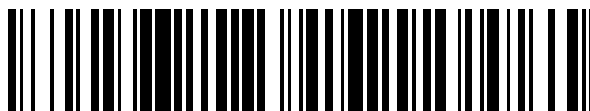


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 156**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04746847 .5**
96 Fecha de presentación: **25.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1640458**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Método para seleccionar pacientes adecuados para vacuna de WT1**

30 Prioridad:
27.06.2003 JP 2003184436
12.03.2004 JP 2004070497

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.04.2012

73 Titular/es:
**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
IMMUNOLOGY, INC.
13-9, ENOKI-CHO
SUITA-SHI, OSAKA-FU, JP**

72 Inventor/es:
SUGIYAMA, Haruo

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 378 156 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para seleccionar pacientes adecuados para vacuna de WT1

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método para seleccionar pacientes altamente sensibles a vacuna de WT1 y un método terapéutico para tratar cáncer que implica dicho método de selección. De forma más particular, la presente invención se refiere a un método para seleccionar pacientes altamente sensibles a vacuna de WT1 basándose en la frecuencia de precursores de CTL específicos de WT1 como un indicador y similares.

Antecedentes de la técnica

El gen WT1 (gen de tumor de Wilms 1) se ha identificado como uno de los genes causantes del tumor de Wilms que es un tumor renal de la infancia (Cell 60: 509, 1990, Nature 343: 774, 1990). El gen WT1 codifica el factor de transcripción WT1 y WT1 desempeña un papel importante en muchos procesos tales como proliferación, diferenciación y apoptosis de células y desarrollo de tejidos (Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998). El gen WT1 se definió originalmente como un gen supresor de tumores. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que el gen WT1 está altamente expresado en leucemia y diversos cánceres sólidos incluyendo cáncer de pulmón y cáncer de mama y por lo tanto, se indica que el gen WT1 ejerce una función oncogénica que promueve el crecimiento canceroso. Además, se demostró que la estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica, siendo dichas células positivas para HLA-A*0201 o HLA-A*2402, con péptidos derivados de WT1 induce los linfocitos T citotóxicos específicos de péptido (CTL) y los CTL destruyen las células de leucemia o de tumor sólido que expresan de forma endógena WT1. Estos resultados demostraron que WT1 es una molécula diana prometedoras para inmunoterapia de cáncer (Int. J. Hematol 76: 127, 2002).

Ha habido métodos conocidos para determinar CTL específicos de péptido antigénico *in vitro*, incluyendo método de monómero de HLA, método de dímero de HLA y método de tetrámero de HLA (Science 274: 94, 1996), método de pentámero de HLA y método de ELISPOT (J. Immunol. Methods 110:29,1988), técnica de RT-PCR en tiempo real (J. Immunol. Methods 210:195,1997), método de dilución limitante (Br. J. Cancer 77: 1907, 1998) y similares. El tetrámero de HLA se prepara por biotilación de un complejo (monómero de HLA) formado por asociación de β 2-microglobulina y cadena α de HLA con un péptido y permitiendo que el monómero se una a avidina marcada con fluorescencia para tetramerización. Las frecuencias de CTL pueden medirse tiñendo CTL específicos de péptido con tetrámeros de HLA y analizando por citometría de flujo. La medición de frecuencias de CTL por método de monómero de HLA, método de dímero de HLA y método de pentámero de HLA puede llevarse a cabo basándose en el mismo principio.

Los CTL no estimulados con vacuna se denominan "células precursoras de CTL". Se considera que cuanto mayor sea la frecuencia de existencia de células precursoras de CTL específicas para un antígeno canceroso dado, más eficazmente pueden inducirse CTL específicos, cuando dicho antígeno se administra como una vacuna de cáncer, que hace más fácil conseguir respuesta química de terapia de vacuna de cáncer. En otras palabras, si un paciente que muestra alta frecuencia de existencia con respecto a células precursoras de CTL específicas para un antígeno de cáncer dado se selecciona antes de la vacunación, sería posible tratar más eficazmente mediante el uso de dicho antígeno de cáncer.

La frecuencia de células precursoras de CTL se midió usando tetrámero de HLA y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con melanoma y se ha presentado en varios artículos; sin embargo, muestran que la frecuencia de células precursoras de CTL específicas para péptido antigénico tumoral es baja (J. Immunother. 24: 66, 2001, Hum. Gene. Ther. 13: 569, 2002). A partir de estos resultados, se ha considerado que la frecuencia de existencia de las células precursoras de CTL específicas para antígeno es generalmente baja y que es difícil seleccionar pacientes adecuados para una vacuna de cáncer basándose en la frecuencia de células precursoras de CTL como un indicador.

Tsuboi *et al*, 2002 (Cancer Immunol Immunother. 51, 614-620) describe un epítipo de unión a HLA-A2 inmunogénico de WT1 y la inducción de CTL específico después de exposición al mismo. Oka *et al*, 2002 (Curr Cane Drug Target, 2, 45-54) describe la generación de CTL específico de WT1 y rechazo de célula tumoral que expresa WT1 por vacunación de WT1. Los autores también describen un péptido derivado de WT1 inmunogénico, concretamente Db126.

Oka *et al*, 2000 (J Immunol, 164,1873-1880) describe la inducción de CTL específico de WT1 en ratones después de administración de péptidos WT1 y posterior protección en estos ratones contra presentaciones tumorales. Los autores concluyen que están presentes precursores de CTL responsables de los péptidos de WT1.

Borrello *et al*, 2002 (Cancer Control, 9(2), 138-150) revisa varios candidatos potenciales para el desarrollo de vacunas de cáncer, incluyendo WT1.

Maeda *et al*, 2002 (Brit J Cancer, 87, 796-804) describe un método para tratamiento de vacuna tumoral que implica la detección de células precursoras de CTL específicas de péptido en el estado de prevacunación. Los autores muestran que son detectables células precursoras de CTL específicas de péptido en la mayoría de los pacientes con cáncer, pero el porcentaje de estas células no implica automáticamente que la persona de ensayo padezca cáncer.

5 **Descripción de la invención**

En su sentido más amplio la presente invención se refiere a métodos como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

10 El fin de la presente invención es proporcionar un método para seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1 basándose en la frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 como un indicador y similares.

15 El presente inventor preparó un tetrámero de HLA usando un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 y usó el tetrámero resultante en la medición de frecuencia de células precursoras de CTL en pacientes de tumor maligno hematopoyético o cáncer de pulmón antes de la administración de la vacuna. Se descubrió sorprendentemente que las células precursoras de CTL (células precursoras de CTL específicas de WT1) existen en mayor frecuencia que las conocidas hasta ahora en comparación con individuos sanos. Este resultado reveló que es posible seleccionar
20 pacientes altamente sensibles a vacuna de WT1 o identificar una molécula diana de vacuna de WT1 basándose en la frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 como un indicador, en lo que respecta al antígeno tumoral WT1. También, puesto que los pacientes que tienen diversos cánceres mostraron alta frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1, resultó evidente que el diagnóstico del cáncer puede hacerse basándose en la frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 como un indicador.

25 El presente inventor clasificó después las células precursoras de CTL específicas de WT1 con precisión con respecto a la función y descubrió que, en particular, la célula precursora de CTL de tipo efector (en lo sucesivo en este documento, puede denominarse simplemente "célula efectora") existe en proporción más alta entre células precursoras de CTL. Este resultado indicó que la selección de pacientes altamente sensibles a vacuna de WT1 o diagnóstico de cáncer también puede llevarse a cabo basándose en la frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 del tipo efector como un indicador.

30 Además, el presente inventor midió la frecuencia de CTL específicos de WT1 en pacientes sometidos a tratamiento con un péptido antigénico tumoral ("péptido de WT1") derivado de WT1 y descubrió que el efecto terapéutico se correlaciona con el aumento de frecuencia de CTL después de la administración en relación con el obtenido antes de la administración.

La presente invención se ha establecido basándose en los hallazgos anteriores.

40 Por lo tanto, la presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Un método *in vitro* para seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1 que comprende las siguientes etapas (a) y (b):

45 (a) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo (a); y
(b) comparar el valor medido de (a) con el de un sujeto sano y evaluar la sensibilidad a vacuna de WT1, usando como indicador que la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras específicas de WT1 de (a) es 1,5 veces o más la de un sujeto sano.

50 (2) El método como se ha descrito en (1), en el que la sensibilidad a vacuna de WT1 permite el diagnóstico de cáncer.

(3) El método como se describe en (1) o (2), en el que la medición de la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 se lleva a cabo por uno cualquiera de método de monómero de HLA, método de dímero de HLA, método de tetrámero de HLA, método de pentámero de HLA, método de ELISPOT, técnica de RT-PCR en tiempo real y método de dilución limitante.

55 (4) El método como se ha descrito en (3), en el que la medición se lleva a cabo por método de tetrámero de HLA.

(5) EL método como se ha descrito en (4), que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

60 (a) poner un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 en contacto con una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;

(b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas al tetrámero de HLA;

65 (c) comparar el valor medido de (b) con el de un sujeto sano y evaluar la sensibilidad a vacuna de WT1, siendo el valor medido de (b) 1,5 veces o más el de un sujeto sano.

- (6) El método como se ha descrito en (5), en el que la sensibilidad a vacuna de WT1 permite el diagnóstico de cáncer.
- (7) Un método para identificar una molécula diana de vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica de un paciente, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
- 5 (a) aplicar cada una de las moléculas diana plurales de la vacuna de WT1 a una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;
- (b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en las muestras biológicas respectivas de (a) y comparar los resultados entre sí; y
- 10 (c) identificar la molécula diana que mostró el mayor valor en (b) como la molécula diana de vacuna de WT1 eficaz para el paciente de ensayo.
- (8) El método de identificación como se ha descrito en (7), en el que la medición de la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 se lleva a cabo por uno cualquiera de método de monómero de HLA, método de dímero de HLA, método de tetrámero de HLA, método de pentámero de HLA, método de ELISPOT, técnica de RT-PCR en tiempo real y método de dilución limitante.
- (9) El método de identificación como se ha descrito en (8), en el que la medición se lleva a cabo por método de tetrámero de HLA.
- 20 (10) El método de identificación como se ha descrito en (9), que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
- (a) poner cada uno de los tetrámeros de HLA plurales que comprenden diferentes péptidos antigénicos tumorales derivados de WT1 en contacto con una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;
- (b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas a los tetrámeros de HLA respectivos y comparar los resultados entre sí; y
- 25 (c) identificar el péptido antigénico de tumor derivado de WT1 contenido en el tetrámero de HLA que mostró el mayor valor en (b) como el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 eficaz para el paciente de ensayo.
- (11) El método como se ha descrito en (5), (6) o (10), en el que la etapa (b) se lleva a cabo midiendo la proporción de células unidas a tetrámero de HLA entre células precursoras de CTL positivas para CD8 o positivas para CD8/CD3 o CTL.
- (12) El método como se ha descrito en (1) o (2), en el que las células precursoras de CTL son células precursoras de CTL de tipo efector.
- 35 (13). El método como se ha descrito en (12), que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
- (a) poner un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD45RA y un anticuerpo anti-CD27 en contacto con una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
- 40 (b) medir la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 de tipo efector entre células precursoras de CTL que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivas para unión al tetrámero de HLA; y
- (c) comparar el resultado medido de (b) con el de un sujeto sano y evaluar la sensibilidad a vacuna de WT1, siendo el valor medido de (b) 1,5 veces o más el de un sujeto sano.
- 45 (14) El método como se ha descrito en (4) a (6), (9) a (12) en el que el antígeno de HLA como un componente del tetrámero de HLA es un antígeno RLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
- (15) El método como se ha descrito en (14), en el que el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona de los siguientes péptidos:
- 50 Cys Met Thr Trp Asn Gin Met Asn Leu (SEC ID N°: 2);
Cys Tyr Thr Trp Asn Gin Met Asn Leu (SEC ID N°: 3); y
Arg Tyr Pro Ser Cys Gin Lys Lys Phe (SEC ID N°: 5).
- 55 (16) El método como se ha descrito en (1) a (15), que se lleva a cabo usando citometría de flujo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la frecuencia de existencia de precursores de CTL específicos de WT1 en pacientes que tienen cáncer e individuos sanos. El eje vertical indica la frecuencia de precursores de CTL (células precursoras). El "cáncer de sangre" muestra los resultados obtenidos de pacientes positivos para HLA-A2402 que tienen tumor maligno hematopoyético. La expresión "cáncer de pulmón" muestra los resultados obtenidos de pacientes positivos para HLA-A2402 que tienen cáncer de pulmón y el término "sano" los resultados obtenidos de individuos sanos positivos para HLA-A2402.

10 Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona un método *in vitro* para seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1, que comprende las siguientes etapas (a) y (b),

15 (a) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo (a); y

(b) comparar el valor medido de (a) con el de un sujeto sano y evaluar la sensibilidad a vacuna de WT1, usando como un indicador que la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras específicas de WT1 de (a) es 1,5 veces o más la de un sujeto sano.

20 El presente inventor ha descubierto que existen células precursoras de CTL (células precursoras de CTL específicas de WT1) en un paciente antes de la administración de vacuna en frecuencias mayores que las conocidas hasta ahora. En consecuencia, pueden seleccionarse pacientes altamente sensibles a vacuna de WT1 basándose en la cantidad o frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 como un indicador.

25 El sujeto de ensayo en la etapa (a) se refiere a una persona que se sospecha o se diagnostica que tiene cáncer, específicamente, una persona que se sospecha o se diagnostica que tiene cáncer incluyendo cánceres de la sangre tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer de ovario. Es un ejemplo preferido una persona que se sospecha o se diagnostica que tiene leucemia, síndrome mielodisplásico y cáncer de pulmón.

30 No existen limitaciones con respecto a la muestra biológica usada en la etapa (a) siempre que contenga células precursoras de CTL. Los ejemplos específicos incluyen sangre, fluido linfático o cultivos de los mismos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de sangre o tejidos en los que se infiltran linfocitos T y similares. La muestra biológica puede usarse tal cual o después de dilución o concentración. Es un ejemplo preferido PBMC, que puede aislarse de una manera convencional tal como método de centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque.

40 El método para medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en la etapa (a) puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, por el que pueda medirse la frecuencia de existencia o cantidad de CTL. Los ejemplos específicos incluyen método de monómero de HLA, método de dímero de HLA, método de tetrámero de HLA, método de pentámero de HLA, método de ELISPOT, técnica de RT-PCR en tiempo real, método de dilución limitante y similares.

45 Como se usa en este documento, el método de tetrámero de HLA es un método en el que se detecta un CTL específico de péptido antigénico usando un tetrámero de HLA preparado por biotinylación de un monómero de HLA (dicho monómero se ha formado por asociación de una cadena α de antígeno HLA y una β 2-microglobulina con un péptido antigénico objetivo) y permitiendo la unión a avidina marcada con fluorescencia para tetramerización. Específicamente, la cantidad de CTL puede determinarse tiñendo un CTL específico de péptido antigénico por dicho tetrámero de HLA y analizando por citometría de flujo. La preparación de un tetrámero de HLA y detección de CTL usando el mismo se conocen y pueden llevarse a cabo de acuerdo con un método, por ejemplo, descrito en la bibliografía (Science 274; 94, 1996).

50 El método de monómero de HLA es un método en el que se detecta un CTL específico de péptido antigénico usando un monómero de HLA usado en la preparación de tetrámeros de HLA, formándose dicho monómero por asociación de una cadena α de antígeno de HLA y una 2-microglobulina con un péptido antigénico seguido de biotinylación.

60 El método de dímero de HLA es un método en el que se detecta un CTL específico de péptido antigénico usando un dímero de HLA que se prepara fusionando una cadena α de antígeno de HLA y una Ig (inmunoglobulina, por ejemplo, IgG1) y permitiendo que la fusión resultante se una a β 2-microglobulina y un péptido antigénico (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6671-6675 (1993)). Los CTL específicos de péptido antigénico unidos a dímero de HLA pueden detectarse, por ejemplo, permitiendo que el anticuerpo anti-IgG1 marcado se una a IgG1.

65 El método de pentámero de HLA es un método que se ha desarrollado recientemente, en el que se detecta un CTL específico de péptido antigénico usando un pentámero en el que se polimerizan cinco moléculas complejas de un

antígeno de HLA y un péptido antigénico a través de dominio de superenrollamiento. Puesto que el complejo de antígeno de HLA-péptido antigénico puede marcarse con fluorescencia o similares. El análisis puede llevarse a cabo por citometría de flujo o similares como sucede con el método de tetrámero de HLA (véase, <http://www.proimmune.co.uk/>).

5 Los anteriormente mencionados, monómero, dímero, tetrámero y pentámero de HLA están todos disponibles por producción a petición del cliente de un fabricante tal como Prolimmune o BD Biosciences.

10 El método de ELISPOT es un método en el que se detecta CTL en una muestra biológica inmovilizando un anticuerpo inducido contra una citocina tal como IFN- γ o GM-CSF en una placa, añadiendo una muestra biológica estimulada por un antígeno o péptido antigénico pretendido y detectando la citocina secretada de CTL activado en la muestra biológica y unida al anticuerpo inmovilizado anterior como un punto usando anticuerpo anti-citocina. El método para determinar CTL por el método de ELISPOT se conoce y se puede llevar a cabo de acuerdo con un método descrito en la bibliografía (por ejemplo, J. Immunol. Methods 110: 29, 1988).

15 El método de RT-PCR en tiempo real es un método en el que la frecuencia de CTL sensible a un antígeno o péptido antigénico objetivo se mide de forma indirecta a través de la medición de un gen que codifica citocina tal como IFN- γ , GM-CSF o similares producido por CTL activado por medio de RT-PCR. El método para determinar CTL por el método de RT-PCR en tiempo real se conoce y puede llevarse a cabo de acuerdo con un método descrito en la bibliografía (por ejemplo, J. Immunol. Methods 210: 195, 1997).

20 El método de dilución limitante es un método en el que la frecuencia de CTL se mide sembrando en placas una muestra biológica que contiene CTL en pocillos a diferentes densidades celulares, cultivando la placa mientras se estimula con un antígeno o péptido antigénico objetivo, midiendo la cantidad de citocinas o citotoxicidad producida por los CTL activados y determinando la frecuencia de CTL basándose en el número de pocillos positivos. El método para determinar CTL por el método de dilución limitante se conoce y puede llevarse a cabo de acuerdo con un método descrito en la bibliografía (por ejemplo, Br. J. Cancer 77:1907,1998).

25 Es posible medir la frecuencia de existencia o cantidad de precursores de CTL específicos de WT1 de acuerdo con el método conocido para determinación de CTL como se ha mencionado anteriormente.

30 La evaluación de sensibilidad a vacuna de WT1 en la etapa (b) se lleva a cabo comparando la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en un sujeto de ensayo obtenida en la etapa (a) (en lo sucesivo en este documento, denominada "valor de sujeto de ensayo"), con la de un sujeto sano (en lo sucesivo en este documento, denominado "valor de sujeto sano") y decidiendo la diferencia entre ellos. En este caso, se necesita un material biológico aislado y preparado de un sujeto sano (sangre, fluido linfático, PBMC, etc.), que puede obtenerse recogiendo una muestra biológica de un sujeto sin cáncer. Como se usa en este documento, "sujeto sano" significa una persona a la que no se le ha diagnosticado cáncer.

35 La comparación entre los valores de sujeto de ensayo y los valores del sujeto sano puede llevarse a cabo midiendo la muestra biológica de un sujeto de ensayo y la de un sujeto sano en paralelo. Cuando no se realiza la comparación paralela, también puede llevarse a cabo comparación usando un valor medio o un valor intermedio estadístico de valores de sujeto sano calculados a partir de los valores del sujeto sano obtenidos por medición de muestras biológicas plurales (al menos 2, preferiblemente 3 ó mas, más preferiblemente 5 ó más) de un sujeto sano en condiciones constantes cuando no se realiza medición paralela.

40 La evaluación de si un sujeto de ensayo es o no altamente sensible a vacuna de WT1 se lleva a cabo usando como un indicador que el valor del sujeto de ensayo es 1,5 veces o más, preferiblemente 2 veces o más en comparación con el valor del sujeto de ensayo. Es decir, cuando el valor del sujeto de ensayo sea 1,5 veces o mayor, preferiblemente, 2 veces o mayor que el valor del sujeto sano, se evalúa que la sensibilidad a vacuna de WT1 es alta. Se evalúa que un paciente que se ha evaluado que es altamente sensible a vacuna de WT1 es adecuado para vacuna de WT1, en otras palabras, es posible preferiblemente aplicar la terapia de vacuna de WT1 al paciente.

45 Entre los métodos anteriormente mencionados para medir CTL, el método de tetrámero de HLA es el más preferido desde el punto de vista de facilidad y precisión. Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención proporciona un método para seleccionar y tratar a un paciente altamente sensible a vacuna de WT1 caracterizado porque usa el método de tetrámero de HLA. Como se ha mencionado anteriormente, el método de monómero de HLA, método de dímero de HLA y método de pentámero de HLA son principalmente los mismos que el método de tetrámero de HLA y son métodos preferidos para medir CTL. Sin embargo, la presente invención se describirá en este documento tomando el método de tetrámero de HLA como ejemplo.

50 El método para seleccionar y tratar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1 mediante el uso de tetrámero de HLA, específicamente, comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c)

55 (a) poner un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico de tumor derivado de WT1 en contacto con la muestra biológica;

- (b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas al tetrámero de HLA y
 (c) decidir si el valor medido de (b) es alto o no en comparación con el del sujeto sano y evaluar la sensibilidad a la vacuna de WT1, usando como un indicador que la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras específicas de WT1 para vacuna de WT1 de (a) es 1,5 veces o más la de un sujeto sano.

A este respecto, la “muestra biológica” y el “sujeto de ensayo” en la etapa (a) son los mismos que se han definido anteriormente.

- 10 El “tetrámero de HLA” usado en la etapa (b) se refiere a un tetrámero preparado por biotilación de un complejo (monómero de HLA) obtenido por asociación de una cadena α de antígeno HLA y una 2-microglobulina con un péptido (péptido antigénico) y permitiendo que se una a avidina para tetramerización (Science 279:2103- 2106 (1998) y Science 274: 94-96 (1996)). El tetrámero de HLA se marca preferiblemente con fluorescencia de modo que las células precursoras de CTL puedan seleccionarse fácilmente o detectarse por una medida de detección conocida tal como citometría de flujo, microscopía fluorescente y similares. Los ejemplos específicos incluyen tetrámeros de HLA marcados con ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína de peridininil clorofila (PerCP), alofococianina (APC), ficoeritrina-texasred (también llamada ECD) y ficoeritrina-cianina 5.1 (también llamada PC5) o similares.
- 20 El péptido antigénico de cáncer derivado de WT1 usado como un componente de un tetrámero de HLA anterior se origina de WT1 humano (Cell, 60: 509, 1990, N° de acceso de base de datos de NCBI XP_034418, SEC ID N°: 1) y es capaz e formar un complejo con un antígeno de HLA y de este modo ejercer la actividad inductora de linfocitos T citotóxicos (CTL) restringidos por HLA (inmunogenicidad).
- 25 Se ha sabido que existen muchos subtipos de molécula de HLA y que la secuencia de aminoácidos del péptido antigénico tumoral con el que se une una molécula de HLA obedece a una cierta regla (motivo de unión) (Immunogenetics, 41, p178, 1995; J.Immunol., 155: p4749, 1995). Por ejemplo, se conoce el motivo de unión para HLA-A24 en el que, en los péptidos que consisten en 8-11 restos aminoacídicos, el aminoácido en la posición 2 es tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), metionina (Met) o triptófano (Trp) y el aminoácido en la posición C-terminal es fenilalanina (Phe), leucina (Leu), isoleucina (Ile), triptófano (Trp) o metionina (Met) (J. Immunol., 152, p3913, 1994, Immunogenetics, 41, p178, 1995, J. Immunol., 155, p4307, 1994).

Con respecto a los motivos para HLA-A2, se conocen los siguientes motivos enumerados en la Tabla 1 (Immunogenetics, 41, p178, 1995; J. Immunol., 155: p4749, 1995).

Tabla 1

Tipo de HLA-A2	2º aminoácido desde el extremo N-terminal	aminoácido en el extremo C-terminal
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0206	V, Q	V, L
HLA-A0207	L	L

Longitud del péptido = 8 - 11 aminoácidos

- Recientemente, se ha hecho posible buscar secuencias peptídicas que se espera que sean capaces de unirse a antígenos de HLA mediante internet usando software BIMAS; NIH (http://bimas.dcrf.nih.gov/molbio/hla_bind/). También es posible buscar secuencias peptídicas usando análisis de predicción de unión de péptido HLA BIMAS (J. Immunol., 152,163, 1994). Los ejemplos específicos de péptidos derivados de WT1 que se han buscado e identificado de tal manera son los enumerados en la Tabla II – Tabla XLVI del documento WO2000/18795.

- Los péptidos derivados de WT1 anteriormente mencionados pueden alterarse parcialmente por sustitución, delección y/o adición de un resto o restos aminoacídicos incluyendo la adición de un resto o restos aminoacídicos en el extremo N y/o C-terminal del péptido, preferiblemente, por sustitución de un resto o restos aminoacídicos. La sustitución se lleva a cabo preferiblemente con un resto aminoacídico disponible a la vista de los motivos mencionados anteriormente.

- Un péptido antigénico de cáncer derivado de WT1 puede seleccionarse sometiendo los péptidos derivados de WT1 (incluyendo variantes) a un ensayo conocido para péptido antigénico de cáncer, por ejemplo, un método descrito en el documento WO02/47474 o Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002)

Los ejemplos específicos de péptidos antigénicos de cáncer derivados de WT1 incluyen los siguientes péptidos

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu	(SEC ID N°: 2)
Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu	(SEC ID N°: 3)
Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu	(SEC ID N°: 4)
Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe	(SEC ID N°: 5)
Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu	(SEC ID N°: 6)
Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu	(SEC ID N°: 7)
Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu	(SEC ID N°: 8)
Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu	(SEC ID N°: 9)
Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu	(SEC ID N°: 10)
Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu	(SEC ID N°: 11)
Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu	(SEC ID N°: 12)
Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu	(SEC ID N°: 13)
Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu	(SEC ID N°: 14)
Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu	(SEC ID N°: 15)
Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe	(SEC ID N°: 16)
Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe	(SEC ID N°: 17)
Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe	(SEC ID N°: 18)

En las anteriores, "Abu" se refiere a "ácido α -aminoacético".

- 5 Entre ellos, los péptidos expuestos en SEC ID N°: y SEC ID N°: 4 son péptidos de unión a antígeno de HLA-A24 y antígeno de HLA-A2 y los otros péptidos expuestos en SEC ID N°: 3, 5, 6 - 18 son péptidos de unión a antígeno de HLA-A24.

- 10 El péptido antigénico de cáncer preferido puede seleccionarse de los expuestos en SEC ID N°: 2, 3, 4 y 5 anteriormente.

Un tetrámero de HLA puede contener dos o más péptidos entre los anteriormente mencionados.

- 15 Puede realizarse síntesis de un péptido de acuerdo con procesos generalmente usados en el campo de la química de péptidos. Un método tal puede hallarse en la bibliografía incluyendo Peptide Synthesis, Interscience, Nueva York, 1966; The Proteins, Vol. 2, Academic Press Inc., Nueva York, 1976; Peptide Synthesis, Maruzen, Inc., 1975; Peptide-Gosei no Kiso to Jikken, Maruzen, Inc., 1985; e Iyakuhi no Kaihatsu (Zoku), Vol. 14, Peptide Synthesis, Hirokawa-syoten, 1991.

- 20 Además la presente descripción incluye péptidos en los que el grupo amino del aminoácido N-terminal o el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal de los péptidos anteriormente descritos está modificado.

Los péptidos que experimentan dicha modificación también quedan dentro del alcance de la presente descripción.

- 25 Los ejemplos de un grupo para la modificación de grupo amino del aminoácido N-terminal incluyen grupos 1 a 3 seleccionados de un grupo alquilo C₁ - C₆, un grupo fenilo, un grupo cicloalquilo y un grupo acilo, específicamente, un grupo alcanilo C₁ - C₆, un grupo alcanilo C₁ - C₆ sustituido por grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido por grupo cicloalquilo C₅ - C₇, un grupo alquilsulfonilo C₁ - C₆, un grupo fenilsulfonilo, un grupo alcóxicarbonilo C₂ - C₆, un grupo alcóxicarbonilo sustituido por grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido por grupo cicloalcoxi C₅ - C₇ y un grupo fenoxicarbonilo y similares.

- 35 Los ejemplos de un grupo para la modificación de grupo carboxilo del aminoácido C-terminal incluyen un grupo éster y un grupo amida. El grupo éster incluye específicamente un grupo alquil éster C₁ - C₆, un grupo alquil éster C₀ - C₆ sustituido por grupo fenilo y un grupo cicloalquil éster C₅ - C₇ y similares. El grupo amida incluye específicamente un grupo amida, un grupo amida sustituido por uno o dos grupos alquilo C₁ - C₆, un grupo amida sustituido por uno dos grupos alquilo C₀ - C₆ que se sustituyen por grupo fenilo y un grupo amida que forma azacicloalcano de 5 a 7 miembros que incluye átomo de nitrógeno de grupo amida y similares.

- 40 Como antígeno de HLA (cadena α de antígeno de HLA), que es un componente del tetrámero de HLA, puede usarse un antígeno de HLA de cualquier subtipo; sin embargo, es necesario usar un antígeno de HLA del mismo subtipo que el del sujeto a diagnosticar o seleccionar. Los ejemplos de antígeno de HLA incluyen antígeno de HLA-A24 tal como HLA-A*2402, etc.; antígeno de HLA-A2 tal como HLA-A*0201, -A*0204, -A*0205, -A*0206, etc.; antígeno de HLA-A26 tal como HLA-A*2601, etc.; y HLA-A*3101, HLA-A*3303, HLA-A*1101, y similares. Los ejemplos específicos incluyen antígeno de HLA-A24, antígeno de HLA-A2 y antígeno de HLA-A26. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de estos antígenos de HLA se conocen. Por ejemplo, las secuencias para antígeno de

HLA-A24 se describen en Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995) y número de acceso de Genbank M64740; las del antígeno de HLA-A2 en número de acceso de Genbank M84379; y las del antígeno de HLA-A26 en número de acceso de Genbank D 14350. En consecuencia, puede clonarse fácilmente una cadena α de antígeno de HLA basándose en la información con respecto a estas secuencias de bases conocidas de una manera convencional tal como PCR.

La cadena α de dicho antígeno de HLA es preferiblemente un fragmento en forma soluble para hacer la unión y selección de CTL fácil. Se prefiere adicionalmente que el extremo C-terminal de la cadena α de dicho antígeno de HLA tenga una estructura viable para que la biotilación permita tetramerización por unión de biotinavidina, es decir, tiene una parte de unión a biotina añadida.

Específicamente, en el caso de HLA-A2402 (un tipo de HLA-A24), se prepara ADNc para una cadena α de HLA-A*2402 soluble recombinante que se diseña para permitir que el resto de lisina específico en el marcador C-terminal se biotinile por enzima BirA mediante reacción de PCR usando, como un molde, un plásmido de expresión de HLA-A*2402 (número de acceso de GenBank M64740) y, como un cebador directo:

5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTTCTACCTCCGT-3' (SEC ID N°: 19); y, como un cebador inverso:

5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGGCAGACCCTC-3' (SEC ID N°: 20).

Como una 2-microglobulina que es un componente de tetrámero de HLA, se prefiere 2-microglobulina humana. Puede prepararse ADNc para dicha 2-microglobulina humana mediante reacción de PCR usando, como un molde, un plásmido de expresión de β 2-microglobulina humana (número de acceso de GenBank AB021288) y, como un cebador directo:

5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAAATTCAG-3' (SEC ID N°: 21); y, como un cebador inverso:

5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3' (SEC ID N°: 22).

Como avidina que es un componente de tetrámero de HLA, puede usarse cualquier avidina conocida hasta ahora. Sin embargo, se prefiere que dicha avidina esté marcada con fluorescencia para facilitar la detección por citometría de flujo o microscopía fluorescente y similares. Puede usarse cualquier pigmento fluorescente conocido sin limitación, por ejemplo, ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína peridinil clorofila (PerCP), alofocianina (APC), ficoeritrina-texasred (también llamada ECD) y ficoeritrina-cianina 5.1 (también llamada PC5) o similares.

El proceso para la preparación de tetrámeros de HLA que comprende esos componentes para un tetrámero de HLA se conoce bien como se ha descrito en la bibliografía (Science 279: 2103-2106 (1998), Science 274: 94-96 (1996), etc.). La preparación se describirá en lo sucesivo en este documento de forma breve.

Primero, una célula hospedadora apropiada tal como células de *E. coli* o de mamífero capaces de expresar una proteína se transforma con un vector de cadena α de HLA y un vector de expresión de β 2-microglobulina y se permite que se exprese. Se usa aquí preferiblemente *E. coli* (por ejemplo, BL21). El complejo de HLA monomérico resultante y un péptido antigénico (péptido antigénico de cáncer derivado de WT1) se mezclan después para formar un complejo de péptido-HLA soluble. La secuencia C-terminal de la cadena α de HLA del complejo de péptido-HLA resultante se biotinila con enzima BirA. Cuando se mezclan un complejo de péptido-HLA biotilado y una avidina marcada con fluorescencia a la relación molar de 4:1, se forma un tetrámero de HLA. Se prefiere purificar la proteína resultante por filtración en gel o similares en cada etapa anterior.

La etapa (a) anterior se lleva a cabo poniendo un tetrámero de HLA preparado como se ha mencionado anteriormente en contacto con una muestra biológica (una muestra biológica que contiene precursores de CTL aislados de un sujeto de ensayo). El contacto se lleva a cabo preferiblemente a 37 °C. Además, el contacto se lleva a cabo preferiblemente en un tampón biológico normal tal como tampón fosfato que contiene suero (PBS).

Se prefiere que se prepare un control negativo realizando los mismos procedimientos en paralelo usando estreptavidina marcada con fluorescencia en lugar de tetrámero de HLA.

En la etapa (b) después de la etapa (a), se mide la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas a un tetrámero de HLA. La medición puede llevarse a cabo por cualquiera de los métodos conocidos hasta ahora. Cuando un tetrámero de HLA está marcado con fluorescencia, las células precursoras de CTL unidas al tetrámero de HLA también están marcadas con fluoresceína. Los CTL marcados de este modo pueden detectarse o aislarse por citometría de flujo o microscopía fluorescente.

La frecuencia de existencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas a tetrámero de HLA pueden obtenerse, por ejemplo, midiendo la proporción (frecuencia) de células unidas a tetrámero de HLA entre células positivas para CD8 (células precursoras de CTL positivas para CD8) o células positivas para CD8/CD3 (células

precursoras de CTL positivas para CD8/CD3).

Las células positivas para CD8 pueden marcarse y detectarse usando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti CD8 humano de ratón marcado con fluorescencia. Las células positivas para CD3 pueden marcarse y detectarse usando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con fluorescencia.

Debe usarse aquí un pigmento fluorescente diferente del usado en el tetrámero de HLA. Es decir, deben usarse pigmentos fluorescentes distintos entre sí, por ejemplo, cuando se usa tetrámero de HLA marcado con PE, puede usarse anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC y anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con PerCP.

El proceso concreto comprende, cuando se mide la proporción (frecuencia) de células unidas a tetrámero de HLA con respecto a células positivas para CD8, por ejemplo, poner el tetrámero de HLA marcado con PE en contacto con una muestra biológica, añadir anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC, permitir que la mezcla reaccione y analizar las células teñidas por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia. Se seleccionan las células positivas para CD8 (CD8+). La proporción (frecuencia) de células precursoras de CTL específicas para péptido antigénico de WT1 puede calcularse restando la proporción de células positivas para avidina (CD8⁺avidina⁺) como el control negativo de la proporción de células positivas para tetrámero (CD8⁺tetrámero⁺) en las células CD8⁺ seleccionadas, como sigue:

$$\text{Células precursoras de CTL específicas para péptido antigénico de WT1 (\%)} = 100 \times \left\{ \left[\frac{\text{células CD8}^+ \text{ tetrámero}^+}{\text{células CD8}^+} \right] - \left[\frac{\text{células CD8}^+ \text{ avidina}^+}{\text{células CD8}^+} \right] \right\}$$

Cuando se mide la proporción (frecuencia) de células unidas a tetrámero de HLA con respecto a células positivas para CD8 y CD3, por ejemplo, poniendo tetrámero de HLA marcado con PE en contacto con una muestra biológica, añadiendo anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC y anticuerpo anti-CD3 humano de ratón marcado con PerCP, permitiendo que la mezcla reaccione y analizando las células teñidas por citometría de flujo o microscopía fluorescente, se seleccionan las células positivas para CD3 y CD8 (CD3⁺CD8⁺). La proporción (frecuencia) de células precursoras de CTL específicas para péptido antigénico de WT1 puede calcularse restando la proporción de células positivas para avidina (CD3⁺CD8⁺avidina⁺) como el control negativo de la proporción de células positivas para tetrámero (CD3⁺CD8⁺tetrámero⁺) en las células CD3⁺CD8⁺ seleccionadas, como sigue:

$$\text{Células precursoras de CTL específicas de péptido antigénico de WT1 (\%)} = 100 \times \left\{ \left[\frac{\text{células CD3}^+ \text{ CD8}^+ \text{ tetrámero}^+}{\text{células CD3}^+ \text{ CD8}^+} \right] - \left[\frac{\text{células CD3}^+ \text{ CD8}^+ \text{ avidina}^+}{\text{células CD3}^+ \text{ CD8}^+} \right] \right\}$$

La sensibilidad a vacuna de WT1 se evalúa basándose en los resultados obtenidos por la medición anterior. Específicamente, se lleva a cabo comparando la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en un sujeto de ensayo obtenido en la etapa (a) (en lo sucesivo en este documento, denominado "valor de sujeto de ensayo") con la de sujeto sano (en lo sucesivo en este documento, denominado "valor de sujeto sano") y decidiendo la diferencia entre ellas. En este caso, se necesita un material biológico aislado y preparado a partir de un sujeto sano (sangre, fluido linfático, PBMC, etc.), que puede obtenerse recogiendo una muestra biológica de un sujeto que no tenga cáncer. Como se usa en este documento "sujeto sano" significa una persona a la que no se le ha diagnosticado cáncer.

La comparación entre los valores de sujeto de ensayo y los valores de sujeto sano puede llevarse a cabo midiendo la muestra biológica de un sujeto de ensayo y la de un sujeto sano en paralelo. Cuando no se realiza la comparación en paralelo, la comparación también puede llevarse a cabo usando un valor medio o un valor intermedio estadístico de valores de sujeto sano calculados a partir de los valores de sujeto sano obtenidos midiendo muestras biológicas plurales (al menos dos, preferiblemente tres o más, más preferiblemente cinco o más) de un sujeto sano en condiciones contantes cuando no se realiza medición paralela.

La evaluación de si un sujeto de ensayo es o no altamente sensible a vacuna de WT1 se lleva a cabo usando como un indicador que el valor de sujeto de ensayo sea 1,5 veces o más, preferiblemente 2 veces o más en comparación con el valor del sujeto sano. Es decir, cuando el valor del sujeto de ensayo es 1,5 veces o más, preferiblemente, 2 veces o más el valor del sujeto sano, se evalúa que la sensibilidad a vacuna de WT1 es alta. Se evalúa que un paciente que se ha evaluado que es altamente sensible a vacuna de WT1 es adecuado para vacuna de WT1, en otras palabras, es posible aplicar preferiblemente terapia de vacuna de WT1 al paciente.

El método para seleccionar pacientes de la presente invención como se ha descrito anteriormente también puede usarse no solamente en la evaluación de pacientes antes de la administración de vacunas sino también para diagnóstico o confirmación de eficacia después de la administración de vacuna.

La presente invención también proporciona un método *in vitro* para seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1, que comprende las siguientes etapas (a) y (b),

(a) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en una

muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo (a); y
 (b) comparar el valor medido de (a) con el de un sujeto sano y evaluar la sensibilidad a vacuna de WT1, usando como indicador que la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras específicas de WT1 de (a) es 1,5 veces o más la de un sujeto sano.

5 El presente inventor seleccionó células precursoras de CTL específicas de WT1 con precisión con respecto a función y descubrió que, en particular, las células precursoras de CTL de tipo efector existen en mayor proporción en comparación con individuos sanos. En consecuencia, pueden seleccionarse pacientes altamente sensibles a vacuna de WT1 basándose en la cantidad o frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 de tipo efector como un indicador. El método de selección que usa células precursoras de CTL de tipo efector como un indicador puede ser útil para llevar a cabo análisis más detallado, cuando hay pocas o ninguna diferencia entre los valores de un sujeto de ensayo y los de un sujeto sano cuando se miden por el método de selección que usa la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL como un indicador.

15 Un ejemplo específico de un método de selección comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) poner un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico de tumor derivado de WT1, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD45RA y un anticuerpo anti-CD27 en contacto con la muestra biológica;
 20 (b) medir la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 de tipo efector entre células precursoras de CTL que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivas para unión a tetrámero de HLA;
 (c) decidir si el valor medido de (b) es alto o no en comparación con el de un sujeto sano, y evaluar la sensibilidad a vacuna de WT1.

25 Como se usa en este documento, la expresión "célula efectora" significa célula precursora de CTL positiva para CD45RA y negativa para CD27. La frecuencia de dichas células efectoras puede obtenerse midiendo la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 entre células precursoras de CTL. Específicamente puede llevarse a cabo poniendo una muestra de ensayo en contacto con un tetrámero de HLA, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD45RA y un anticuerpo anti-CD27; y midiendo la proporción de células
 30 positivas para CD45RA y negativas para CD27 entre células precursoras de CTL (células precursoras de CTL específicas de WT1) que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivas para unión a tetrámero de HLA.

Las células positivas para CD45RA pueden marcarse y detectarse usando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con fluorescencia. Las células positivas para CD27 pueden marcarse y detectarse usando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD27 humano de ratón marcado con fluorescencia. Un pigmento fluorescente usado aquí debe ser diferente del usado en el tetrámero de HLA, anticuerpo anti-CD8 o anticuerpo anti-CD3. Es decir, deben usarse pigmentos fluorescentes distintos entre sí, por ejemplo, cuando se usan tetrámeros de HLA marcado con PE, anticuerpo monoclonal anti-CD8 marcado con FITC y anticuerpo monoclonal anti-CD3 marcado con Per, pueden usarse anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con ECD
 40 y anticuerpo monoclonal anti-CD27 humano de ratón marcado con PC5. Estos anticuerpos marcados pueden obtenerse de Beckman Coulter, y similares.

El proceso concetro para medir las células precursoras o similares puede llevarse a cabo de una manera similar al método de selección descrito anteriormente en el que la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL se usa como un indicador.
 45

El método para seleccionar pacientes altamente sensibles a vacuna de WT1 como se ha descrito anteriormente también es aplicable al diagnóstico de cáncer. Es decir, el presente inventor descubrió que la frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 es mayor en pacientes de tumor maligno hematopoyético o cáncer de pulmón en comparación con individuos sanos. En consecuencia, es posible diagnosticar cáncer usando la frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 o células precursoras de CTL específicas de WT1 de tipo efector como un indicador. Los ejemplos de cáncer que pueden diagnosticarse incluyen cánceres de sangre tales como leucemia, síndrome mielodisplásico, mieloma múltiple y linfoma maligno, y cánceres sólidos tales como cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer embrionario, cáncer hepático, cáncer de piel, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer cervical y cáncer ovárico. Los ejemplos preferidos son leucemia, síndrome mielodisplásico y cáncer de pulmón.
 50
 55

La presente invención también proporciona un método para identificar una molécula diana de vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica de un paciente, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
 60

(a) aplicar cada una de moléculas diana plurales de vacuna de WT1 a una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;
 (b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en las respectivas muestras biológicas de (a) y comparar los resultados entre sí; y
 65 (c) identificar la molécula diana que mostró el valor más alto en (b) como la molécula diana de vacuna de WT1 eficaz para el paciente de ensayo.

El presente inventor ha descubierto que existen células precursoras de CTL específicas de WT1 en un paciente antes de la administración de vacuna en más alta frecuencia que las conocidas hasta ahora. En consecuencia, es posible identificar una molécula diana (molécula diana para uso terapéutico) de vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica de un paciente basándose en la cantidad o frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 como un indicador.

Es decir, el método de identificación anterior puede usarse de forma eficaz para identificar la molécula diana más adecuada (péptido antigénico) para tratar un paciente que se ha evaluado que es altamente sensible a la vacuna de WT1.

Específicamente, la identificación puede llevarse a cabo, de forma similar al método de selección de pacientes altamente sensibles a vacuna de WT1, midiendo la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 usando método de monómero de HLA, método de dímero de HLA, método de tetrámero de HLA, método de pentámero de HLA, método de ELISPOT, técnica de RT-PCR en tiempo real o método de dilución limitante. Preferiblemente, se usa el método de monómero de HLA, método de dímero de HLA, método de tetrámero de HLA o método de pentámero de HLA. El método de identificación se describirá a continuación en este documento tomando concretamente el método de tetrámero de HLA como un ejemplo.

El método que implica método de tetrámero de HLA comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

- (a) poner cada uno de tetrámeros de HLA plurales que comprenden diferentes péptidos antigénicos tumorales derivados de WT1 en contacto con la muestra biológica;
- (b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas a los tetrámeros de HLA respectivos y comparar los resultados entre sí; y
- (c) identificar un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 eficaz para el paciente de ensayo basándose en los resultados obtenidos en (b).

Específicamente, se preparan tetrámeros de HLA plurales que contienen cada uno un péptido antigénico de cáncer derivado de WT1 como un candidato. Después cada uno de los tetrámeros de HLA se pone en contacto con una muestra biológica aislada de un paciente de ensayo y se mide la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas a un tetrámero de HLA. Los valores obtenidos de tetrámeros de HLA respectivos se comparan y se identifica un péptido antigénico de cáncer comprendido en el tetrámero de HLA que mostró el valor más alto, que es un péptido antigénico de cáncer que se reconoce más fácilmente por CTL, como la molécula diana para terapia de vacuna de WT1 para el paciente, es decir, la molécula diana característica del paciente.

Puede usarse cualquier péptido antigénico de cáncer siempre que derive de WT1 y los ejemplos incluyen péptidos antigénicos de cáncer expuestos en SEC ID N°: 2 a 18. El péptido antigénico de cáncer preferido es el que se expone en una cualquiera de SEC ID N°: 2 - 5.

El proceso concreto de las etapas respectivas o método de preparación para cada componente puede hallarse en la sección anterior con respecto a un método de selección de un paciente altamente sensible a vacuna de WT1.

De acuerdo con el presente método para identificar una molécula diana de vacuna de WT1, es posible identificar una molécula diana capaz de tratar cáncer característico de un paciente. Por lo tanto, la presente descripción describe una composición farmacéutica para tratar cáncer en un paciente dado, que comprende una molécula diana identificada por el método de identificación de una molécula diana de vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica del paciente; y un método de tratamiento de cáncer característico de un paciente, que comprende administrar al paciente la molécula diana identificada por el método de identificación. La composición farmacéutica de la presente descripción comprende vacuna de cáncer y puede contener un adyuvante y similares que se conocen en la técnica.

La presente descripción describe adicionalmente un agente de diagnóstico clínico para seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1, que comprende como un ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA conteniendo cada uno un péptido antigénico de tumor derivado de WT1. El agente de diagnóstico clínico de la presente descripción se describirá a continuación en este documento tomando el tetrámero de HLA como ejemplo.

El "tetrámero de HLA" como ingrediente del agente de diagnóstico clínico de la presente descripción se refiere a, como se ha mencionado anteriormente, un tetrámero preparado por biotilación de un complejo (monómero de HLA) obtenido por asociación de una cadena α de antígeno HLA y una β 2-microglobulina con un péptido antigénico de cáncer derivado de WT1, y permitiendo la unión a avidina para tetramerización (Science 279: 2103- 2106 (1998); y Science 274: 94-96 (1996)).

Puede usarse cualquier péptido antigénico de cáncer aquí siempre que derive de WT1 y los ejemplos incluyen péptidos antigénicos de cáncer expuestos en SEC ID N°: 2 a 18. El péptido antigénico de cáncer preferido es el

expuesto en una cualquiera de SEC ID Nº: 2 - 5.

El proceso de etapas respectivas o método de preparación para cada componente puede hallarse en la sección anterior con respecto al método de seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1.

5 El agente de diagnóstico clínico de la presente descripción puede ser un componente de un kit para seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1. El kit puede ser el que está compuesto de un agente de diagnóstico clínico solo de la presente descripción o el que está compuesto de un agente de diagnóstico clínico de la presente descripción y otro ingrediente o ingredientes. Los ejemplos de otros ingredientes en el kit incluyen estreptavidina
10 marcada con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con fluorescencia y similares. Cuando se detectan células efectoras, el kit puede contener anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD27 humano de ratón marcado con fluorescencia.

15 Los ejemplos de pigmentos fluorescentes incluyen ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína de peridininil clorofila (PerPC), alofocianina (APC), ficoeritrina-texasred (también llamado ECD), y ficoeritrina-cianina 5.1 (también llamado PC5) y similares.

20 El agente de diagnóstico clínico y un kit de la presente descripción pueden usarse en la selección no solamente de un paciente altamente sensible a vacuna de WT1 sino también una molécula diana de vacuna de WT1 (molécula diana para tratamiento). Además, el agente puede usarse como un agente de diagnóstico para cáncer sin cambiar los componentes.

25 La presente descripción también proporciona un método para determinar la idoneidad de un paciente para vacuna de WT1, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):

(a) aislar una muestra biológica que contiene CTL de un paciente después de la administración de vacuna de WT1;
(b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de CTL específicos de WT1 en la muestra biológica de (a);
(c) decidir si el valor medido de (b) es o no alto por comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la
30 administración de vacuna de WT1, y evaluar si el paciente es adecuado para terapia de vacuna de WT1 y un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende tratar al paciente que se evalúa que es adecuado por el método de determinación con WT1 o péptido antigénico de cáncer derivado de WT1.

35 Como se describe en los ejemplos posteriormente, el presente inventor midió la frecuencia de CTL específicos de WT1 en pacientes que se someten a tratamiento con un péptido antigénico de tumor derivado de WT1 ("vacuna de WT1") y se descubrió que el efecto terapéutico se correlaciona con el aumento de frecuencia de CTL después de la administración del péptido en relación con la obtenida antes de la administración del mismo. Es decir, el caso en el que la frecuencia de existencia de CTL específicos de WT1 después de la administración de péptido de WT1 es 1,5 veces o mayor en comparación con la de la muestra obtenida antes de la administración se define como "respuesta
40 inmune positiva" y se investigó la relación entre la inmunosensibilidad y el efecto terapéutico. Como resultado se reconoció una posible correlación entre la inmunosensibilidad y el efecto terapéutico. Este resultado reveló que es posible evaluar si el tratamiento con vacuna de WT1 es adecuado o no para un paciente objeto basándose en la inmunosensibilidad anteriormente mencionada (aumento de la frecuencia o aumento de CTL) como un indicador.

45 Por lo tanto, el método de determinación de la presente descripción puede usarse de forma eficaz para evaluar la idoneidad del tratamiento para un paciente que se somete a terapia de vacuna de WT1, por ejemplo, la idoneidad de tratamiento continuo con administración de péptidos.

50 Los procedimientos concretos en las etapas (a) y (b) del método de determinación pueden hallarse en la sección anterior con respecto al "método de selección de un paciente altamente sensible a vacuna de WT1". Específicamente, puede llevarse a cabo midiendo la frecuencia de existencia o cantidad de CTL específicos de WT1 por método de monómero de HLA, método de dímero de HLA, método de tetrámero de HLA, método de pentámero de HLA, método de ELISPOT, técnica de RT-PCR en tiempo real, método de dilución limitante o similares.

55 La evaluación de si un paciente es adecuado o no para terapia de vacuna de WT1 en la etapa (c) se lleva a cabo comparando la frecuencia de existencia o cantidad de CTL específicos de WT1 obtenidos del paciente después de administración de vacuna de WT1 (en lo sucesivo en este documento, denominado "valor post-administración") y la obtenida antes de la administración de vacuna de WT1 (en lo sucesivo en este documento, denominado "valor pre-administración") y decidiendo la diferencia entre ambos valores.

60 Como se usa en este documento, "después de la administración de la vacuna" se refiere a cualquier momento (temporización) después de una o más veces de administración de vacuna de WT1. Sin embargo, en el caso de programa de dosificación de péptido de intervalo de dos semanas, el tiempo preferido (temporización) es después de la primera a la quinta administración de vacuna de WT1, preferiblemente, después de la primera a tercera
65 administración de vacuna de WT1.

La evaluación de si el tratamiento con vacuna de WT1 es adecuado o no puede llevarse a cabo usando como indicador que el valor post-administración sea 1,5 veces o más en comparación con el valor pre-administración. Es decir, cuando el valor post-administración es 1,5 veces o más el valor pre-administración, se evalúa que el tratamiento con vacuna de WT1 es adecuado. Basándose en estos hallazgos, la presente invención también proporciona un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende tratar a un paciente que se ha evaluado que es adecuado por el método de determinación de la idoneidad de un paciente para vacuna de WT1 de la presente invención con WT1 o péptido antigénico de tumor derivado de WT1.

Entre los métodos anteriormente mencionados de medición de CTL, se prefieren principalmente el método de monómero de HLA, método de dímero de HLA, método de tetrámero de HLA y método de pentámero de HLA desde el punto de vista de facilidad de manipulación y precisión. El método de determinación se describirá a continuación en este documento tomando el método de tetrámero de HLA como ejemplo.

El método que implica método de tetrámero de HLA comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):

- (a) aislar una muestra biológica que contiene CTL de un paciente después de administración de vacuna de WT1;
- (b) poner un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico de tumor derivado de WT1 en contacto con la muestra biológica de (a);
- (c) medir la frecuencia de existencia o cantidad de CTL específicos de WT1 unidos al tetrámero de HLA; y
- (d) decidir si el valor medido de (c) es alto o no en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de vacuna de WT1 y evaluar si el paciente es adecuado para terapia de vacuna de WT1.

El antígeno de HLA usado aquí como componente del tetrámero de HLA incluye un antígeno HLA-A24 o un antígeno de HLA-A2.

Los ejemplos de péptido antigénico de cáncer como componente de un tetrámero de HLA incluyen: Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID N°: 2), Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID N°: 3), Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEC ID N°: 4) y Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEC ID N°: 5). Como todos los péptidos expuestos en SEC ID N°: 2 - 5 son péptidos capaces de unirse a HLA-A24, los ejemplos de tetrámero de HLA usado en el método mencionado anteriormente para determinación de la presente invención incluyen tetrámeros de HLA que comprenden uno cualquiera de los péptidos expuestos en SEC ID N°: 2-5 y un antígeno de HLA-A24. Además, como los péptidos expuestos en SEC ID N°: 2 y 4 también son capaces de unirse a antígeno de HLA-A2, también se incluyen tetrámeros de HLA que comprenden un péptido expuesto en SEC ID N°: 2 ó 4 y un antígeno de HLA-A2.

En el método de determinación o tratamiento de la presente descripción se prefiere usar un tetrámero de HLA que comprende el mismo péptido que el usado en el tratamiento o un péptido con el que los CTL muestran reacción cruzada, habiéndose inducido dichos CTL por el péptido usado en el tratamiento. Por ejemplo, cuando un péptido expuesto en SEC ID N°: 3 se usa en el tratamiento de un paciente, se usa un tetrámero de HLA que comprende un péptido expuesto en SEC ID N°: 2 ó 3 y un antígeno de HLA-A24 de forma eficaz.

Los procedimientos concretos en las etapas (a) a (c) del método de determinación o tratamiento de la presente descripción pueden hallarse en la sección anterior con respecto al "método de selección de un paciente altamente sensible a vacuna de WT1". Además, la evaluación de la etapa (d) puede llevarse a cabo basándose en la comparación de valores de pre-administración y valores post-administración como se ha mencionado anteriormente.

El ejemplo específico del método de determinación o tratamiento de la presente descripción se describirá a continuación en este documento.

En primer lugar, se recoge sangre de un paciente que tiene cáncer antes de la administración de péptido antigénico de cáncer derivado de WT1 y se separa PBMC (muestra pre-administración). A continuación se recoge sangre del paciente después de tratarle por administración de péptido y se separa PBMC (muestra post-administración). Se añade a muestras pre y post-administración respectivas un tetrámero de HLA y la frecuencia de CTL específicos de péptidos se mide y se calcula de acuerdo con los métodos de análisis que se describen en la sección anterior con respecto al "método para seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1" y el Ejemplo 3. Cuando la frecuencia de CTL en la muestra post-administración es 1,5 veces o más en comparación con la de la muestra pre-administración, se evalúa que el tratamiento con vacuna de WT1 es adecuado (es decir, se espera que la vacuna de WT1 sea terapéuticamente eficaz).

La presente descripción también proporciona un agente de diagnóstico clínico para determinar la idoneidad para vacuna de WT1 que comprende como un ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA que contiene cada uno un péptido antigénico de cáncer derivado de WT1 y un kit que comprende dicho agente de diagnóstico clínico. Los ingredientes de dicho agente de diagnóstico clínico y kit son como se ha definido en la sección anterior con respecto al "agente clínico de diagnóstico para la selección de un paciente altamente sensible a vacuna de WT1".

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos, pero no se limita a estos ejemplos en ningún sentido.

5 Ejemplo 1

Preparación de Células Mononucleares de Sangre Periférica

10 Después de obtener consentimiento informado, se recogió sangre de pacientes positivos para HLA-A*2402 que tenían cáncer e individuos sanos positivos para HLA-A*2402. Entre los pacientes, los que tenían tumor maligno hematopoyético fueron dieciocho que se componían de leucemia mielocítica aguda (AML) (n=11), leucemia linfática aguda (ALL) (n=2), leucemia mielocítica crónica (CML) (n=1) y síndrome mielodisplásico (MDS) (n=4); y los que tenían cáncer de pulmón fueron siete. Hubo diez individuos sanos positivos para HLA-A*2402.

15 Como para los pacientes que tenían tumor maligno hematopoyético, se identificó alta expresión significativa de gen WT1 en mieloma y muestras de sangre periférica una vez o más en el momento del diagnóstico o a lo largo del tratamiento. Como para los pacientes que tenían cáncer de pulmón, se identificó alta expresión significativa de gen WT1 en biopsia o muestras extraídas.

20 Las células mononucleares periféricas (PBMC) se separaron de la sangre recogida por método de centrifugación de gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque) y se almacenaron en nitrógeno líquido en estado congelado.

25 Ejemplo 2

Preparación de Tetrámero de HLA

30 Se preparó un tetrámero que comprendía HLA-A*2402 marcado con pigmento fluorescente (Ficoeritrina; PE) usando un péptido de 9 aminoácidos (SEC ID N°: 2) que comprendía la secuencia de aminoácidos en la posición 235-243 de proteína WT1 de acuerdo con el método descrito en Int. J. Cancer: 100, 565-570, 2002.

En primer lugar, se amplificó ADNc que codificaba HLA-A2402 recombinante por PCR usando un plásmido de expresión de HLA-A*2402 (n° de acceso de GenBank M64740) como un molde y un cebador directo:

35 5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTTCTACCTCCGT-3' (SEC ID N°: 19); y un cebador inverso:
5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGCTTGGGCAGACCCTC-3' (SEC ID N°: 20).

40 El cebador inverso codifica una secuencia de reconocimiento de BirA de modo que las fases se conforman en el extremo c-terminal. Los fragmentos amplificados se escindieron por enzimas de restricción NcoI y BamH1 y se clonaron en el vector pET11d (Novagen).

Después se amplificó ADNc que codificaba β2-microglobulina humana soluble recombinante usando un plásmido de expresión de 2-microglobulina humana (número de acceso de GenBank ABO21288) como un molde y un cebador directo:

45 5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAAATTCAG-3' (SEC ID N°: 21); y un cebador inverso:
5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3' (SEC ID N°: 22).

50 Los fragmentos amplificados se escindieron por enzimas de restricción NdeI y BamH1 y se clonaron en un vector pET11a (Novagen).

55 Se permitió que los dos vectores resultantes se expresaran en *E. coli* BL21 y se recuperaron como fracciones insolubles de cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión respectivos se disolvieron en solución de urea 8M y se diluyeron por un tampón de replegamiento. Se añadió a la dilución un péptido (SEC ID N°: 2) para formar un complejo de HLA-péptido soluble. La secuencia C-terminal del complejo de péptido-HLA se biotiniló con enzima BirA y el tetrámero de HLA-péptido biotinilado resultante se purificó por técnica de filtración en gel. El complejo de HLA-péptido biotinilado y avidina marcada con PE (Molecular Probe) se mezclaron a una relación molar de 4:1 para preparar tetrámero de HLA.

60 Ejemplo 3

Análisis de células precursoras de CTL específicas de WT1 con Tetrámero de HLA

65 Las PBMC congeladas obtenidas en el Ejemplo 1 se descongelaron e inmediatamente se resuspendieron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía suero bovino fetal al 0,5 % (FCS) a la densidad celular de 1×10^6 células/ml. Se añadió a la suspensión una solución de tetrámero (500 µg/µl, 2µl) preparada en el Ejemplo 2.

- La suspensión se incubó después a 37 °C durante 30 minutos. Se preparó una muestra para el control negativo tratando de una manera similar excepto que se añadió estreptavidina marcada con PE (Becton Dickinson) en lugar de tetrámero. Después de inactivar con agua helada, se añadieron anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC (15 µl, BD Pharmigen) y anticuerpo anti-CD3 humano de ratón marcado con PerCP (15 µl, BD Pharmigen) y la mezcla se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Las células teñidas se sometieron a lavado en centrífuga con PBS que contenía FCS 0.5 % (2x) y se analizaron por el citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson). Se seleccionaron células positivas para CD3 y CD8 (CD3⁺ CD8⁺). La proporción de células precursoras de CTL específicas de péptido antigénico de WT1 se calculó restando la proporción de células positivas para estreptavidina marcada con PE (CD3⁺CD8⁺avidina⁺) en el control negativo de la proporción de células positivas para tetrámero (CD3⁺CD8⁺tetrámero⁺) en las células CD3⁺CD8⁺ seleccionadas, como sigue:

$$\text{Células precursoras de CTL específicas de péptido antigénico de WT1 (\%)} = 100 \times \left\{ \left[\frac{\text{células CD3}^+\text{CD8}^+\text{tetrámero}^+}{\text{células CD3}^+\text{CD8}^+} \right] - \left[\frac{\text{células CD3}^+\text{CD8}^+\text{avidina}^+}{\text{células CD3}^+\text{CD8}^+} \right] \right\}$$

- Los resultados del análisis de PBMC de pacientes que tienen cáncer e individuos sanos se muestran en la Tabla 2. Los resultados se representaron con respecto a enfermedades respectivas como se muestra en la Figura 1. Estos resultados mostraron que la proporción de células precursoras de CTL específicas de péptido antigénico de WT1 en células positivas para CD3/CD8 fue de 0,47 a 1,30 % (media = 0,82 %) para individuos sanos, 1,04 - 29,45 % (media = 5,24 %) para pacientes que tenían tumor hematopoyético maligno y 0,33 - 5,97 % (media = 2,44 %) para pacientes que tenían cáncer de pulmón. El análisis estadístico reveló que la proporción aumentó significativamente ($p < 0,05$) en pacientes que tenían tumor hematopoyético maligno o cáncer de pulmón en comparación con individuos sanos.

Tabla 2

Muestra, N° de paciente	Frecuencia de precursores de CTL (%)
AML, paciente N° 1	8,26
AML, paciente N° 2	8,01
AML, paciente N° 3	5,12
AML, paciente N° 4	3,84
AML, paciente N° 5	4,51
AML, paciente N° 6	3,27
AML, paciente N° 7	2,68
AML, paciente N° 8	2,60
AML, paciente N° 9	1,77
AML, paciente N° 10	1,04
AML, paciente N° 11	1,49
ALL, paciente N° 1	7,32
ALL, paciente N° 2	1,78
CML, paciente 1	2,46
MDS, paciente 1	29,45
MDS, paciente 2	2,99
MDS, paciente 3	2,81
MDS, paciente 4	2,08
cáncer de pulmón, paciente 1	5,97
cáncer de pulmón, paciente2	3,83
cáncer de pulmón, paciente3	2,63
cáncer de pulmón, paciente4	1,89
cáncer de pulmón, paciente5	1,69
cáncer de pulmón, paciente6	0,72
cáncer de pulmón, paciente7	0,33

Muestra, Nº de paciente	Frecuencia de precursores de CTL (%)
individuo sano 1	1,30
individuo sano 2	1,05
individuo sano 3	1,08
individuo sano 4	0,85
individuo sano 5	0,81
individuo sano 6	0,79
individuo sano 7	0,61
individuo sano 8	0,64
individuo sano 9	0,57
individuo sano 10	0,47
AML: leucemia mielocítica aguda ALL: leucemia linfática aguda CML: leucemia mielocítica crónica MDS: síndrome mielodisplásico	

Ejemplo 4

Análisis de Frecuencia de CTL específicos de WT1 después de Administración del Péptido

5

El siguiente ensayo se llevó a cabo después de obtener la aprobación del comité ético de la Universidad de Osaka, Facultad de Medicina, y el consentimiento informado de los pacientes con cáncer.

10 Se administró un péptido que comprendía la secuencia de aminoácidos en la posición 235-243 de WT1 (SEC ID N°: 2) o su variante que comprendía SEC ID N°: 3 en la que la metionina en la posición 2 de SEC ID N°: 2 está reemplazada por tirosina a pacientes con cáncer a 0,3 mg, 1 mg o 3 mg por cuerpo. El péptido se emulsionó con Montanide ISA51 (SEPPIC) y la emulsión resultante se inyectó por vía intradérmica una o varias veces a intervalos de 2 semanas. Los pacientes objeto padecían cáncer de pulmón positivo para HLA-A*2402 y positivo para WT1, cáncer de mama o leucemia.

15

15 La respuesta inmune al péptido administrado se evaluó basándose en la frecuencia de CTL medida por el método de tetrámero de HLA similar al Ejemplo 3. Cuando la frecuencia de CTL específicos de péptido en cualquier etapa después de la administración del péptido aumenta 1,5 o más en comparación con la obtenida antes de la administración del péptido, se evaluó que era "respuesta inmune positiva". Además, cuando los valores de marcador tumoral, el número de células tumorales o el volumen del tumor se redujo, se evaluó que era "terapéuticamente eficaz". La correlación entre la respuesta inmune y el efecto terapéutico se evaluó por ensayo de chi cuadrada en pacientes con cáncer (n=19) que se habían evaluado con respecto a la respuesta inmune a y el efecto terapéutico de la administración del péptido. Como resultado, ocho (73 %) de los once pacientes que eran positivos con respecto a efecto terapéutico mostraron respuesta inmune positiva, mientras que solamente dos (25 %) de ocho pacientes que eran negativos con respecto a efecto terapéutico mostraron respuesta inmune positiva, lo que indica que el efecto terapéutico y la respuesta inmune se correlacionan de forma positiva (P = 0,0397). Estos resultados indican que la inducción de CTL específicos para el péptido administrado es un factor importante para el efecto terapéutico. Además, la inmunosensibilidad anterior puede usarse como un indicador para la conformación de progreso favorable del tratamiento con administración del péptido o la decisión de si el tratamiento por

20
25
30 administración del péptido debería o no continuarse.

Ejemplo 5

Análisis de Función de CTL específicos de WT1

35

35 Se ha indicado que los CTL específicos de péptido antigénico positivos para la tinción de tetrámero de HLA y CD8 pueden seleccionarse adicionalmente con precisión tiñendo con anticuerpo anti-CD45RA y anticuerpo anti-CD27 (J. Exp. Med., 186, p1407, 1997). Las células positivas para CD45RA y positivas para CD27 se clasifican en tipo virgen; las células negativas para CD45RA y positivas para CD27, y negativas para CD45RA y negativas para CD27 en tipo memoria; y las células positivas para CD45RA y negativas para CD27 en tipo efector. Las células de tipo efector representan poblaciones celulares de la actividad de CTL más fuerte.

40

Se recogieron PBMC antes de la administración de péptido de pacientes con cáncer positivos para HLA-A*2402 (n=24; 14 cánceres de la sangre, 10 cánceres sólidos) que se ensayaron por la investigación clínica del Ejemplo 4 e individuos sanos positivos para HLA-A*2402 después de obtener consentimiento informado. Las PBMC se usaron en el análisis de función de precursores de CTL específicos de péptido de WT1 que son positivos para la tinción con tetrámero de HLA y CD8. Para el análisis por citometría de flujo, las células se tiñeron de una manera similar al ejemplo 3 con tetrámero de HLA, anticuerpo anti-CD8, anticuerpo anti-CD45RA y anticuerpo anti-CD27. Se calculó la proporción de células que pertenecían a tipo virgen positivo para CD45RA/positivo para CD27, tipo memoria negativo para CD45RA o tipo efector positivo para CD45RA/negativo para CD27 en poblaciones celulares positivas para tetrámero de HLA y positivas para CD8. Las proporciones para células de tipo virgen, tipo memoria y tipo efector fueron 23,7 %, 45,5 % y 30,8 % para los pacientes con cáncer. En cuanto a los individuos sanos, las proporciones fueron 35,9 %, 53,8 % y 8,9 %. La comparación de pacientes con cáncer e individuos sanos mostró que la proporción de células de tipo efector es significativamente alta ($P < 0,05$) en los pacientes con cáncer; sin embargo, no existen diferencias significativas entre los pacientes con cáncer y los individuos sanos con respecto a la proporción de células de tipo virgen y de tipo memoria. En el Ejemplo 3, los pacientes con cáncer mostraron aumento de células precursoras de CTL específicas de WT1 y se reveló ahora que los pacientes con cáncer mostraban aumento de proporción de los CTL que tenía función de tipo efector entre los CTL. Estos resultados demostraron que los pacientes con cáncer pueden diagnosticarse basándose en la frecuencia de existencia de células precursoras de CTL de tipo efector.

20 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1 basándose en la frecuencia de existencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 como un indicador. De acuerdo con el método de selección de la presente invención, puede seleccionarse un paciente que se espera que sea sensible a terapia de vacuna de WT1, lo que hace posible tratar cáncer de forma más apropiada.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Haruo, Sugiyama
 <120> Método para seleccionar un sujeto que es aplicable a vacuna de WT1
 <130> 664590
 35 <150> JP 2003-184436 <151 > 27-06-2003
 <150> JP 2004-070497 <151 > 12-03-2004
 40 <160> 22
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 449
 45 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

ES 2 378 156 T3

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

435

440

445

Leu

5 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 2

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

15 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 3

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5

30 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 4

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5

40 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 5

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe
 1 5

50

ES 2 378 156 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 10

5

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
1 5

<210> 11

<211> 9

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

15

<400> 11

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
1 5

20

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 12

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
1 5

30

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

40

<400> 13

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
1 5

45

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético

<400> 14

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu

1 5

<210> 15
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<400> 15

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1 5

15 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<400> 16

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe

1 5

25 <210> 17
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
35 <400> 17

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe

1 5

40 <210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Descripción de secuencia artificial: péptido sintético
<223> Xaa en la posición 5 significa Abu.
<400> 18

Arg Tyr Pro Ser Xaa Gln Lys Lys Phe

1 5

50 <210> 19
<211> 40

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR

 <400> 19
 ccatgggcag ccattctatg cgctatTTTT ctacctccgt 40

 10 <210> 20
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR

 <400> 20
 20 ggatcctggc tcccatctca gggtaggggg cttgggcaga ccctc 45

 <210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR

 <400> 21
 30 catatgatcc agcgtacccc gaaaattcag 30

 <210> 22
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR

 <400> 22
 40 ggatccttac atgtctcgat cccactaac 30

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para seleccionar un paciente altamente sensible a vacuna de WT1, que comprende las siguientes etapas (a) y (b):
- 5 (a) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo y
 (b) comparar el valor medido de (a) con el de un sujeto sano y evaluar la sensibilidad a vacuna de WT1 usando como un indicador que la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de
 10 WT1 de (a) es 1,5 veces o más la de un sujeto sano.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sensibilidad a vacuna de WT1 permite el diagnóstico de cáncer.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la medición de la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 se lleva a cabo por uno cualquiera de método de monómero de HLA, método de dímero de HLA, método de tetrámero de HLA, método de pentámero de HLA, método de ELISPOT, técnica de RT-PCR en tiempo real y método de dilución limitante.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la medición se lleva a cabo por método de tetrámero de HLA.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
- 25 (a) poner un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico de tumor derivado de WT1 en contacto con una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
 (b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas al tetrámero de HLA; y
 30 (c) comparar el valor medido de (b) con el de un sujeto sano y evaluar la sensibilidad a vacuna de WT1, siendo el valor medido de (b) 1,5 veces o más el de un sujeto sano.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la sensibilidad a vacuna de WT1 permite el diagnóstico de cáncer.
- 35 7. Un método para identificar una molécula diana de vacuna de WT1 siendo dicha molécula característica de un paciente, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
- (a) aplicar cada una de las moléculas diana plurales de vacuna de WT1 a una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;
 40 (b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en las muestras biológicas respectivas de (a) y comparar los resultados entre sí; y
 (c) identificar la molécula diana que mostró el mayor valor en (b) como la molécula diana de vacuna de WT1 eficaz para el paciente de ensayo.
- 45 8. El método de identificación de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la medición de la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 se lleva a cabo por uno cualquiera de método de monómero de HLA, método de dímero de HLA, método de tetrámero de HLA, método de pentámero de HLA, método de ELISPOT, técnica de RT-PCR en tiempo real y método de dilución limitante.
- 50 9. El método de identificación de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la medición se lleva a cabo por método de tetrámero de HLA.
10. El método de identificación de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
- 55 (a) poner cada uno de los tetrámeros de HLA plurales que comprenden diferentes péptidos antigénicos de tumor derivados de WT1 en contacto con una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;
 (b) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas a los tetrámeros de HLA respectivos y comparar los resultados entre sí; y
 60 (c) identificar el péptido antigénico de tumor derivado de WT1 contenido en el tetrámero de HLA que mostró el mayor valor en (b) como el péptido antigénico de tumor derivado de WT1 eficaz para el paciente de ensayo.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 5, 6 ó 10, en el que la etapa (b) se lleva a cabo midiendo la proporción de células unidas a tetrámero de HLA entre CTL o células precursoras de CTL positivas para CD8 o
 65 positivas para CD8/CD3.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que las células precursoras de CTL son células precursoras de CTL de tipo efector.
- 5 13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
- (a) poner un tetramero de HLA que comprende un péptido antigénico de tumor derivado de WT1, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD45RA y un anticuerpo anti-CD27 en contacto con una muestra biológica que contiene células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
- 10 (b) medir la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 de tipo efector entre células precursoras de CTL que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivas para unión con tetramero de HLA; y
- (c) comparar el resultado medido de (b) con el de un sujeto sano y evaluar la sensibilidad a vacuna de WT1, siendo el valor medido de (b) 1,5 veces o más el de un sujeto sano.
- 15 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, 9 a 12 en el que el antígeno de HLA como componente de tetramero de HLA es un antígeno de HLA-A24 o un antígeno de HLA-A2.
- 20 15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el péptido antigénico de tumor derivado de WT1 se selecciona de los siguientes péptidos:
- Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID N°: 2);
Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEC ID N°: 3); y
Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEC ID N°: 5).
- 25 16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que se lleva a cabo usando citometría de flujo.

