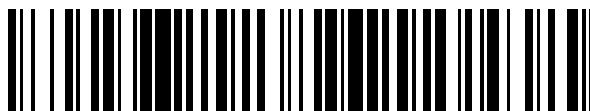


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 478 446**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004** **E 11154327 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014** **EP 2338509**

54 Título: **Método de selección de pacientes candidatos para la vacuna contra WT1**

30 Prioridad:

27.06.2003 JP 2003184436

12.03.2004 JP 2004070497

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.07.2014

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL INSTITUTE OF CANCER
IMMUNOLOGY, INC. (100.0%)**

**13-9, Enoki-cho, Suita-shi
Osaka-fu, Osaka, JP**

72 Inventor/es:

SUGIYAMA, HARUO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 478 446 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 de selección de pacientes candidatos para la vacuna contra WT1**5 Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método de selección de pacientes altamente sensibles a la vacuna contra WT1. Más concretamente, la presente invención se refiere a un método de selección de pacientes altamente sensibles a la vacuna contra WT1 sobre la base de la frecuencia de precursores de CTL específicos de WT1 como

10 indicador, y similares.

Técnica anterior

El gen WT1 (gen del tumor de Wilms 1) se ha identificado como uno de los genes causantes del tumor de Wilms que es un tumor renal infantil (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 la proliferación, la diferenciación y la apoptosis de las células, y el desarrollo de los tejidos (Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998). El gen WT1 fue definido originalmente como un gen supresor de tumores. Sin embargo, estudios posteriores revelaron que el gen WT1 está altamente expresado en la leucemia y varios cánceres sólidos, incluyendo cáncer de pulmón y cáncer de mama, e indicando, de ese modo, que el gen WT1 ejerce más bien una función oncogénica que promueve el crecimiento del cáncer. Además, se demostró que la estimulación in vitro de células mononucleares de sangre periférica, células que son positivas para HLA-A*0201 o HLA-A*2402, con péptidos derivados de WT1 induce la formación de los linfocitos T citotóxicos específicos de péptido (CTL), y los CTL destruyen las células de leucemia o de tumores sólidos que expresan endógenamente WT1. Estos resultados demostraron que WT1 es una molécula diana prometedora en la inmunoterapia del cáncer (Int. J. Hematol 76: 127, 2002).

Se conocen métodos para la determinación de CTL específicos de péptidos antigénicos in vitro, incluyendo el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA y el método del tetrámero de HLA (Science 274: 94, 1996), el método del pentámero de HLA y el método ELISPOT (J. Immunol. Methods 110: 29, 1988), la técnica de RT-PCR en tiempo real (J. Immunol. Methods 210: 195, 1997), el método de dilución limitante (Br. J. Cancer 77: 1907, 1998), y similares. El tetrámero de HLA se prepara biotinilando un complejo (monómero de HLA) formado por asociación de la α -cadena de HLA y microglobulina β 2 con un péptido, y permitiendo que el monómero se una a avidina marcada con fluorescencia para la tetramerización. Las frecuencias de los CTL se pueden medir por tinción de CTL específicos del péptido con tetrámeros de HLA y análisis mediante citometría de flujo. La medición de frecuencias de CTL por el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA y el método del pentámero de HLA se puede llevar a cabo basándose en el mismo principio.

Los CTL no estimulados con vacunas se conocen como "células precursoras de CTL". Se considera que cuanto mayor es la frecuencia de existencia de células precursoras de CTL específicas para un antígeno canceroso dado, más eficazmente se pueden inducir los CTL específicos, cuando dicho antígeno se administra como una vacuna contra el cáncer, que hace que sea más fácil alcanzar la respuesta clínica de la terapia de vacuna contra el cáncer. En otras palabras, si se selecciona un paciente que muestra una alta frecuencia de existencia en relación con las células precursoras de CTL específicas para un antígeno canceroso dado antes de la vacunación, sería posible un tratamiento más eficazmente mediante el uso de dicho antígeno canceroso.

La frecuencia de las células precursoras de CTL se midió utilizando tetrámeros de HLA y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con melanoma y se refirió en varias publicaciones; sin embargo, éstas muestran que la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas para el 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 células precursoras de CTL específicas para el antígeno es generalmente baja y que es difícil seleccionar los pacientes adecuados para una vacuna contra el cáncer sobre la base de la frecuencia de células precursoras de CTL como indicador.

Tsuboi et al., 2002 (Cancer Immunol Immunother. 51, 614-620) describen un epítipo de unión a HLA-A2 inmunogénico de WT1 y la inducción de CTL específicos después de la exposición al mismo.

Oka et al., 2002 (Curr Canc Drug Target, 2, 45-54) describen la generación de CTL específicos de WT1 y el rechazo de las células tumorales que expresan WT1 por medio de la vacunación contra WT1. Los autores también describen un péptido derivado de WT1 inmunogénico, esto es Db126.

Oka et al., 2000 (3 Immunol, 164, 1873-1880) describen la inducción de CTL específicos de WT1 en ratones después de la administración de péptidos WT1 y la posterior protección en estos ratones sensibilizados tumorales. Los autores llegaron a la conclusión de que los precursores de CTL responsables de los péptidos WT1 estaban presentes.

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

Maeda et al., 2002 (Brit J Cancer, 87, 796-804) describen un método para el tratamiento con vacunas tumorales que implica la detección de las células precursoras de CTL específicas del péptido en el estado previo a la vacunación. Los autores demuestran que las células precursoras de CTL específicas del péptido son detectables en la mayoría de los pacientes con cáncer, pero el porcentaje de estas células no implica automáticamente que la persona de ensayo padezca cáncer.

Descripción de la invención

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

El propósito de la presente invención es proporcionar un método de selección de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1 sobre la base de la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas de WT1 como indicador, y similares.

El autor de la presente invención preparó un tetrámero de HLA utilizando un péptido antigénico tumoral derivado de WT1, y utilizó el tetrámero resultante en la medición de la frecuencia de células precursoras de CTL en los pacientes con una malignidad hematopoyética o con cáncer de pulmón antes de la administración de la vacuna. Se encontró sorprendentemente que existen células precursoras de CTL (células precursoras de CTL específicas de WT1) con una frecuencia mayor de la que se conocía hasta ahora en comparación con individuos sanos. Este resultado reveló que es posible seleccionar a los pacientes altamente sensibles a la vacuna contra WT1 o identificar una molécula diana de la vacuna contra WT1 sobre la base de la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas de WT1 como un indicador, en lo que respecta a un antígeno tumoral WT1. Asimismo, puesto que los pacientes que tienen diversos tipos de cáncer mostraron una alta frecuencia de células precursoras de CTL específicas de WT1, se hizo evidente que el diagnóstico del cáncer se puede realizar sobre la base de la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas de WT1 como un indicador.

El autor de la presente invención clasificó a continuación las células precursoras de CTL específicas de WT1 finamente con respecto a su función, y se encontró que, en particular, células precursoras de CTL de tipo efector (en adelante, pueden ser referidas simplemente como "células efectoras") existen en mayor proporción entre las células precursoras de CTL. Este resultado indicó que la selección de pacientes altamente sensibles a la vacuna contra WT1 o el diagnóstico de cáncer también se puede llevar a cabo sobre la base de la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas de WT1 de tipo efector como indicador.

Además, el autor de la presente invención midió la frecuencia de CTL específicas de WT1 en pacientes sometidos a tratamiento con un péptido antigénico tumoral ("péptido WT1") derivado de WT1 y encontró que el efecto terapéutico se correlacionaba con el aumento de la frecuencia de CTL después de la administración en relación con el obtenido antes de la administración.

La presente invención se ha establecido sobre la base de las conclusiones anteriores.

Por lo tanto, la presente invención proporciona lo siguiente:

Un método in vitro para determinar la idoneidad de un paciente para la vacuna contra WT1, que comprende las siguientes etapas (a) y (b):

(a) la medición de la frecuencia de existencia o cantidad de CTL específicos de WT1 en una muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna contra WT1; y

(b) decidir si el valor medido de (a) es o no elevado en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de la vacuna contra WT1, y evaluar que el paciente es adecuado para la vacuna contra WT1 cuando el valor medido de (a) es 1,5 veces o mayor en comparación con el de la muestra obtenida antes de la administración.

El uso de un kit que comprende un agente de diagnóstico clínico para determinar la idoneidad de un paciente para la vacuna contra WT1 de acuerdo con dicho método in vitro, cuyo kit comprende como ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA que contienen cada uno un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 y estreptavidina marcada fluorescentemente, anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con fluorescencia o anticuerpo monoclonal anti-CD27 humano de ratón marcado con fluorescencia.

Otras realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

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 y en individuos sanos. El eje vertical indica la frecuencia de precursores de CTL (células precursoras). El "cáncer de la sangre", muestra los resultados obtenidos a partir de pacientes positivos para HLA-A2402 que tienen un tumor maligno hematopoyético. El término "cáncer de pulmón", muestra los resultados obtenidos a partir de pacientes positivos para HLA-A2402 que tienen cáncer de pulmón, y el término "sano" los resultados obtenidos a partir de individuos sanos positivos para HLA-A2402.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona un método in vitro para determinar la idoneidad de un paciente para la vacuna contra WT1,

que comprende las siguientes etapas (a) y (b):

- (a) medir la frecuencia de existencia o cantidad de CTL específicas para WT1 en una muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna contra WT1; y
- (b) decidir si el valor medido de (a) es o no elevado en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de la vacuna contra WT1, y evaluar que el paciente es adecuado para la vacuna contra WT1 cuando el valor medido de (a) es 1,5 veces o mayor en comparación con el de la muestra obtenida antes de la administración.

El autor de la presente invención ha encontrado que existen células precursoras de CTL (células precursoras de CTL específicas de WT1) en un paciente antes de la administración de la vacuna con una frecuencia más elevada que la conocida hasta ahora. En consecuencia, los pacientes altamente sensibles a la vacuna contra WT1 se pueden seleccionar sobre la base de la cantidad o la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas de WT1 como un indicador.

El sujeto de ensayo en la etapa (a) se refiere a una persona que se sospecha o se ha diagnosticado que tiene cáncer, específicamente, a una persona que se sospecha o se ha diagnosticado que tiene cáncer, incluyendo cánceres de la sangre 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 de útero, cáncer cervical, y cáncer de ovario. El ejemplo preferido es una persona que se sospecha o se ha diagnosticado que tiene leucemia, síndrome mielodisplásico y cáncer de pulmón.

No existen limitaciones en cuanto a la muestra biológica aislada de un sujeto de ensayo en la etapa (a) en la medida en que contenga las células precursoras de CTL. Un ejemplo específico incluye sangre, fluido linfático o culturas de los mismos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de sangre, o tejidos a los que se han infiltrado células T, y similares. La muestra biológica se puede utilizar tal como es, o después de dilución o concentración. El ejemplo preferido son las PBMC, que pueden ser aisladas de una manera convencional tal como el método de centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque.

El método de medición de la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en la etapa (a) se puede llevar a cabo por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por medio de los cuales se pueden medir la frecuencia de existencia o cantidad de CTL. Los ejemplos específicos incluyen el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método del pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real, el método de dilución limitante, y similares.

Según se utiliza en la presente memoria, el método del tetrámero de HLA es un método en el que un CTL específico de un antígeno peptídico se detecta utilizando un tetrámero de HLA preparado mediante biotilación de un monómero de HLA (dicho monómero se ha formado por asociación de una cadena α del antígeno HLA y una microglobulina $\beta 2$ con un péptido antigénico objetivo), y permitiendo que se unen a la avidina marcada fluorescentemente para la tetramerización. Específicamente, la cantidad de CTL se puede determinar por tinción de un CTL específico de un péptido antigénico por dicho tetrámero de HLA y análisis por citometría de flujo. La preparación de un tetrámero de HLA y la detección de los CTL utilizando el mismo son conocidas y se pueden llevar a cabo de acuerdo con un método, por ejemplo, descrito en la bibliografía (Science 274: 94, 1996).

El método del monómero de HLA es un método en el que CTL específicos de un péptido antigénico se detectan utilizando un monómero de HLA empleado en la preparación del tetrámero de HLA, cuyo monómero se forma por asociación de una cadena α del antígeno HLA y una microglobulina $\beta 2$ con un péptido antigénico seguido de biotilación.

El método del dímero de HLA es un método en el que un CTL específico de un péptido antigénico se detecta usando un dímero de HLA que se prepara mediante la fusión de una cadena α del antígeno HLA y una Ig (inmunoglobulina,

por ejemplo, IgG1), y permitiendo que la fusión resultante se una a microglobulina $\beta 2$ y a péptido antigénico (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6671-6675 (1993)). Los CTL específicos del péptido antigénico unido al dímero de HLA se pueden detectar, por ejemplo, permitiendo que el anticuerpo anti-IgG1 marcado se una a IgG1.

El método del pentámero de HLA es un método que se ha desarrollado recientemente, en el que un CTL específico de un péptido antigénico se detecta usando un pentámero en el que cinco moléculas complejas de un antígeno HLA y un péptido antigénico se polimerizan a través del dominio de Bobina en Espiral. Dado que el complejo de antígeno HLA-péptido-antigénico se puede marcar con fluorescencia o similar, el análisis se puede llevar a cabo por medio de citometría de flujo o similar, como en el caso del método del tetrámero de HLA (véase, <http://www.proimmune.co.uk/>).

Los monómeros, dímeros, tetrámeros y pentámeros de HLA están disponibles mediante producción por encargo de un fabricante como Prolimmune o BD Biosciences.

El método ELISPOT es un método en el que se detectan CTL en una muestra biológica mediante la inmovilización de un anticuerpo generado contra una citoquina tal como IFN- γ o GM-CSF en una placa, la adición de una muestra biológica estimulada por un antígeno o péptido antigénico deseado, y la detección de la citoquina secretada a partir de los CTL activados en la muestra biológica y unidos al anticuerpo inmovilizado anterior como una mancha usando un anticuerpo anti-citoquina. El método de determinación de CTL mediante el método ELISPOT es conocido y se puede llevar a cabo de acuerdo con un método descrito en la literatura (p. ej., J. Immunol. Methods 110: 29, 1988).

El método de RT-PCR en tiempo real es un método en el que la frecuencia de CTL reactivos a un antígeno o péptido antigénico objetivo se mide indirectamente a través de la medición de un gen que codifica una citoquina tal como IFN- γ , GM-CSF o similar producido por los CTL activados por medio de RT-PCR. El método de determinación de CTL mediante el método de RT-PCR en tiempo real es conocido y se puede llevar a cabo de acuerdo con un método descrito en la literatura (por ejemplo, J. Immunol. Methods 210: 195, 1997).

El método de dilución limitante es un método en el que se mide la frecuencia de CTL mediante el cultivo en placa de una muestra biológica que contiene CTL en los pocillos a diferentes densidades de células, el cultivo de la placa mientras se estimula con un antígeno o péptido antigénico objetivo, la medición de la cantidad de citoquinas o citotoxicidad producidas por los CTL activados, y la determinación de la frecuencia de CTL sobre la base del número de pocillos positivos. El método de determinación de CTL mediante el método de dilución limitante se conoce y se puede llevar a cabo de acuerdo con un método descrito en la literatura (p. ej., Br. J. Cancer 77: 1907, 1998).

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

La evaluación de la capacidad de respuesta a la vacuna contra WT1 en la etapa (c) se puede llevar a cabo comparando la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en un sujeto de ensayo obtenido en la etapa (b) (en adelante, referido como "valor del sujeto de ensayo"), con la de sujetos sanos (en lo sucesivo, denominado "valor de sujeto sano") y decidiendo la diferencia entre ellos. En este caso, se necesita un material biológico aislado y preparado a partir de un sujeto sano (sangre, fluido linfático, PB1VIC, etc.), que se puede obtener mediante recogida de una muestra biológica de un sujeto que no tiene cáncer. Según se utiliza en la presente memoria, "sujeto sano" significa una persona que no ha sido diagnosticado de cáncer.

La comparación entre los valores del sujetos de ensayo y los valores del sujeto sano se puede llevar a cabo mediante la medición de la muestra biológica de un sujeto de ensayo y la de un sujeto sano en paralelo. Cuando no se lleva a cabo la comparación en paralelo, la comparación también se puede llevar a cabo utilizando un valor medio o un valor estadístico intermedio de los valores del sujeto sano calculados a partir de los valores de sujetos sanos I obtenidos mediante la medición de varias (por lo menos dos, preferiblemente tres o más, más preferiblemente cinco o más) muestras biológicas de un sujeto sano en condiciones constantes cuando no se realiza la medición en paralelo.

La evaluación de si un sujeto de ensayo es o no muy sensible a la vacuna contra WT1 se puede llevar a cabo utilizando como un indicador que el valor del sujeto de ensayo es 1,5 veces o mayor, preferiblemente 2 veces o mayor que el valor del sujeto sano. Es decir, cuando el valor del sujeto de ensayo es 1,5 veces o mayor, preferiblemente, 2 veces o mayor que el valor del sujeto sano, se evalúa que la capacidad de respuesta a la vacuna contra WT1 es alta. Un paciente que se considera que es muy sensible a la vacuna contra WT1 es adecuado para la vacuna contra WT1, en otras palabras, es posible aplicar preferiblemente la terapia de vacuna contra WT1 al paciente.

Entre los métodos de medición de los CTL anteriormente mencionados, el método del tetrámero de HLA es el más preferido desde el punto de vista de la facilidad y la precisión. Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención proporciona un método de selección y tratamiento de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1

caracterizado porque utiliza el método del tetrámero de HLA. Como se mencionó anteriormente, el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, y el método del pentámero de HLA son principalmente el mismo método que el del tetrámero de HLA, y son los métodos preferidos para medir los CTL. Sin embargo, la presente invención se describirá en la presente memoria adoptando como ejemplo el método del tetrámero de HLA.

El método de la descripción para seleccionar y tratar a un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1 mediante el uso del tetrámero de HLA, específicamente, comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):

- (a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL a partir de un sujeto de ensayo;
- (b) poner en contacto un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 con la muestra biológica de (a);
- (c) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas al tetrámero de HLA; y
- (d) decidir si el valor medido de (c) es o no elevado en comparación con el de sujetos sanos, y evaluar la capacidad de respuesta a la vacuna contra WT1.

A este respecto, la "muestra biológica" y el "sujeto de ensayo" de la etapa (a) son los mismos definidos anteriormente.

El "tetrámero de HLA" utilizado en la etapa (b) se refiere a un tetrámero preparado biotinilando un complejo (monómero de HLA) obtenido por asociación de una cadena α del antígeno HLA y una microglobulina $\beta 2$ con un péptido (péptido antigénico), y permitiendo que se una a avidina para la tetramerización (Science 279: 2103-2106 (1998); y Science 274: 94-96 (1996)). El tetrámero de HLA preferentemente se marca con fluorescencia de modo que las células precursoras de CTL puedan ser fácilmente clasificadas o detectadas mediante 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 peridín clorofila (PerCP), alofococianina (APC), ficoeritrina-Rojo Texas (también llamada ECD), y ficoeritrina-cianina 5.1 (también llamada PCS), o similares.

El péptido antigénico canceroso derivado de WT1 utilizado como componente del tetrámero de HLA anteriormente se origina a partir de WT1 humano (Cell, 60: 509, 1990, Número de Acceso de la Base de Datos NCBI XP_034418, SEQ ID NO: 1), y es capaz de formar un complejo con un antígeno HLA y ejercer de este modo la actividad inductora de células T citotóxicas (CTL) restringida a HLA (inmunogenicidad).

Se ha sabido que existen muchos subtipos de moléculas de HLA y que la secuencia de aminoácidos del péptido antigénico tumoral al 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 sabe que en el motivo de unión para HLA-A24, en los péptidos que consisten en 8 - 11 residuos de aminoácidos, el aminoácido de la posición 2 es tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), metionina (Met) o triptófano (Trp), y el aminoácido en el extremo 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).

En cuanto a los motivos de 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	Aminoácido del extremo C
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 la búsqueda de secuencias de péptidos que se espera que sean capaces de unirse a antígenos HLA a través de Internet utilizando el soporte lógico BIMAS; NIH(http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/). También es posible la búsqueda de secuencias de péptidos utilizando el análisis de predicción de la unión a péptidos HLA de BIMAS (J. Immunol., 152 163, 1994). Los ejemplos específicos de los péptidos derivados de WT1 que se han buscado e identificado de esta manera son los que se enumeran en la Tabla II - Tabla XLVI del documento W0 2000/ 18795.

Los péptidos derivados de WT1 anteriormente mencionados se pueden modificar parcialmente por sustitución, delección y/o adición de uno o varios residuos de aminoácidos incluyendo la adición de uno o varios residuos de aminoácido en el extremo N- y/o C-terminal del péptido, preferiblemente, por sustitución de uno o varios residuos de aminoácido. La sustitución se lleva a cabo preferiblemente con un residuo de aminoácido disponible a la vista de los motivos mencionados anteriormente.

Un péptido antigénico canceroso derivado de WT1 se puede seleccionar sometiendo los péptidos derivados de WT1 (incluyendo las variantes) a un análisis conocido para péptidos antigénicos cancerosos, por ejemplo, un método descrito en el documento WO 02/47474 o en el documento Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002).

Los ejemplos específicos de los péptidos antigénicos cancerosos derivados de WT1 incluyen los siguientes péptidos.

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2)
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3)
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4)
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5)
 Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 6)
 Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 7)
 Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 8)
 Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 9)
 Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 10)
 Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 11)
 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (SEQ ID NO: 12)
 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (SEQ ID NO: 13)
 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (SEQ ID NO: 14)
 Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (SEQ ID NO: 15)
 Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 16)
 Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 17)
 Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 18)

En lo anterior, "Abu" se refiere a "ácido α aminoacético.

Entre ellos, los péptidos expuestos en los SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 son los péptidos de unión al antígeno HLA-A24 y al antígeno HLA-A2 y los otros péptidos expuestos en los SEQ ID NO: 3, 5, 6 - 18 son los péptidos de unión al antígeno HLA-A24.

Los péptidos antigénicos cancerosos preferidos se pueden seleccionar entre los expuestos en el SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5 más arriba.

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

La síntesis de un péptido se puede llevar a cabo de acuerdo con los procesos utilizados generalmente en el campo de la química de péptidos. Semejante método se puede encontrar en la literatura, 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.

Asimismo, 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 descritos anteriormente está modificado.

Los péptidos sometidos a dicha modificación también se encuentran dentro del alcance de la presente descripción.

Los ejemplos de un grupo para la modificación del grupo amino del aminoácido N-terminal incluyen de 1 a 3 grupos seleccionados entre un grupo C₁-C₆ o, un grupo fenilo, un grupo cicloalquilo y un grupo acilo, específicamente, un grupo alcanilo C₁-C₆, un grupo alcanilo C₁-C₆ sustituido con un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido con un grupo cicloalquilo C₅-C₇, un grupo alquil(C₁-C₆)sulfonilo, un grupo fenilsulfonilo, un grupo alcoxi(C₂-C₆)carbonilo, un grupo alcocarbonilo sustituido con un grupo fenilo, un grupo carbonilo sustituido con un grupo cicloalcoxi C₅-C₇, y un grupo fenoxicarbonilo, y similares.

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

En cuanto al antígeno HLA (cadena α del antígeno HLA), que es un componente del tetrámero de HLA, se puede utilizar un antígeno HLA de cualquier subtipo; sin embargo, es necesario utilizar un antígeno HLA del mismo subtipo que el del sujeto que va a ser diagnosticado o seleccionado. Los ejemplos del antígeno HLA incluyen HLA-A24 tal como HLA-A*2402, etc; antígeno HLA-A2 tal como HLA-A*0201, -A*0204, -A*0205, -A*0206, etc; antígeno HLA-A26 tal como HLA-A*2601, etc; y HLA-A*3101, HLA-A*3303, HLA-A*1101, y similares. Los ejemplos específicos incluyen el antígeno HLA-A24, el antígeno HLA-A2 y el antígeno HLA-A26. Se conocen las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de estos antígenos HLA. Por ejemplo, las secuencias del antígeno HLA-A24 se describen en Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995) y en el Núm. de Acceso Genbank M64740; aquellas para el antígeno HLA-A2 en el Núm. de Acceso Genbank M84379; y aquellas para HLA-A26 en el Núm. de Acceso Genbank D14350. Por consiguiente, una cadena α del antígeno HLA se puede clonar fácilmente sobre la base de la información referente a estas secuencias de bases conocidas de una manera convencional, tal como PCR.

La cadena α de dicho antígeno HLA es preferiblemente un fragmento en forma soluble para facilitar la unión y la selección de CTL. Se prefiere además que el extremo C de la cadena α de dicho antígeno HLA tenga una estructura viable para la biotinylation que permita la tetramerización mediante la unión biotina-avidina, es decir, se le haya añadido una porción de unión a biotina.

Específicamente, en el caso de HLA-A2402 (una clase de HLA-A24), se prepara el ADNc para una cadena α de HLA-A*2402 soluble recombinante que está diseñado para permitir que el residuo de lisina específico de la etiqueta C-terminal sea biotinilado por la enzima BirA mediante reacción de PCR utilizando como molde, un plásmido de expresión de HLA-A*2402 (Núm. de Acc. GenBank M64740) y, como cebador directo:

5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTCTACCTCCGT-3' (SEQ ID NO: 19); y, como cebador inverso:
5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGGCAGACCC3'C-3' (SEQ ID NO: 20).

En cuanto a la microglobulina $\beta 2$, que es un componente del tetrámero de HLA, se prefiere la microglobulina $\beta 2$ humana. El ADNc para dicha microglobulina $\beta 2$ humana se puede preparar por reacción de PCR utilizando, como molde, un plásmido de expresión de microglobulina $\beta 2$ humana (Núm. de Acc. GenBank ABO21288) y, como cebador directo:

5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAAATTTCAG-3' (SEQ ID NO: 21); y, como cebador inverso:
5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3' (SEQ ID NO: 22).

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

El proceso para la preparación de tetrámeros de HLA que comprenden esos componentes para un tetrámero de HLA es bien conocido como se describe en la literatura (Science 279: 2103-2106 (1998), Science 274: 94-96 (1996), etc. La preparación se describirá a continuación brevemente.

En primer lugar, se transforman células anfitrionas apropiadas tales como E. coli o células de mamífero capaces de expresar una proteína con un vector de expresión de la cadena α de HLA y un vector de expresión de microglobulina $\beta 2$, y se permite que se expresen. Preferiblemente aquí se utiliza E. coli (por ejemplo, BL21). El complejo resultante de monómero de HLA y péptido antigénico (péptido antigénico canceroso derivado de WT1) se mezclan a continuación para formar un complejo soluble de HLA-péptido. La secuencia C-terminal de la cadena α de HLA del complejo de HLA-péptido resultante se biotinila con la enzima BirA. Cuando se mezclan un complejo de HLA-péptido biotinilado y una avidina marcada con fluorescencia a una razón molar de 4:1, se forma un tetrámero de HLA. Se prefiere purificar la proteína resultante mediante filtración en gel o similar en cada etapa anterior.

La etapa (b) anterior se lleva a cabo poniendo en contacto un tetrámero de HLA preparado como se mencionó anteriormente 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 de fosfato que contiene suero (PBS).

Se prefiere preparar un control negativo llevando a cabo los mismos procedimientos en paralelo utilizando estreptavidina marcada con fluorescencia en lugar de tetrámero de HLA.

En la etapa (c) después de la etapa (b), se mide la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas a un tetrámero de HLA. La medición se puede llevar 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 se marcan con fluoresceína. Los CTL marcados de este

modo se pueden detectar o aislados por medio de citometría de flujo o microscopía de fluorescencia.

La frecuencia de existencia de células precursoras de CTL específicas de WT1 unidas al tetrámero de HLA se puede obtener mediante, por ejemplo, la medición de la proporción (frecuencia) de las células unidas al tetrámero de HLA entre las células positivas para CD8 (células precursoras de CTL positivas para CD8) o las células positivas para CD8/CD3 (células precursoras de CTL positivas para CD8/CD3).

Las células positivas para CD8 se pueden marcar y detectar utilizando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con fluorescencia. Las células positivas para CD3 se pueden marcar y detectar utilizando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con fluorescencia.

El pigmento fluorescente utilizado aquí debe ser diferente del utilizado en el tetrámero de HLA. Es decir, se deben utilizar pigmentos fluorescentes distintos el uno del otro, por ejemplo, cuando se utiliza tetrámero de HLA marcado con PE, son utilizables el anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC y el anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con PerCP.

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

células precursoras de CTL específicas del péptido antigénico de WT1 (%) = 100 x

{[(células CD8⁺tetrámero⁺)/(células CD8⁺)] - [(células CD8⁺avidina⁺)/(células CD8⁺)]}

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

células precursoras de CTL específicas del péptido antigénico de WT1 (%) = 100 x

{[(células CD3⁺CD8⁺tetrámero⁺)/(células CD3⁺CD8⁺)] -

[(células CD3⁺CD8⁺avidina⁺)/(células CD3⁺CD8⁺)]}

La capacidad de respuesta a la vacuna contra WT1 se evalúa sobre la base de los resultados obtenidos por medio de la medición anterior. Específicamente, se puede llevar a cabo mediante la comparación de la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en un sujeto de ensayo obtenida en la etapa (b) (en lo sucesivo, referido como "valor del sujeto de ensayo") con la de un sujetos sano (en lo sucesivo, referido como "valor del sujeto sano"), y decidir la diferencia entre ellas. En este caso, se necesita un material biológico aislado y preparado a partir de un sujeto sano (sangre, líquido linfático, PBMC, etc.), que se puede obtener recogiendo una muestra biológica de un sujeto que no tiene cáncer. Según se utiliza en la presente memoria, "sujeto sano" significa una persona que no se ha diagnosticado que tenga cáncer.

La comparación entre los valores del sujeto de ensayo y los valores del sujeto sano se puede llevar a cabo mediante la medición de la muestra biológica de un sujeto de ensayo y de un sujeto sano en paralelo. Cuando no se lleva a cabo la comparación en paralelo, la comparación también puede llevarse a cabo utilizando un valor medio o un valor estadístico intermedio de los valores del sujeto sano calculados a partir de los valores del sujeto sano obtenidos mediante la medición de varias (por lo menos dos, preferiblemente tres o más, más preferiblemente cinco o más) muestras biológicas de un sujeto sano bajo condiciones constantes cuando no se realiza la medición en paralelo.

La evaluación de si un sujeto de ensayo es muy sensible o no a la vacuna contra WT1 se puede llevar a cabo utilizando como un indicador el que el valor del sujeto de ensayo sea 1,5 veces o mayor, preferiblemente 2 veces o mayor en comparación con el valor del sujeto sano. Es decir, cuando el valor del sujeto de ensayo es 1,5 veces o mayor, preferiblemente, 2 veces o mayor que el valor del sujeto sano, se consideró que la capacidad de respuesta a

la vacuna contra WT1 era alta. Se considera que un paciente que se había considerado que era muy sensible a la vacuna contra WT1 es adecuado para la vacuna contra WT1, en otras palabras, es posible aplicar la terapia de vacuna contra WT1 al paciente preferiblemente.

- 5 El método de selección de los pacientes descrito anteriormente también se puede utilizar no sólo en la evaluación de los pacientes antes de la administración de la vacuna, sino también en el diagnóstico o la confirmación de la eficacia después de la administración de la vacuna.

10 La presente descripción también proporciona un método de selección de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1, que comprende las siguientes etapas (a), (b), y (c):

- (a) aislar una muestra biológica que contiene las 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 de tipo efector en la muestra biológica de (a); y
 15 (c) decidir si el valor medido de (B) es alto o no en comparación con el de sujetos sanos, y evaluar la capacidad de respuesta a la vacuna contra WT1, y
 un método para tratar el cáncer en el paciente seleccionado por medio de dicho método.

20 El autor de la presente invención clasificó células precursoras de CTL específicas de WT1 finamente con respecto a la función, y encontró que, en particular, existen las células precursoras de CTL de tipo efector en mayor proporción en comparación con los individuos sanos. Por lo tanto, se pueden seleccionar los pacientes altamente sensibles a la vacuna contra WT1 sobre la base de la cantidad o la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas de WT1 de tipo efector como indicador. El método de selección que utiliza las células precursoras de CTL de tipo efector como indicador puede ser útil para llevar a cabo análisis más detallados, cuando no hay/hay pocas
 25 diferencias entre los valores de un sujeto de ensayo y los de un sujeto sano cuando se miden por medio del método de selección que utiliza la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL como indicador.

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

- 30 (a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un sujeto de ensayo;
 (b) 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 la muestra biológica de (a);
 (c) medir la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 de tipo efector entre las células precursoras de CTL que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivas para la unión al
 35 tetrámero de HLA; y
 (d) decidir si el valor medido de (c) es alto o no en comparación con el de sujetos sanos, y evaluar la capacidad de respuesta a la vacuna contra WT1, y

un método de tratamiento del cáncer en el paciente seleccionado por medio de dicho método.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "célula efectora" significa células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27. La frecuencia de dichas células efectoras se puede obtener mediante la medición de la proporción de células precursoras de CTL positivas para CD45RA y negativas para CD27 entre las células precursoras de CTL. Específicamente, se puede llevar a cabo poniendo una muestra de ensayo en contacto
 45 con un tetrámero de HLA, un anticuerpo anti-CD8, un anticuerpo anti-CD45RA y un anticuerpo anti-CD27; y midiendo la proporción de células positivas para CD45RA y negativas para CD27 entre las células precursoras de CTL (células precursoras de CTL específicas de WT1) que son positivas para CD8 o CD8/CD3 y positivas para la unión al tetrámero de HLA.

50 Las células positivas para CD45RAs se pueden marcar y detectar utilizando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con fluorescencia. Las células positivas para CD27 se pueden marcar y detectar utilizando, por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD27 humano de ratón marcado con fluorescencia. El pigmento fluorescente utilizado en la presente memoria debe ser diferente del utilizado en el tetrámero de HLA, el anticuerpo anti-CD8 o el anticuerpo anti-CD3. Es decir, se deben utilizar pigmentos fluorescentes distintos entre sí,
 55 por ejemplo, cuando se utilizan tetrámero de HLA marcado con PE, anticuerpo monoclonal anti-CD8 marcado con FITC y anticuerpo monoclonal anti-CD3 marcado con Per, son utilizables anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con ECD y anticuerpo monoclonal anti-CD27 humano de ratón marcado con PC5. Estos anticuerpos marcados se pueden adquirir de Beckman Coulter, y similares.

60 El proceso concreto para la medición de las células precursoras o similares se puede llevar a cabo de una manera similar al método de selección descrito anteriormente en donde la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL se utilizan como un indicador.

El método de selección de pacientes altamente sensibles a la vacuna contra WT1 como se ha descrito anteriormente

también es aplicable al diagnóstico de cáncer. Es decir, el autor de la presente invención encontró que la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas de WT1 es mayor en los pacientes de tumor maligno hematopoyético o de cáncer de pulmón en comparación con individuos sanos. Por lo tanto, es posible diagnosticar el cáncer usando la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas de WT1 o de las células precursoras de CTL específicas de WT1 de tipo efector como indicador. Los ejemplos de cáncer que puede ser diagnosticar incluyen 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, vejiga cáncer, cáncer de próstata, cáncer de útero, cáncer cervical, y cáncer de ovario, los ejemplos preferidos son la leucemia, el síndrome mielodisplásico y el cáncer de pulmón.

La presente descripción, también proporciona un método de identificación de una molécula diana de la vacuna contra WT1 siendo dicha molécula peculiar para un paciente, que comprende las siguientes etapas (a), (b), (c) y (d):

- (a) aislar una muestra biológica que contiene las células precursoras de CTL de un paciente de ensayo;
- (b) aplicar cada una de una pluralidad de moléculas diana de la vacuna contra WT1 a la muestra biológica de (a);
- (c) medir la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 en las respectivas muestras biológicas de (b) y comparar los resultados entre sí; y
- (d) identificar una molécula diana de la vacuna contra WT1 eficaz para el paciente de ensayo sobre la base de los resultados obtenidos en (c).

El autor de la presente invención ha encontrado que existen células precursoras de CTL específicas de WT1 en un paciente antes de la administración de la vacuna con una frecuencia mayor que la conocida hasta ahora. Por lo tanto, es posible identificar una molécula diana (molécula diana para uso terapéutico) de la vacuna contra WT1, siendo dicha molécula peculiar para un paciente sobre la base de la cantidad o la frecuencia de las células precursoras de CTL específicas de WT1 como indicador.

Es decir, el método de identificación anterior se puede utilizar eficazmente para identificar la molécula diana más adecuada (péptido antigénico) para el tratamiento de un paciente que se ha considerado que es altamente sensible a la vacuna contra WT1.

Específicamente, la identificación se puede llevar a cabo, de manera similar al método de selección de pacientes altamente sensibles a la vacuna contra WT1, mediante la medición de la frecuencia de existencia o cantidad de células precursoras de CTL específicas de WT1 mediante el método de monómero de HLA, el método de dímero de HLA, el método tetrámero de HLA, el método del pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real o el método de dilución limitante. Preferiblemente, se utiliza el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, método del tetrámero de HLA o el método del pentámero de HLA. El método de identificación se describirá a continuación tomando como ejemplo concretamente el método del tetrámero de HLA.

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

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

Específicamente, se preparan tetrámeros de HLA plurales que contienen cada uno un péptido antigénico canceroso derivado de WT1 como candidato. A continuación, 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 a partir de los respectivos tetrámeros de HLA se comparan y se identifica un péptido antigénico canceroso incluido en el tetrámero de HLA que muestra el valor más alto, que es un péptido antigénico canceroso que es reconocido más fácilmente por los CTL, como la molécula diana para la terapia de vacuna contra WT1 para el paciente, es decir, la molécula diana peculiar para el paciente.

Se puede utilizar cualquier péptido antigénico canceroso con tal que derive de WT1, y los ejemplos incluyen los péptidos antigénicos cancerosos mostrados en el SEQ ID NO: 2 a 18. El péptido antigénico canceroso preferido es el que se muestra en una cualquiera de los SEC ID NO: 2 - 5.

El procedimiento concreto de las respectivas etapas o del método de preparación para cada componente se puede encontrar en la sección anterior con respecto a un método de selección de un paciente muy sensible a la vacuna

contra WT1.

De acuerdo con el presente método de identificación de una molécula diana de la vacuna contra WT1, es posible identificar una molécula diana capaz de tratar el cáncer peculiar para un paciente. Por lo tanto, en una realización diferente, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica para tratar cáncer en un paciente dado, que comprende una molécula diana identificada por medio del método de identificación de una (molécula diana de la vacuna contra WT1, siendo dicha molécula peculiar para el paciente; y un método de tratamiento del cáncer peculiar para un paciente, que comprende administrar al paciente la molécula diana identificada por medio del método de identificación. La composición farmacéutica de la presente divulgación comprende la vacuna contra el cáncer, y puede contener un coadyuvante y similares, que son conocidos en la técnica.

La presente descripción proporciona adicionalmente un agente de diagnóstico clínico para la selección de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1, que comprende como ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetramero de HLA o un pentámero de HLA, conteniendo cada uno un péptido antigénico tumoral derivado de WT1. El agente de diagnóstico clínico de la presente descripción se describirá a continuación tomando como ejemplo el tetramero de HLA.

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

En la presente memoria se puede utilizar cualquier péptido antigénico canceroso con tal que derive de WT1, y los ejemplos incluyen los péptidos antigénicos cancerosos mostrados en el SEQ ID NO: 2 a 18. El péptido antigénico canceroso preferido es el que se muestra en una cualquiera de los SEQ ID NO: 2 - 5.

El procedimiento de las respectivas etapas o del método de preparación para cada componente se puede encontrar en la sección anterior con respecto al método de selección de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1.

El agente de diagnóstico clínico de la presente descripción puede ser un componente de un kit para la selección de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1. El kit puede ser el que se compone de un agente de diagnóstico clínico solo de la presente descripción o el que se compone de un agente de diagnóstico clínico de la presente descripción y otro u otros ingredientes. Los ejemplos de los otros ingredientes en el kit incluyen estreptavidina 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 las 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.

Los ejemplos del pigmento fluorescente incluyen ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína de peridinin clorofila (PerCP), alofocianina (APC), ficoeritrina-Rojo Texas (también denominada ECD), y ficoeritrinacianina 5.1 (también denominada PC5), y similares.

El agente de diagnóstico clínico y un kit de la presente descripción se pueden utilizar en la selección no solo de un muy sensible a la vacuna contra WT1 sino también una molécula diana de la vacuna contra WT1 (molécula diana para el tratamiento). Además, el agente se puede utilizar como un agente de diagnóstico para el cáncer sin cambiar los componentes.

La presente invención proporciona un método de determinación de la idoneidad de un paciente para la vacuna contra WT1, que comprende las siguientes etapas (a), y (b):

(a) medir de la frecuencia de existencia o cantidad de los CTL específicos de WT1 en una muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna contra WT1; y

(b) decidir si el valor medido de (a) es alto o no en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de la vacuna contra WT1, y evaluar que el paciente es adecuado para la vacuna contra WT1 cuando el valor medido de (a) es 1,5 veces o mayor en comparación con el de la muestra obtenida antes de la administración.

Como se describe en los Ejemplos de más abajo, el autor de la presente invención midió la frecuencia de los CTL específicos de WT1 en pacientes sometidos a tratamiento con un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 ("vacuna contra WT1") y encontró que el efecto terapéutico se correlaciona con el aumento de la frecuencia de CTL después de la administración del péptido con respecto a 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 del péptido WT1 es 1,5 veces o mayor en comparación a la de la muestra obtenida antes de la administración se define como

"respuesta inmunológica positiva", y se investigó la relación entre la inmunosensibilidad y el efecto terapéutico. Como resultado, se reconoció una correlación positiva entre la inmunosensibilidad y el efecto terapéutico. Este resultado reveló que es posible evaluar si el tratamiento con la vacuna contra WT1 es adecuado para un paciente sujeto sobre la base de la inmunosensibilidad mencionada anteriormente (incremento en la frecuencia o cantidad de los CTL) como indicador.

Por lo tanto, el método de determinación de la presente invención se puede utilizar eficazmente para evaluar la idoneidad del tratamiento para un paciente sometido a terapia de vacuna contra WT1, por ejemplo, la idoneidad de un tratamiento continuo con la administración del péptido.

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

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

Según se utiliza en la presente memoria, "después de la administración de la vacuna" se refiere a cualquier momento (calendario) después de la administración una o más veces de la vacuna contra WT1. Sin embargo, en el caso del programa de dosificación del péptido de dos semanas de intervalo, el momento preferido (calendario) es después de la primera a la quinta administración de la vacuna contra WT1, preferiblemente, después de la primera a tercera administración de la vacuna contra WT1.

La evaluación de si el tratamiento con la vacuna contra WT1 es adecuado o no se puede llevar a cabo utilizando como indicador que el valor después de la administración es de 1,5 veces o mayor en comparación con el valor antes de la administración. Es decir, cuando el valor después de la administración es de 1,5 veces o mayor que el valor antes de la administración, se considera que el tratamiento con la vacuna contra WT1 es adecuado. Sobre la base de estos hallazgos, la presente invención también proporciona un método para tratar cáncer en un paciente, que comprende el tratamiento de un paciente que se ha considerado que es adecuado por medio del método de determinación de la idoneidad de un paciente para la vacuna contra WT1 de la presente invención con WT1 o péptido antigénico tumoral derivado de WT1.

Entre los métodos de medición de los CTL anteriormente mencionados, se prefieren principalmente el método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA y el método del pentámero de HLA desde el punto de vista de facilidad de manipulación y la exactitud. El método de determinación se describe a continuación tomando el método del tetrámero de HLA como un ejemplo.

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

(a) poner un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 en contacto con una muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna contra WT1
(b) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de los CTL específicos de WT1 unidos al tetrámero de HLA; y
(c) decidir si el valor medido de (b) es alto o no en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de la vacuna contra WT1, y evaluar que el paciente es adecuado para la vacuna WT1 cuando el valor medido de (a) es 1,5 veces o mayor en comparación con el de la muestra obtenida antes de la administración.

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

Los ejemplos del péptido antigénico canceroso como un componente de un tetrámero de HLA incluyen: Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2), Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3), Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5). Puesto que todos los péptidos mostrados en los SEQ ID NO: 2 - 5 son péptidos capaces de unirse a HLA-A24, los ejemplos del tetrámero de HLA utilizado en el método anteriormente mencionado para la determinación de la presente invención incluyen tetrámeros de HLA que comprenden uno cualquiera de los péptidos mostrados en los SEC ID NO: 2 - 5 y un antígeno HLA-A24. Además, puesto que los péptidos mostrados en los SEQ ID NO: 2 y 4 también son capaces de unirse al antígeno HLA-A2, también están incluidos los tetrámeros de HLA que comprenden un péptido mostrado en el SEC ID NO: 2 o 4 y un antígeno HLA-A2.

En el método de determinación de la presente invención, se prefiere utilizar un tetramero de HLA que comprende el mismo péptido que el utilizado en el tratamiento o un péptido con el que los CTL muestran reacción cruzada, habiendo sido inducidos dichos CTL por el péptido utilizado en el tratamiento. Por ejemplo, cuando un péptido mostrado en el SEQ ID NO: 3 se utiliza en el tratamiento de un paciente, se utiliza eficazmente un tetramero de HLA que comprende un péptido mostrado en el SEC ID NO: 2 o 3 y un antígeno HLA-A24.

Los procedimientos concretos en las etapas (a) a (b) del método de determinación o de tratamiento de la presente invención se pueden encontrar en la sección anterior sobre el "método de selección de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1". Adicionalmente, la evaluación de la etapa (c) se puede llevar a cabo sobre la base de la comparación de los valores de pre-administración y los valores post-administración como se mencionó anteriormente.

El ejemplo específico del método de determinación o tratamiento de la presente invención se describirá a continuación.

En primer lugar, se recoge sangre de un paciente que tiene cáncer antes de la administración de un péptido antigénico canceroso derivado de WT1, y se separan las PBMC (muestra de pre-administración). A continuación, se recoge sangre del paciente después de tratarlo mediante la administración del péptido, y se separan las PBMC (muestra post-administración). A las respectivas muestras pre- y post-administración se les añaden un tetramero de HLA, y se mide y se calcula la frecuencia de los CTL específicos del péptido de acuerdo con los métodos de análisis que se describen en la sección anterior sobre el "método de selección de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1" y el Ejemplo 3. Cuando la frecuencia de los CTL en la muestra de post-administración es de 1,5 veces o mayor en comparación con la de la muestra pre-administración, se considera que el tratamiento con la vacuna contra WT1 es adecuado (es decir, se espera que la vacuna contra WT1 sea terapéuticamente eficaz).

La presente invención también proporciona el uso de un agente de diagnóstico clínico para determinar la idoneidad para la vacuna contra WT1 que comprende como ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetramero de HLA o un pentámero de HLA que contienen cada uno un péptido antigénico canceroso derivado de WT1, y el uso de un kit que comprende dicho agente de diagnóstico clínico. Los ingredientes de dicho agente de diagnóstico clínico y el kit son los definidos en la sección anterior sobre el "agente de diagnóstico clínico para la selección de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1".

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, pero no está limitada por estos ejemplos en ningún aspecto.

Ejemplo 1

Preparación de células mononucleares de sangre periférica

Después de obtener el consentimiento informado, se recogió sangre de pacientes positivos para HLA-A* 2402 que tienen cáncer e individuos sanos positivos para HLA-A* 2402. Entre los pacientes, los que tenían tumor maligno hematopoyético eran dieciocho compuestos de leucemia mielocítica aguda (LMA) (n = 11), leucemia linfática aguda (LLA) (n = 2), leucemia mielocítica crónica (LMC) (n = 1), y síndrome mielodisplásico (SMD) (n = 4); y los que tenían cáncer de pulmón eran siete. Había diez individuos sanos positivos para HLA-A* 2402.

En cuanto a los pacientes que tenían un tumor maligno hematopoyético, se identificó alta expresión significativa del gen WT1 en el mieloma y en muestras de sangre periférica una vez o más en el momento del diagnóstico o en el curso del tratamiento. En cuanto a los pacientes que tenían cáncer de pulmón, se identificó una expresión significativa elevada del gen WT1 en la biopsia o en las muestras extraídas.

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

Ejemplo 2

Preparación de tetramero de HLA

Se preparó un tetramero que comprendía HLA-A* 2402 marcado con pigmento fluorescente (ficoeritrina; PE) utilizando un péptido de 9 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) que comprendía la secuencia de aminoácidos en la posición 235-243 de la proteína WT1 de acuerdo con el método descrito en Int. J. Cancer: 100, 565-570, 2002.

En primer lugar, se amplificó el ADNc que codificaba HLA-A2402 recombinante mediante PCR utilizando un plásmido de expresión de HLA-A* 2402 (Núm. de Acceso GenBank M64740) como molde y un cebador directo: 5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTCTACCTCCGT-3' (SEQ ID NO: 19); y un cebador inverso: 5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGGCAGACCCTC-3' (SEQ ID NO: 20).

El cebador inverso codifica una secuencia de reconocimiento B irA de manera que los marcos se ajustan al extremo C. Los fragmentos amplificados fueron escindidos por las enzimas de restricción NcoI y BamHI, y se clonaron en vector pET11d (Novagen).

A continuación, el ADNc que codifica microglobulina β 2 humana soluble recombinante se amplificó utilizando un plásmido de expresión de microglobulina β 2 humana (Núm. de Acceso Genbank ABO21288) como molde y un cebador directo:

5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAAATTCAG-3' (SEQ ID NO: 21); y un cebador inverso:

5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3' (SEQ ID NO: 22).

Los fragmentos amplificados fueron escindidos por las enzimas de restricción NdeI y BamHI, y se clonaron en vector pET11a (Novagen).

Se permitió que los dos vectores resultantes se expresaran en E. coli.BL21, y se recuperaron como fracciones insolubles de los cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión respectivos se disolvieron en solución de urea 8M y se diluyeron mediante un tampón de replegamiento. A la dilución se le añadió un péptido (SEQ ID NO: 2) para formar un complejo de HLA-péptido soluble. La secuencia C-terminal del complejo de HLA-péptido se biotiniló con la enzima BirA y el tetrámero de HLA-péptido biotinilado resultante se purificó por medio de la técnica de filtración en gel. El complejo de HLA-péptido biotinilado y avidina marcada con PE (Molecular Probe) se mezclaron a una proporción molar de 4:1 para preparar el tetrámero de HLA.

Ejemplo 3

Análisis de las células precursoras de CTL específicas de WT1 con tetrámero de HLA

Las PBMC congeladas obtenidas en el Ejemplo 1 se descongelaron, e inmediatamente se volvieron a suspender 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. A la suspensión se le añadió una solución de tetrámero (500 μ g/ μ l, 2 μ l) preparada en el Ejemplo 2. La suspensión se incubó a continuación a 37°C durante 30 minutos. Se preparó una muestra para el control negativo tratando de una manera similar excepto que se añadió la estreptavidina marcada con PE (Becton Dickinson) en lugar del tetrámero. Después de sofocar con agua enfriada con hielo, se añadieron anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con FITC (15 μ l, BD Pharmingen) y anticuerpo anti-CD3 humano de ratón marcado con PerCP (15 μ l, BD Pharmingen), y la mezcla se incubó a 4°C durante 30 minutos. Las células teñidas se sometieron a lavado centrífugo con PBS que contenía 0,5% de FCS (2x), y se analizaron mediante un citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson). Se seleccionaron las células positivas para CD3 y CD8 (CD3⁺CD8⁺). La proporción de células precursoras de CTL específicas del péptido antigénico WT1 se calculó restando la proporción de células positivas para estreptavidina marcadas con PE (CD3+CD8+avidina+) en el control negativo de la proporción de células positivas para el tetrámero (CD3+CD8+tetrámero+) en las células CD3+CD8+ seleccionadas, como sigue:

células precursoras de CTL específicas del péptido antigénico de WT1 (%) = 100 x

{[(células CD3⁺CD8⁺tetrámero⁺)/(células CD3⁺CD8⁺)] -

[(células CD3⁺CD8⁺avidina⁺)/(células CD3⁺CD8⁺)]}

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

Tabla 2

Muestra, Núm. de paciente	Frecuencia de precursores de CTL (%)
LMA, paciente Núm. 1	8,26

Muestra, Núm. de paciente	Frecuencia de precursores de CTL (%)
LMA, paciente Núm. 2	8,01
LMA, paciente Núm. 3	5,12
LMA, paciente Núm. 4	3,84
LMA, paciente Núm. 5	4,51
LMA, paciente Núm. 6	3,27
LMA, paciente Núm. 7	2,68
LMA, paciente Núm. 8	2,60
LMA, paciente Núm. 9	1,77
LMA, paciente Núm. 10	1,04
LMA, paciente Núm. 11	1,49
LLA, paciente Núm. 1	7,32
LLA, paciente Núm. 2	1,78
LMC, paciente 1	2,46
SMD, paciente 1	29,45
SMD, paciente 2	2,99
SMD, paciente 3	2,81
SMD, paciente 4	2,08
cáncer de pulmón. paciente 1	5,97
cáncer de pulmón. paciente 2	3,83
cáncer de pulmón. paciente 3	2,63
cáncer de pulmón. paciente 4	1,89
cáncer de pulmón. paciente 5	1,69
cáncer de pulmón. paciente 6	0,72
cáncer de pulmón. paciente 7	0,33
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
LMA: leucemia mieloide aguda LLA: leucemia linfática aguda LMC: leucemia mieloide crónica SMD: síndrome mielodisplásico	

Ejemplo 4

Análisis de la frecuencia de CTL específicos de WT1 después de la administración del péptido

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

Se administró un péptido que comprendía la secuencia de aminoácidos en la posición 235-243 de WT1 (SEQ ID NO: 2) o su variante que comprendía el SEC ID NO: 3 en donde la metionina en la posición 2 del SEC ID NO: 2 se reemplaza por tirosina a pacientes con cáncer a 0,3 mg, 1 mg o 3 mg por organismo. El péptido se emulsionó con Montanide ISA51 (Seppic), y la emulsión resultante se inyectó por vía intradérmica una vez o varias veces a intervalos de 2 semanas. Los pacientes sujeto sufrían de cáncer de pulmón positivo para HLA-A*2402 y positivo para WT1, cáncer de mama o leucemia.

La respuesta inmunitaria al péptido administrado se evaluó sobre la base de la frecuencia de CTL medida por el método de tetrámero de HLA de un modo similar al Ejemplo 3. Cuando la frecuencia de los CTL específicos del péptido en cualquier etapa después de la administración de péptido aumentó 1,5 veces o más en comparación con la obtenida antes de la administración del péptido, se consideró que era una "respuesta inmunitaria positiva". Adicionalmente, cuando los valores de los marcadores tumorales, el número de células tumorales o el volumen de tumor disminuyeron, se consideró que era "terapéuticamente eficaz". La correlación entre la respuesta inmunitaria y el efecto terapéutico se evaluó mediante la prueba de la chi cuadrado en pacientes con cáncer (n = 19) que habían sido evaluados para determinar la respuesta inmunitaria a y el efecto terapéutico de la administración del péptido. Como resultado, ocho (73%) de once pacientes que fueron positivos en cuanto al efecto terapéutico mostraron una respuesta inmunitaria positiva, mientras que solo dos (25%) de ocho pacientes que fueron negativos en cuanto al efecto terapéutico mostraron respuesta inmunitaria positiva, lo que indica que el efecto terapéutico y la respuesta inmunitaria se correlacionan positivamente (P = 0,0397). Estos resultados indican que la inducción de CTL específicos del péptido administrado es un factor importante para el efecto terapéutico. Además, se puede utilizar la inmunosensibilidad anterior como un indicador para la conformación de una evolución favorable de tratamiento con la administración del péptido o la decisión de si el tratamiento mediante la administración de péptido debe continuar o no.

Ejemplo 5

Análisis de la función de los CTL específicos de WT1

Se ha informado de que los CTL específicos del péptido antigénico positivos para la tinción del tetrámero de HLA y CD8 se pueden ordenar adicionalmente finamente por medio de la tinción con anticuerpo anti-CD45RA y anticuerpo anti-CD27 (J. Exp. Med., 186, pág. 1407, 1997). Las células positivas para CD45RA y positivas para CD27 se clasifican en células de tipo no sometido a tratamiento previo; las células negativas para CD45RA y positivas para CD27, y negativas para CD45RA y positivas para CD27 en tipo de memoria; y las células positivas para CD45RA y negativas para CD27 en el tipo de efector. Las células de tipo efector representan poblaciones de células con la actividad de CTL más fuerte.

Las PBMC se recogieron antes de la administración del péptido de pacientes con cáncer positivos para HLA-A*2402 (n = 24; 14 tipos de cáncer de sangre, 10 cánceres sólidos) que fueron evaluados mediante la investigación clínica en el Ejemplo 4 e individuos sanos positivos para HLA-A*2402 después la obtención del consentimiento informado. Se utilizaron PIVIBC en el análisis de la función de los precursores de CTL específicos del péptido WT1 que son positivos para la tinción de tetrámero de HLA y CD8. Para el análisis mediante citometría de flujo, las células se tiñeron en una manera similar a la del Ejemplo 3 con el tetrámero de HLA, el anticuerpo anti-CD8, el anticuerpo anti-CD45RA, y el anticuerpo anti-CD27. Se calculó la proporción de células que pertenecían al tipo no sometido a tratamiento previo positivas para CD45RA/positivas para CD27, de tipo de memoria negativas para CD45RA o de tipo efector positivas para CD45RA/negativas para CD27 en poblaciones de células positivas para el tetrámero de HLA y positivas para CD8. Las proporciones de las células de tipo no sometido a tratamiento previo, de tipo memoria y de 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 los pacientes con cáncer y los 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 hay diferencias significativas entre los pacientes con cáncer y los individuos sanos con respecto a la proporción de las células de tipo no sometido a tratamiento previo y de tipo memoria. En el Ejemplo 3, los pacientes de cáncer mostraron aumento de las células precursoras de CTL específicas de WT1, y, ahora se revela que los pacientes de cáncer muestran un aumento de la proporción de CTL que tienen la función de tipo efector entre los CTL. Estos resultados demostraron que los pacientes de cáncer se pueden diagnosticar sobre la base de la frecuencia de existencia de células precursoras de CTL de tipo efector.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente descripción, se proporcionan un método de selección de un paciente muy sensible a la vacuna contra WT1 sobre la base de la frecuencia de existencia de células precursoras de CTL específicas de WT1

como indicador, un método de tratamiento del cáncer que lo utiliza, y agentes de diagnóstico clínico para la selección, y similares. De acuerdo con el método de selección de la presente invención, se puede seleccionar un paciente que se espera que sea sensible a la terapia de vacuna de WIT1, que hace posible tratar el cáncer más apropiadamente.

5

LISTA DE SECUENCIAS

[0135]

<110> Haruo, Sugiyama

10 <120> Método de selección de los pacientes idóneos para la vacuna contra WT1

<130> 664 590

<140> PCT/JP2004/009378

<141> 2004-06-25

<150> JP 2003-184436

15 <151> 2003-06-27

<150> JP 2004-070497

<151> 2004-03-12

<160> 22

<170> PatentIn Ver.2.1

20 <210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro

1

5

10

15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala

20

25

30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr

25

35

40

45

ES 2 478 446 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser
245 250 255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu
260 265 270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile
275 280 285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro
290 295 300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys
305 310 315 320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys
325 330 335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro
340 345 350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp
355 360 365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln
370 375 380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr
385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys
405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala
435 440 445

Leu
<210> 2
5 <211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 2
 Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5
 <210> 3
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 3
 Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 10 1 5
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 4
 Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5
 <210> 5
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 25 <400> 5
 Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 6
 Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5
 35 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 7
 Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5
 <210> 8
 <211> 9
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <223> Xaa en la posición 1 representa Abu.
 50 <400> 8
 Xaa Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5
 <210> 9
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 5 <400> 9
 Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 10
 Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu
 1 5
 15 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 11
 Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5
 <210> 12
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 12
 Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu
 30 1 5
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 13
 Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu
 1 5
 <210> 14
 40 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 45 <400> 14
 Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu
 1 5
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 15

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 16

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe

1 5

10 <210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 17

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe

1 5

<210> 18

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<223> Xaa en la posición 5 representa Abu.

25 <400> 18

Arg Tyr Pro Ser Xaa Gln Lys Lys Phe

1 5

<210> 19

<211> 40

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 19

ccatgggcag ccattctatg cgctatcttt ctacctccgt 40

35 <210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 20

ggatcctggc tccatctca gggtagggg ctgggcaga CCTC 45

<210> 21

<211> 30

45 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 21

50 catatgatcc agcgtacccc gaaaattcag 30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 22

ggatccttac atgtctcgat ccactaac 30

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para determinar la idoneidad de un paciente para la vacuna contra WT1, que comprende las siguientes etapas (a) y (b):
 - (a) medir la frecuencia de existencia o la cantidad de los CTL específicos de WT1 en una muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna contra WT1; y
 - (b) decidir si el valor medido de (a) es alto o no en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de la vacuna contra WT1, y considerar que el paciente es idóneo para la vacuna contra WT1 cuando el valor medido de (a) es 1,5 veces o mayor en comparación con que en la muestra obtenida antes de la administración.
2. El método de determinación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la medición de la frecuencia de existencia o la cantidad de los CTL específicos de WT1 se lleva a cabo por medio de uno cualquiera de método del monómero de HLA, el método del dímero de HLA, el método del tetrámero de HLA, el método del pentámero de HLA, el método ELISPOT, la técnica de RT-PCR en tiempo real y el método de dilución limitante.
3. El método de determinación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la medición se lleva a cabo por medio del método del tetrámero de HLA.
4. El método de determinación de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas (a), (b) y (c):
 - (a) poner un tetrámero de HLA que comprende un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 en contacto con una muestra biológica que contiene los CTL de un paciente después de la administración de la vacuna contra WT1;
 - (b) medir de la frecuencia de existencia o la cantidad de los CTL específicos de WT1 unidos al tetrámero de HLA; y
 - (c) decidir si el valor medido de (b) es alto o no en comparación con el de la muestra biológica obtenida antes de la administración de la vacuna contra WT1 y decidir que el paciente es idóneo para la vacuna contra WT1 cuando el valor medido en (b) es 1,5 veces o mayor que el de antes de la administración de la vacuna contra WT1.
5. El método de determinación de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la etapa (b) en la reivindicación 4 se lleva a cabo midiendo la proporción de células unidas al tetrámero de HLA entre los CTL positivos para CD8 o positivos para CD8/CD3.
6. El método de determinación de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde el antígeno HLA como componente de tetrámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
7. El método de determinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:
 - Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),
 - Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),
 - Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y
 - Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).
8. El método de determinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se lleva a cabo utilizando citometría de flujo.
9. El uso de un kit que comprende un agente de diagnóstico clínico para determinar la idoneidad de un paciente para la vacuna contra WT1 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8", que comprende como ingrediente un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA que contienen cada uno un péptido antigénico tumoral derivado de WT1 y estreptavidina marcada con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD8 humano de ratón marcado con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD3 humano de ratón marcado con fluorescencia, anticuerpo monoclonal anti-CD45RA humano de ratón marcado con fluorescencia o anticuerpo monoclonal anti CD27-humano de ratón marcado con fluorescencia.
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el antígeno HLA como componente de un monómero de HLA, un dímero de HLA, un tetrámero de HLA o un pentámero de HLA es un antígeno HLA-A24 o un antígeno HLA-A2.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde el péptido antigénico tumoral derivado de WT1 se selecciona entre los siguientes péptidos:
 - Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 2),
 - Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (SEQ ID NO: 3),
 - Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (SEQ ID NO: 4) y

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (SEQ ID NO: 5).

FIG. 1

