

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 328**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09150609 .7**
96 Fecha de presentación: **24.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **2045604**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2009**

54 Título: **Procedimiento para el examen de los tumores sólidos**

30 Prioridad:
24.05.2000 JP 2000152923
23.01.2001 JP 2001014927

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.10.2012

73 Titular/es:
**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
IMMUNOLOGY, INC. (100.0%)
13-9, Enoki-cho Suita -shi
Osaka 564-0053, JP**

72 Inventor/es:
SUGIYAMA, HARUO

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

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).

ES 2 389 328 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el examen de los tumores sólidos.

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento de examen para una enfermedad relacionada con WT1 y, más particularmente, a un procedimiento para analizar la presencia de dicha enfermedad y evaluar la progresión, el curso de la curación y el pronóstico de la enfermedad.

Antecedentes de la técnica

- 10 El gen WT1 constituye un factor de transcripción de dedos de zinc, aislado como un gen asociado etiológicamente con el tumor de Wilm y su producto génico (la proteína WT1), presenta una estructura que comprende un dominio de represión, un dominio de activación un dedo de zinc.

- 15 Los presentes inventores informaron anteriormente de que el nivel de expresión del gen WT1 es alto en la leucemia aguda, que este nivel de expresión está relacionado inversamente con el pronóstico de la enfermedad, y que el MRD (enfermedad residual mínima) de la leucemia aguda, puede detectarse midiendo dicho nivel de expresión [Blood, Vol. 84, nº 9, pág 3071 (1994)]. Además, los inventores descubrieron que midiendo el nivel de expresión del gen WT1, pueden detectarse varios tipos de cáncer sólido y de tejidos atípicos (WO97/39354).

La determinación de dicho nivel de expresión del gen WT1, que comprende la medición del producto de transcripción o de traducción del gen WT1, posee un gran significado clínico en la búsqueda de la presencia de una enfermedad relacionada con el WT1.

Exposición de la invención

- 20 El objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un nuevo procedimiento para el examen de una enfermedad relacionada con WT1, particularmente de un procedimiento efectivo para diagnosticar la enfermedad y evaluar la eficacia de una terapia y el pronóstico de esta enfermedad.

- 25 Durante su continua investigación para cumplir con el objetivo anteriormente mencionado, los inventores descubrieron que las cantidades del anticuerpo anti-WT1 detectadas en el suero o de otras muestras de ensayo de los pacientes con la enfermedad relacionada con el WT1, disminuyen con la curación de la enfermedad, de forma que la cantidad del anticuerpo anti-WT1 puede constituir un nuevo marcador clínico de la enfermedad relacionada con WT1, y que midiendo dicha cantidad, puede detectarse la presencia de una enfermedad relacionada con WT1, así como pueden controlarse y evaluar con una alta seguridad la progresión, curso de la curación y pronóstico de la enfermedad.

- 30 La presente invención se ha desarrollado basándose en los hallazgos anteriores.

La invención proporciona un procedimiento para analizar una enfermedad relacionada con WT1, que comprende la medición de la cantidad de anticuerpo contra WT1 en una muestra y utilizando el valor de la medición como un marcador clínico o índice para el análisis.

La presente invención proporciona:

- 35 [1] Un procedimiento *in vivo* de análisis de tumores sólidos, que comprende medir la cantidad de anticuerpo contra el antígeno del tumor de Wilms 1 en una muestra y que utiliza el valor de medición como un marcador clínico para el análisis.
- [2] El procedimiento según [1], en el que el procedimiento está destinado a analizar la presencia o ausencia de tumores sólidos.
- 40 [3] El procedimiento según [1], en el que el procedimiento está destinado a evaluar la progresión, curso de curación, o pronóstico de los tumores sólidos.
- [4] El procedimiento según [1], en el que la determinación de la cantidad de anticuerpo anti-tumor de Wilms 1 es realizada mediante inmunorreacción que utiliza un antígeno de tumor de Wilms 1.
- 45 [5] El procedimiento según [2], en el que el antígeno de tumor de Wilms 1 es una proteína de tumor de Wilms 1 que contiene un dominio de represión y un dominio de activación pero que no contiene dedos de cinc.
- [6] El procedimiento según [1], en el que el anticuerpo anti-tumor de Wilms 1 es un anticuerpo IgG o un anticuerpo IgM.
- [7] El procedimiento según [3], en el que el curso temporal de la cantidad de anticuerpo anti-tumor de Wilms 1 es utilizado como un marcador clínico.

- [8] El procedimiento según [3], en el que la proporción cuantitativa de anticuerpo IgI anti-tumor de Wilms 1 frente al anticuerpo IgM anti-tumor de Wilms 1 es utilizada como un marcador clínico.

En particular, la presente exposición proporciona las maneras siguientes de analizar la enfermedad relacionada con WT1:

- 5 1. Procedimiento que comprende la detección de la presencia de una enfermedad relacionada con WT1.
2. Procedimiento para evaluar la progresión, curso de la curación, y pronóstico de una enfermedad relacionada con WT1.
3. Procedimiento para controlar la progresión de un síndrome demielodisplásico a leucemia.
4. Procedimiento para dilucidar una remisión completa de la leucemia.
- 10 5. Procedimiento que comprende el ensayo de un anticuerpo anti-WT1 mediante una inmunorreacción utilizando un antígeno WT1.
6. Procedimiento tal como se ha definido anteriormente, en el que el antígeno WT1 es una proteína WT1 que contiene un dominio de represión y un dominio de activación, pero que carece de un dedo de zinc.
- 15 7. Procedimiento tal como se ha definido anteriormente, en el que el anticuerpo anti-WT1 es un anticuerpo IgG o un anticuerpo IgM.
8. Procedimiento que comprende la utilización a lo largo del tiempo de la cantidad del anticuerpo anti-WT1 como un marcador clínico.
9. Procedimiento que comprende la utilización de la proporción cuantitativa del anticuerpo IgG y del anticuerpo IgM contra WT1, como un marcador clínico.
- 20 La representación de los aminoácidos, péptidos, secuencias nucleótidas, ácidos nucleicos, etc., mediante las abreviaturas en la presente memoria, está de acuerdo invariablemente con las normas del IUPAC-IUB, "The Guidelines for Drafting Specifications and Equivalents referring to Nucleotide Sequences or Amino Acid Sequences" (editado por la Oficina Japonesa de Patentes) y las convenciones que predominan en este campo particular de la técnica.
- 25 El procedimiento para analizar la enfermedad relacionada con WT1, según la invención, se lleva a cabo midiendo la cantidad de anticuerpo anti-WT1 en una muestra.
- La muestra que se menciona anteriormente no está limitada, siempre que comprenda un anticuerpo anti-WT1. La muestra puede ser una derivada de un paciente que padezca una enfermedad relacionada con WT1, o un paciente del que se sospecha padece la enfermedad, y una muestra derivada de un paciente que recibió tratamiento por la enfermedad relacionada con WT1. La muestra puede estar constituida por un fluido corporal en el que se encuentran generalmente anticuerpos, tal como la sangre, orina o similares.
- 30 Haciendo referencia al análisis con respecto a la presencia de la enfermedad relacionada con el WT1, según los procedimientos descritos en la presente memoria pueden ejemplificarse diversas enfermedades relacionadas con WT1, tales como dicha leucemia aguda y otros tipos de leucemia.
- 35 El anticuerpo anti-WT1 que va a ensayarse según la invención, es un anticuerpo para el producto de expresión (proteína WT1) del gen WT1 [Cell, 60, 509, (1990); Nature, 343, 774 (1990)]. Comprende todos los anticuerpos relevantes que se detecten en un individuo. El anticuerpo como tal incluye varias inmunoglobulinas tales como el anticuerpo IgG, el anticuerpo IgA y el anticuerpo IgM.
- 40 El ensayo del anticuerpo anti-WT1 según la invención, puede llevarse a cabo mediante diversas procedimientos rutinarios que se utilizan en la técnica de la determinación de anticuerpos, tales como un procedimiento de inmunoensayo que utiliza un antígeno WT1, entre otros. Un ejemplo específico del procedimiento del inmunoensayo es una técnica sándwich en fase sólida.
- 45 La técnica sándwich en fase sólida puede llevarse a cabo típicamente de la siguiente forma: Un antígeno (antígeno WT1) que puede realizar una reacción específica antígeno-anticuerpo, con el anticuerpo objetivo contra WT1 (anticuerpo anti-WT1), se inmoviliza en primer lugar, añadiéndose entonces una muestra. Entonces, tiene lugar una reacción antígeno-anticuerpo, entre el antígeno inmovilizado y el anticuerpo que se encuentra en la muestra, de forma que el anticuerpo anti-WT1 que se encuentra en la muestra se une al antígeno inmovilizado. Entonces, este anticuerpo unido se detecta con un reactivo de detección de anticuerpos, por lo que puede ensayarse en la muestra el anticuerpo anti-WT1 que se encuentra en ella.
- 50 Esta técnica sándwich en fase sólida puede llevarse a cabo de la manera alternativa siguiente. Así, en primer lugar, el reactivo que detecta el anticuerpo es inmovilizado para provocar la captura de los anticuerpos que se encuentren

en la muestra, añadiéndose entonces el antígeno del WT1, que provoca la unión del anticuerpo anti-WT1 entre los anticuerpos capturados. A continuación, un anticuerpo marcado obtenido marcando el anticuerpo específico contra dicho antígeno provoca unirse a dicho antígeno, para detectar y determinar de este modo el anticuerpo objetivo anti-WT1 que se encuentra en la muestra.

- 5 La selección de varios medios y su modificación en estas técnicas de ensayo resultan invariablemente bien conocidos por los expertos en la materia y cualquiera de dichos medios y versiones pueden utilizarse sustancialmente de manera no limitativa en la práctica de la presente invención [referencia, Rinsho Kensaho Teiyo (Protocolos de ensayo de laboratorio clínico), Kanehara Publishing Co., 1995, por ejemplo].

10 Con respecto al reactivo de detección del anticuerpo que va a utilizarse tal como se ha mencionado anteriormente, pueden utilizarse de manera no limitativa diversos reactivos que se utilizan rutinariamente para detectar varias inmunoglobulinas, tal como la IgG. Los ejemplos de dichos reactivos incluyen el anticuerpo anti IgG humano, el anticuerpo anti IgM humano, y el anticuerpo anti Ig (G+M) humano que se unen específicamente al IgG humano, IgM humano, o a ambos, que van a determinarse, y una preparación suya. Estos pueden obtenerse a partir de orígenes comerciales o prepararse opcionalmente mediante procedimientos establecidos *per se*.

15 El antígeno WT1 que va utilizarse como se ha indicado anteriormente puede ser cualquier antígeno que sea específico para el producto del gen WT1 (proteína). Este antígeno puede ser una proteína WT1 como tal, o el fragmento suyo que posea un epítipo específico de la proteína WT1. El antígeno WT1 mencionado anteriormente, incluye el antígeno sintetizado químicamente de acuerdo con la información de la secuencia aminoácida con respecto a la proteína WT1 o al antígeno preparado mediante una técnica de ingeniería genética. Debe apreciarse
20 que si un candidato a antígeno WT1 puede utilizarse satisfactoriamente en la práctica de la invención, puede dilucidarse fácilmente, por ejemplo, llevando a cabo una reacción antígeno-anticuerpo de forma rutinaria, utilizando un anticuerpo que se ha establecido sea el anticuerpo WT1 albergado por un paciente con enfermedad relacionada con el WT1.

25 En la presente invención, el antígeno WT1, que está particularmente adaptado como el antígeno del sistema de ensayo, es uno que contiene el dominio de represión y el dominio de activación de la proteína WT1, y que todavía es defectuoso en los dedos de zinc. Entre sus especies, es particularmente preferida una proteína (a la que se hará brevemente referencia en adelante como HWT3), que tiene una secuencia parcial que consiste en la parte de los residuos 1~294 de la secuencia aminoácida de la proteína WT1. HWT3 puede obtenerse mediante una técnica de ingeniería genética que utiliza el gen conocido WT1, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito como un
30 ejemplo específico en la sección de Mejor Modo de poner en práctica la invención, que se presenta a continuación o mediante cualquier procedimiento análogo.

La producción de un antígeno WT1 mediante una técnica de ingeniería genética utilizando el gen WT1, puede ser llevada a cabo según la tecnología génica recombinante general conocida hasta la fecha. Más particularmente, mediante el procedimiento que comprende construir un ADN recombinante tal que el gen WT1 de interés pueda
35 expresarse en las células huésped, transfectando con él a éstas, y dejando crecer al transformante que resulta, el objetivo del antígeno WT1 puede producirse como un producto de expresión génica intra o extracelular del transformante.

Las diversas operaciones y manipulaciones que pueden utilizarse en la producción anteriormente mencionada del antígeno WT1, tales como la síntesis química, el tratamiento enzimático para la fragmentación, la delección, adición y
40 unión de un gen o de sus fragmentos, el aislamiento, purificación, selección, etc., la introducción del ADN recombinante en las células huésped, y el cultivo de las células transformantes entre otras, pueden llevarse a cabo según procedimientos establecidos [referencia, "Bunshi Idengaku Jikkenho (Protocolos experimentales en Genética Molecular), Kyoritsu Publishing Co., 1993; PCR Technology, Takara Shuzo Co., 1990; Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 80, 5990 (1983); Molecular Cloning,
45 por T. Maniatis *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory (1982), etc.].

Si se desea, el antígeno WT1 puede aislarse y purificarse a partir del producto de expresión mencionado anteriormente o similar, según las diversas técnicas separadoras que utilizan sus propiedades físicas y/o químicas [por ejemplo, "Biochemistry Data Book II, páginas 1175-1259, Primera Edición 1ª impresión, 23 de junio de 1980, publicado por K.K. Tokyo Kagaku Dojin, etc.].

50 La determinación de la cantidad del anticuerpo anti-WT1 en una muestra, según la invención, puede realizarse asimismo utilizando diversos sistemas de ensayo, utilizando medios y técnicas conocidos. En dichos sistemas de ensayos, los reactivos de ensayo conocidos hasta la fecha, por ejemplo, pueden utilizarse ventajosamente.

Adoptando un sistema de ensayo que utilice una técnica en fase sólida como ejemplo, el antígeno o el anticuerpo es inmovilizado en una fase sólida de forma rutinaria. Como la fase sólida, los transportadores o soportes insolubles e
55 inertes, son varillas, perlas, microplacas, tubos de ensayo, etc., realizados en diversos materiales, tales como vidrios, polvo de celulosa, Sephadex, Sepharose, poliestireno, papel de filtro, carboximetilcelulosa, resinas de intercambio iónico, dextrano, películas de plástico, tubos de plástico, resinas poliamídicas, perlas de vidrio, seda, copolímero de éter poliamín-metil vinilo-ácido maleico, copolímero de aminoácidos, copolímero etileno-ácido

maleico, y así sucesivamente.

La inmovilización del antígeno o del anticuerpo puede también llevarse a cabo, sustancialmente sin restricción, mediante la tecnología conocida. Esta tecnología incluye los procedimientos que dependen del enlace físico, los que dependen del enlace químico, y los que utilizan ambos. Los ejemplos típicos son varios procedimientos que utilizan reacciones de unión química tales como el enlace covalente, por ejemplo, el procedimiento diazo, el procedimiento peptídico (procedimiento derivado de la amida ácida, procedimiento de la resina de cloruro de carboxilo, procedimiento de la resina de carbodiimida, procedimiento derivado del anhídrido maleico, procedimiento derivado del isocianato, procedimiento polisacárido activado por el bromuro de cianógeno, procedimiento derivado del carbonato de celulosa, procedimiento del reactivo de condensación, etc), procedimiento de alquilación, procedimiento de unión al soporte utilizando un reactivo de entrecruzamiento (glutaraldehído, isocianato de hexametileno, o similar, se utiliza como el agente de entrecruzamiento), el procedimiento de unión al transportador utilizando una reacción Ugi), etc.; el procedimiento de enlace iónico que utiliza una resina de intercambio iónico o transportador similar; y el procedimiento de adsorción física que utiliza un vidrio poroso, tal como perlas de vidrio, como transportador.

El agente de marca para utilizar en cada sistema de ensayo no está particularmente limitado, pero puede ser cualquiera de los agentes que se conocen hasta la fecha. Los ejemplos específicos incluyen los diversos radioisótopos que se utilizan convencionalmente en inmunoensayos; enzimas tales como la fosfatasa alcalina (ALP), peroxidasa, (POX), etc.; sustancias fluorescentes tales como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), etc.; el isotiocianato de tetrametilrodamina (RITC), etc.; y otros, por ejemplo, el 1N-(2,2,6,6-tetrametil-1-oxil-4-piperidil)-5N-(aspartato)-(2,4-dinitrobenceno (TOPA).

Como enzimas para marca enzimática, pueden utilizarse no sólo las sustancias mencionadas anteriormente, sino también la microperoxidasa, quimiotripsinógeno, procarboxipeptidasa, gliceroaldehído-3-fosfórico deshidrogenasa, amilasa, fosforilasa, D-nasa, P-nasa, etc. La marca con dicho agente marcador puede llevarse a cabo mediante tecnología conocida [referencia, (Tatsuo Iwasaki *et al*: Monoclonal Antibody, Kodansha Scientific, 1984; Eiji Ishikawa *et al*: Enzyme Immunoassay, 2ª edición, Igaku Shoin, 1982; etc.).

La determinación de la actividad enzimática puede también realizarse de la forma conocida según el tipo de enzima empleada. Por ejemplo, dicha determinación puede llevarse a cabo utilizando ABTSJ (2,2'-azino-bi(3-etilbenzotiazolina-ácido sulfónico) como el sustrato cuando se utiliza una peroxidasa como agente marcador, o p-nitrofenil fosfato como el sustrato cuando se utiliza fosfatasa alcalina como agente de marca, y midiendo la descomposición del sustrato con un espectrofotómetro o similar [referencia, Eiji Ishikawa *et al*; Enzyme Immunoassay, 2ª edición., Igakushoin, 1982, por ejemplo].

Cuando se utiliza un radioisótopo o una sustancia fluorescente como marca en lugar de dicha enzima, la determinación de la inmunoglobulina marcada puede llevarse a cabo mediante la técnica conocida que utiliza la marca particular.

El disolvente que debe utilizarse en cada sistema de ensayo, puede ser cualquier disolvente que no afecte de forma adversa la reacción en el sistema de ensayo particular. Los ejemplos de disolvente preferidos para su utilización general son soluciones tampón que tengan valores pH dentro del intervalo de aproximadamente 5-9, tales como solución tampón citrato, solución tampón fosfato, solución tampón Tris-HCl, solución tampón acetato, y así sucesivamente.

Las condiciones de la reacción inmune (unión) no están, tampoco, particularmente limitadas. Así, pueden utilizarse las condiciones de utilización rutinaria para los inmunoensayos de este tipo. Generalmente, la temperatura de la reacción no es superior a aproximadamente 45°C, preferentemente es del orden de aproximadamente 4-40°C, siendo el tiempo de reacción de aproximadamente 1-40 horas.

La característica más importante de la invención, consiste en utilizar la cantidad de anticuerpo anti-WT1 en una muestra, como un marcador clínico de la enfermedad relacionada con WT1.

Comparado con los individuos sanos, el nivel de anticuerpo anti-WT1 en un paciente con enfermedad relacionada con el WT1, está significativamente elevado, y disminuye con el progreso de la cura de la enfermedad. Por tanto, tomando este nivel de anticuerpo anti-WT1 y su cambio, particularmente el curso temporal de la cantidad del anticuerpo anti-WT1 como un marcador clínico, pueden evaluarse la presencia de enfermedad relacionada con el WT1, el curso de la curación y el pronóstico. Una disminución en la cantidad de anticuerpo anti-WT1 en una muestra, puede considerarse como un marcador clínico particularmente deseable.

En el contexto de la presente invención se descubrió que, entre dichos varios anticuerpos anti-WT1, las cantidades del anticuerpo IgM anti-WT1 y del anticuerpo IgG anti-WT1, los respectivos cursos temporales, y el curso temporales de su proporción, sirven como marcadores más efectivos de la presencia, curso de la curación, y pronóstico de una enfermedad relacionada con el WT1.

Además, en el contexto de la presente invención se descubrió que la enfermedad relacionada con WT1, particularmente, el síndrome mielodisplásico (MDS), tiene lugar un cambio del anticuerpo de WT1 de IgM a IgG

asociado con la progresión de la enfermedad. Por tanto, rastreando el curso temporal de la proporción presencial del anticuerpo IgM anti-WT1 con respecto al anticuerpo IgG anti-WT1, es posible controlar la progresión de la enfermedad en dicho MDS, es decir, el curso de la progresión desde la anemia resistente al tratamiento (RA) a través de la RA con un exceso de blastos, a la RAEB en transformación (RAEB-t) y posteriormente, a la leucemia.

- 5 Los inventores encontraron posteriormente que el anticuerpo anti-WT1 desaparece en la remisión completa de una enfermedad relacionada con WT1, tal como la leucemia, y que, por tanto, el intervalo de tiempo en el cual esta desaparición del anticuerpo persiste, puede considerarse como el período de tiempo durante el cual el estado anterior de remisión completa se mantiene.

- 10 La detección del anticuerpo anti-WT1 en un paciente con enfermedad relacionada con el WT1, es decir, la confirmación de un paciente positivo al anticuerpo anti-WT1, proporciona evidencia de que el paciente se presenta con una respuesta humoral inmune al WT1. Por tanto, la detección de un anticuerpo anti-WT1 es útil para la evaluación o el diagnóstico de la competencia inmunológica del paciente. Comparado con un paciente que no presenta una respuesta inmune, un paciente que presenta ésta posee una inmunidad más alta y puede tener un pronóstico mucho mejor. Por tanto, la determinación del anticuerpo anti-WT1 en un paciente con enfermedad
15 relacionada con WT1, se utiliza habitualmente para diagnosticar la competencia inmunológica contra la enfermedad relacionada con el WT1, particularmente (contra el cáncer) en varios pacientes cancerosos.

- El procedimiento de examen de la invención puede llevarse a cabo conveniente utilizando un agente de prueba, preferentemente un equipo de prueba (reactivo de ensayo). La presente invención proporciona además un reactivo de análisis para dilucidar la presencia, curso de la curación, y pronóstico de una enfermedad relacionada con el
20 WT1.

- El reactivo de análisis de la invención comprende un antígeno WT1, es decir, un antígeno que puede experimentar una reacción antígeno-anticuerpo con el anticuerpo anti-WT1 que va a ensayarse, como un ingrediente activo. Este reactivo de análisis puede comprender además un reactivo opcional tal como un agente detector de un antígeno que es útil para el sistema particular de ensayo. Además, puede contener reactivos apropiados que ayuden en el
25 proceso de determinación, tal como un diluyente del anticuerpo, un diluyente de la reacción, un tampón, una solución de lavado, y un agente marcado que detecte la actividad, entre otros.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 es una vista esquemática que ilustra las estructuras de los antígenos WT1 producidos de acuerdo con el Ejemplo 1-(1).

- 30 La figura 2 es una vista que representa los resultados del análisis para la reactividad entre el antígeno WT1 y el anticuerpo anti-WT1, de acuerdo con el Ejemplo 1-(2).

La figura 3 es un gráfico que representa los títulos del anticuerpo anti-WT1 (IgG) en pacientes con una enfermedad relacionada con el WT1, y en voluntarios sanos, determinado mediante el procedimiento de examen de la invención en el Ejemplo 2.

- 35 La figura 4 es un gráfico que representa los títulos del anticuerpo anti-WT1 (IgG) en pacientes con una enfermedad relacionada con el WT1 y en voluntarios sanos, determinado mediante el procedimiento de examen de la invención en el Ejemplo 2.

- La figura 5 es un gráfico que representa los títulos del anticuerpo anti-WT1 (IgM) en pacientes con una enfermedad relacionada con el WT1, y en voluntarios sanos, determinado mediante el procedimiento de examen de la invención en el Ejemplo 2.
40

La figura 6 es un gráfico que representa los títulos del anticuerpo anti-WT1 (IgM) en pacientes con una enfermedad relacionada con el WT1 y en voluntarios sanos, determinado mediante el procedimiento de examen de la invención en el Ejemplo 2.

- 45 La figura 7 es un gráfico que representa el curso temporal del anticuerpo anti-WT1 antes del comienzo de la terapia y después de la completa remisión de la leucemia aguda, determinado mediante el procedimiento de examen de la invención en el Ejemplo 3.

La figura 8 es un gráfico que representa los títulos del anticuerpo anti-WT1 (IgM) en pacientes con una enfermedad relacionada con el WT1, y en voluntarios sanos, determinado mediante el procedimiento de examen de la invención en el Ejemplo 4.

- 50 La figura 9 es un gráfico que representa los títulos del anticuerpo anti-WT1 (IgG) en pacientes con una enfermedad relacionada con el WT1 y en voluntarios sanos, determinado mediante el procedimiento de examen de la invención en el Ejemplo 4.

La figura 10 es un gráfico que representa los títulos del anticuerpo anti-WT1 (IgM e IgG) en una enfermedad relacionada con el WT1, determinado mediante el procedimiento de examen de la invención en el Ejemplo 4.

La figura 11 es un gráfico que representa la especificidad de un sistema de ensayo del anticuerpo anti-WT1 que materializa el procedimiento de examen de la invención, tal como se analiza en el Ejemplo 5-(1).

La figura 12 es una vista que representa los resultados de un análisis de transferencia Western realizado en el Ejemplo 5-(2).

5 Mejor modo de poner en práctica la invención

Los ejemplos siguientes ilustran la invención con mayor detalle. Debe, sin embargo, apreciarse que éstos no definen el alcance de la invención.

EJEMPLO 1 Determinación del anticuerpo anti-WT1

(1) Producción de un antígeno WT1

10 El gen WT1 (Blood, Vol. 91, pág. 2969 (1998)), se integró en el plásmido pBluescript II (producto de Stratagene), y utilizando este pBluescript II/WT1 (+/+) como matriz, se amplificó el fragmento de ADN mediante PCR, utilizando un cebador preparado añadiendo una secuencia de reconocimiento EcoR I en el extremo 5' (SEC ID n°:1) y un cebador preparado añadiendo una secuencia de reconocimiento Not I en el extremo 3' (SEC ID n°:2). El fragmento amplificado de ADN corresponde a una parte del ADNc del gen WT1 que codifica la secuencia de los aminoácidos 1 a 294 de la proteína WT1.

Entonces, el fragmento de ADN así obtenido se unió a un pGEX-5x-3 (Amersham Pharmacia Biotech), utilizándose para transfectar *Escherichia coli* BL 21 (DE3). Para una potenciación de la solubilidad de la proteína de fusión, las células se transfectaron simultáneamente con el plásmido pT-Trx de expresión de la tioredoxina. *E. coli* se cultivó por la noche y el líquido de cultivo se diluyó 10 veces, incubándose a 37°C durante 1,5 horas, y añadiéndose a continuación isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 0,1 mM, seguido posteriormente por 5 horas de incubación. Las células se recuperaron entonces y, después de añadir una solución citolítica [50 mM Tris-ClH (pH 7,5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Prefabloc SC (Boehringer Mannheim), 10 µg/ml de leupeptina, 1 mM DTT], se trataron con ultrasonidos y se centrifugaron, recuperándose el sobrenadante. La proteína de fusión en el sobrenadante se conjugó con la glutation-sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech), que fue entonces lavada, y que se eluyó con un tampón de elución (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 20 mM glutatión reducido, 1 mM DTT), para recuperar la proteína de fusión HWT3 de GST-WT1.

De forma similar, tal como se describe a continuación, se obtuvieron HWT2 (el fragmento WT1ADNc que codifica la secuencia aminoácida 1 a 181 de la proteína WT1) y HWT4 (el fragmento WT1ADNc que codifica la secuencia aminoácida 182 a 294 de la proteína WT1).

Así, con pBluescript II/WT1(+/+) como matriz, se llevó a cabo una PCR utilizando un cebador que contenía una secuencia de reconocimiento EcoRI en el extremo 5' y un cebador que contenía una secuencia de reconocimiento NotI en el extremo 3' (el cebador-5' con la secuencia de SEC ID n°:1 y el cebador-3' con la secuencia de SEC ID n°:3 para HWT2, o el cebador-5' con la secuencia de SEC ID n°:4, y el cebador-3' con la secuencia de SEC ID n°:2 para HWT4), para amplificar el fragmento objetivo ADN. Cada ADN obtenido de esta forma se clonó en pGEX-5X-3 (Amersham Pharmacia Biotech) y se utilizó para transfectar *Escherichia coli* BL21 (DE3). A partir de esta *E. coli*, se recuperaron las proteínas de fusión HWT2 o HWT4 de WT1, de la misma forma que se describió anteriormente.

Las estructuras de las proteínas HWT2, HWT3 y HWT4 respectivas obtenidas tal como se ha llevado a cabo anteriormente, se muestran esquemáticamente en comparación con WT1 en la figura 1.

40 En la figura 1, la región 1-181 representa un dominio de represión, la región 182-294 representa un dominio de activación, seguido por un dedo de zinc.

(2) Ensayo para reactividad entre el antígeno WT1 y el anticuerpo WT1.

La reactividad entre el antígeno WT1 y el anticuerpo WT1 que se concibieron como se indicó anteriormente en (1), se ensayó de la siguiente manera:

45 Así, la proteína de fusión GST se disolvió en PBS a una concentración de 250 µg/ml y se adsorbió en una membrana de nitrocelulosa (Optitran, Schleicher & Schuell) a una concentración de 25 µg/cm². Esta membrana de nitrocelulosa se lavó con PBS, se sumergió en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 2% durante 2 horas, y se montó en un dispositivo de transferencia (Schleicher & Schuell). Sobre la membrana de nitrocelulosa que transporta adsorbida la proteína de fusión GST, se situaron 20 µl de solución de anticuerpo anti-WT1, haciéndose reaccionar durante 1 hora, y después de lavar con PBS, se hizo reaccionar posteriormente la membrana durante 1 hora, con el anticuerpo anti-IgG conjugado con HRP. Después de lavar, la membrana se sumergió en una solución sustrato (RenaissanceTM, NEN Life Science products) para reacción, y después de secar, se dejó la membrana en contacto con una película fotosensible (Hyperfilm MP, Amersham Life Science). Después de exponer la película, la densidad de la banda en ésta se midió con un sistema de análisis computarizado de rastreo (Molecular Dynamics).

para calcular el título del anticuerpo en unidades densitométricas.

Los anticuerpos anti-WT1 que se utilizaron fueron los siguientes:

- * S-Cruz 180: un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína de fusión GST, que contiene la secuencia N-terminal de 180 residuos del WT1 humano (producto de Santa Cruz Biotechnology, Inc)
- 5 * Pharmingen: un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proteína WT1 humana que reconoce la secuencia exónica 5, tal como se obtiene inmunizando un péptido sintético que corresponde a la secuencia del exón 5 del WT1 humano (producto de Pharmingen).

(3) Resultados

Los resultados se presentan en la figura 2

- 10 Puede deducirse lo siguiente a partir de los resultados representados en la figura 2. Así, mientras que HWT2 reacciona exclusivamente con el anticuerpo policlonal de conejo S-Cruz 180, y HWT4 reacciona exclusivamente con el anticuerpo monoclonal Pharmingen de ratón, se encontró que HWT3 reaccionó con ambos.

Para la detección de amplio espectro de los anticuerpos anti WT1 en una muestra, se utilizó HWT3 como el antígeno para detectar los anticuerpos anti-WT1 en una muestra en el procedimiento siguiente.

15 **EJEMPLO 2 Ensayo 1 para la enfermedad relacionada con WT1**

(1) Preparación de una muestra

El suero de ensayo se diluyó 2500 veces con PBS que contenía 2% de BSA y 0,05% de Tween 20 para preparar una muestra.

(2) Preparación de la membrana con el antígeno adsorbido

- 20 La solución de la proteína de fusión HWT3 (250 µg/ml) se dispuso y se dejó que se adsorbiera sobre una membrana de nitrocelulosa (Optitran, Schleicher & Schuell) a una concentración de 25 µg/cm² durante 1 hora. Esta membrana se lavó con PBS, se sumergió entonces en una solución bloqueadora ((solución de albúmina sérica bovina al 2%) durante 2 horas, se lavó otra vez y se utilizó como la membrana en la que se había adsorbido el antígeno.

(3) Determinación del anticuerpo WT1

- 25 Utilizando la membrana en la que se había adsorbido el antígeno, obtenida tal como se ha mencionado anteriormente en el punto (2), se determinó cada uno de los anticuerpos anti-WT1 (IgG e IgM) contenidos en la muestra que se había preparado en el punto (1), de la misma forma que se describe en el Ejemplo 1-(2).

- De este modo, la membrana de nitrocelulosa que soportaba la proteína de fusión GST tal como fue adsorbida, se montó en un dispositivo de transferencia y 20 µl de la muestra (suero diluido) se dispusieron sobre la membrana, incubándose durante 1 hora. Después de lavar con PBS, se hizo reaccionar posteriormente la membrana en BSA/PBS al 1%, con el anticuerpo anti-IgM humano de cabra conjugado a HRP (ICN Pharmaceuticals Inc.), en el caso del anticuerpo IgM durante 1 hora. En el caso del anticuerpo IgG, se hizo reaccionar posteriormente con el anticuerpo anti-IgG humano de conejo, conjugado a HRP (ICN Pharmaceuticals Inc.) durante 1 hora. Después de la finalización de la reacción, la membrana se lavó con PBS, se sumergió en una solución de sustrato para reacción, se secó, y se situó en estrecho contacto con la película fotosensible. Ésta se expuso entonces, y se midió la densidad de la banda sobre la película para determinar el título del anticuerpo (en unidades densitométricas). Estos procedimientos se llevaron a cabo invariablemente a temperatura ambiente.
- 30 35

(4) Resultados del ensayo

- 40 (a) Los resultados obtenidos utilizando muestras de 43 voluntarios adultos humanos y de 33 pacientes con enfermedad relacionada con el WT1 ((12 con síndrome mielodisplásico (MDS), 12 con leucemia mielocítica aguda (AML), 4 con leucemia linfofítica aguda (ALL) y 5 con leucemia mielocítica crónica (CML)), de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, se presentan en las figuras 3-6.

En cada figura, las ordenadas representan títulos de anticuerpo (unidades densitométricas) y las abscisas representan cada muestra.

- 45 Los resultados representados en la figura 3 indican que, comparados con los voluntarios sanos, los pacientes con enfermedad relacionada con WT1, presentan títulos de anticuerpos IgG anti-WT1 significativamente altos ($p < 0,001$).

Los resultados representados en la figura 4 indican que, comparados con los voluntarios sanos, los pacientes con AML y con MDS presentan títulos de anticuerpos IgG anti-WT1 significativamente altos.

Los resultados representados en la figura 5 indican que, comparados con los voluntarios sanos, los pacientes con

enfermedad relacionada con WT1, presentan títulos de anticuerpos IgM anti-WT1 significativamente altos ($p=0,0003$).

Los resultados representados en la figura 6 indican que, comparados con los voluntarios sanos, los pacientes con AML y con MDS presentan títulos de anticuerpos IgM anti-WT1 significativamente altos.

- 5 Estos hallazgos evidencian que determinando los anticuerpos IgG y/o IgM anti-WT1, es posible diagnosticar la presencia de enfermedades relacionadas con el WT1, tales como AML, ALL, CML y MDS.

EJEMPLO 3 Ensayo para realizar un pronóstico en pacientes con enfermedad relacionada con el WT1

De la misma forma que se describe en el Ejemplo 2, se midió el título de anticuerpos IgG anti-WT1 en 6 pacientes afectados de leucemia aguda, y después del tratamiento (cuando se produce la remisión completa (CR)).

- 10 Los resultados se presentan en la figura 7.

Haciendo referencia a la figura 7, las abscisas se refieren a antes del tratamiento y a después de la remisión completa para cada paciente, y las ordenadas se refieren al título de los anticuerpos anti-WT1 de cada muestra. Siguiendo con la descripción de las figuras, las líneas (1)-(6) representan a los pacientes respectivos con enfermedad relacionada con WT1, de las cuales, las líneas continuas se relacionan con los cuatro pacientes en los que el trasplante de células troncales sanguíneas periféricas dio lugar a una remisión completa, mientras que las líneas a trazos representan los dos pacientes en los que la quimioterapia dio lugar a una remisión completa.

- 15 que el trasplante de células troncales sanguíneas periféricas dio lugar a una remisión completa, mientras que las líneas a trazos representan los dos pacientes en los que la quimioterapia dio lugar a una remisión completa.

A partir de la figura 7, puede apreciarse lo siguiente: Así, el título de anticuerpos IgG anti-WT1 que se detecta antes del tratamiento, según el procedimiento de la invención, cae definitivamente por debajo del límite de detección cuando el tratamiento ha sido lo bastante efectivo como para proporcionar una remisión completa (CR).

- 20 Los hallazgos anteriores indican que la eficiencia de un tratamiento puede confirmarse y diagnosticarse llevando a cabo el seguimiento del título de anticuerpos IgG anti-WT1, estableciéndose de forma diferente que este título refleja la enfermedad residual mínima.

EJEMPLO 4 Ensayo 2 para la enfermedad relacionada con WT1

(1) Preparación de las muestras.

- 25 Se recuperaron los sueros a partir de los 43 voluntarios adultos sanos y de los 46 pacientes con enfermedades relacionadas con WT1 (16 con síndrome mielodisplásico (MDS), 16 con leucemia mielocítica aguda (AML), 7 con leucemia linfocítica aguda (ALL) y 7 con leucemia mielocítica crónica (CML)). El análisis de la población de patentes MDS fue: 6 con anemia resistente al tratamiento (RA), 4 con anemia resistente al tratamiento con exceso de blastos (RAEB), y 6 con RAEB en transformación (RAEB-t).

- 30 Los sueros de ensayo se guardaron a -20°C hasta que se utilizaron.

(2) Preparación de un antígeno WT1 para la determinación del anticuerpo anti WT1.

La secuencia del ADN que corresponde al fragmento de la proteína WT1 (1-294 (HWT3)), se amplificó mediante PCR, de la misma forma que en el Ejemplo 1-(1), clonándose en el vector plasmídico pET-21b(+), que posee la secuencia C-terminal His- Tag (Novagen Inc., Madison, WI). El plásmido resultante se utilizó para transfectar *Escherichia coli* XL1-Blue, examinándose el transformante mediante mapeado de enzimas de restricción y secuenciación del ADN. Entonces, este ADN plasmídico se usó para transfectar *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Stratagene, La Jolla, CA), para preparar un ADN recombinante.

- 35 *Escherichia coli* BL21 (DE3) recombinante se cultivó hasta que $A_{600}=0,6$ a 37°C , y se incubó en presencia de $0,1\text{ }\mu\text{M}$ IPTG durante 4 horas, para inducir un fragmento proteico de WT1. Las células de *E. coli* se recuperaron centrifugando a 6.000 g durante 10 minutos, se volvieron a suspender en 4 ml (por 200 ml de cultivo) de tampón A (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, $\text{pH } 8,0$), y se guardaron a -80°C . Después de descongelar en hielo, *E. coli* se fragmentó mediante ultrasonidos ($\times 3$, 2 min), y se centrifugó a 6.000 g durante 10 minutos. El sedimento que contenía el cuerpo de inclusión se volvió a suspender en tampón B (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, $\text{pH } 8,0$, 300 mM NaCl, 6 M urea, 15 mM imidazol, 20 mM de $\beta\text{-ME}$) y se guardaron en hielo bajo agitación moderada durante 1 hora para desnaturalizar la proteína.

- 40 La *E. coli* BL21 (DE3) recombinante se cultivó hasta que $A_{600}=0,6$ a 37°C , y se incubó en presencia de $0,1\text{ }\mu\text{M}$ IPTG durante 4 horas, para inducir un fragmento proteico de WT1. Las células de *E. coli* se recuperaron centrifugando a 6.000 g durante 10 minutos, se volvieron a suspender en 4 ml (por 200 ml de cultivo) de tampón A (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, $\text{pH } 8,0$), y se guardaron a -80°C . Después de descongelar en hielo, *E. coli* se fragmentó mediante ultrasonidos ($\times 3$, 2 min), y se centrifugó a 6.000 g durante 10 minutos. El sedimento que contenía el cuerpo de inclusión se volvió a suspender en tampón B (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl, $\text{pH } 8,0$, 300 mM NaCl, 6 M urea, 15 mM imidazol, 20 mM de $\beta\text{-ME}$) y se guardaron en hielo bajo agitación moderada durante 1 hora para desnaturalizar la proteína.

- 45 Una columna que contenía níquel nitro triacético agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania), se cargó con la solución resultante para permitir que la proteína se inmovilizara. Se lavó la columna con tampón C (el tampón B anterior que contenía Tween al 1%, pero no $\beta\text{-ME}$), y se eluyó el fragmento proteico de WT1 con 4 ml de tampón D (el tampón B anterior que contenía 150 mM de imidazol, pero sin contener $\beta\text{-ME}$, $\text{pH } 8,0$). Para volver a mantener la proteína recombinante, se emplazó el eluido en una cassette (cassette Slide-a-Lyzer, Pierce Chemical Company, IL) y se dializó contra un exceso de tampón 20 mM Tris- HCl ($\text{pH } 8,0$) a 4°C por la noche.

La proteína recombinante se concentró entonces con Centricon-30 (Millipore Corp., Bedford, MA), midiéndose la

concentración proteica mediante el procedimiento Bradford, utilizando un equipo de análisis proteico (Bio-Rad Labs, Hercules, CA). Se ensayó la pureza y la especificidad de la proteína resultante mediante SDS-PAGE y análisis de transferencia Western, solubilizándose dicha proteína en una solución de glicerol (v/v) al 30%, y guardándose a -80°C hasta que se utilizó.

5 (3) Determinación del anticuerpo anti-WT1

El fragmento proteico (HWT3) de WT1 obtenido anteriormente se conjugó con una membrana de nitrocelulosa (Optitran, Schleicher & Schuell) a una concentración de 2,5 µg/cm² (1 hora de incubación a temperatura ambiente). Esta membrana se lavó con PBS y, después de bloqueo durante 2 horas en BSA-PBS, se montó en un dispositivo de transferencia (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania), según la (presente) memoria.

- 10 La determinación se llevó a cabo de acuerdo con el Ejemplo 2. Así, 20 µl del suero de ensayo preparado según el punto (1) anterior (utilizando PBS que contenía BSA al 1% y Tween 20 al 0,1%, diluyéndose el suero 1/500 veces en el caso de IgM o 1/2.500 veces en el caso de IgG), se aplicaron a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBS, la membrana se hizo reaccionar, en BSA al 1%/PBS, con el anticuerpo anti-IgM humano de cabra, conjugado a HRP o con el anticuerpo anti-IgG humano de conejo, conjugado a HRP, durante 1 hora.

Después de lavar completamente con PBS, se midió el título del anticuerpo de la misma forma que anteriormente. Cada resultado se expresó en el promedio de, por lo menos, dos mediciones.

(4) Resultados

- 20 (a) Los resultados obtenidos mediante el procedimiento citado anteriormente (los resultados de la determinación del anticuerpo IgM o IgG anti-WT1 en cada muestra), se representan en la Tabla 1, y en la figura 8 los resultados de la determinación del anticuerpo IgM anti-WT1 y en la figura 9, los resultados de la determinación del anticuerpo IgG anti-WT1.

En cada figura, las ordenadas representan el título del anticuerpo (unidades densitométricas) y las abscisas, cada muestra. Debe comprenderse que, en cada figura, los círculos negros representan una muestra que contiene sólo el anticuerpo IgM o el IgG anti-WT1, y los círculos blancos representan una muestra que contiene los dos anticuerpos IgM anti-WT1 e IgG anti-WT1. Además, el valor de extinción que se utilizó para el anticuerpo anti-WT1 fue el título del anticuerpo de 600 para el anticuerpo IgM, o el título del anticuerpo de 500 para el anticuerpo IgG (Clin. Chem., 39, 561 (1993)).

Tabla 1

	-	+	IgM	IgG	IgM+IgG
Voluntarios sanos	34/43 (79,1)	9/43 (20,9)	7/43 (16,2)	2/43 (4,7)	0/43 (0)
Pacientes con enfermedad relacionada con WT1	9/46 (19,5)	37/46 (80,4)	24/46* (52,2)	23/46* (50,0)	10/46 (21,7)
AML	3/16 (18,7)	13/16 (81,3)	11/16 (68,8)	8/16 (50,0)	6/16 (37,5)
ALL	3/7 (42,9)	4/7 (57,1)	1/7 (14,3)	3/7 (42,9)	0/7 (0)
CML	2/7 (28,6)	5/7 (71,4)	3/7 (42,9)	2/7 (28,6)	0/7 (0)
MDS	1/16 (6,3)	15/16 (93,7)	9/16 (56,3)	10/16 (62,5)	4/16 (25,0)

Los números entre paréntesis significan un porcentaje (%).

Los números marcados * incluyen el número de casos con anticuerpos IgM + IgG anti-WT1.

A partir de los resultados representados en la Tabla 1, la figura 8 y la figura 9, puede deducirse lo que se expone a continuación.

Así, en 24 (52,2%) de 46 pacientes con enfermedad relacionada con WT1, se detectó anticuerpo IgM anti-WT1. Por otra parte, se descubrió en 7 (16,2%) de los 43 voluntarios sanos.

- 5 Comparados con los voluntarios sanos, tanto la tasa de detección de los anticuerpos IgM anti-WT1 ($p=0,0001$) como el título de anticuerpos IgM anti-WT1 ($p<0,0001$) fueron significativamente más altos en los pacientes con la enfermedad relacionada con el WT1.

- 10 La comparación de los títulos de anticuerpos IgM anti-WT1 en los 4 tipos de enfermedad relacionada con el WT1, con los títulos correspondientes en los voluntarios sanos, reveló que en los pacientes con todos los tipos de enfermedad relacionada con el WT1, excepto ALL, el título de anticuerpos fue significativamente más alto que en los voluntarios sanos.

Los anticuerpos IgG anti-WT1 se detectaron en 23 (50,0) de los 46 pacientes con enfermedad relacionada con el WT1, pero sólo en 2 (4,7%) de los 43 voluntarios sanos.

- 15 Comparados con los voluntarios sanos, tanto la tasa de detección de los anticuerpos IgG anti-WT1 ($p=0,0001$) como el título de anticuerpos IgG anti-WT1 ($p<0,0001$) fueron significativamente más altos en los pacientes con la enfermedad relacionada con el WT1. Además, la comparación de los títulos de anticuerpos IgG anti-WT1 en los pacientes con enfermedad relacionada con el WT1 con los títulos correspondientes en voluntarios sanos, reveló que en tres tipos de la enfermedad, exceptuando ALL, principalmente en AML, CML y MDS, este título de anticuerpos fue significativamente más alto cuando se comparó con los voluntarios sanos.

- 20 La producción de los anticuerpos IgM e IgG anti WT1 mostró un contraste notable entre los pacientes con la enfermedad relacionada con el WT1 y los voluntarios sanos. Tanto los anticuerpos IgM como los IgG anti-WT1 se produjeron en 10 (21,7%) de los 46 pacientes con enfermedades relacionadas con el WT1, pero ninguno de los 43 voluntarios sanos, presentó ninguno de ellos. Se debe considerar que 3 pacientes (2 con AML y 1 con MDS) que mostraban los títulos más altos del anticuerpo IgG anti-WT1, habían producido simultáneamente anticuerpos IgM anti-WT1 y que mientras 6 (el 37,5%) de 16 pacientes con AML y 4 (el 25,0%) de 16 pacientes con MDS habían producido tanto anticuerpos IgM como IgG anti-WT1, ninguno de los pacientes de ALL y de CML habían producido simultáneamente los dos anticuerpos.

- 30 No se encontró correlación entre el título de anticuerpos anti-WT1 y cada uno de los niveles de expresión de WT1 (RT-PCR) y la edad de los pacientes, o entre la presencia de anticuerpos anti-WT1 y el sexo, situación patológica, y supervivencia/muerte de cada uno de los pacientes.

- (b) En 4 pacientes leucémicos, el título de anticuerpos anti-WT1 se midió tanto en el diagnóstico como durante la remisión continuada completa (CCR).

Los resultados se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2

Enfermedad	AML	AML	AML	AML
IgM en el diagnóstico durante CCR	<600	772	1477	1283
	600	600	<600	<600
IgM en el diagnóstico durante CCR	989	794	754	1900
	500	500	<500	<500
Tratamiento	Alo-BMT	Quimioterapia	Quimioterapia	Alo-BMT
Situación del paciente	5.5	5.4	3.9	3.1
Duración de la CCR (años)	(-)	(-)	(-)	(-)
Terapia inmunosupresora				
IgM	129	59	58	69
	(52-270)++			

Enfermedad	AML	AML	AML	AML
IgG	1077 (880-1800)	140	1120	1320
IgA	145 (126-517)	120	150	1211

La "situación del paciente" refleja la situación del paciente en la determinación del título de los anticuerpos anti-WT1 durante CCR.

++ Los números entre paréntesis significan el intervalo normal (mg/dl).

- 5 Se deduce a partir de los resultados en la Tabla 2 que, en todos estos pacientes, que los títulos de anticuerpos anti-WT1 comparativamente altos que se encontraron en la etapa de diagnóstico y no se detectaron en la etapa de CCR. En estos pacientes, la duración de la CCR sería de entre 3,1 y 5,5 años, los títulos séricos de IgM, IgG e IgA permanecieron al nivel normal, y no se habría administrado ningún inmunosupresor durante el tiempo del ensayo. Estos hallazgos sugieren que se habrían recuperado completamente del estado inmunodeprimido provocado por una quimioterapia potente o por el trasplante alogénico de médula ósea. Por tanto, se considera que la ausencia de anticuerpos anti-WT1 en la etapa CCR es el resultado de la desaparición o del alivio de la carga tumoral leucémica y de la desaparición subsiguiente de la estimulación inmunológica debida al antígeno WT1.

(c) Cambio del tipo de anticuerpo anti-WT1

- 15 Se determinaron los anticuerpos IgM e IgG anti-WT1 en 16 pacientes de MDS (6 con RA, 4 con RAEB y 6 con RAEB-t). Los resultados se presentan en la figura 10.

Se puede deducir lo siguiente de los resultados representados en la figura 10. Así, se detectó el anticuerpo IgM anti-WT1 en 5 de los 6 casos RA y, en 3 de estos 5 casos, se encontraron títulos de anticuerpos comparativamente altos. Contrariamente, no se detectaron anticuerpos IgG anti-WT1 en 4 de los 6 casos, siendo también bajos los títulos de anticuerpos en los 2 casos restantes.

- 20 Entre los pacientes de RAEB, se detectaron los anticuerpos IgM anti-WT1 e IgG anti-WT1 en 2 y 3, respectivamente, de 4 casos. Los títulos de anticuerpos IgM anti-WT1 fueron inferiores a los de dichos pacientes de RA, mientras que los títulos de anticuerpos IgG anti-WT1 fueron más altos.

- 25 Los pacientes de RAEB-t fueron claramente distintos de los que presentaban RA. Así, se encontraron títulos bajos de anticuerpos IgM anti-WT1 en 2 de 6 casos, mientras que se encontraron altos títulos de anticuerpos IgG anti-WT1 en 5 de los 6 casos.

Estos hallazgos indican convincentemente que, asociado con la progresión de MDS a partir de RA, a través de RAEB a RAEB-t, existe un cambio en el tipo de inmunoglobulina del anticuerpo anti-WT1, desde IgM a IgG.

EJEMPLO 5 Ensayo para la confirmación de la especificidad del sistema de ensayo anticuerpo-anti-WT1

- 30 (5-1) A cada uno de los sueros positivos al anticuerpo IgG anti-WT1, sueros negativos al anticuerpo IgG anti-WT1 y solución del anticuerpo policlonal anti-WT1 (S-Cruz-180), se añadió una cantidad predeterminada de la proteína ensayo (HWT3, albúmina (HSA) o transferrina humana), llevándose a cabo la determinación del anticuerpo-anti WT1 (ensayo de inhibición), de acuerdo con el procedimiento que se describe en el Ejemplo 4.

- 35 Los resultados se presentan en la figura 11.

- 40 Haciendo referencia a la figura 11, las ordenadas representan el porcentaje de inhibición y las abscisas representan el nivel de adición (ng/pocillo) de la proteína de prueba. En el gráfico, (1) representa la muestra positiva al anticuerpo anti-WT1 + HWT3, (2) representa la muestra positiva al anticuerpo anti-WT1 + HSA, y (3) representa la muestra positiva al anticuerpo anti-WT1 + transferrina, (4) representa la muestra negativa al anticuerpo anti-WT1 + HWT3, (5) representa la muestra negativa al anticuerpo anti-WT1 + HSA, (6) representa la muestra negativa al anticuerpo anti-WT1 + transferrina, (7) representa la solución del anticuerpo policlonal anti-WT1 + HWT3, (8) representa la solución del anticuerpo policlonal anti-WT1 + HSA, y (9) representa la solución del anticuerpo policlonal anti-WT1 + la transferrina.

Resulta evidente a partir de los resultados representados en la figura 11, que la adición de la proteína HWT3,

antígeno del sistema de detección, a la muestra positiva al anticuerpo anti-WT1, o la solución del anticuerpo policlonal anti-WT1, provocó una inhibición variable de la detección del anticuerpo anti-WT1 en una forma dependiente del nivel de adición de la proteína HWT3. Esta inhibición dependiente del nivel de HWT3 pudo confirmarse asimismo cuando se utilizó la muestra positiva al anticuerpo IgM anti-WT1. Por otra parte, la adición de HSA o la transferrina no provocó tal inhibición y, cuando la muestra era negativa al anticuerpo anti-WT1, la adición de HWT3 no tuvo influencia.

Estos hallazgos evidenciaron que este sistema de ensayo del anticuerpo anti-WT1 proporciona la detección específica de los anticuerpos contra WT1.

(5-2) Se sometió a SDS-PAGE al 10% un lisado nuclear de K562 (progenie celular eritroleucémica), para preparar una proteína WT1 (proteína natural WT1), para análisis de transferencia Western. Utilizando las muestras positivas y negativas al anticuerpo IgG anti-WT1, que se utilizaron en los ensayos llevados a cabo en el Ejemplo 4, se realizó el análisis de transferencia Western de la proteína WT1. Los sueros del ensayo se diluyeron 50 veces, y como segundo anticuerpo, se utilizó anticuerpo IgG anti(conejo o humano) marcado con ALP. Como control positivo, se utilizó solución de anticuerpo policlonal anti-WT1 (S-Cruz 180)

Los resultados se presentan en la figura 12.

Haciendo referencia a la figura 12, la posición de WT1 se muestra a lo largo de los marcadores de tamaño en la columna izquierda.

El carril 1 representa el resultado con control positivo (S-Cruz 180), el carril 2 representa el resultado obtenido con la muestra (ALL) positiva al anticuerpo IgG anti-WT1, que se ensayó tenía un título de anticuerpos de 1366 en el Ejemplo 4, el carril 3 representa el resultado obtenido con la muestra (AML) positiva al anticuerpo IgG anti-WT1, que se ensayó tenía un título de anticuerpos de 754, el carril 4 representa el resultado obtenido con la muestra (RAEB-t) negativa al anticuerpo IgG anti-WT1, que se encontró era inferior al valor de extinción en el Ejemplo 4, y los carriles 5 y 6 representan los resultados obtenidos con las muestras de los voluntarios sanos, negativas al anticuerpo IgG anti-WT1.

Resulta evidente a partir de los datos en la figura 12, que la proteína WT1 natural puede detectarse, en el sistema de ensayo de la invención, con un suero que se descubrió era positivo al anticuerpo anti-WT1 (indetectable con el correspondiente suero negativo), pudiendo detectarse, según este sistema de ensayo de la invención, los anticuerpos objetivos anti-WT1 que reconocen la proteína natural WT1.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la invención, se proporciona un nuevo procedimiento de examen para la presencia de una enfermedad relacionada con el WT1 tal como la leucemia, el curso temporal de su curación, y su pronóstico. El procedimiento de examen de la invención no sólo permite la detección y el diagnóstico de las enfermedades relacionadas con el WT1, sino también el control de la progresión de la enfermedad a partir de MDS a la leucemia, e incluso la confirmación de la remisión completa de la leucemia.

Listado de secuencias

<110> Haruo SUGIYAMA

<120> Procedimiento de detección de las enfermedades asociadas a WT1

<130> P01-37

<150> JP 2000-152923 & JP 2001-14927

<151> 2000-5-24 & 2001-1-23

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

	<223> cebador 5' de WT1	
	<400> 1	
	ttgaattcaa tgggctccga cgtgcgg	27
	<210> 2	
5	<211> 26	
	<212> ADN	
	<220>	
	<223> Secuencia artificial	
	<223> cebador 3' de WT1	
10	<400> 2	
	ttgtcgacga agacaccgtg cgtgtg	26
	<210> 3	
	<211> 26	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 3' para HWT2	
	<400> 3	
	ttgtcgacca tgggatcctc atgctt	26
20	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador 5' para HWT4	
	<400> 4	
	ttgaattcag atccaatggg ccagcag	27

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para analizar los tumores sólidos, que comprende la medición, en una muestra, de la cantidad de anticuerpo contra el antígeno del tumor de Wilms 1 y utilizar el valor de la medición como un marcador clínico para el análisis.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento está destinado a analizar la presencia o ausencia de tumores sólidos.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el procedimiento está destinado a evaluar la progresión, curso de la curación, o pronóstico del MDS y/o de los tumores sólidos.
- 10 4. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la determinación de la cantidad del anticuerpo anti-tumor de Wilms 1, se lleva a cabo mediante una inmunorreacción que utiliza un antígeno del tumor de Wilms 1.
5. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el antígeno del tumor de Wilms 1 es una proteína del tumor de Wilms 1 que contiene un dominio de represión y un dominio de activación pero que no contiene un dedo de zinc.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-tumor de Wilms 1 es un anticuerpo IgG o un anticuerpo IgM.
- 15 7. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el curso temporal de la cantidad del anticuerpo anti-tumor de Wilms 1, se utiliza como un marcador clínico.
8. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la proporción cuantitativa del IgG anticuerpo anti-tumor de Wilms 1, con respecto al anticuerpo IgM anti-tumor de Wilms 1, se utiliza como marcador clínico.

Fig. 1

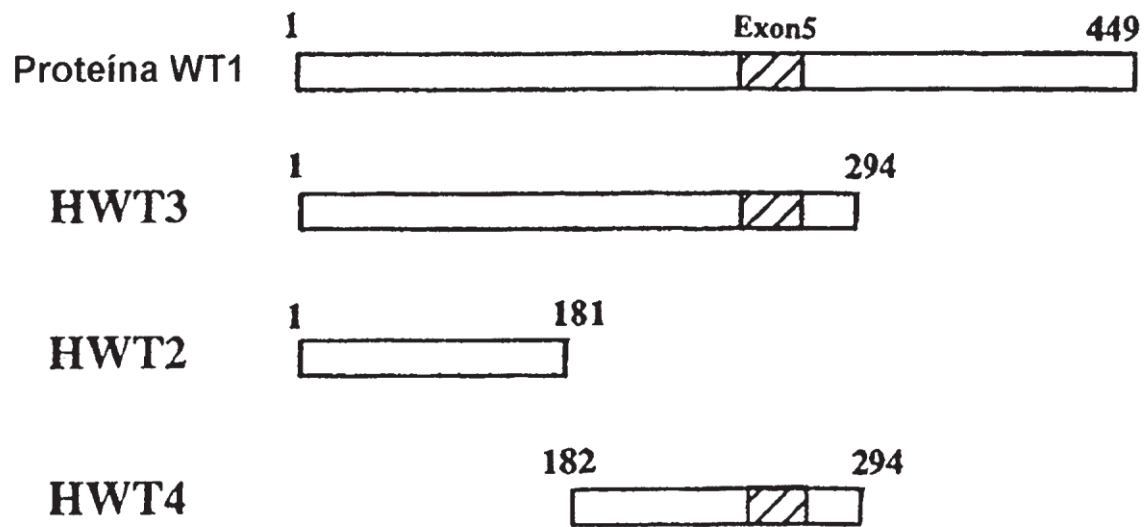


Fig. 2

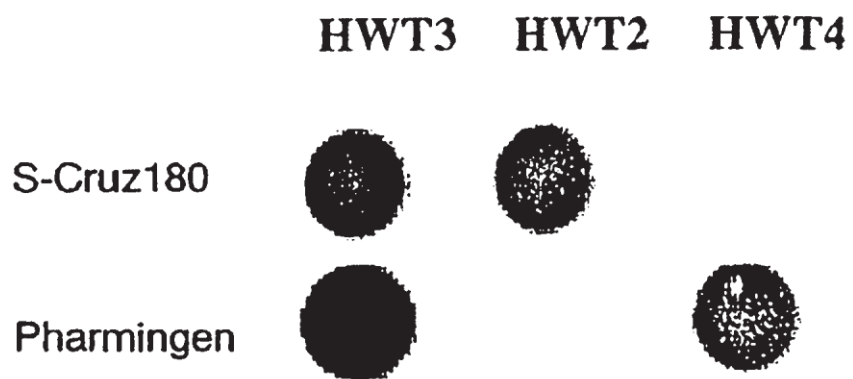


Fig. 3

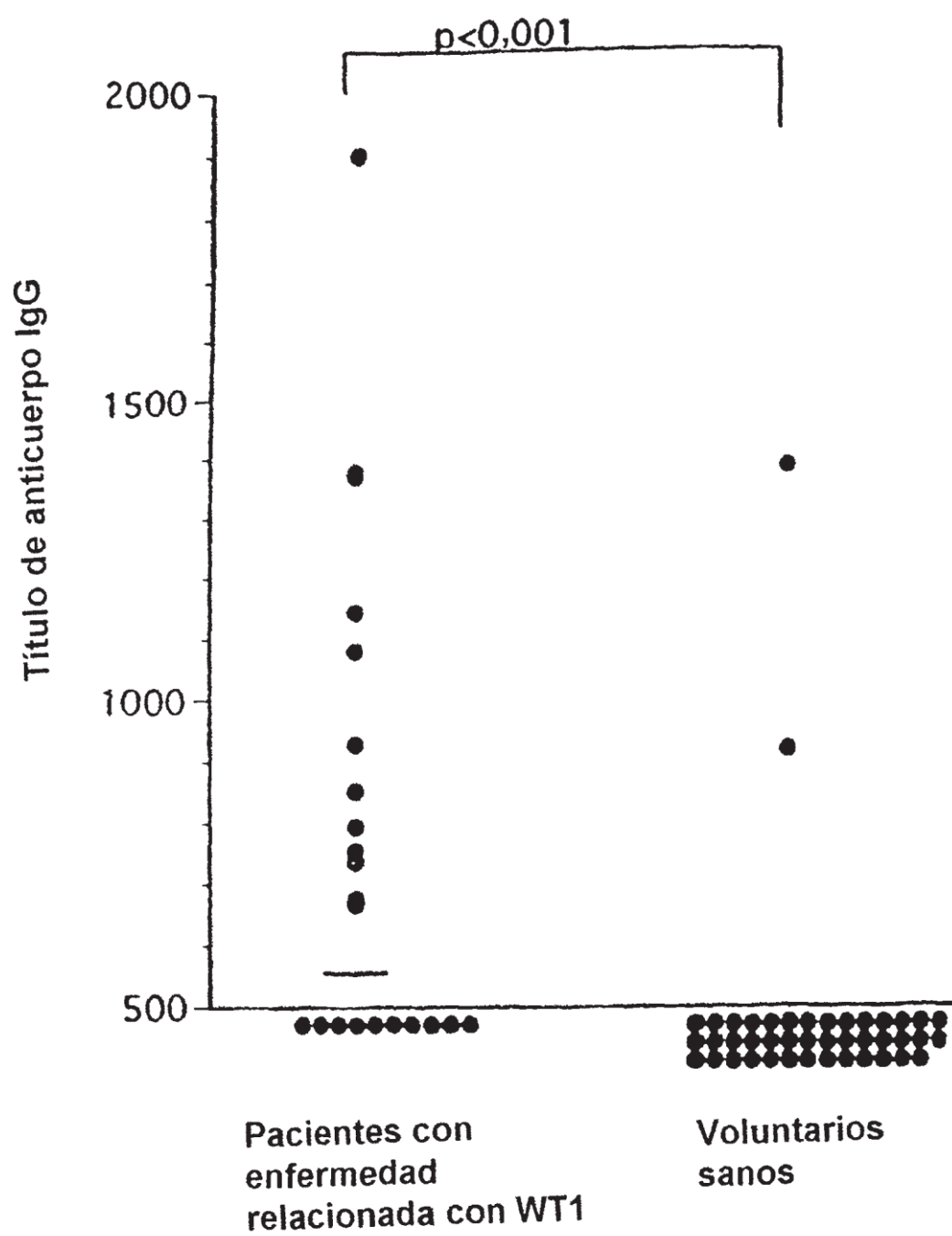


Fig. 4

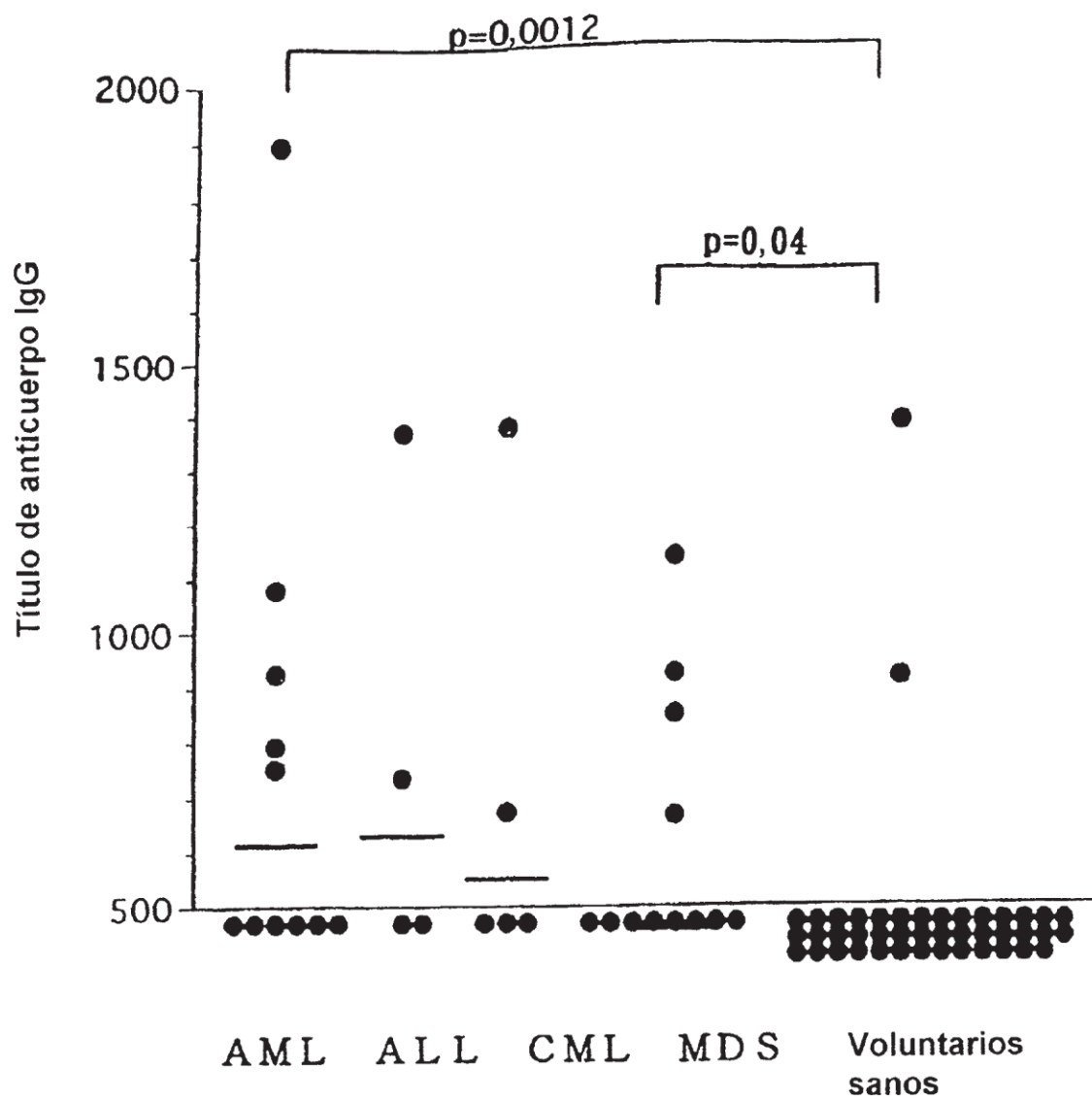


Fig. 5

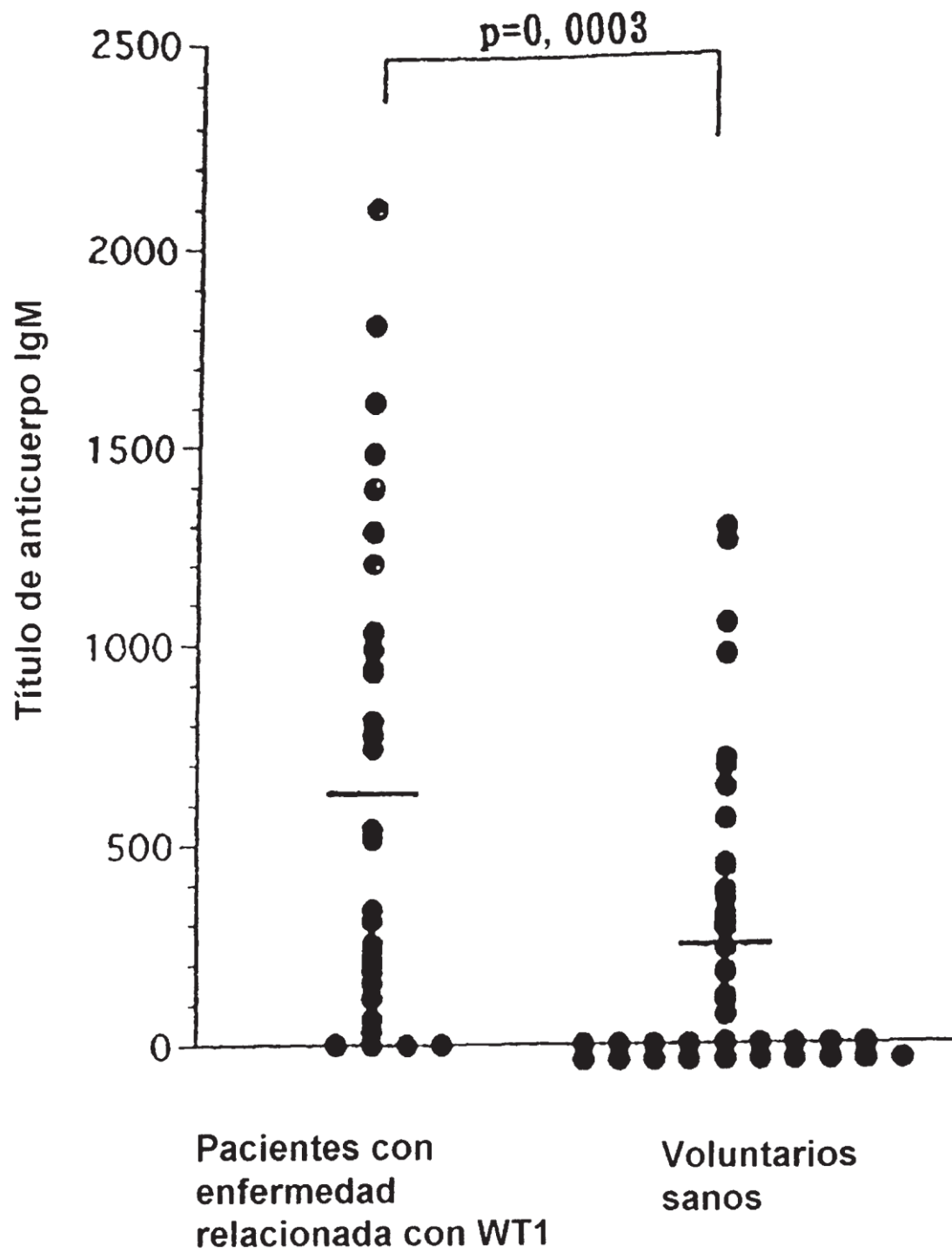


Fig. 6

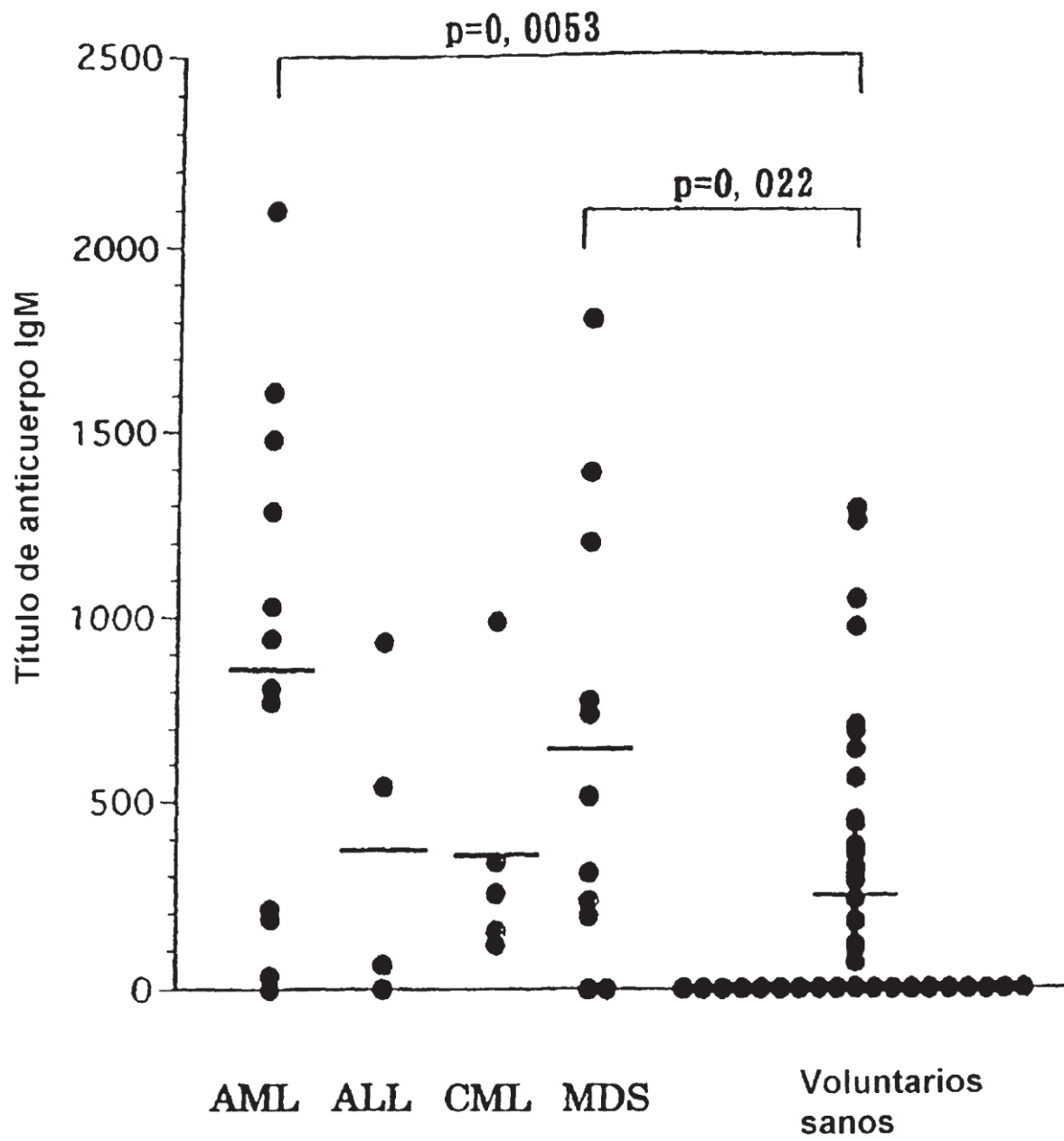


Fig. 7

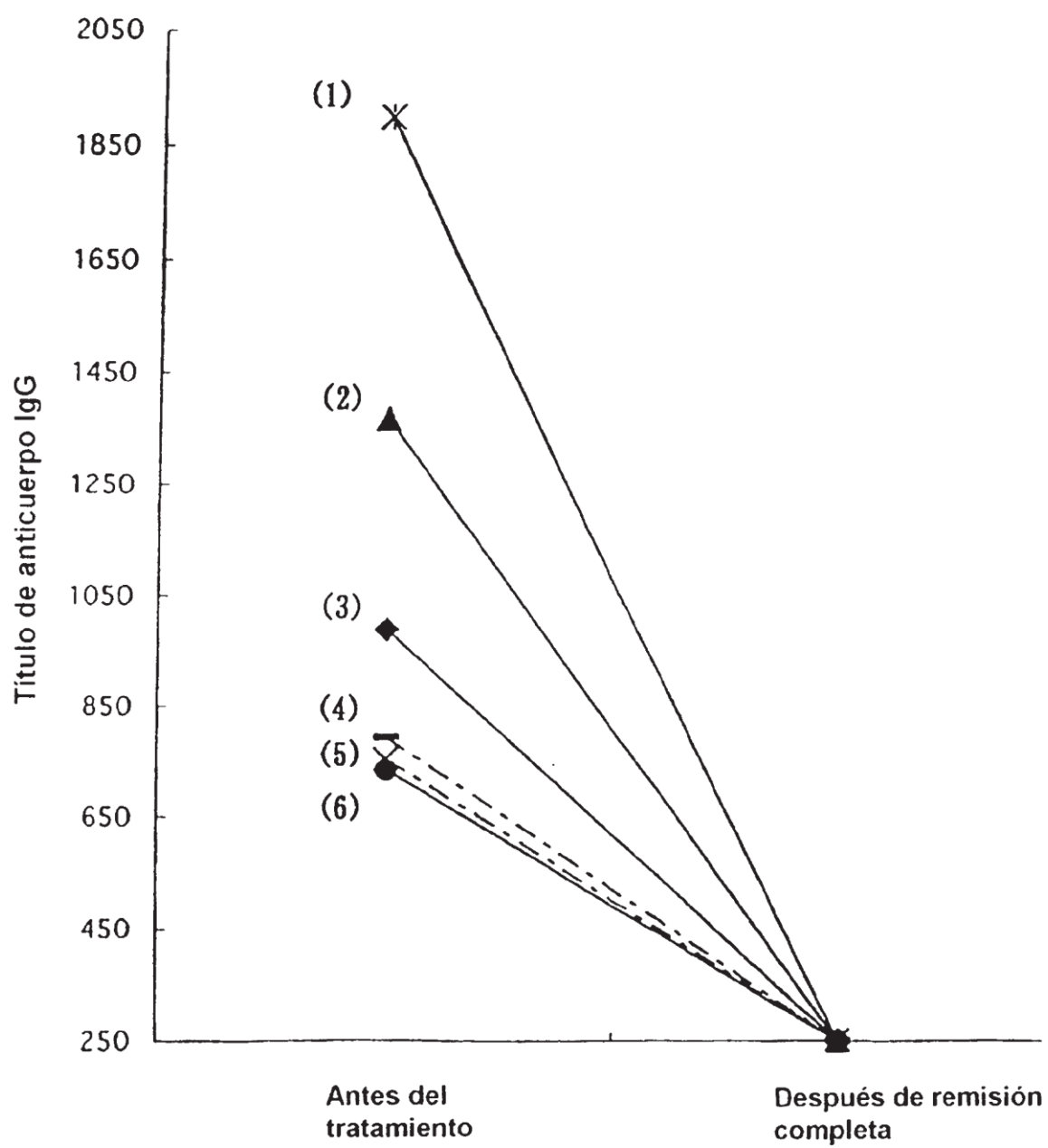


Fig. 8

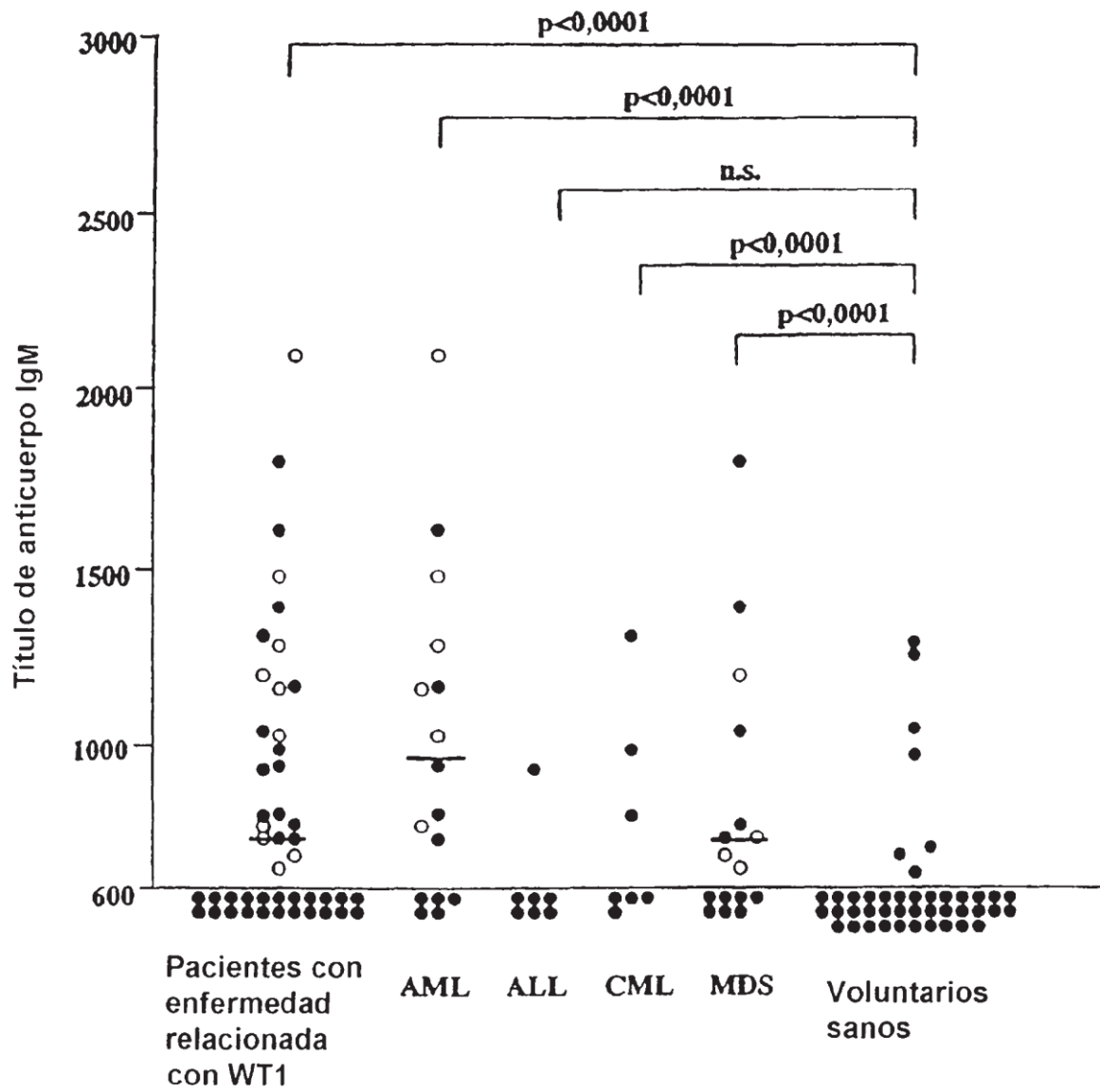


Fig. 9

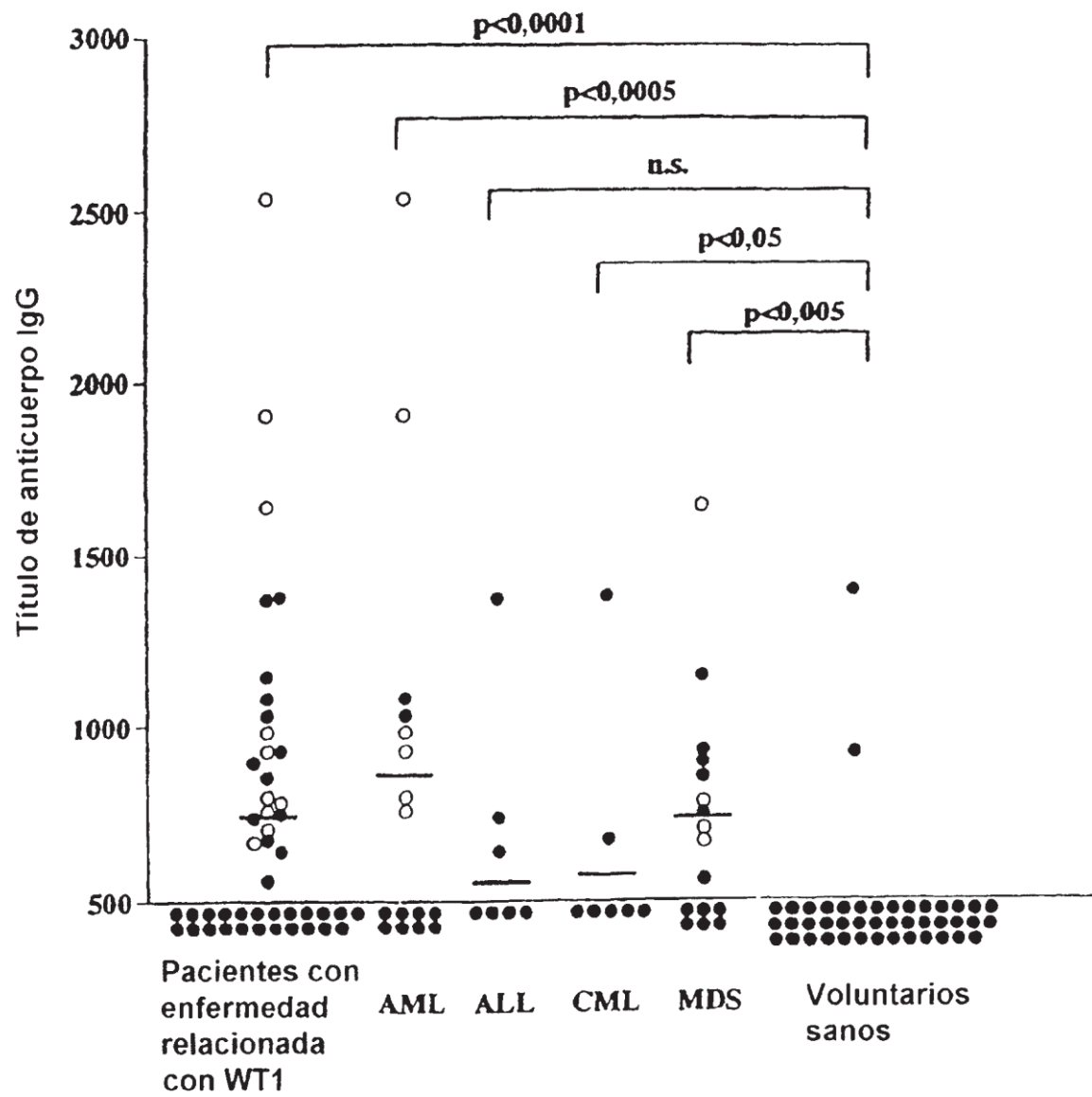


Fig. 10

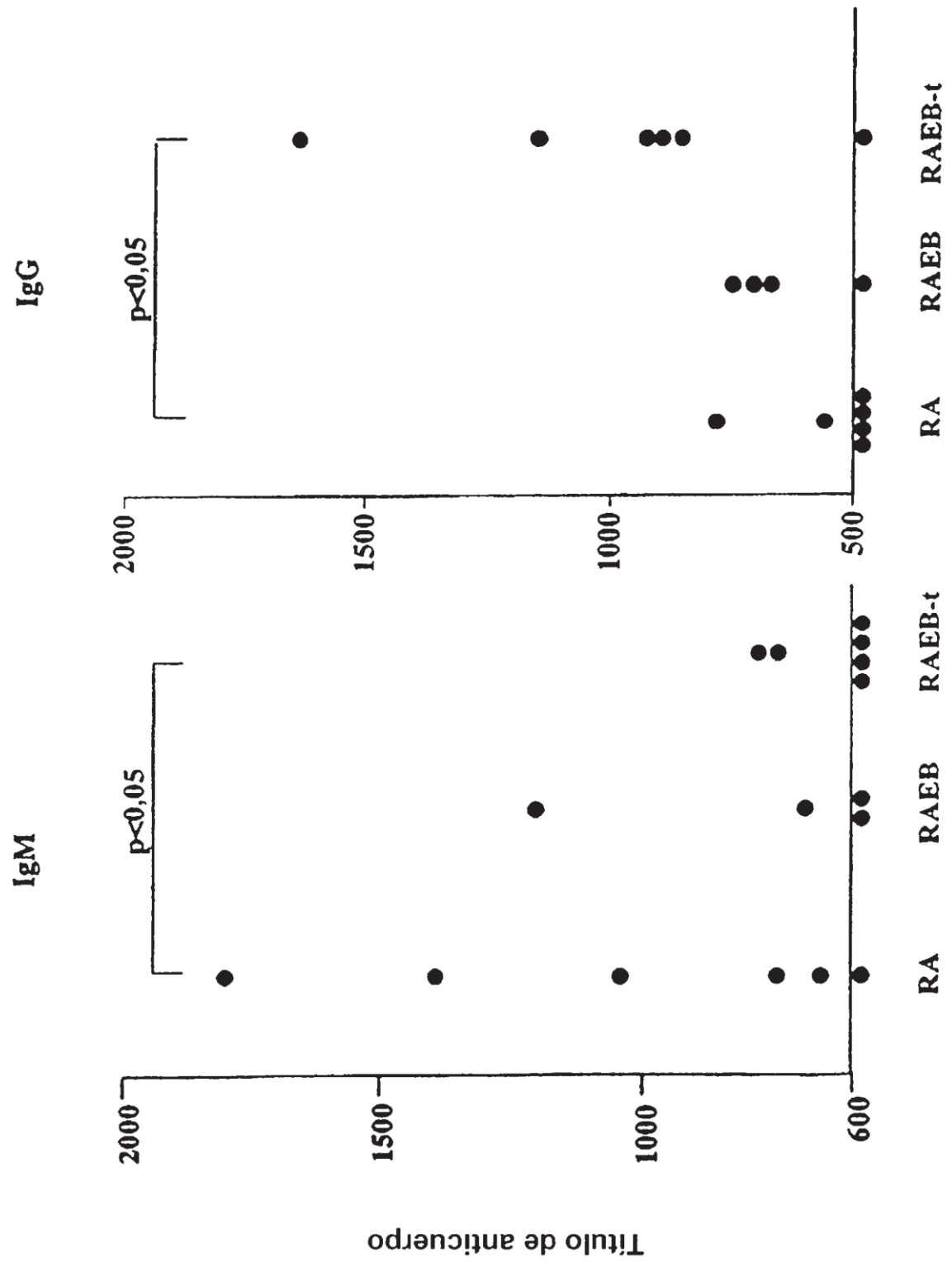


Fig. 11

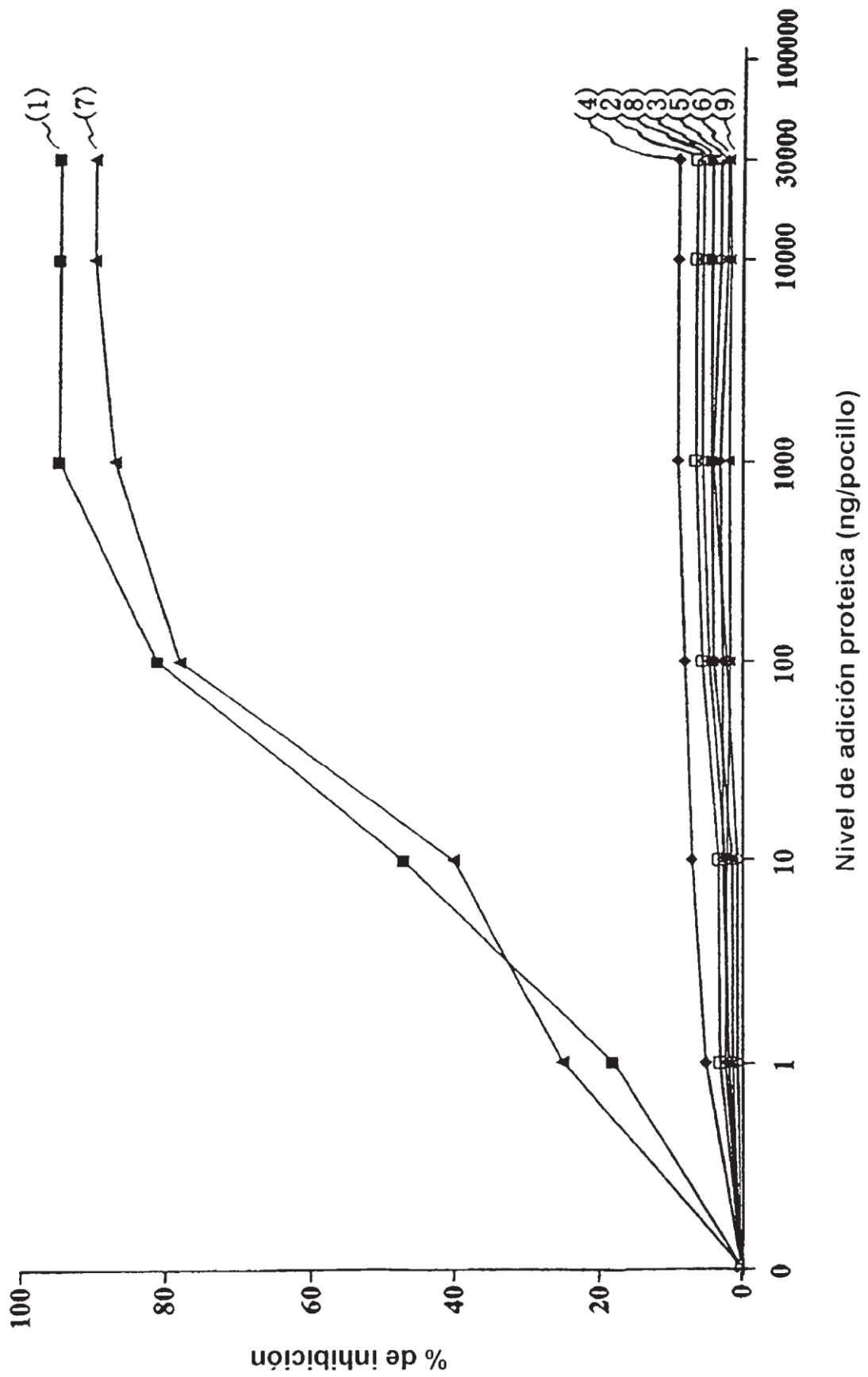


Fig. 12

