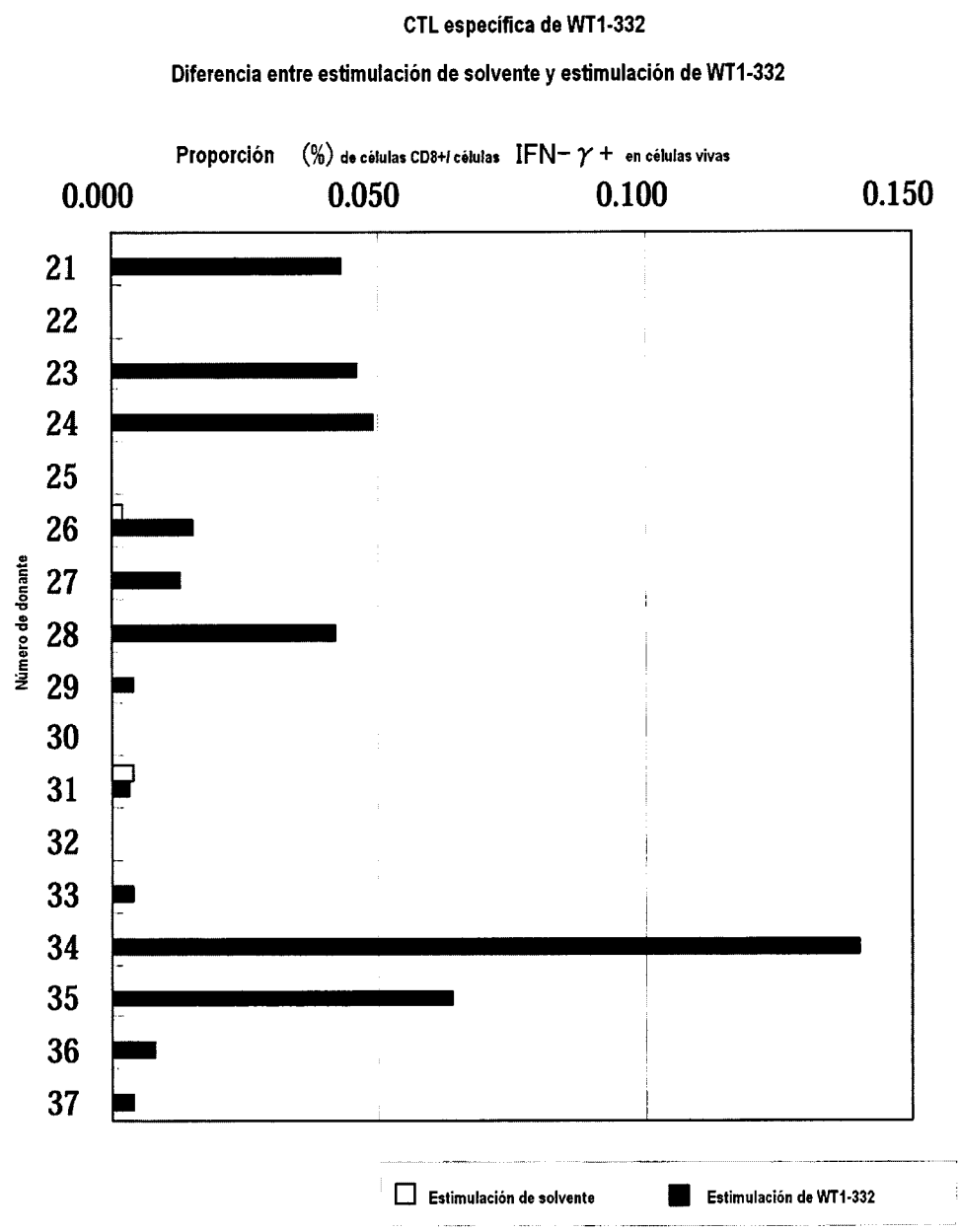


FIGURA 10

24

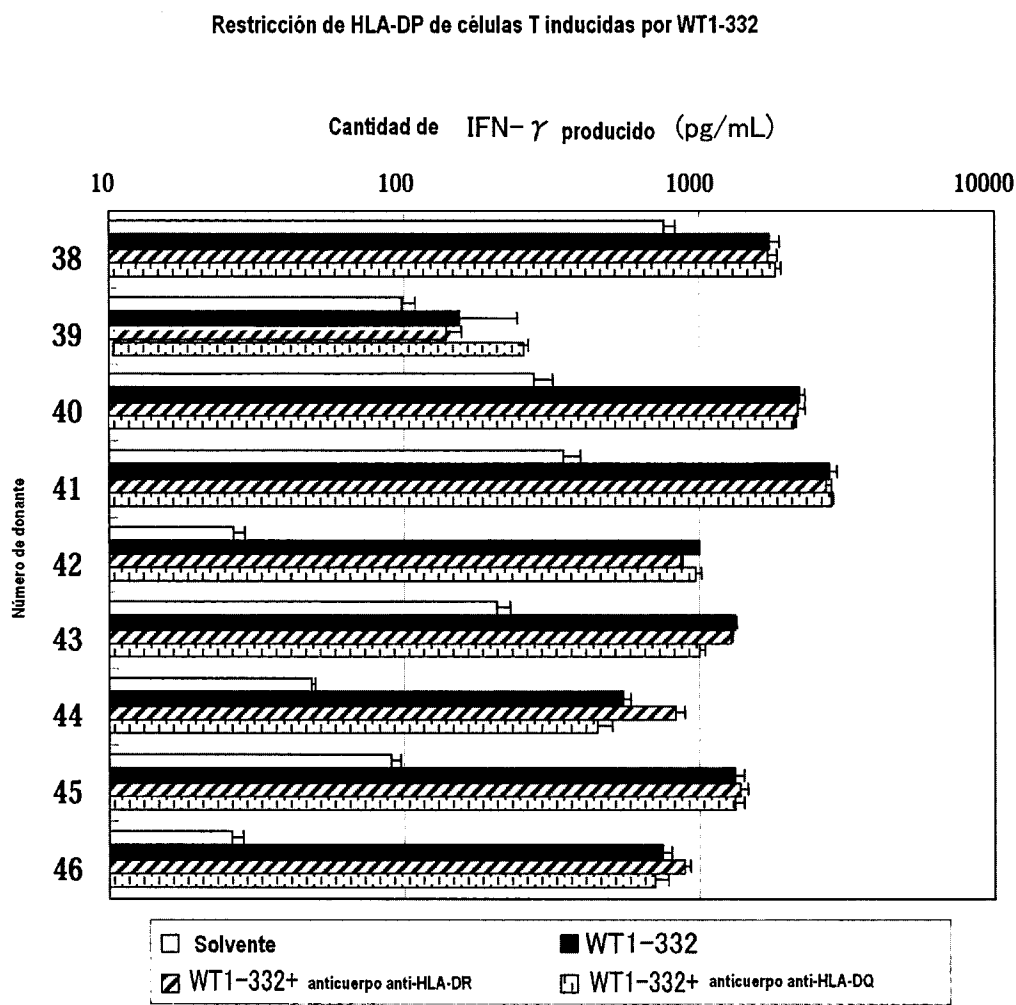


FIGURA 11

25

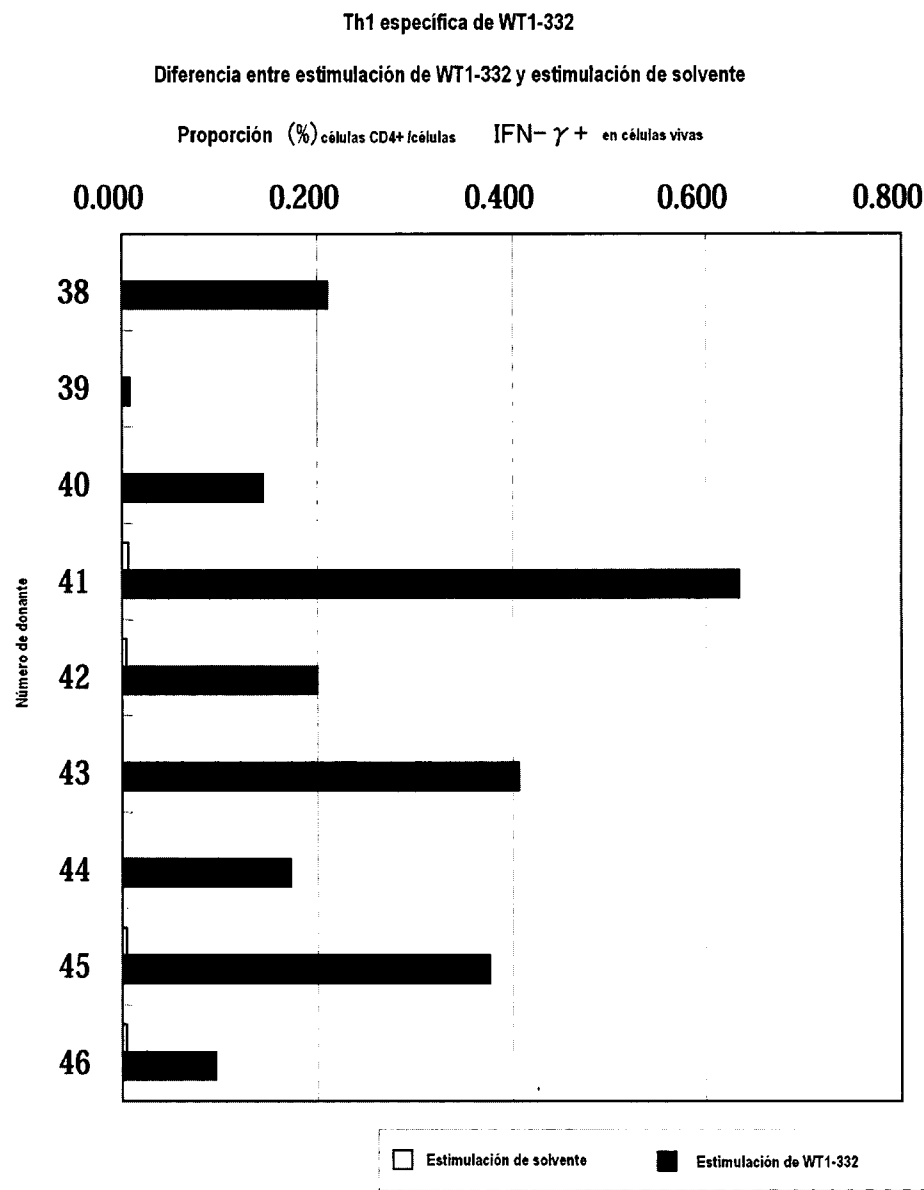


FIGURA 12

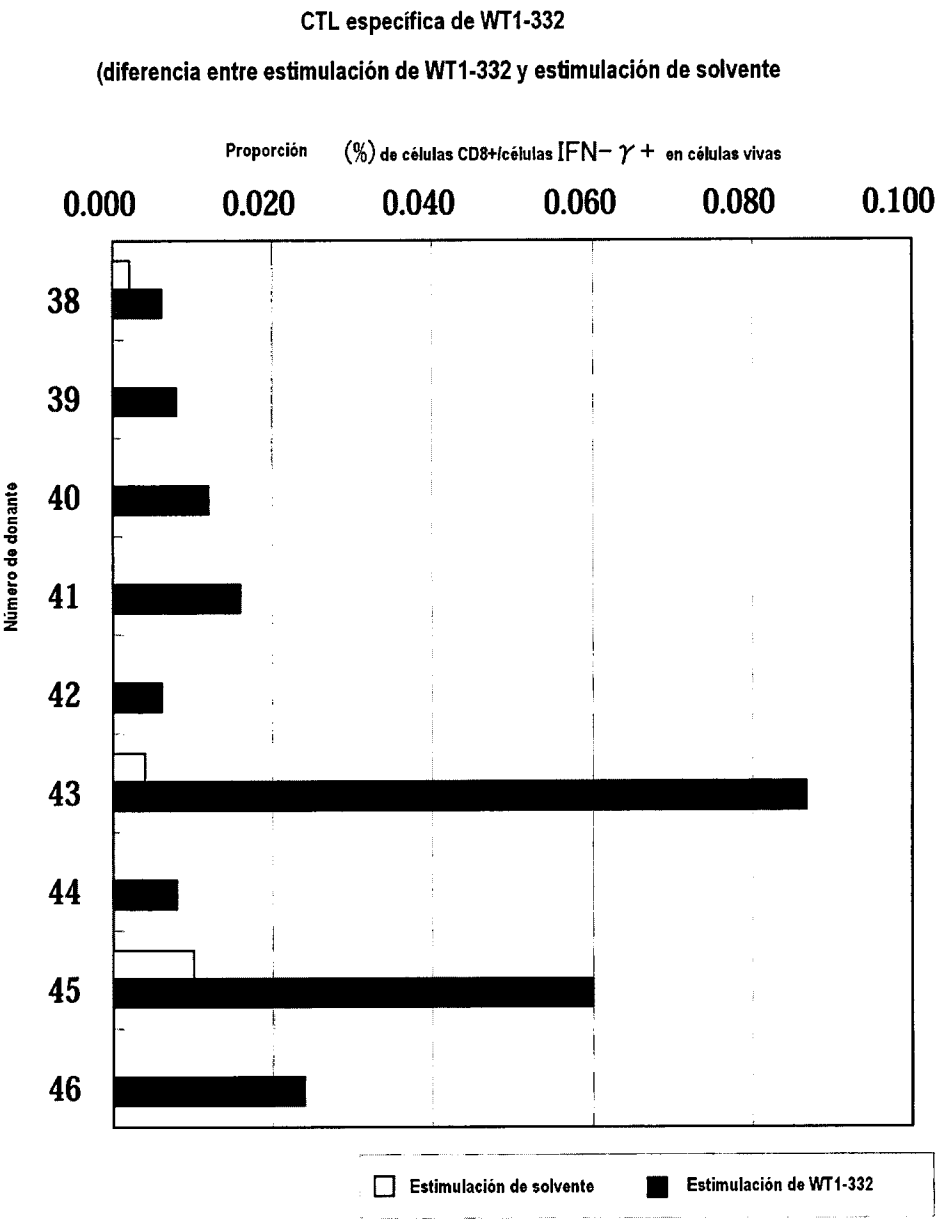


FIGURA 13

CAVELIER

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

179

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

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

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

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

International Institute of Cancer Immunology, Inc.

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

Osaka 564-0053 JAPAN

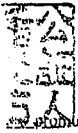
17075
59

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

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

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

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

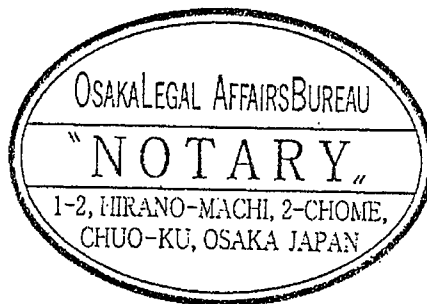


Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan
sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso,
desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes
oficiosos.

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

8

重吉大

重吉大

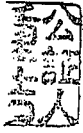
2737



登簿平成21年第334号
嘱託人 株式会社 癌免疫'研究所
代表取締役 高橋泰治は、代理人稲本暢子を
通じ当公証人の面前で、別紙編綴の証書にあ
る上記嘱託人の署名は同嘱託人がしたもので
あることを自認する旨陳述した。_____
上記の会社は日本国大阪府吹田市江の木町13番9号第6マ
イダビル305に所在し日本の法律に基づいて設立された会
社であり高橋泰治は同会社の代表取締役である。_____
よってこれを認証する。_____
平成21年5月21日 _____
公証人重吉孝一郎役場において。_____
大阪市中心区平野町2丁目1番2号（沢の鶴ビル内）
大阪法務局所属
公証人 重吉孝一郎

重吉大

大阪法務局所属 公証人役場



NOTARIAL ATTESTATION

REGISTER NUMBER: 3 3 4 / 2 0 0 9

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

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

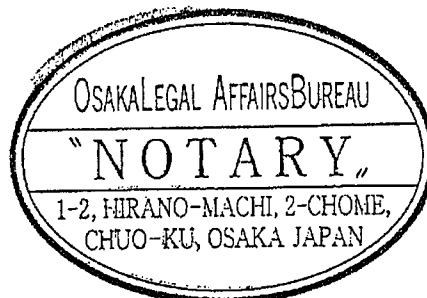
Koichiro Shigeyoshi

Koichiro SHIGEYOSHI

Notary attached to

The Osaka Legal Affairs Bureau

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



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

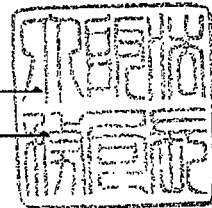
平成 21 年 登簿 第 334 号

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 a la Oficina de Asuntos jurídicos de Osaka.

Eduardo Calado N.
Eduardo Calado 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, JAPÓN

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

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

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

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

21.07.1964

mj

SECRETARÍA DE
RELACIONES EXTERIORES

0001

EDUARDO CAJADO

LA

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

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

domiciliado (s) en/of 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome,

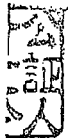
Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan

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

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, 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;

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

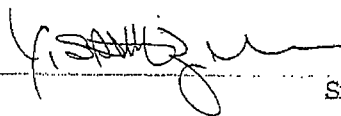


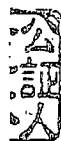
66

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 promuevan. 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.

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

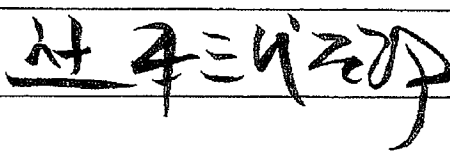
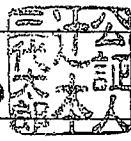
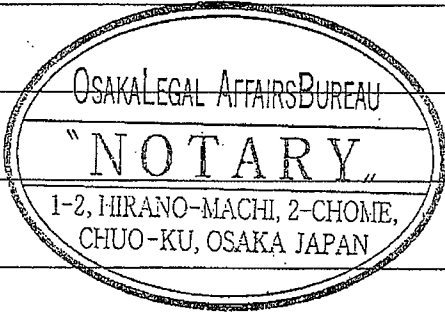
Dado y firmado hoy/Given and signed this 26th of June, 2009
en/in Japan
por/by Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department

Firma  Signature

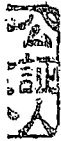


証人

67

登簿平成 21 年第 387 号
当公証人は次の認証をする。
大塚製薬株式会社
知的財産部部長 鮫澤由夫
上記の者は代理人 三枝英二により
当公証人の面前でこの証書の署名を自認した。
上記の会社は日本国東京都千代田区神田司町 2
丁目 9 番地に所在し日本の法律に基づいて設立
された会社であることを東京法務局発行の証明
書によって相違ないことが認められるものであ
る。 _____
平成 21 年 6 月 26 日当公証人役場において
大阪市中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号 (沢の鶴ビル内)
大阪法務局所属
公証人  


大阪法務局所属 公証人役場



Registration No. 387-2009

CERTIFICATE

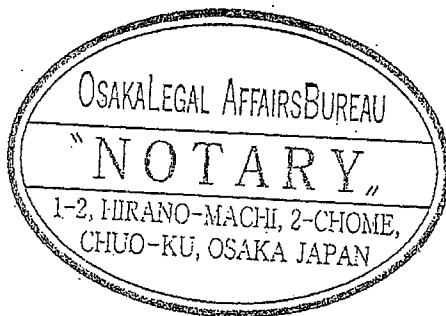
I, the undersigned, hereby certify :

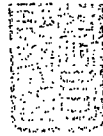
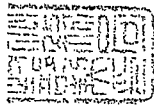
that Eiji SAEGUSA, a proxy for Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department of OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., has stated in my presence that Eiji SAEGUSA has acknowledged as true the signature of Yoshio SAMEZAWA on the attached REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY.

that the abovementioned company is a corporation located at 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan; and was established under the laws of Japan ; as verified by the certificate issued by Tokyo District Legal Affairs Bureau.

Dated on this 26th day of June, 2009


Mirotaro TSUJIMOTO
Notary
Osaka Legal Affairs Bureau





総 第 2833 号

証 明

大阪法務局所属公証人

辻本 三代太郎

平成 21 年 6 月 26 日付

平成 21 年 登簿 第 387 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。

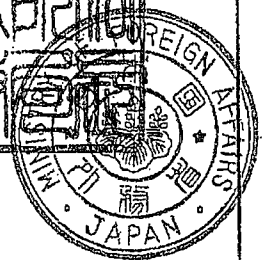
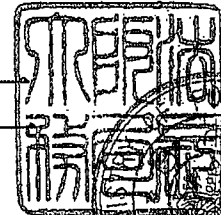
For legalization by the foreign consul in Japan,
this is to certify that the Seal affixed hereto
is genuine.

Osaka, JUN. 26 2009

平成 21 年 6 月 26 日
平成 年 月 日

Official
Ministry of Foreign Affairs
(Consular Service Division)

大阪法務局長 白石 研二



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 JUN. 26. 2009

Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

016576

2009 AGO -3 A 10:12

Jose Diaz
Cuya firma aparece en el
documento de semperna
las funciones indicadas

COPIA DE
LEGALIZACIONES
COPIA DE

EMBAJADA DE COLOMBIA - SECCION CONSULAR

Tokio, Japón, JUNIO 30, 2009

No. 173

El encargado de las funciones consulares de Colombia

CERTIFICA:

Que el (la) Señor(a) NORIKO KAWAHITO, quien autoriza el presente documento, es la persona legalmente facultada para representar en la fecha señalada al (a la) MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPON y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son las que usa y acostumbra para sus actos oficiales.

El Encargado de Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

Firma del Encargado de Funciones Consulares

JOSE FRANCISCO DIAZ MELLA

Segundo Secretario

Derechos: US\$30.00

Encargado de Funciones Consulares

AC

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.04/09b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., domiciliada en 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokio 1018535, Japón, otorga derechos de representación y poder a los Doctores Luz Clemencia de Páez, 23555; Daniel Peña, tpa. 65620 y Germán Marín, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

Dado y firmado el 26 de junio de 2009 en Japón por Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual.

Firma Firma Ilegible

Registro No. 387 - 2009

CERTIFICADO

Yo, el suscrito, por el presente certifico:

que el señor Eiji SAEGUSA, apoderado de Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual de OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., ha declarado en mi presencia que Eiji SEAGUSA ha reconocido como verdadera la firma del señor Yoshio SAMEWAZA en el adjunto documento de Representación y Poder.

que la anterior compañía es una sociedad domiciliada en 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokio 1018535, Japón; y que fue constituida de conformidad con las leyes de Japón; como lo constata el certificado expedido por la Oficina de Asuntos Legales de Tokio.

Fechado hoy 26 de junio de 2009

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

Firma ilegible
Miyotaro TSUJIMOTO
Notario
Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Sello: Oficina de Asuntos Legales de Osaka
NOTARIO
1-2 HIRANO-MACHI, 2-CHOME,
CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

TEXTO EN JAPONÉS

CERTIFICADO

El presente es para certificar que el Certificado Notarial anexo fue suscrito por un Notario debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón y que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha JUN.-26.2009

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Se anexa certificación No.173 expedida por la Sección Consular de la Embajada de Colombia en Tokio, Japón con fecha del 30 de junio de 2009 en donde se certifica la firma anterior del señor NORIKO KAWAHITO como funcionario del Ministerio de Relaciones Exteriores, Japón, así como el sello que aparece en el documento anexo. Certificación firmada por José Francisco Díaz Ulloa, Segundo Secretario de las Funciones Consulares. Pagados los Derechos Consulares.

Legalización de la firma anterior por parte del Jefe de Legalizaciones en Bogotá D.C. del Ministerio de Relaciones Exteriores con número 016576 con fecha del 3 de agosto de 2004.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-155360\WPCL002H\COLO 14055-841-003-5

D. F. V. S.
DIEGO F. VILLALBA
TRADUCCION E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2009 AGO 11 A 9:27

019140

JEFE DE LEGALIZACIONES
COGOTA H.C.

DILEO VARGAS
CUYA FIRMA AGENDE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

RECIBO LEGALIZACION 3/3

No. 981183746596.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 000088

Bogotá D.C., Enero 05 de 2015 - 09:12:47

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	636818733	02/01/2015	11.415.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
			\$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-111246-00007-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 98 94

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-004047-00000-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 98 94

COLO-2015-0028

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 5 de 2015 - 09:12:51

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 15 - 002206
		Bogotá D.C., Enero 07 de 2015 - 16:39:28

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	636818755	07/01/2015	8.603.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
2 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	32.000.00	64.000.00
			\$64.000.00
		=====	

SON: **SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-111246- -00007-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 851 DIVISIONAL Folios: 93 94

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-004047- -00000-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 98 99

800-176-089-2

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐ Indicación que se solicita 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 (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐ Indicación que se solicita una PCT

☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita Diseño industrial

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

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial. La muestra del material que incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

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

☐ Representación gráfica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-111246- -00007-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 95 94

PI02-F08 (2009-11-18)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 15-004047- -00000-0000

Fecha: 2015-01-08 16:38:01 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 95 94