



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 104**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/12** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C07H 21/04** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61K 38/19** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01909186 .7**

86 Fecha de presentación : **13.02.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1255554**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.11.2002**

54 Título: **Vacuna contra los tumores específicos del riñón dirigida contra el antígeno G-250 del tumor de riñón.**

30 Prioridad: **14.02.2000 US 182429 P**  
**15.02.2000 US 182636 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2007**

73 Titular/es:  
**The Regents of the University of California**  
**12th Floor, 1111 Franklin Street**  
**Oakland, California 94607-5200, US**

72 Inventor/es: **Belldegrun, Arie y**  
**Tso, Cho-Lea**

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 286 104 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**

Vacuna contra los tumores específicos del riñón dirigida contra el antígeno G-250 del tumor del riñón.

**5 Campo de la invención**

Esta invención se refiere al campo de la oncología. En particular esta invención proporciona nuevas vacunas para uso en el tratamiento de los cánceres de células renales.

**10 Antecedentes de la invención**

El carcinoma de células renales (RCC), a menudo también identificado como cáncer renal, “hipernefroma”, o adenocarcinoma del riñón representa aproximadamente el 85 por ciento de todos los neoplasmas renales primarios. Anualmente se diagnostican aproximadamente 25.000 nuevos casos con 10.000 muertes en Estados Unidos. Desafortunadamente, la prognosis de pacientes con carcinoma de células renales recurrente o metastático es baja. La quimioterapia y la radioterapia tienen poca o ninguna actividad en esta enfermedad y no hay un programa estándar quimioterapéutico, hormonal, o inmunológico para el cáncer renal recurrente o metastático.

Los programas de quimioterapia normalmente utilizados incluyen el uso de sulfato de vinblastina, con o sin el uso de nitrosoureas. Los interferones han sido utilizados con un éxito muy limitado. La interleuquina 2 (Aldesleukin) ha sido aprobada para el tratamiento de pacientes seleccionados con carcinoma de células renales metastático. Se ha notado una tasa de respuesta global del 15 por cien en 255 pacientes, pero ésta ha estado acompañada tanto de reacciones adversas severas como por algunas muertes relacionadas con el tratamiento. Otras opciones de tratamiento para pacientes con enfermedad avanzada están, como mucho en fase de investigación.

**25 Resumen de la invención**

Esta invención proporciona una nueva aproximación al tratamiento de carcinomas de células renales. En particular esta invención se refiere al descubrimiento de que una molécula quimérica que comprende un factor de estimulación de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) unido a un antígeno específico del cáncer de riñón G250 proporciona una “vacuna” altamente efectiva que aumenta una respuesta inmune dirigida contra los cánceres de células renales. La molécula quimérica puede ser utilizada como una vacuna tradicional o en aplicaciones inmunoterapéuticas adoptivas. Pueden utilizarse los ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión GM-CSF-G250 como vacunas de ADN desprotegido o para transfectar células en un régimen de tratamiento inmunoterapéutico adoptivo.

Así pues, en una realización, esta invención proporciona una construcción que comprende un antígeno específico del cáncer de riñón G250 unido a un factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF). El GM-CSF es preferiblemente un GM-CSF humano, o un fragmento y/o mutante biológicamente activo del mismo. De forma similar el antígeno G250 es un antígeno G250 preferiblemente humano. En realizaciones particularmente preferidas el antígeno G250 está unido de forma covalente al GM-CSF (directamente o mediante un enlazador). Los enlazadores preferidos son codificados por la secuencia de nucleótidos ggggcg. En una realización particularmente preferida el antígeno G250 y el GM-CSF son componentes de una proteína de fusión (químicamente construida o expresada de forma recombinante. En dichas proteínas de fusión, el antígeno G250 y el GM-CSF están directamente enlazados, o más preferiblemente, enlazados por un enlazador de péptidos con una longitud comprendida entre 2 y aproximadamente 50 amino ácidos, más preferiblemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20, y más preferiblemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 amino ácidos. Un enlazador de péptidos preferido es -Arg-Arg-. Uno preferido de forma particular tiene la secuencia de SEC ID NO: 1 (excluyendo el fragmento His<sub>6</sub>).

En otra realización esta invención proporciona una composición que comprende las moléculas quiméricas descritas en la misma y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Esta invención también proporciona un ácido nucleico (por ej. un ADN o un ARN) que codifica una proteína de fusión que comprende un antígeno específico del cáncer de riñón G250 unido a un factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF). El G250 es un G250 preferiblemente humano (o un fragmento antigénico o un epítipo específico del cáncer del mismo). De forma similar el GM-CSF es un GM-CSF preferiblemente humano o un fragmento biológicamente activo del mismo. En una realización preferida el ácido nucleico codifica una proteína de fusión en donde el antígeno del G250 y el GM-CSF están directamente enlazados, o más preferiblemente, unidos por un enlazador de péptidos de una longitud comprendida entre 2 y aproximadamente 50, más preferiblemente de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20, y más preferiblemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 amino ácidos. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico puede codificar preferiblemente un enlazador que es -Arg-Arg-. Un ácido nucleico preferido es el ácido nucleico de la SEC ID NO: 2. En algunas realizaciones preferidas, el ácido nucleico es un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la SEC ID NO: 1. El ácido nucleico está preferiblemente en un casete de expresión y en ciertas realizaciones, el ácido nucleico está presente en un vector (*por ej.* un vector de baculovirus).

Esta invención también proporciona una célula huésped transfectada con uno o más de los ácidos nucleicos descritos en la presente invención. La célula huésped es preferiblemente una célula eucariótica, y más preferiblemente una célula de insecto.

Esta invención también proporciona métodos de producir una vacuna anti-tumoral. Los métodos implican preferiblemente cultivar una célula transfectada con un ácido nucleico que codifica una molécula quimérica del GM-CSF-G250 bajo condiciones en las que el nucleico expresa una proteína de fusión del G250-GM-CSF y recuperar dicha proteína de fusión. De nuevo la célula es preferiblemente una célula eucariótica, más preferiblemente una célula de insecto (*por ej.* una SF9).

En otra realización, esta invención proporciona métodos para inducir una respuesta inmune contra el antígeno específico de riñón G250, y/o una célula que muestra el antígeno específico de riñón G250, y/o cualquier célula del cáncer que expresa un antígeno G250, y/o un antígeno de reactividad cruzada con un antígeno de G250. Los métodos implican activar una célula del sistema inmune con una construcción que comprende un antígeno específico de cáncer de riñón (G250) unido a un factor de estimulación de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) en donde el activante proporciona una respuesta inmune dirigida contra el antígeno G250. En algunas realizaciones, el activante comprende poner en contacto una célula que presente el antígeno (*por ej.* monocito, o célula dendrítica) con la construcción (molécula quimérica. En ciertas realizaciones, la célula activada es un linfocito-T citotóxico (CTL), o un linfocito infiltrante, *etc.* El activante también puede implicar poner en contacto un linfocito sanguíneo periférico (PBL) o un linfocito infiltrante del tumor (TIL) con la construcción. El contacto puede tener lugar *in vivo*, o *ex vivo* (*por ej.*, *in vitro*). En varias realizaciones, el activante comprende la carga de una célula que presente el antígeno (APC) con un polipéptido que comprende un G250. La activación también puede comprender la transfección de una célula (*por ej.*, un PBL, un APC, un TIL, una célula de tumor de carcinoma de célula renal, *etc.*) con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de GM-CSF-G250. El método puede comprender además la infusión de células (*por ej.* linfocitos T citotóxicos) de nuevo al mamífero.

En todavía otra realización esta invención proporciona un método de inhibir la proliferación o el crecimiento de una célula de riñón transformada (*por ej.* neoplásica). El método implica la separación de una célula inmune de un huésped de mamífero; la activación de la célula inmune por contacto de la célula con una proteína que comprende un antígeno específico del carcinoma de célula renal (G250) unido a un factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) en donde el activante proporciona una respuesta inmune dirigida contra el antígeno G250 y la respuesta inmune inhibe el crecimiento o la proliferación de una célula de riñón transformada. En realizaciones preferidas, la célula de riñón transformada es una célula de carcinoma de célula renal (*por ej.* en un tumor sólido, un tumor disperso, o una célula metastática). El activante puede comprender poner en contacto una célula que presente el antígeno (*por ej.* una célula dendrítica) con la construcción. La célula activada puede incluir, pero no está limitada a un linfocito T citotóxico (CTL), un linfocito infiltrante del tumor (TIL), *etc.* En ciertas realizaciones, el activante comprende inyectar (o administrar de otro modo) a un mamífero uno o más de los siguientes: un polipéptido que comprende una proteína de fusión GM-CSF-G250; células dendríticas pulsadas con una proteína de fusión GM-CSF-G250; una construcción de terapia génica (*por ej.* adenovirus, adenovirus del gutless, retrovirus, lentivirus, virus adeno-asociado, virus de vacuna, *etc.*) que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de GM-CSF-G250, un dendrítico que expresa una proteína de fusión de GM-CSF-G250, una célula de tumor (*por ej.* RCC) que expresa una proteína de fusión de GM-CSF-G250, un fibroblasto que expresa una proteína de fusión del GM-CSF-G250, un ADN desprovisto del GM-CSF-G250, un reactivo de transfección (*por ej.* lípido catiónico, dendrímero, liposoma, *etc.* conteniendo o complejo con un ácido nucleico que codifica un polipéptido del GM-CSF-G250. En una realización particularmente preferida, el activante comprende células dendríticas aisladas/PMBCs. En otra realización, el activante comprende poner en contacto (*in vivo* o *ex vivo*) un linfocito sanguíneo periférico (PBL) o un linfocito infiltrante del tumor (TIL) con dicha construcción. Las células sanguíneas periféricas y/o dendríticas y/o monocitos son infundidas de forma preferible en el sujeto.

Esta invención también proporciona un método de inhibición de la proliferación e el crecimiento de una célula renal transformada que lleva un antígeno G250. El método implica la separación de una célula inmune de un huésped de mamífero; la activación de la célula inmune por contacto de la célula con una proteína que comprende un antígeno específico del carcinoma de la célula renal (G250) unido a un factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) o un fragmento del mismo; expandir de forma opcional la célula activada; e infundir la célula activada en un organismo que contiene una célula renal transformada que tiene un antígeno G250. En ciertas realizaciones, el activante comprende poner en contacto la célula con uno o más de los siguientes: un polipéptido que comprende una proteína de fusión GM-CSF-G250; células dendríticas pulsadas con una proteína de fusión GM-CSF-G250; una construcción de terapia génica (*por ej.* adenovirus, adenovirus de gutless, retrovirus, lantivirus, virus adeno-asociado, virus de vacuna, *etc.*) que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de GM-CSF-G250, una proteína de fusión que expresa el GM-CSF-G250, una célula del tumor (*por ej.* RCC) que expresa una proteína de fusión GM-CSF-G250, un fibroblasto que expresa una proteína de fusión GM-CSF-G250, un ADN desprovisto de GM-CSF-G350, un reactivo de transfección (*por ej.* lípido catiónico, dendrímero, liposoma, *etc.* conteniendo o complejo con un ácido nucleico que codifica un polipéptido de GM-CSF-G250. En una realización particularmente preferida, el activante comprende células dendríticas aisladas del activante/PMBCs. En otra realización, el activante comprende poner en contacto (*in vivo* o *ex vivo*) un limfocito sanguíneo periférico (PBL) o un linfocito infiltrante del tumor (TIL) con dicha construcción. Las células sanguíneas periféricas y/o las células dendríticas y/o los monocitos son infundidos de forma preferible en el sujeto. La separación puede comprender aislar y cultivar los linfocitos periféricos y/o los monocitos, y/o las células dendríticas del huésped del mamífero. La infusión puede implicar la infusión de células cultivadas o de células activadas producidas utilizando las células cultivadas en el huésped del que se ha separado la célula inmune.

En todavía otra realización, la invención proporciona un método de tratamiento de un individuo que tiene un cáncer de célula renal. El método implica la sensibilización del antígeno que presentan las células (*por ej.*, PBMCs, células dendríticas, *etc.*) *in vitro* con una cantidad efectiva para la sensibilización de una proteína de fusión quimérica que comprende un antígeno específico del carcinoma de célula renal (G250) unido a un factor de estimulación de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF); y administrar a un individuo que tenga dicho cáncer de célula renal o metástasis una cantidad terapéuticamente efectiva de las células que presentan el antígeno sensibilizado. En realizaciones particularmente preferidas, las células que presentan el antígeno son autólogas al individuo o alogénicas con MHC emparejados. En ciertas realizaciones, la sensibilización implica poner en contacto linfocitos de sangre periférica o monolitos o células dendríticas con proteína de fusión de G250-GM-CSF. En ciertas realizaciones, la sensibilización implica poner en contacto PBL, TIL, monocito, célula dendrítica con un polipéptido de G250-GM-CSF y/o transfectar la célula dendrítica, APC, RCC, fibroblastos, con un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión quimérica.

### Definiciones

El término “G250-GM-CSF” hace referencia a una molécula quimérica que comprende un antígeno de tumor de célula renal G250 unido a un factor de estimulación de la colonia de macrófagos de granulocitos. La unión puede ser una conjugación química (directa o a través de un enlazador) o la molécula quimérica puede ser una proteína de fusión (expresada de forma recombinante o unida por condensación de las dos moléculas del sujeto). La anotación “G250-GM-CSF” alcanza realizaciones en donde el G250 y el GM-CSF están unidos de forma terminal o a un sitio interno y contemplan la unión de la molécula de G250 tanto a la terminación amino como carboxilo del GM-CSF. Además, el término *my* alcanza las moléculas quiméricas que comprenden fragmentos o mutantes del G250 en donde los fragmentos del G250 retienen el epítopo reconocido por los anticuerpos que se dirigen específicamente a los carcinomas de células renales que tienen el antígeno G250. De forma similar, el término *my* alcanza las moléculas quiméricas que comprenden fragmentos o mutantes de GM-CSF en donde el GM-CSF retiene la actividad biológica del GM-CSF nativo (*por ej.* son reconocidos por los receptores que reconocen el GM-CSF nativo y/o muestran una actividad mitogénica similar, *etc.*)

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” son utilizados de forma intercambiable en la presente invención para hacer referencia a un polímero de residuos de amino ácidos. Los términos aplican a polímeros de amino ácidos en los que uno o más residuos de amino ácidos es un análogo químico artificial de un amino ácido de origen natural, así como de polímeros de amino ácidos de origen natural. El término también incluye variantes en la tradicional formación de péptidos mediante la unión de amino ácidos que constituyen el polipéptido.

Los términos “ácido nucleico” o “oligonucleótido” o equivalentes gramaticales hacen referencia en la presente invención a al menos dos nucleótidos unidos entre sí de forma covalente. Un ácido nucleico de la presente invención es preferiblemente de hebra única o de doble hebra y de forma general contendrá enlaces de fosfodiéster, aunque en algunos casos, tal como se señala a continuación, se incluyen los análogos de ácido nucleico que pueden tener esqueletos alternados, comprendiendo, por ejemplo, la fosforamida (Beaucage y otros. (1993) *Tetrahedron* 49(10):1925) y las referencias del mismo; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800; Sprinzl y otros (1977) *Eur. J. Biochem.* 81: 579; Letsinger y otros. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 3487; Sawai y otros. (1984) *Chem. Lett.* 805, Letsinger y otros. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 4470; y Pauwels y otros. (1986) *Chemica Scripta* 26: 1419, fosforotioato (Mag y otros. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437; y la Patente U.S. No. 5.644.048), fosforoditioato (Briu y otros. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111: 2321, uniones de O-metilfosforoamidita (*ver* Eckstein, *Oligonucleotides y Analogues: A Practical Approach*, Oxford University Press), y esqueletos y uniones de los ácidos nucleicos del péptido (*ver* Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895; Meier y otros. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31: 1008; Nielsen (1993) *Nature*, 365: 566; Carlsson y otros. (1996) *Nature* 380: 207). Otros análogos de ácido nucleicos incluyen aquellos con esqueletos positivos (Denpcy y otros. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6097; esqueletos no iónicos (patentes U.S. Nos. 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; *Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English* 30: 423; Letsinger y otros. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470; Letsinger y otros. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1597; Capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, “Carbohydrate Modifications in Antisense Research”, Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker y otros. (1994), *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs y otros. (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996) y esqueletos de no-ribosa, incluyendo los descritos en las patentes U.S. Nos. 5.235.033 y 5.034.506, y los Capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos conteniendo uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos (*ver* Jenkins y otros. (1995), *Chem. Soc. Rev.* pp169-176). Se han descrito varios análogos de ácidos nucleico en Rawls, C & E News 2 de Junio de 1997, página 35. Pueden realizarse estas modificaciones del esqueleto del fosfato de ribosa para facilitar la adición de mitades adicionales tales como marcadores, o para incrementar la estabilidad y la vida media de dichas moléculas en entornos fisiológicos.

El término “célula inmune” hace referencia a una célula que es capaz de participar, directa o indirectamente, en una respuesta inmune. Las células inmunes incluyen, pero no están limitadas a células-T, células-B, células dendríticas, células-T citotóxicas, linfocitos infiltrantes del tumor, *etc.*

Tal como se utiliza en la presente invención, el término “activación” (*por ej.* como en la activación de una célula o en la activación de una respuesta inmune) incluye la activación directa como por contacto con la construcción o por activación indirecta tal como por contacto con la construcción o el fragmento antigénico a través de una célula que presenta el antígeno (*por ej.* una célula dendrítica).

Una “proteína de fusión” hace referencia a un polipéptido formado por la unión de dos o más polipéptidos a través de un enlace peptídico formado entre las terminaciones amino de un polipéptido y la terminación carboxilo de otro polipéptido. La proteína de fusión puede estar formada por el acoplamiento químico de los polipéptidos constituyentes, o puede ser expresada como un polipéptido único a partir de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión contigua. Una proteína de fusión de cadena única es una proteína de fusión que tiene un esqueleto de polipéptido contiguo único.

Un “espaciador” o “enlazador” se utiliza en referencia a una proteína de fusión referida a un péptido que une las proteínas que comprenden una proteína de fusión. Generalmente un espaciador no tiene actividad biológica específica diferente de la de unir las proteínas o la de preservar alguna distancia mínima u otras relaciones espaciales entre ellas. Sin embargo, los amino ácidos constituyentes de un espaciador pueden ser seleccionados para influenciar alguna propiedad de la molécula tal como el doblado, la carga neta, o la hidrofobicidad de la molécula.

Un “espaciador” o “enlazador” tal como se utiliza en referencia a una molécula química químicamente conjugada se refiere a cualquier molécula que une/junta las moléculas constituyentes de la molécula química químicamente conjugada.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un análisis de RT-PCR de las células del tumor del RCC.

La Figura 2 ilustra el análisis FACS de células dendríticas derivadas de cultivos de PBMC adherentes.

La Figura 3 ilustra la sobre-regulación de antígeno de HLA en células dendríticas por la proteína de fusión de GM-CSF-G250.

La Figura 4 ilustra la citotoxicidad del PMBC de la masa modulada por la proteína de fusión de G250-GM-CSF (paciente 1).

La Figura 5 ilustra la citotoxicidad del PBMC de la masa modulada por la proteína de fusión del GM-cSF/G250 (paciente 2).

Las Figuras 6A, 6B y 6C ilustran la expresión y la purificación de la proteína de fusión del GM-CSF-G250. La Figura 6A muestra la tinción inmunohistoquímica para el G250 y la expresión del GM-CSF con células Sf-9 de anticuerpos de anti-G250 y anti-GM-CSF infectadas con y sin baculovirus recombinantes de genes de fusión. Ampliación, x 100. La Figura 6B muestra un análisis de bandas Western de la proteína de fusión GM-CSF-G250 fragmentada 6xHis eluida a partir de la columna de afinidad Ni-NTA utilizando anticuerpo de antiGM-CSF (L = carga, BT= a través de la fractura, W= lavado). La Figura 6C muestra un SDS-PAGE teñido de azul coomasivo de la proteína de fusión eluida a partir de la columna de afinidad Ni-NTA (línea 1) y purificada además con SP Sefarosa/FPLC (línea 2 y línea 3).

Las Figuras 7A y 7B muestran una comparación de la actividad funcional de la proteína de fusión GM-CSF recombinante y GM-CSF-G250 purificada. Se midió la actividad del GM-CSF utilizando la línea celular humana dependiente de GM-CSF, TF-1. Se cultivaron las células TF-1 células (2 x 10<sup>4</sup>/pocillo/ml) en presencia de cantidades diluidas de forma seriada de (Figura 7A) GM-CSF recombinante o, (Figura 7B) proteína de fusión GM-CSF-G250 purificada tal como se ha indicado: Después de una incubación de 5 días los cultivos se pulsaron con timidita tritiada 0,1 mCi durante un periodo adicional de 12 h. A continuación se recogieron los cultivos y se midió la timidita incorporada por conteo de centelleo.

Las Figuras 8A, 8B, y 8C muestran los efectos inmunomoduladores de la proteína de fusión en las células dendríticas. La Figura 8A muestra un análisis de flujo de doble color de las células dendríticas crecidas en GM-CSF (800U/ml) más IL-4 (1000 U/ml) o en proteína de fusión (FP) más IL-4. Se marcaron las células con anticuerpos conjugados de FITC y PE frente a marcadores de la superficie de la célula de DC, tal como se ha indicado. Las células que fueron mayores que los linfocitos fueron cercadas de modo selectivo y los controles negativos corresponden al marcaje con un anticuerpo del control emparejado con el isótopo. Este análisis es representativo de los cultivos de 5 DC. La Figura 8B muestra un análisis citométrico de flujo de los antígenos de HLA antígenos de DC cultivada en GM-CSF más IL-4 o proteína de fusión más IL-4. Las células marcadas con anticuerpo primario (clase I o clase II de HLA) y anticuerpo secundario FITC-conjugado. Este análisis es representativo de cuatro DC diferentes derivados de cuatro pacientes RCC. La Figura 8C muestra un análisis citométrico de flujo de doble color de DC expresado CD83<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> que cultivado en el estado indicado. Los datos, promedio del triplicado; barras, SD. Este análisis es representativo de cuatro diferentes DC derivados de cuatro pacientes de RCC.

La Figura 9 muestra un curso de tiempo de la expresión de mRNA de citoquina en PBMC que fueron tratados con la proteína de fusión GM-CSF-G250 (FP) (2,7 mg/10<sup>7</sup> células) durante varios periodos de tiempo tal como se indicó y a continuación se recogieron para realizar el análisis de RT-PCR semi-cuantitativo. Se separaron los productos de la PCR marcados con 32P por electroforesis a través de gel de archilamida al 7%. Se secaron los geles y se sometieron a autoradiografía. Se preparó el estándar valorado a partir de muestras de ARN diluidas extraídas a partir de PBMC tratado con FP durante 24 h.

Las Figuras 10A, 10B, y 10C muestran los perfiles de crecimiento y de citotoxicidad de PBMC derivado del paciente estimulado con la proteína de fusión de GM-CSF-G250. La Figura 10A muestra la expansión del crecimiento de PBMC (paciente #1) inducido por varias estrategias inmunomoduladoras tal como se ha indicado. Se estimularon los cultivos de células con FP en el día 0, día 6, día 12 y día 18. Se cambió el medio de cultivo semanalmente pero se mantuvo en un volumen constante. El conteo de células se llevó a cabo en el día 20. Se calculó la doblez de la expansión por división del conteo de células final por ml con el conteo de células por ml sembradas en el día 0 ( $3 \times 10^5$  células/ml). Datos, promedios del triplicado; barras, SD. Este análisis es representativo de cuatro cultivos de PBMC diferentes derivados de cuatro pacientes de RCC, que mostraron un perfil de crecimiento similar. La Figura 10B muestra la citotoxicidad de PBMC (paciente #1) frente a células de riñón normales autólogas, células de tumor primario y células de tumor derivados de los nudo de la linfa. Se determinó la citotoxicidad mediante un ensayo de liberación de Cr 51 de 18 h en el día 21. Se expresó la actividad de matar como las unidades líticas por 10<sup>6</sup> células del efector. Las unidades líticas se definieron como el número de células de efector capaces de inducir el 30% de lisis. La liberación espontánea para el tumor objetivo fue de < 20% de la liberación máxima. Datos, promedios del triplicado; barras, SD. La Figura 10C muestra la inhibición de la citotoxicidad frente a células de tumor LN autólogas por anticuerpos específicos de células T y antígenos de HLA. Se pre-trataron las células objetivo de tumor o PBMC con anticuerpos respectivos tal como se ha indicado antes para el ensayo de citotoxicidad. Datos, promedios del triplicado; barras, SD. D, análisis de RT-PCR semi-cuantitativo de la expresión del mRNA G250 por el riñón normal, tumor primario y tumor derivado de LN derivado del tumor derivado del paciente #1.

Las Figuras 11A y 11B muestran la proteína de fusión inducida G250 objetivada y la inmunidad de la célula T restringida. La Figura 11A muestra la citotoxicidad del PBMC frente a objetivos del tumor autólogo y alogénico tal como se ha indicado. Los cultivos de PBMC se pre-trataron con IL-4 (1000 U/ml) y FP (0.34 mg/ml) o IL-4 y GM-CSF (800 U/ml) durante una semana y a continuación se re-estimularon con IL-2 y FP o IL-2 y GM-CSF semanalmente. La citotoxicidad fue determinada mediante un ensayo de liberación de <sup>51</sup>Cr durante 18 h el día 35. Se midió la citotoxicidad frente al objetivo del tumor autólogo en presencia del anticuerpo de control del isótopo o de anticuerpos específicos de HLA clase I, HLA clase II, CD3, CD4, o CD8. Datos, promedios del triplicado; barras, SD. La Figura 11B muestra un análisis fenotípico de PBMC modulado de FP que expresó la actividad antitumoral.

La Figura 12 muestra un mapa del vector pCEP4/GMCSF-G250 en donde el gen recombinante es insertado entre KpnI y XhoI.

La Figura 13 muestra la digestión y la electroforesis de pCEP4/GMCSF-G250 Línea 1: pCEP4/GMCSF-G250. Línea 2: pCEP4/GMCSF-G250 digerido con KpnI y XhoI. M: marcador del peso molecular (1 kb PLUS ADN ladder (Gibco).

### Descripción detallada

Esta invención proporciona una nueva aproximación al tratamiento (por ej., la mitigación de los síntomas) de un carcinoma de células renales o cualquier tipo de cáncer que exprese el antígeno G250 (por ej. el cáncer cervical) o que exprese un antígeno con actividad cruzada de G250. En particular esta invención utiliza una molécula quimérica que comprende un antígeno específico del cáncer de riñón (G250) unido a un factor de estimulación de la colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Sin estar ligado a una teoría en particular, se cree que esta molécula quimérica proporciona dos modos de actividad. La vacunación de pacientes con avanzado carcinoma de células renales avanzadas utilizando una molécula de G250-GM-CSF quimérica dará lugar a la activación de las células dendríticas de los pacientes (DC), las células que presentan el antígeno más potente. Las células dendríticas toman el GM-CSF, *por ej.*, vía el receptor de GM-CSF y el antígeno G250 unido es co-transportado en virtud de su unión al GM-CSF. Las células dendríticas procesan el antígeno de G250 y el péptido de G250 presente en la HLA clase I que a continuación activa las células T citotóxicas específicas de G250 (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) que a continuación lisan las células del cáncer de riñón positivas G250. Además, o de forma alternativa, el péptido G250 está presente en las células HLA clase II que activan las células auxiliares T específicas de G250 que a continuación activan o mantienen la actividad de matar de las CTLs.

En ciertas realizaciones, puede administrarse un ácido nucleico que codifica una construcción de G250-GM-CSF como una vacuna de "ADN desprotegido". En esta aproximación, el organismo/paciente es inyectado, *por ej.* de forma intramuscular, con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión del G250-GM-CSF. El ácido nucleico es expresado dentro del organismo conduciendo a la producción de una proteína de fusión de G250-GM-CSF que a continuación obtiene una respuesta inmune del carcinoma de células anti-renales tal como se ha descrito anteriormente.

En otra realización, las moléculas del G250-GM-CSF quiméricas pueden ser utilizadas en inmunoterapia adoptiva. En este caso, se utiliza la molécula quimérica (proteína de fusión) o un ácido nucleico que codifica la molécula quimérica para activar los linfocitos (*por ej.* células T) *ex vivo*. Los linfocitos activados son expandidos de forma opcional, *ex vivo*, y a continuación re-infundidos de nuevo en el sujeto (paciente) en donde atacan de forma específica y lisan las células del tumor positivo de G250 (*por ej.* el tumor de las células del riñón o las células de cáncer cervical).

En realizaciones particularmente preferidas, esta invención utiliza una o más de las siguientes formulaciones:

1. Un polipéptido que comprende una proteína de fusión de GM-CSF-G250

## ES 2 286 104 T3

2. Una célula dendrítica u otras células, pulsada con un polipéptido que comprende una proteína de fusión del GM-CSF-G250;

3. ácidos nucleicos que codifican el GM-CSF-G250 en un vector de “terapia génica” (*por ej.* adenovirus, adenovirus de gutless, retrovirus, lentivirus, virus adeno-asociados, virus de vacuna, *etc.*)

4. Células dendríticas transfectadas con un ácido nucleico que codifica el GM-CSF-G250 (*por ej.*, vía el virus recombinante, la transfección de ADN de plásmido, y similares);

5. Células de tumor (*por ej.* células del RCC) que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una proteína de fusión de GM-CSF-G250;

7. Un ácido nucleico que codifica un GM-CSF-G250 (*por ej.* “ADN desprotegido”); y

8. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende un GM-CSF-G250 complejo con un agente de transfección (*por ej.*, lípido de DMRIE/DOPE, dendrímeros, *etc.*)

Cada una de estas formulaciones puede ser administrada directamente a un organismo (*por ej.* un mamífero que tiene un cáncer que expresa un antígeno de G250 o un antígeno de reacción cruzada a un antígeno de G250) o puede ser utilizado en un contexto de inmunoterapia adoptiva. En la última aproximación, la inmunoterapia adoptiva utiliza de forma preferible las células derivadas de la sangre periférica (*por ej.* linfocitos de sangre periférica (PBLs) o células derivadas de un tumor (*por ej.* linfocitos que se infiltran en el tumor (TILs)). La administración de la formulación da lugar a la activación y a la propagación de células T citotóxicas dirigidas al G250 en PBMC o cultivos de TIL. La infusión de los CTLs dirigidas a los CTLs en el paciente da lugar al desarrollo y al mantenimiento de una respuesta inmune dirigida al G250.

Las formulaciones anteriormente identificadas también pueden ser administradas directamente a un mamífero para la vacunación “*in vivo*”. De este modo, por ejemplo, los polipéptidos de GM-CSF-G250 o los ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos pueden ser administrados al organismo como vacunas “tradicionales”. Sin embargo, las otras formulaciones inmunogénicas identificadas anteriormente, son también altamente activas *in vivo* y también pueden ser “directamente” administradas a un organismo como una “vacuna”. De este modo, por ejemplo, las células dendríticas pulsadas con una proteína de fusión GM-CSF-G250, una célula dendrítica, u otras células, transfectada con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de GM-CSF-G250, vectores de terapia génica que codifican un polipéptido de GM-CSF-G250, pueden ser todos ellos administrados a un organismo en donde inducen y mantienen una población de células T citotóxicas dirigidas a G250.

Constituye un descubrimiento de esta invención que las moléculas quiméricas de G250-GM-CSF *por ej.* cuando se utilizan *in vivo* como una vacuna o en una modalidad inmunoterapéutica inducen una respuesta inmune altamente vigorosa dirigida específicamente a los carcinomas de células renales. La aproximación produce la muerte o la inhibición de las células renales neoplásicas tanto difusas (*por ej.* células metastásicas motiles) como agregadas (*por ej.* como en un tumor sólido). Estos métodos pueden acompañar la administración de otros agentes (*por ej.* agentes inmunomoduladores o agentes citotóxicos, tales como citoquinas o fármacos).

Es reconocido que los métodos de esta invención no necesitan mostrar una completa eliminación del tumor (*por ej.* una “curación”) para ser valiosos. Incluso una ligera disminución en la velocidad de crecimiento de un tumor, y/o en la propagación del metastático, u otro neoplástico, las células pueden ser clínicamente relevantes mejorando la calidad y/o la duración de la vida. Naturalmente, dada la elevada eficacia observada, es esperable que los métodos de esta invención pueden ofrecer un grado significativo o completo de remisión particularmente cuando se utilizan en combinación con otras modalidades de tratamiento (*por ej.* cirugía, quimioterapia, terapia de interleuquina, TGF $\beta$  o terapia antisentido de IL-10, *etc.*).

### I. Moléculas quiméricas de G250-GMCSF y su expresión

Esta invención utiliza una molécula quimérica que comprende un antígeno específico del cáncer de riñón G250 unido a un factor de estimulación de la colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF), para inducir una respuesta inmune mediada por la célula dirigida a las células de tumor renales. En una molécula quimérica, se unen dos o más moléculas que existen de forma separada en su estado nativo juntas para formar una única molécula que tiene la funcionalidad deseada de todas sus moléculas constituyentes. En este caso, las moléculas constituyentes son el antígeno de G250 y GM-CSF respectivamente. El G250 proporciona un epítopo que es presentado (*por ej.* a las células T) dando lugar a la activación y a la expansión de dichas células y a la formación de las células citotóxicas (*por ej.* linfocitos T citotóxicos, linfocitos infiltrantes del tumor (TILs), *etc.*) que son dirigidas a las células del tumor que tienen el antígeno de G250. El GM-CSF actúa tanto para estimular los componentes del sistema inmune (*por ej.* monocitos, células dendríticas, NK, PMN, PBMC, *etc.*) y para mediar la captación del antígeno de G250 asociado por las células dendríticas. Además, particularmente en las modalidades inmunoterapéuticas adoptivas, el GM-CSF también puede actuar como un adyuvante.

La unión del antígeno de G250 al GM-CSF puede ser directa (*por ej.* un enlace covalente) o indirecta (*por ej.* a través de un enlazador). Además, el antígeno de G250 y las proteínas del GM-CSF pueden ser unidos por modifica-

## ES 2 286 104 T3

ción química de las proteínas o puede ser expresada como una proteína de fusión recombinante. A continuación se proporcionan métodos detallados de producir los componentes individuales y la molécula quimérica.

El antígeno específico del tumor de riñón G250 es conocido por los expertos en la materia (*ver, por ej.*, Oosterwijk y otros. (1996) *Molecular characterization of the Renal Cell Carcinoma-associated antigen G250, Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 37: 461; Uemura y otros. (1994) *Internal Image Anti-Idiotypic Antibodies Related to Renal-Cell Carcinoma-Associated Antigen G250, Int. J. Cancer*, 56: 609-614). La secuencia de ácido nucleico de G250 está públicamente disponible (*ver, por ej.*, número de acceso del GenBank X66839).

De forma similar, la secuencia de ácido nucleico del GM-CSF (*por ej.* el GM-CSF humano) es bien conocido por los expertos en la materia (*ver, por ej.*, número de acceso del GenBank: E02287).

Utilizando la información de la secuencia conocida pueden producirse los ácidos nucleicos que codifican el G250, el GM-CSF, o un G250-GM-CSF utilizando métodos estándar bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, el ácido nucleico(s) puede ser clonado, o amplificado por métodos *in vitro*, tales como la reacción de la cadena de polimerasa (PCR), la reacción de la cadena de ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), y el sistema de replicación de la secuencia de auto-mantenimiento (SSR), *etc.* Son bien conocidos por los expertos en la materia una amplia variedad de metodologías de clonación y de amplificación *in vitro*.

Ejemplos de estas técnicas e instrucciones suficientes para dirigir a personas expertas en la materia hacia muchos ejercicios de clonación se encuentran en Berger y Kimmel, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology* 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook y otros. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2ª ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook y otros); *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel y otros., eds., Current Protocols, una joint venture entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento de 1994) (Ausubel); Cashion y otros, patente U.S. número 5.017.478; y Carr, patente Europea No. 0.246.864.

Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a las personas expertas en la materia a través de métodos de amplificación *in vitro* se encuentran en Berger, Sambrook, y Ausubel, así como en Mullis y otros, (1987) patente U.S. No. 4.683.202; *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications* (Innis y otros eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1 de octubre de 1990) *C&EN* 36-47; *The Journal Of NIH Research* (1991) 3: 81-94; (Kwoh y otros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173; Guatelli y otros (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1874; Lomell y otros (1989) *J Clin. Chem.*, 35: 1826; Landegren y otros., (1988) *Science*, 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) *Biotechnology*, 8: 291-294; Wu y Wallace, (1989) *Gene*, 4: 560; y Barringer y otros. (1990) *Gene*, 89: 117.

Además, se describe la clonación y expresión de un gen de fusión de GM-CSF-G250 en el Ejemplo 1. Mientras la clonación y la expresión de una proteína de fusión recombinante es ilustrada y será apreciada que las proteínas de G250 y el GM-CSF pueden ser obtenidas y/o expresadas de forma recombinante y a continuación químicamente acopladas tal como se describe a continuación.

Las moléculas de G250 y del GM-CSF pueden ser unidas en cualquier orden. De este modo, el G250 puede ser unido tanto a las terminaciones amino como carboxi del GM-CSF. Cuando las moléculas son químicamente conjugadas, no necesitan ser unidas extremo con extremo y pueden ser unidas a cualquier terminación conveniente o sitio interno.

El G250 y el GM-CSF pueden ser unidos por cualquiera de los medios bien conocidos por los expertos en la materia. De forma típica el G250 y el GM-CSF son conjugados, tanto directamente como a través de un enlazador (espaciador). Debido a que ambas moléculas son polipéptidos, en una realización, es preferible expresar de forma recombinante la molécula quimérica como una proteína de fusión de cadena única que contiene opcionalmente un espaciador entre el GM-CSF y el G250.

Los medios de conjugar químicamente las moléculas son bien conocidos por los expertos en la materia. Los polipéptidos contienen de forma típica una variedad de grupos funcionales; *por ej.*, grupos ácido carboxílico (COOH) o amina libre (-NH<sub>2</sub>), que son asequibles por reacción con un grupo funcional adecuado en una molécula efector para unir el efector del mismo.

De forma alternativa, el G250 y/o el GM-CSF pueden ser derivatizados para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de las moléculas enlazadoras tales como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

Un "enlazador", tal como se utiliza en la presente invención, es una molécula que se utiliza para unir el G250 al GM-CSF. En realizaciones preferidas, el enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto para el G250 como para el GM-CSF. Enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no están limitados a, enlazadores de cadenas carbonadas lineales o ramificadas, enlazadores de carbono heterocíclicos, o enlazadores de tipo péptido. En ciertas realizaciones, los enlazadores pueden ser unidos a amino ácidos que comprenden el G250 y/o el GM-CSF a través de sus grupos laterales (*por ej.*, a través de un enlace de disulfuro a la cisterna). Sin embargo, en una realización preferida, los enlazadores serán unidos a los grupos amino o carboxilo del carbono alfa

de los amino ácidos terminales. El enlazador puede ser bifuncional, teniendo un grupo funcional reactivo con un sustituyente en el G250 y un grupo funcional diferente reactivo con un sustituyente en el GM-CSF. De forma alternativa, el G250 y/o el GM-CSF pueden ser derivatizados para reaccionar con un enlazador "mono-funcional" (ver, por ej., patente U.S. No. 4.671.958 y 4.659.839 para los procedimientos para generar grupos reactivos en los péptidos).

5 En una realización preferida de forma particular, las moléculas quiméricas de esta invención son proteínas de fusión. La proteína de fusión puede ser sintetizada químicamente utilizando técnicas de síntesis de péptidos estándar, o, de forma más preferible, expresadas de forma recombinante. Cuando ambas moléculas son relativamente cortas la molécula quimérica puede ser sintetizada como un polipéptido contiguo único. La síntesis en fase sólida en la que  
10 el amino ácido C-terminal de la secuencia está unido a un soporte insoluble seguida por la adición secuencial de los amino ácidos restantes en la secuencia es un método preferido para la síntesis química de los polipéptidos de esta invención. Las técnicas para la síntesis en fase sólida han sido descritas por Barany y Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; pp. 3-284 in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A.*, Merrifield y otros *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2156 (1963), y Stewart y otros., *Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed.* Pierce Chem. Co., Rockford, III. (1984).

En una realización más preferida, las proteínas de fusión quiméricas de la presente invención son sintetizadas utilizando metodología de ADN recombinante. Generalmente esto implica la creación de una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión, situando el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor en particular,  
20 expresando la proteína en un huésped, aislando la proteína expresada y, en el caso en que se requiera, renaturalizando la proteína.

El ADN que codifica la proteína de fusión de esta invención (GM-CSF-G250) puede ser preparado por cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la clonación y la restricción de las secuencias apropiadas o la síntesis química directa por métodos tales como el método del fosfotriéster de Narang y otros. *Meth. Enzymol.* 68: 90-99 (1979); el método de fosfodiéster de Brown y otros., *Meth. Enzymol.* 68: 109-151 (1979); el método de la dietilfosforamida de Beaucage y otros., *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862 (1981); y el método del soporte sólido de la patente U.S. No. 4.458.066.

30 La síntesis química produce un oligonucleótido de hebra única. Este puede ser convertido en un ADN de doble hebra por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una polimerasa de ADN utilizando la hebra simple como un molde. Un experto en la materia reconocerá que aunque la síntesis química de ADN esté limitada a las secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse mayores secuencias por la unión de secuencias más cortas.

35 De forma alternativa, las subsecuencias pueden ser clonadas y las subsecuencias apropiadas rotas utilizando enzimas de restricción apropiadas. Los fragmentos pueden entonces ser ligados para producir la deseada secuencia de ADN.

40 En una realización preferida, el ADN que codifica las proteínas de fusión de la presente invención utiliza los métodos de amplificación de ADN tales como la reacción de la cadena de polimerasa (PCR). Tal como se ilustra en los Ejemplos 1 y 2. De este modo, por ejemplo, el GM-CSF es amplificado utilizando los primeros que introducen los sitios EcoRI y NotI (3' y 5' respectivamente), y el G250 cADN es amplificado con primeros que introducen NotI y His-stop-GbL II (5' y 3' respectivamente). Los productos de amplificación son ligados (GM-CSF-NotI-G250-His-stop-Bgl II).

45 Las construcciones ilustradas en el Ejemplo 1 introducen un enlazador (gcggcg) entre los ácidos nucleicos que codifican el G250 y el GM-CSF. Se utiliza la secuencia enlazadora para separar el GM-CSF y el G250 por una distancia suficiente para asegurar que, en una realización preferida, cada dominio se dobla de forma adecuada en sus estructuras secundaria y terciaria. Las secuencias de enlazador de péptidos preferidas adoptan una conformación extendida flexible, no muestran una propensión para el desarrollo de una estructura secundaria ordenada que puede interaccionar con los dominios del GM-CSF y G250 funcional. Los aminoácidos típicos en las regiones de proteína flexible incluyen Gly, Asn y Ser. Virtualmente puede esperarse que cualquier permutación de las secuencias de amino ácidos conteniendo Gly, Asn y Ser satisfagan los criterios anteriores para una secuencia de enlazador. Otros amino ácidos casi neutros, tales como Thr y Ala, también pueden ser utilizados en la secuencia del enlazador. De este modo las secuencias de amino ácidos como los enlazadores del GM-CSF y del G250, además de la ilustrada en el Ejemplo 1, incluyen el enlazador Gly<sub>4</sub> SerGly<sub>5</sub> Ser (SEC ID NO:3) utilizado en la patente U.S. No. 5.108.910 o una serie de cuatro residuos (Ala Gly Ser) (SEC ID NO:4), etc. Todavía se han descrito otras secuencias de amino ácidos que pueden ser utilizadas como enlazadores en Maratea y otros (1985), *Gene* 40: 39-46; Murphy y otros. (1986) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 83: 8258-62; patente U.S. No. 4.935.233; y patente U.S. No. 4.751.180.

50 La longitud de la secuencia enlazadora del péptido puede variar sin que afecte de forma significativa la actividad biológica de la proteína de fusión. En una realización preferida de la presente invención, se utiliza una secuencia enlazadora de una longitud de aproximadamente 2 amino ácidos para proporcionar una separación adecuada de los dominios de proteína funcionales, aunque también puede utilizarse secuencias de enlazador mayores. La secuencia de enlazador puede estar comprendida entre 1 y 50 amino ácidos de longitud. En la mayoría de los aspectos preferidos de la presente invención, la secuencia de enlazador está comprendida entre 1 y 20 amino ácidos de longitud. En las realizaciones preferidas descritas en la presente invención, la secuencia del enlazador está comprendida entre 2 y

## ES 2 286 104 T3

aproximadamente 15 amino ácidos, y ventajosamente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 amino ácidos. Las secuencias de enlazador de péptido no son requeridas de forma necesaria en las proteínas de fusión de esta invención.

5 Generalmente el espaciador no tendrá una actividad biológica específica diferente de la de unir las proteínas o la de preservar alguna distancia mínima u otras relaciones espaciales entre ellas. Sin embargo, los amino ácidos constituyentes del espaciador pueden ser seleccionados para influir en algunas propiedades de la molécula tales como el doblado, la carga neta, o la hidrofobicidad.

10 En los casos en que se desee expresar de forma recombinante tanto el G250, como el GM-CSF, o la proteína de fusión del G250-GM-CSF, las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína deseada son unidas de forma típicamente operable a los elementos reguladores transcripcionales o translacionales. Los elementos reguladores incluyen de forma típica un promotor transcripcional, una secuencia de operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifique los sitios de unión del ribosoma del mRNA adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traslación. Puede incorporarse de forma adicional la capacidad para replicar en un huésped, normalmente conferido por un origen de replicación y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

15 Las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión pueden ser expresadas en una variedad de células huésped, incluyendo *E. coli* y otros huéspedes bacterianos, y células huésped eucarióticas incluyendo pero no limitada levaduras, células de insectos (*por ej.* células SF9) y otras varias células eucarióticas tales como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y las líneas celulares de mieloma. El gen de la proteína recombinante será unido de forma operable a las secuencias de control de expresión apropiadas para cada huésped. Para la *E. coli* éste incluye un promotor tal como el T7, trp, o los promotores lambda, un sitio de unión de ribosoma y preferiblemente una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucarióticas, las secuencias de control incluirán un promotor y preferiblemente un intensificador derivado de los genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etc., y una secuencia de poliadenuilación, y puede incluir secuencias de donador sílice y de aceptor. En una realización particularmente preferida el gen de fusión de GM-CSF-G250 es insertado en el sitio del gen de polihedrina basado en el vector de transferencia de baculovirus (*por ej.*, pVL 1393, disponible de PharMingen) y expresado en células de insecto (*por ej.* células SF9).

20 Los plásmidos de la invención pueden ser transferidos en la célula huésped seleccionada por los métodos bien conocidos tales como la transformación de cloruro cálcico para la *E. coli* y el tratamiento con fosfato cálcico o la electrofiltración para las células de mamífero. Pueden seleccionarse las células transformadas por los plásmidos por resistencia a los antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes *amp*, *gpt*, *neo*, y *hyg*.

25 Una vez expresadas, las proteínas de fusión recombinantes pueden ser purificadas de acuerdo con los procedimientos estándar del estado de la técnica, incluyendo la precipitación de sulfato amónico, la captación del fragmento his, las columnas de afinidad, la cromatografía de columna, la electroforesis de gel y similares (*ver*, de forma general, R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y. (1982), Deutscher, *Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y. (1990)). Las composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente entre el 90 y el 95% de homogeneidad son las preferidas, y de entre el 98 y el 99% o de mayor homogeneidad son las más preferidas para el uso farmacéutico. Una vez purificados, parcialmente o hasta homogeneidad en el caso en que se desee, los polipéptidos pueden entonces ser utilizados de modo terapéutico.

30 Un experto en la materia reconocerá que después de la síntesis química, la expresión biológica, o la purificación, el G250, el GM-CSF, o la proteína de GM-CSF-G250 pueden poseer una conformación sustancialmente diferente de las conformaciones originales de los polipéptido(s). En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido y a continuación causar que el polipéptido se doble de nuevo en la conformación preferida. Los métodos de reducir y desnaturalizar proteínas e inducir el doblado de Nuevo son bien conocidos por los expertos en la materia (*ver*, Debinski y otros (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan, (1993) *Bioconj. Chem.*, 4: 581-585; y Buchner y otros., (1992) *Anal. Biochem.*, 205: 263-270). Debinski y otros., por ejemplo, describe la desnaturalización y reducción de las proteínas del cuerpo de inclusión en la guanidina-DTE. La proteína es entonces doblada de Nuevo en un tampón redox conteniendo glutatona oxidada y L-arginina.

35 Un experto en la materia reconocería que modificaciones pueden hacerse en el GM-CSF, G250, o las proteínas del GM-CSF-G250 sin disminuir su actividad biológica. Pueden hacerse algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión, o incorporación de las moléculas constituyentes en una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, una metionina adicionada al terminal amino para proporcionar un sitio de iniciación, o amino ácidos adicionales situados en cada terminación para crear sitios de restricción convenientemente localizados o codones de terminación. En el Ejemplo 1 se ilustra la expresión recombinante de una proteína de fusión de GM-CSF-G250.

### 60 II. Vacuna de la proteína *in vivo*

Las composiciones inmunogénicas (por *ej.* vacunas) son preferiblemente preparadas a partir de las proteínas de fusión del G250-GM-CSF de esta invención. Las composiciones inmunogénicas que incluyen vacunas pueden ser preparadas como inyectables, como soluciones líquidas, suspensiones o emulsiones. El ingrediente o ingredientes

## ES 2 286 104 T3

inmunogénicos activos pueden ser mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables que sean compatibles con ellos. Dichos excipientes son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero no están limitados a agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos. Las composiciones inmunogénicas y vacunas pueden contener además sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, o adyuvantes para incrementar la efectividad de los mismos.

Las composiciones inmunogénicas del G250-GM-CSF pueden ser administradas de modo parenteral, por inyección subcutánea, intravenosa, intradérmica, intratumoral, o intramuscular. De modo alternativo, las composiciones inmunogénicas formadas de acuerdo con la presente invención, pueden ser formuladas y liberadas de un modo que evoque una respuesta inmune a las superficies de la mucosa. De este modo, la composición inmunogénica puede ser administrada a las superficies de la mucosa por, por ejemplo, las rutas nasal u oral (intragástrica). De modo alternativo, pueden ser deseables otros modos de administración que incluyan supositorios y formulaciones orales. Para los supositorios, los aglutinantes y soportes pueden incluir, por ejemplo, glicoles de polialcaleno o triglicéridos. Dichos supositorios pueden estar formados a partir de mezclas que contienen el ingrediente(s) inmunogénico(s) activo(s) en el orden de aproximadamente 0,5 a aproximadamente el 10%, preferiblemente entre aproximadamente el 1 y el 2%. Las formulaciones orales pueden incluir soportes normalmente utilizados tales como, grados farmacéuticos de sacarina, celulosa y carbonato de magnesio. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos y contener aproximadamente entre el 1 y el 95% del ingrediente(s) activo(s), preferiblemente entre aproximadamente el 20 y aproximadamente el 75%.

Las preparaciones inmunogénicas y vacunas son administradas de un modo compatible con la formulación de la dosis, y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva, inmunogénica y protectora. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, incluyendo, por ejemplo, la capacidad del sistema inmune del individuo a sintetizar anticuerpos, y en el caso en que sea necesario, para producir una respuesta inmune mediada por la célula. Las cantidades precisas del ingrediente activo requeridas para administrar dependen del juicio del médico. Sin embargo, los intervalos de dosis adecuados son fácilmente determinables por un experto en la materia y pueden estar comprendidos entre el orden de microgramos a miligramos del ingrediente(s) activo(s) para la vacuna. Las preparaciones antigénicas de esta invención pueden ser administradas tanto por una dosis única como por dosis múltiples de una cantidad efectiva. Las cantidades efectivas de las composiciones de la invención pueden variar entre 0,01-1.000  $\mu\text{g/ml}$  por dosis, más preferiblemente entre 0,1-500  $\mu\text{g/ml}$  por dosis, y más preferiblemente 10-300  $\mu\text{g/ml}$  por dosis.

También son variables los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis repetidas, pero pueden incluir una administración inicial seguida por subsiguientes administraciones repetidas. La dosis también dependerá de la vía de administración y variará de acuerdo con el tamaño del huésped.

La concentración del ingrediente activo (proteína quimérica) en una composición inmunogénica de acuerdo con la invención está en general comprendida entre aproximadamente el 1 y el 95%.

La inmunogenicidad puede ser mejorada de forma significativa si los antígenos son co-administrados con adyuvantes. Aunque el componente del GM-CSF de la molécula quimérica puede, el mismo actuar como adyuvante, también pueden utilizarse otros adyuvantes. Los adyuvantes intensifican la inmunogenicidad de un antígeno pero no son necesariamente inmunogénicos por sí mismos. Los adyuvantes pueden actuar reteniendo el antígeno localmente cerca del sitio de administración para producir un efecto de deposición que facilita una liberación lenta, sostenida del antígeno a las células del sistema inmune. Los adyuvantes también pueden atraer células del sistema inmune a un depot de antígeno y estimular dichas células para obtener respuestas inmunes.

Los agentes inmunoestimuladores o adyuvantes han sido utilizados durante muchos años para mejorar las respuestas inmunes del huésped a, por ejemplo, las vacunas. Los adyuvantes intrínsecos, tales como los lipopolisacáridos, son normalmente los componentes de las bacterias muertas o atenuadas utilizadas como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que son formulados para intensificar las respuestas inmunes del huésped. De este modo, los adyuvantes han sido identificados para intensificar la respuesta inmune a los antígenos liberados de forma parenteral. Sin embargo, algunos de estos adyuvantes son tóxicos, y pueden causar efectos secundarios indeseables, haciéndolos inadecuados para uso en humanos y muchos animales. Efectivamente, solo el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (a los que se hace referencia de modo colectivo como alum) son utilizados de forma rutinaria como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias.

La eficacia del alum en incrementar las respuestas del anticuerpo a los toxoides de la difteria y el tétanos ha sido bien establecida y una vacuna de HBsAg ha sido utilizada como adyuvante con alum.

Un amplio rango de adyuvantes extrínsecos pueden provocar respuestas inmunes potentes a los antígenos. Estas incluyen saponinas acomplejadas a los antígenos de la proteína de la membrana (complejos inmune estimulantes), polímeros de plurónico con aceite mineral, micobacterias muertas en aceite mineral, adyuvante incompleto de Freund, productos bacterianos, tales como muramil dipéptido (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A, y liposomas.

Para inducir de forma eficiente respuestas inmunes humorales (HIR) e inmunidad mediada por la célula (CMI), los inmunógenos son a menudo emulsionados en adyuvantes. Muchos adyuvantes son tóxicos, inducen granulomas, inflamaciones agudas y crónicas (adyuvante completo de Freund, FCA), histolisis (saponinas y polímeros de Plurónico)

y pirogenicidad, artritis y uveitis anterior (LPS y MDP). Aunque el FCA es un excelente adyuvante y ampliamente utilizado en investigación, no está autorizado para uso en vacunas humanas o de veterinaria debido a su toxicidad.

### III. Vacuna del ADN *in vivo*

En algunas realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión del G250-GM-CSF son incorporados en las vacunas de ADN. Se ha demostrado la capacidad de inyectar directamente ADN, que codifica una proteína antigénica, para obtener una respuesta inmune protectora en numerosos sistemas experimentales (*ver, por ej.,* Conry y otros (1994) *Cancer Res.*, 54: 1164-1168; Cox y otros (1993) *Virol.*, 67: 5664-5667; Davis y otros. (1993) *Hum. Mole. Genet.*, 2: 1847-1851; Sedegah y otros (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91: 9866-9870; Montgomery y otros. (1993) *DNA Cell Bio.*, 12: 777-783; Ulmer y otros (1993) *Science*, 259: 1745-1749; Wang y otros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90: 4156-4160; Xiang y otros (1994) *Virology*, 199: 132-140, *etc.*).

La vacunación a través de ADN inyectado directamente, que codifica una proteína antigénica, para obtener una respuesta inmune protectora a menudo produce tanto respuestas mediadas por células como humorales. Además, han sido descritas las respuestas inmunes reproducibles al ADN que codifica varios antígenos en ratones que permanecen esencialmente durante toda la vida del animal (*ver, por ej.,* Yankauckas y otros (1993) *DNA Cell Biol.*, 12: 771-776).

Tal como se ha indicado anteriormente, las vacunas de ADN son conocidas por los expertos en la materia (*ver, también* las patentes U.S. Nos. 5.589.466 y 5.593.971, PCT/US90/01515, PCT/US93/02338, PCT/US93/048131, PCT/US94/00899, y las solicitudes prioritarias citadas en las mismas. Además de los protocolos de liberación descritos en dichas solicitudes, se han descrito métodos alternativos de liberación de ADN en las patentes U.S. Nos. 4.945.050 y 5.036.006.

Utilizando la tecnología de vacunas de ADN, el ADN del plásmido (u otro vector) que incluye una secuencia que codifica una proteína de fusión unida de forma operable a los elementos reguladores requeridos para la expresión del gen es administrado a individuos (*por ej.* pacientes humanos, mamíferos no-humanos, *etc.*). Las células del individuo toman el ADN administrado y se expresa la secuencia de codificación. El antígeno así producido se transforma en un objetivo frente al que se dirige una respuesta inmune. En el caso presente, la respuesta inmune dirigida contra el componente de antígeno de la molécula quimérica proporciona el beneficio profiláctico o terapéutico a los cánceres de células renales del individuo.

Las vacunas de esta invención pueden ser administradas por una variedad de técnicas incluyendo varios diferentes dispositivos para la administración de sustancias al tejido. La literatura publicada incluye varios artículos de revisión que describen aspectos de la tecnología de vacunas de ADN y citan algunos de las muchas descripciones de resultados obtenidos utilizando la tecnología (*ver, por ej.,* McDonnell y Askari (1996) *New Engl. J. Med.* 334(1): 42-45; Robinson (1995) *Can. Med. Assoc. J.* 152(10): 1629-1632; Fynan y otros (1995) *Int. J. Immunopharmac.* 17(2): 79-83; Pardoll y Beckerleg (1995) *Immunity* 3: 165-169; y Spooner y otros (1995) *Gene Therapy* 2: 173-180.

De acuerdo con la presente invención, se inserta la secuencia de codificación del G250-GM-CSF en un plásmido (u otro vector) que es utilizado a continuación en una composición de la vacuna. En realizaciones preferidas, la secuencia que codifica el G250-GM-CSF es unida de forma operable a los elementos reguladores requeridos para la expresión de la construcción en las células eucarióticas. Los elementos reguladores para la expresión del ADN incluyen, pero no están limitados a un promotor y a una señal de poliadenilación. Además, otros elementos, tales como una región de Kozak, también pueden estar incluidos en la construcción genética. Las señales de iniciación y de terminación son elementos reguladores que son a menudo, pero no necesariamente, considerados parte de la secuencia de codificación. En realizaciones preferidas, las secuencias de codificación de las construcciones genéticas de esta invención incluyen señales de iniciación y de terminación funcionales.

Ejemplos de promotores útiles para practicar la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para humanos, incluyen pero no están limitados a, promotores del Virus Simian 40 (SV40), promotor del Virus de Tumor Mamario de Ratón (MMTV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) tal como el promotor de Repetición del terminal Largo del HIV (LTR), Virus Moloney, ALV, Citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato CMV, el Virus de Epstein Barr (EBV), el Virus del Sarcoma de Rous (RSV) así como promotores de genes humanos tales como Actina humana, Miosina humana, Hemoglobina humana, creatina de músculo humano y metalotioneina humana.

Ejemplos de señales de poliadenilación útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para humanos, incluyen pero no están limitados a las señales de poliadenilación de SV40 y las señales de poliadenilación de LTR. En particular, puede utilizarse la señal de poliadenilación de SV40 que está en el plásmido de pCEP4 (Invitrogen, San Diego, Calif.), a la que se hace referencia como señal de poliadenilación de SV40.

Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión del ADN, también pueden incluirse otros elementos en la molécula de ADN. Dichos elementos adicionales incluyen intensificadores. El intensificador puede ser seleccionado entre el grupo que incluye pero no está limitado a, Actina humana, Miosina humana, Hemoglobina humana, creatina de músculo humano e intensificadores virales tales como los que proceden de CMV, RSV y EBV.

La presente invención se refiere a métodos de introducir el material genético en las células de un individuo con el fin de inducir respuestas inmunes contra los cánceres de células renales. Los métodos comprenden las etapas de administrar al tejido de dicho individuo, ADN que incluye una secuencia de codificación para una proteína de fusión de G250-GM-CSF unida de forma operable a los elementos reguladores requeridos para la expresión. El ADN puede ser administrado en presencia de adyuvantes u otras sustancias que tienen la capacidad de promover la captación de ADN o de reclutar células del sistema inmune al sitio de la inoculación. Debe entenderse que, en realizaciones preferidas, la propia unidad de transcripción es expresada en la célula huésped por factores de transcripción proporcionados por la célula huésped, o proporcionados por una unidad de transcripción de ADN. Una unidad de transcripción de ADN puede comprender ácidos nucleicos que codifican proteínas que sirven para estimular la respuesta inmune tal como la citoquina, proteínas que sirven como un adyuvante y proteínas que actúan como un receptor.

Los vectores que contienen la vacuna basada en el ácido nucleico de la invención pueden ser introducidos en el huésped deseado por métodos conocidos en el estado de la técnica, por ej., transfección, electrofiltración, microinyección, transducción, fusión de células, dextrano de DEAE, precipitación de fosfato cálcico, lipofección (fusión de lisosomas), uso de un disparador de gen, o un transportador del vector de ADN (ver, *por ej.*, Wu y otros (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 963-967; Wu y Wu (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 14621-14624). El sujeto puede ser inoculado de forma intramuscular, intranasal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, tópica, o por un disparador de un gen.

El sujeto también puede ser inoculado por una ruta de la mucosa. La unidad de transcripción de ADN puede ser administrada a una superficie de la mucosa por una variedad de métodos, incluyendo lavado, gotas nasales conteniendo ADN, inhaladores, supositorios o por ADN encapsulado en microesferas. Por ejemplo, la unidad de transcripción de ADN puede ser administrada a una superficie de la mucosa respiratoria, tal como la tráquea o en cualquier superficie incluyendo la lengua o la membrana de la mucosa.

Las unidades de transcripción de ADN son administradas de forma preferible en un medio, es decir, un adyuvante que actúa para favorecer la captación y la expresión de ADN. Preferiblemente, es adecuado un medio inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como un adyuvante para introducir la unidad de transcripción de ADN en el sujeto. Un ejemplo de un adyuvante adecuado es alum (gel de aluminio), aunque incluso una solución salina es aceptable. Otros posibles adyuvantes incluyen moléculas orgánicas tales como esqualinas, iscoms, aceites orgánicos y grasas.

Un inmuno-efector puede ser co-expresado con el ácido nucleico del G250-GM-CSF de la presente invención y por ello intensifica la respuesta inmune al antígeno. Puede administrarse un ácido nucleico que codifica el inmuno-efector en una unidad de transcripción de ADN separada, unida de forma operable a un promotor adecuado de ADN, o de forma alternativa el inmuno-efector puede ser incluido en una unidad de transcripción de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica la construcción del G250-GM-CSF que son unidas de forma operable a uno o más promotores de ADN. Otras realizaciones contienen dos o más de dichos inmuno-efectores unidos de forma operable a uno o más promotores. El ácido nucleico puede consistir en un polímero contiguo, que codifica tanto la proteína quimérica como el inmuno-efector o puede consistir en segmentos de ácido nucleico independiente que codifican de forma individual la molécula quimérica y el inmuno-efector respectivamente. En el último caso, el ácido nucleico puede ser insertado en un vector o los segmentos de ácido nucleico independiente pueden ser situados en vectores separados. El ácido nucleico que codifica el inmuno-efector y la molécula quimérica puede ser unido tanto de forma operativa al mismo promotor de ADN como unido de forma operativa a promotores de ADN separados. La adición de dicho inmuno-efector es conocida en el estado de la técnica. De forma alternativa, las proteínas solubles del inmuno-efector (citoquinas, monoquinas, interferones, etc.) pueden ser administradas directamente al sujeto conjuntamente con el ADN del G250-GM-CSF ADN.

Ejemplos de inmuno-efectores incluyen, pero no están limitados a, interferón- $\alpha$ , interferón- $\gamma$ , interferón- $\beta$ , interferón- $\theta$ , interferón- $\tau$ , factor- $\alpha$  de la necrosis del tumor, factor- $\beta$  de la necrosis del tumor, interleuquina-2, interleuquina-6, interleuquina-7, interleuquina-12, interleuquina-15, molécula co-estimuladora de la célula de B7-1 T, molécula co-estimuladora de la célula B7-2 T, molécula de adhesión de la célula inmune, factor de estimulación de la colonia de granulocitos, factor de estimulación de la colonia de macrófagos de granulocitos, y combinaciones de los mismos.

Cuando es tomada por una célula, la construcción(es) genética(s) puede quedar presente en la célula como una molécula extracromosomal que funciona y/o está integrada en el ADN del cromosoma de la célula. El ADN puede ser introducido en células en donde permanece como material genético separado, *por ej.*, en la forma de un plásmido o plásmidos. De forma alternativa, puede introducirse en la célula el ADN lineal que puede integrar en el cromosoma. Cuando se introduce el ADN en la célula, pueden añadirse los reactivos que favorecen la integración del ADN en los cromosomas. También pueden incluirse en la molécula de ADN las secuencias de ADN que son útiles para favorecer la integración. De forma alternativa, el ARN puede ser administrado a la célula. También se contempla el proporcionar la construcción genética como un minicromosoma lineal incluyendo un centrómero, telómeros y un origen de replicación. Las construcciones génicas pueden quedar como parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o en vectores de microbios recombinantes que viven en las células. Las construcciones de genes pueden ser parte de genomas de vacunas de virus recombinantes en donde el material genético o bien se integra en el cromosoma de la célula o permanece fuera del cromosoma.

Pueden proporcionarse construcciones genéticas con un origen de replicación de mamífero con el fin de mantener la construcción de modo extra-cromosómico y producir múltiples copias de la construcción en la célula. De este modo, por ejemplo, los plásmidos pCEP4 y pREP4 de Invitrogen (San Diego, Calif.) contienen el origen de replicación del

virus de Epstein Barr y la región de codificación EBNA-1 del antígeno nuclear que produce replicación episomal de copia elevada sin integración.

Puede añadirse un elemento adicional que sirve como un objetivo para la destrucción de la célula en el caso en que sea deseable eliminar células que reciben la construcción genética por cualquier razón. Puede incluirse un gen del herpes de timidita quinasa (tk) en una forma expresable en la construcción genética. Puede administrarse el fármaco ganciclovir al individuo y dicho fármaco causará una muerte selectiva de cualquier célula que produzca tk, proporcionando, de este modo la destrucción selectiva de las células con la construcción del ácido nucleico del G250-GM-CSF.

Con el fin de maximizar la producción de proteína, pueden seleccionarse secuencias reguladoras que sean adecuadas para la expresión del gen en las células en las que se administra la construcción. Además, se pueden seleccionar codones que son transcritos de manera más eficiente a la célula. Un experto en la materia puede producir construcciones de ADN que sean funcionales en las células.

La concentración de la dosis es preferiblemente suficiente para proporcionar una respuesta inmune efectiva. La dosis de los vectores recombinantes administrados dependerá de las propiedades de la formulación utilizada, *por ej.*, su vida media en plasma *in vivo*, la concentración de los vectores recombinantes en la formulación, la vía de administración, el sitio y la velocidad de dosificación, la tolerancia clínica del sujeto, y similares, así como en la experiencia del experto en la materia. Pueden utilizarse diferentes dosificaciones en una serie de inoculaciones; el médico puede administrar una inoculación inicial y a continuación aumentar con dosis relativamente menores de los vectores recombinantes o con otros incrementadores.

El intervalo de dosis preferido está comprendido entre aproximadamente 30  $\mu\text{g}$  y aproximadamente 1 mg de ADN, y más preferiblemente entre aproximadamente 50  $\mu\text{g}$  y 500  $\mu\text{g}$ . Pueden utilizarse dosis menores cuando la expresión del plásmido y la inoculación sean optimizadas. Las dosis pueden diferir para los adultos en contraste con los adolescentes o los niños. La inoculación es seguida preferiblemente por incrementadores.

#### IV. *Inmunoterapia adoptiva*

La inmunoterapia adoptiva hace referencia a una aproximación terapéutica para el tratamiento del cáncer o enfermedades infecciosas en la que las células inmunes son administradas a un huésped con el objetivo de que las células medien tanto directa como indirectamente la inmunidad específica (es decir, suban una respuesta inmune dirigida contra) las células del tumor. En realizaciones preferidas, la respuesta inmune da lugar a la inhibición del tumor y/o al crecimiento de células metastáticas y/o a la proliferación y más preferiblemente da lugar a la muerte y/o la resorción de las células neoplásticas. Las células inmunes pueden ser derivadas de un organismo/huésped diferente (células inmunes exógenas) o pueden ser células obtenidas del organismo del sujeto (células inmunes autólogas).

Las células inmunes son activadas de forma típica *in vitro* por un antígeno particular (en este caso el G250), opcionalmente expandido, y a continuación re-infundidas de nuevo en el organismo de origen (*por ej.*, el paciente). Los métodos de llevar a cabo la inmunoterapia adoptiva son bien conocidos por los expertos en la materia (*ver, por ej.*, las patentes U.S. 5.081.029, 5.985.270, 5.830.464, 5.776.451, 5.229.115, 690.915, y similares).

En realizaciones preferidas, esta invención contempla numerosas modalidades de inmunoterapia adoptiva, por ej. tal como se ha descrito anteriormente. En una realización, las células dendríticas (*por ej.* las células aisladas del paciente o las células dendríticas autólogas) son pulsadas con G250 o la molécula quimérica del G250-GM-CSF e inyectadas de nuevo en el sujeto en donde están presentes y activan las células inmune *in vivo*. Además, o de forma alternativa, las células dendríticas pueden ser transfectadas con los ácidos nucleicos que codifican la proteína de fusión del G250-GM-CSF y a continuación la reintroducen en un paciente.

En otra realización, el macrófago modificado o la célula dendrítica (células que presentan antígeno) son pulsadas con proteínas de fusión del G250-GM-CSF o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión del G250-GM-CSF, y utilizadas a continuación para estimular los linfocitos de sangre periférica o TIL en cultivos y activar los CTLs dirigidos a G250 que a continuación son infundidos en el paciente.

De un modo similar, los fibroblastos, y otros APCs, o células tumorales (*por ej.* RCCs) son transfectadas con un ácido nucleico que expresa un G250-GM-CSF y utilizadas para activar las células del tumor o PBLs *ex vivo* para producir CTLs dirigidas a G250 que pueden ser infundidas en el paciente a continuación.

De un modo similar se administran varios "agentes de transfección" incluyendo, pero no limitado a los vectores de terapia génica (*por ej.* adenovirus, adenovirus de gutless, retrovirus, lantivirus, virus adeno-asociados, virus de vacunas *etc*), lípidos catiónicos, liposomas, dendrímeros, y similares, conteniendo o complejados con un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión del G250-GM-CSF a PBLs o a células del tumor (*por ej.* RCCs) *ex vivo* para producir CTLs dirigidas a G250.

En unas realizaciones preferidas de forma particular, se utilizan las células tumorales (*por ej.* las células RCC) transfectadas para expresar una proteína del G250-GM-CSF para proporcionar una vacuna genérica efectiva frente a tumores que expresan el antígeno del G250 o un antígeno que tiene reactividad cruzada con el G250.

## ES 2 286 104 T3

Utilizando las enseñanzas que se proporcionan en la presente memoria, pueden desarrollarse con facilidad otras modalidades terapéuticas que utilizan los polipéptidos del G250-GM-CSF o los ácidos nucleicos del G250-GM-CSF.

5 Tal como se ha indicado anteriormente, en una realización las células inmunes son derivadas de linfocitos de la sangre periférica o TILs (*por ej.* derivados de una suspensión tumores/tumor. Los linfocitos utilizados para la activación *in vitro* incluyen, pero no están limitados a, linfocitos T, células que presentan varios antígenos (*por ej.* monocitos, células dendríticas, células B, *etc.*) y similares. La activación puede implicar poner en contacto una célula que presente el antígeno con la molécula(s) quimérica de esta invención que entonces presenta el antígeno de G250 (o un fragmento del mismo), *por ej.*, en las moléculas HLA de clase I y/o en las moléculas HLA de clase II, y/o puede implicar poner en contacto una célula (*por ej.* linfocito T) directamente con la molécula quimérica. Las células que presentan antígeno (APCs), incluyendo pero no limitadas a los macrófagos, las células dendríticas y las células B, son obtenidas preferiblemente por producción *in vitro* a partir de raíces y células madre a partir de la sangre periférica humana o médula ósea tal como se ha descrito por Inaba y otros, (1992) *J. Exp. Med.* 176:1693-1702.

15 La activación de las células inmunes puede tomar diferentes formas. Estas incluyen, pero no están limitadas a la adición directa de la molécula quimérica a los linfocitos de la sangre periférica (PBLs) o a los linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) en el cultivo, carga de las células que presentan el antígeno (*por ej.* monocitos, células dendríticas, *etc.*) con la molécula quimérica en el cultivo, transfección de las células que presentan el antígeno, o PBLs, con un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión quimérica del GM-CSF-G250, y similares.

20 El APC puede ser obtenido por cualquiera de los diferentes métodos bien conocidos en el estado de la técnica. En un aspecto preferido se utilizan los macrófagos humanos y/o las células dendríticas, obtenidas de los donantes de sangre humana. Por vía del ejemplo pero no limitado al mismo, pueden obtenerse los PBLs (*por ej.* células T) del modo siguiente:

25 Se extraen aproximadamente 200 ml de sangre venosa heparinizada por punción en vena y se aísla el PBL por centrifugación con gradiente Ficoll-Hypaque, rindiendo aproximadamente entre 1 y  $5 \times 10^8$  PBL, dependiendo del contaje de linfocitos del donante(s). Se lavan los PBL en solución salina con tampón fosfato y se suspenden de Nuevo a aproximadamente  $2 \times 10^5$  /ml en un medio RPMI 1640 conteniendo un 10% de suero humano normal inactivado con calor; se hará referencia a este medio como "medio completo".

30 De un modo similar, se aíslan otras células (*por ej.* células mononucleares) a partir de la sangre periférica de un paciente (preferiblemente el paciente a tratar), por centrifugación de gradiente de Ficoll-Hypaque y se siembra en las placas de cultivo del tejido que son pre-recubiertas con el suero del propio paciente o con otro suero humano AB+. Las células son incubadas a 37°C durante 1 hora, y a continuación las células no adherentes son separadas por pipeteo. Sobre las células adherentes que quedan en la placa, se añade una solución salina tamponada con fosfato en EDTA 1 mM fría (4°C) y las placas se dejan a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las células se recogen, se lavan con tampón RPMI y se suspenden en tampón de RPMI. Pueden obtenerse números incrementados de macrófagos por incubación a 37°C con el factor de estimulación de la colonia de macrófagos (M-CSF); pueden obtenerse números incrementados de células dendríticas por incubación con el factor de estimulación de la colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) tal como ha sido descrito en detalle por Inaba y otros (1992) *J. Exp. Med.* 176:1693-1702, y más preferiblemente por incubación con las moléculas quiméricas de G250-GM-CSF de esta invención y, opcionalmente IL-4).

45 Las células (*por ej.* APCs) son sensibilizadas poniéndolas en contacto/incubándolas con la molécula quimérica. En algunas realizaciones, la sensibilización puede ser incrementada poniendo en contacto las APCs con la unión monocovalente de la proteína(s) de choque (hsp) a la molécula quimérica. Se ha demostrado que la unión monocovalente del hsp a las moléculas antigénicas puede incrementar la sensibilización del APC en las aplicaciones inmunoterapéuticas adoptivas (*ver, por ej.*, patente U.S. No. 5.885.270).

50 En una realización preferida, *por ej.* tal como se ha descrito en los ejemplos de la presente invención, se añadió la proteína de fusión del G250-GM-CSF (con IL-4 opcional) en los pacientes PBMC *ex vivo* y a continuación se cultivó a 37°C durante 7 días. Se re-estimuló el cultivo semanalmente con IL-2 y proteína de fusión, *por ej.* durante 4 a 5 ciclos hasta que el cultivo muestra la actividad anti-tumoral frente a células de tumor de riñón autólogas que muestran el G250. A continuación se reinfundieron los CTLs de nuevo en el paciente.

55 Para la re-infusión, se lavaron las células tres veces y se suspendieron de nuevo en un medio fisiológico preferiblemente estéril, a una concentración conveniente (*por ej.*  $1 \times 10^7$  /ml) por inyección en un paciente. A continuación se filtró la suspensión de la célula, *por ej.*, a través de una malla estéril de 110 y se puso en paquetes de transferencia Fenwall. Se ensayaron las muestras de las células para determinar la presencia de microorganismos incluyendo hongos, bacterias aeróbicas y anaeróbicas, y micoplasma. Una muestra de las células es retenida de forma opcional para valoración inmunológica con el fin de demostrar la inducción de inmunidad específica.

65 En una realización preferida, antes del uso en inmunoterapia, se ensayaron los linfocitos estimulados para determinar la reactividad inmune mediada por la célula frente a las células del tumor soportando el antígeno de G250. Puede examinarse el PBL/TIL, después de la estimulación con las moléculas quiméricas de esta invención con respecto a la expresión de la superficie de la célula de los marcadores de la célula T y B por análisis de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína a los antígenos de las células T y B. La expresión de

los marcadores de las células T conocidas, tal como los antígenos CD4 y CD8, confirman la identidad de los linfocitos activados como células T.

A continuación, las células activadas (*por ej.* las células T activadas) son opcionalmente ensayadas para determinar la reactividad frente al G250. Esto se conseguiría por cualquiera de las diferentes técnicas conocidas en el estado de la técnica para ensayar la inmunidad específica mediada por la célula. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un ensayo de citotoxicidad, que mide la capacidad de las células T estimuladas para matar las células tumorales que tienen el antígeno G250 *in vitro*, mediante la incubación de los linfocitos con las células del tumor que portan G250 conteniendo un marcador (*por ej.* células marcadas con Cr<sup>51</sup>) y midiendo la liberación de Cr<sup>51</sup> con la lisis: dichos ensayos han sido descritos (ver, *por ej.*, Zarling y otros (1986) *J. Immunol.* 136: 4669). El PBL activado también puede ser ensayado para determinar la actividad de la célula auxiliar T por medición de su capacidad para proliferar, tal como ha sido mostrado por la incorporación de la timidina H<sup>3</sup>, después de la estimulación, y/o por medición de su capacidad para producir linfoquinas tales como la IL-2 o el interferón con la estimulación, en ausencia del IL-2 exógeno. También pueden utilizarse otros ensayos de inmunidad mediada por la célula específica conocidos en el estado de la técnica, tal como los ensayos de inhibición de la adherencia de leucocitos (Thomson, D. M. P. (ed.), 1982, *Assessment of Immune Status by the Leukocyte Adherence Inhibition Test*, Academic Press, New York).

La inoculación de las células activadas es preferible a través de la administración sistémica. Las células pueden ser administradas de forma intravenosa a través de un catéter venoso central o en una vena periférica larga. Otros métodos de administración (por ejemplo, la infusión directa en una arteria) se encuentran comprendidos dentro del alcance de la invención. Inicialmente se infundieron aproximadamente  $1 \times 10^8$  células y las restantes se infundieron durante las siguientes varias horas. En algunos regímenes, los pacientes pueden recibir opcionalmente además una dosis adecuada de un modificador de la respuesta biológica incluyendo pero no limitado a las citoquinas IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF u otros factores de crecimiento de citoquinas, TGF $\beta$  antisentido, IL-10 antisentido, y similares. De este modo, en algunos pacientes, puede utilizarse la IL-2 humana recombinante y se infundirá de forma intravenosa cada 8 horas empezando al tiempo de la infusión de la célula T. Las inyecciones de IL-2 serán preferiblemente a las dosis de entre 10.000 y 100.000 unidades/kg de peso corporal, tal como se ha utilizado previamente en pacientes de cáncer (Rosenberg y otros (1985) *N. Engl. J. Med.* 313: 1485). La infusión de IL-2 puede ser continuada durante varios días después de la infusión de las células T activadas si es tolerada por el paciente.

Puede utilizarse el tratamiento por inoculación de, *por ej.*, células T activadas sólo o conjuntamente con otros regímenes terapéuticos incluyendo pero no limitado a la administración de IL-2 (tal como se ha descrito *supra*), otros quimioterapéuticos (*por ej.* doxirubicina, vinblastina, vincristina, *etc.*), radioterapia, cirugía, y similares.

Tal como se ha indicado anteriormente, las células pueden opcionalmente, ser expandidas en el cultivo. Esta expansión puede conseguirse por la estimulación repetida de las células T con la construcción de G250-GM-CSF de esta invención con o sin IL-2 o por crecimiento en un medio que contiene sólo IL-2. Otros métodos de cultivo de las células T (por ejemplo con otros linfocitos, factores de crecimiento, u otras moléculas bioactivas) también están comprendidos dentro del alcance de esta invención. Por ejemplo, los anticuerpos o sus moléculas derivadas que reconocen los antígenos Tp67 o Tp44 en las células T han mostrado que aumentan la proliferación de células T activadas (Ledbetter y otros (1985) *J. Immunol.* 135: 2331), y pueden ser utilizados durante la activación *in vitro* para incrementar la proliferación. Se ha encontrado que el interferón aumenta la generación de células T citotóxicas (Zarling y otros (1978) *Immunol.* 121: 2002), y puede ser utilizado durante la activación *in vitro* para aumentar la generación de células T citotóxicas frente a las células de cáncer que portan el G250.

La descripción proporcionada anteriormente detalla varios métodos de aislamiento, activación, y expansión de PBL. Sin embargo, la presente invención proporciona el uso de las construcciones del G250-GM-CSF en varias formas, y modificaciones y adaptaciones al método para acomodar estas variaciones. De este modo, las modificaciones de varias aproximaciones inmunoterapéuticas adoptivas que utilizan las construcciones del G250-GM-CSF se encuentran dentro del alcance de la invención.

#### V. Transferencia de genes para la terapia sistémica o para la inmunoterapia adoptiva

Además del uso de la proteína quimérica del GM-CSF-G250 quimérico para la activación en inmunoterapia adoptiva, las células, (*por ej.*, APCs, PBLs, fibroblastos, TILs, o células de tumor RCC) pueden ser transfectadas con un vector que exprese la molécula quimérica y utilizada para la inmunoterapia adoptiva y/o la terapia de vacuna.

En una realización preferida, el ácido(s) nucleico(s) que codifican las proteínas de fusión del GM-CSF-G250 son clonados en vectores de terapia génica que son competentes para las células transfectadas (tal como las células humanas o de otros mamíferos) *in vitro* y/o *in vivo*.

Se han utilizado varias aproximaciones para introducir los ácidos nucleicos en células *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*. Estas aproximaciones incluyen la liberación de genes basados en lípidos o liposomas (WO 96/18372; WO 93/24640; Mannino y Gould-Fogerite (1988) *BioTechniques* 6(7): 682-691; Rose U.S. Pat No. 5.279.833; WO 91/06309; y Felgner y otros (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413-7414) y los vectores retrovíricos de replicación defectuosa que alojan una secuencia de polinucleótidos terapéutica como parte del genoma retroviral (ver, *por ej.*, Miller y otros (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:4239 (1990); Kolberg (1992) *J NIH Res.* 4: 43, y Cornetta y otros (1991) *Hum. Gene Ther.* 2: 215).

Para una revisión de procedimientos de terapia génica. ver, *por ej.*, Anderson, *Science* (1992) 256: 808-813; Nabel y Felgner (1993) *TIBTECH* 11: 211-217; Mitani y Caskey (1993) *TIBTECH* 11: 162-166; Mulligan (1993) *Science*, 926-932; Dillon (1993) *TIBTECH* 11: 167-175; Miller (1992) *Nature* 357: 455-460; Van Brunt (1988) *Biotechnology* 6(10): 1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology y Neuroscience* 8: 35-36; Kremer y Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51 (1) 31-44; Haddada y otros (1995) in *Current Topics in Microbiology y Immunology*, Doerfler y Böhm (eds) Springer-Verlag, Heidelberg Germany; y Yu y otros, (1994) *Gene Therapy*, 1:13-26.

Los vectores retrovirales ampliamente utilizados incluyen aquellos basados en el virus de la leucemia de murino (MuLV), el virus de la leucemia del simio gibón (GaLV), el virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV), el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), alfavirus, y combinaciones de los mismos (*ver, por ej.*, Buchscher y otros (1992) *J. Virol.* 66(5) 2731-2739; Johann y otros (1992) *J. Virol.* 66 (5):1635-1640 (1992); Sommerfelt y otros, (1990) *Virol.* 176:58-59; Wilson y otros (1989) *J. Virol.* 63:2374-2378; Miller y otros, *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); Wong-Staal y otros, PCT US94/05700, y Rosenburg y Fauci (1993) en *Fundamental Immunology*, tercera edición Paul (ed) Raven Press, Ltd., New York y las referencias del mismo, y Yu y otros (1994) *Gene Therapy, supra*; U.S. Patent 6.008.535, y similares).

Los vectores son opcionalmente pseudotipados para extender el intervalo del huésped del vector a las células que no están infectadas por el retrovirus que corresponde al vector. Por ejemplo, se ha utilizado la glicoproteína que envuelve el virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) para construir los vectores del HIV VSV-G-pseudotipados HIV que pueden infectar las células de raíz hematopoiética (Naldini y otros (1996) *Science* 272:263, y Akkina y otros (1996) *J Virol* 70:2581).

También son utilizados los vectores de base (AAV) adeno-asociados para translucir las células con los ácidos nucleicos objetivo, *por ej.*, en la producción *in vitro* de ácidos nucleicos y péptidos, y en los procedimientos de terapia génica *in vivo* y *ex vivo*. Ver, West y otros (1987) *Virology* 160:38-47; Carter y otros (1989) patente U.S. No. 4.797.368; Carter y otros WO 93/24641 (1993); Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351 para una revisión sobre los vectores de AAV.

La construcción de vectores de AAV recombinante ha sido descrita en un número de publicaciones, incluyendo Lebkowski, patente U.S. No. 5.173.414; Tratschin y otros (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5(11):3251-3260; Tratschin, y otros (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4: 2072-2081; Hermonat y Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6466-6470; McLaughlin y otros (1988) y Samulski y otros (1989) *J. Virol.*, 63:03822-3828. Las líneas celulares que pueden ser transformadas por rAAV incluyen las descritas en Lebkowski y otros (1988) *Mol. Célula. Biol.*, 8:3988-3996. Otros vectores virales adecuados incluyen el virus del herpes, lentivirus, y virus de vacuna.

Además de los vectores virales, son asequibles un número de métodos de transfección no virales. Dichos métodos incluyen, pero no están limitados a los métodos de electrofiltración, transfección de fosfato cálcico, liposomas, complejos de lípidos catiónicos, emulsiones de aceite en agua, polietilen iminas, y dendrímeros.

Los liposomas se describieron por primera vez en 1965 como un modelo de membranas celulares y se aplicaron rápidamente para la liberación de sustancias a las células. Los liposomas atraparon el ADN por uno de los dos mecanismos que han dado lugar a su clasificación tanto en liposomas catiónicos como en liposomas sensibles al pH. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que interaccionan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Los liposomas catiónicos consisten típicamente en un lípido y un co-lípido cargado positivamente. Los co-lípidos normalmente utilizados incluyen dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) o dioleoil fosfatidilcolina (DOPC). En la mayoría de los casos se requieren los co-lípidos, también llamados lípidos auxiliares, para la estabilización del complejo de liposomas. Una variedad de formulaciones de lípidos cargados positivamente son comercialmente asequibles y muchos otros se encuentran bajo desarrollo. Dos de los lípidos catiónicos más frecuentemente citados son la lipofectamina y la lipofectina. La lipofectina es un lípido catiónico comercialmente disponible que fue descrito por primera vez por Phil Feigner en 1987 para liberar genes a las células en cultivo. La lipofectina es una mezcla del cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi) propil]-N-N-N-trimetil amonio (DOTMA) y DOPE.

El ADN y la lipofectina o la lipofectamina interaccionan de forma espontánea para formar complejos que tienen un 100% de eficiencia de carga. En otras palabras, esencialmente todo el ADN es complejoado con el lípido, siempre que esté disponible suficiente cantidad de lípido. Se asume que la carga negativa de la molécula de ADN interacciona con los grupos cargados positivamente del DOTMA. La relación lípido:ADN y las concentraciones de lípido totales utilizadas en la formación de estos complejos son extremadamente importantes para la transferencia de genes eficiente y varían con la aplicación. Se ha utilizado la lipofectina para liberar ADN lineal, ADN de plásmido, y ARN a una variedad de células en cultivo. Poco tiempo después de su introducción, se ha mostrado que la lipofectina puede ser utilizada para liberar genes *in vivo*. Después de la administración intravenosa de los complejos de lipofectina-ADN, tanto el pulmón como el hígado mostraron una marcada afinidad por la captación de estos complejos y la expresión del transgen. La inyección de estos complejos en otros tejidos ha tenido resultados variables y, para la mayor parte, son mucho menos eficientes que la transferencia de gen mediada por lipofectina tanto en el pulmón como en el hígado.

Los liposomas sensibles al pH, o cargados negativamente, atrapan el ADN más que formar complejos con el mismo. Debido a que tanto el ADN como el lípido están cargados de forma similar, se produce repulsión más que formación de complejos. Incluso, algún ADN consigue estar atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. En algunos casos, estos liposomas son desestabilizados por un valor de pH bajo y de ahí el término sensible al pH.

Hasta la fecha, los liposomas catiónicos han sido mucho más eficientes a la liberación de genes tanto *in vivo* como *in vitro* que los liposomas sensibles al pH. Los liposomas sensibles al pH tienen el potencial de ser mucho más eficientes a la liberación *in vivo* que sus contrapartes catiónicas y deben ser capaces de serlo con una toxicidad y una interferencia de la proteína del suero reducidas.

5 En otra aproximación se han utilizado los dendrímeros acomplejados con el ADN para transfectar las células. Dichos dendrímeros incluyen, pero no están limitados a, dendrímeros "starburst" y varios policaciones de dendrímeros.

10 Los policaciones de dendrímeros son compuestos poliméricos de tres dimensiones, oligoméricos altamente ordenados y/o compuestos poliméricos formados de modo típico en una molécula núcleo o iniciador designado por secuencias de reacción reiterativas que adicionan los oligómeros y/o los polímeros y proporcionan una superficie externa que es cambiada de forma positiva. Estos dendrímeros pueden ser preparados tal como se ha descrito en PCT/US83/02052, y las patentes U.S. Nos. 4.507.466, 4.558.120, 4.568.737, 4.587.329, 4.631.337, 4.694.064, 4.713.975, 4.737.550, 4.871.779, 4.857.599.

15 De forma típica, los policaciones de *dendrímero* comprenden una molécula de núcleo sobre la que se adicionan los polímeros. Los polímeros pueden ser oligómeros o polímeros que comprenden grupos terminales capaces de adquirir una carga positiva. Las moléculas de núcleos adecuados comprenden al menos dos residuos reactivos que pueden ser utilizados para la unión de la molécula del núcleo a los oligómeros y/o polímeros. Ejemplos de los residuos reactivos son el hidroxilo, éster, amino, imino, imido, haluro, carboxilo, carboxihaluro, maleimida, ditiopiridilo, y sulfidrido, entre otros. Las moléculas del núcleo preferidas son amoniaco, tris-(2-aminoetil)amina, lisina, ornitina, pentaeritritol y etilenediamina, entre otras. También son adecuadas las combinaciones de estos residuos así como otros residuos reactivos.

25 Los oligómeros y polímeros adecuados para la preparación de los policaciones de *dendrímero* de la invención son oligómeros farmacéuticamente aceptables y/o polímeros que son bien aceptados en el cuerpo. Ejemplos de estos son las poliamidoaminas derivadas de la reacción de un éster de alquilo de un ácido carboxílico  $\alpha,\beta$ -etilenicamente insaturado o una  $\alpha,\beta$ -amida etilenicamente insaturada y una alquilen poliamina o una polialquilen poliamina, entre otras. Las preferidas son el acrilato de metilo y la etilendiamina. El polímero está unido de modo preferiblemente covalente a la molécula del núcleo.

30 Los grupos terminales que pueden estar unidos a los oligómeros y/o polímeros deben ser capaces de adquirir una carga positiva. Ejemplos de estos son los azoles y las aminas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias alifáticas y aromáticas y azoles, que pueden estar sustituidas con S o O, guanidinio, y combinaciones de los mismos. Los grupos terminales catiónicos están unidos de forma preferible de un modo covalente a los oligómeros y/o polímeros. Los grupos catiónicos terminales preferidos son aminas y guanidinio. Sin embargo, también pueden utilizarse otros. Los grupos catiónicos terminales pueden estar presentes en una proporción de aproximadamente entre el 10 y el 100% de todos los grupos terminales del oligómero y/o polímero, y más preferiblemente aproximadamente entre el 50 y el 100%.

35 El policación del *dendrímero* también puede comprender entre aproximadamente el 0 y el 90% de los residuos reactivos terminales diferentes de los grupos catiónicos. Los residuos reactivos terminales adecuados diferentes de los grupos catiónicos terminales son el hidroxilo, ciano, carboxilo, sulfidrido, amida y tioéter, entre otros, y combinaciones de los mismos. Sin embargo, también pueden utilizarse otros grupos.

40 El policación del *dendrímero* está generalmente y de modo preferible asociado de forma no covalente con el polinucleótido. Esto permite una fácil disociación o desmontaje de la composición una vez ésta se ha liberado en la célula. El policación del *dendrímero* típico para uso en la presente invención tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 2.000 y 1.000.000 Da, y más preferiblemente entre aproximadamente 5.000 y 500.000 Da. Sin embargo otros pesos moleculares también son apropiados. Los policaciones del *dendrímero* preferidos tienen un radio de aproximadamente entre 11 y 60 Å, y más preferiblemente de aproximadamente entre 15 y 55 Å. Sin embargo, también son adecuados otros tamaños. Los métodos para la preparación y uso de los dendrímeros en la terapia génica son bien conocidos por los expertos en la materia y se describen en detalle, por ejemplo, en la patente U.S. No. 5.661.025.

45 En los casos en que sea apropiado, pueden utilizarse juntos dos o más tipos de vectores. Por ejemplo, un vector de plásmido puede ser utilizado conjuntamente con liposomas. En el caso de vectores no-virales, el ácido nucleico puede ser incorporado en los vectores no virales por cualquier medio adecuado conocido en el estado de la técnica. Para los plásmidos, esto implica típicamente ligar la construcción en un sitio de restricción adecuado. Para vectores tales como los liposomas, las emulsiones aceite en agua, las polietilen aminas y los dendrímeros, el vector y la construcción pueden ser asociados por mezcla bajo condiciones adecuadas conocidas en el estado de la técnica.

#### VI. Administración de GM-CSF-G250 con otros agentes

50 En varias realizaciones, pueden administrarse conjuntamente las proteínas de fusión del GM-CSF-G250, o los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión del GM-CSF-G250 con otros agentes. Dichos agentes incluyen, pero no están limitados a, varios agentes quimioterapéuticos (*por ej.* doxorubicina y derivados, taxol y derivados, vinblastina, vincristina, derivados de camptotecina, y similares, varias citoquinas (*por ej.* IL-2, IL-7, IL-12, IFN, *etc.*), varias citotoxinas (*por ej.* Pseudomonas exotoxina y derivados, difteria toxina y derivados, ricina y derivados, abrina

y derivados, timidin quinasa y derivados), moléculas antisentido (*por ej.* IL-10 antisentido, TGF- $\beta$ , *etc.*), anticuerpos frente a varios factores/receptores de crecimiento (*por ej.* anti-VEGF, anti-EGFR, anti-IL-8, anti-FGF *etc.*), y similares. Los métodos de esta invención también pueden ser utilizados como un adjunto a la cirugía y/o radioterapia.

## 5 VII. Kits

Los kits que proporciona la invención incluyen materiales/reactivos útiles para la vacuna utilizando un antígeno de polipéptido (polipéptido del GM-CSF-G250) y/o vacuna de ADN, y/o inmunoterapia adoptiva. Los kits optimizados para la vacuna de polipéptido de GM-CSF-G250 preferiblemente comprenden un recipiente que contiene una molécula quimérica del GM-CSF-G250. La molécula puede proporcionarse en solución, en suspensión o como un polvo (*por ej.* liofilizado). El GM-CSF-G250 puede ser envasado con un excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable, *por ej.* en una forma de dosis unitaria.

De un modo similar, los kits optimizados para la vacuna de ADN de una construcción que codifica un polipéptido del GM-CSF-G250 comprenden de modo preferible un recipiente que contiene un ácido nucleico del GM-CSF-G250 (*por ej.* un ADN). Junto con el polipéptido, puede proporcionarse el ácido nucleico en solución, en suspensión, o como un polvo (*por ej.* liofilizado). El nucleico del GM-CSF-G250 puede ser envasado con un excipiente y/o agente(s) de facilitación farmacéuticamente apropiado, *por ej.* en una forma de dosis unitaria. El kit puede incluir además reactivos y/o dispositivos para facilitar la liberación del ácido nucleico al sujeto (*por ej.* humano o mamífero no humano).

Los kits optimizados para la inmunoterapia adoptiva incluyen de forma típica un recipiente que contiene un polipéptido del GM-CSF-G250 quimérico tal como se ha descrito anteriormente. Los kits pueden incluir de forma opcional un ácido nucleico (*por ej.* un vector) que codifica una proteína de fusión del GM-CSF-G250 para la transfección *ex vivo* de células. Dichos kits también pueden incluir, de forma opcional, varias líneas celulares (*por ej.* RCC) y/o reactivos (*por ej.* IL-2) para facilitar la expansión de las células activadas.

Los kits pueden incluir, de forma opcional, reactivos adicionales (*por ej.* tampones, fármacos, citoquinas, líneas de células/célula, medios de cultivos de células, *etc.*) y/o dispositivos (*por ej.* jeringas, dispositivos biolísticos, *etc.*) para la práctica de los métodos de esta invención.

Además, los kits pueden incluir materiales con instrucciones conteniendo direcciones (*es decir*, protocolos) para la práctica de los métodos de esta invención. De este modo los materiales con instrucciones típicas enseñarán el uso de las moléculas quiméricas del GM-CSF-G250 (o el ácido nucleico que las codifica) como vacunas, vacunas de A, o agentes inmunoterapéuticos adoptivos en el tratamiento de los cánceres de células renales. Aunque los materiales de instrucciones comprenden de forma típica materiales escritos o imprimidos no están limitados a los mismos. Cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y de comunicarlas al utilizador último es contemplado por esta invención. Dichos medios incluyen, pero no están limitados a medios de almacenamiento electrónicos (*por ej.*, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips.), medios ópticos (*por ej.*, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir cualquier dirección a sitios de Internet que proporcione dichos materiales de instrucciones.

## 40 Ejemplos

Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

### 45 Ejemplo 1

#### *Clonación y expresión del GM-CSF y de la proteína de fusión G250*

Este ejemplo describe la clonación, la expresión y la purificación de una proteína de fusión del GM-CSF-G250.

#### 50 *Clonación del gen de fusión GM-CSF-G250 humano*

Se rompió un cADN de GM-CSF humano de longitud completa (0.8 kb) del vector del plásmido p91023(B) (Wong y otros (1985) Science 228: 810-815) con la endonucleasa de restricción EcoRI. Se insertaron los sitios Eco RI (5') y NotI (3') en el cADN de GM-CSF por la PCR (0.4 kb) utilizando un primer primero: gcggaattc(atg)tgctgcagagc (5' GM-CSF EcoRI subrayado, SEC ID NO:5) y un segundo primero: gaggagggcggccgc(ctc)ctggactggctc (3' GM-CSF NotI subrayado, para eliminar el codón de interrupción, SEC ID NO:6).

Se introdujeron los sitios NotI (5') y His-interrupción-Gb1 II (3') en el cADN del G250 de longitud completa G250 cADN (1.6 kb) por la PCR utilizando los siguientes primeros: 5' G250 (*NotI*):

gaggagcggcc(gct)cccctgtgccc (elimina el codón de inicio, SEC ID NO:7), 3' G250-His-codón de interrupción-Bgl II: (1) gcagagatct(cta)atggtgatggtgatggtggctccagctcggcracctc (SEC ID NO:8; entre paréntesis = última interrupción, segundo subrayado = 8 His), (2)

65 ggagagatct(cta)atgatgatgatgatgatgatggctccagctcggctacctc (SEC ID NO:9, entre paréntesis - última interrupción, Segundo subrayado = 8 His).

## ES 2 286 104 T3

Los fragmentos estuvieron ligados produciendo M-CSF-NotI-G250-His-interrupción-Bgl II del modo siguiente:

5' (gag)ggcggcc(gct)cccctgtgcccc (resto del Gm-CSF-G250) (SEC ID NO:10 ; en donde (gag) es el ultimo del GM-CSF, y (gct) es el primero del G250.

5

Se insertó el gen de fusión 250 en un sitio del gen de polihedrina con base en el vector de transferencia del baculovirus pVL 1393 (PharMingen). En particular, se cortó el plásmido pVL 1393 con las endonucleasas de restricción EcoRI y Bgl II y se insertó la construcción del EcoRI-GM-CSF-G250-his-interrupción-Bgl II en el vector de corte.

10

Se transfectaron las células de insecto (células sf8) utilizando el kit de transfección BaculoGold (Pharmingen). Esto implicó la co-transfección de ADN del BaculoGold virus linealizado y del ADN del plásmido recombinante conteniendo el gen de fusión del GM-CSF-G250 en las células de insecto (células sf8). Se amplificaron los baculovirus recombinantes y se ensayaron las placas para valorar los virus.

15

Se purificó la proteína G250-GM-CSF de acuerdo con los protocolos proporcionados en el PharMigen Instruction Manual, 4ª Edición, Julio 1997, página 41. Se prepararon brevemente los gránulos por una nueva suspensión de los gránulos de agarosa Ni-NTA. Se introdujeron 2 ml de los gránulos en una columna de cromatografía de 10 ml (aproximadamente una unión de 7,5-15 mg de 6 x la proteína de fusión His). Se dejó que los gránulos se depositaran en la columna y se escurrió el etanol conservante. A continuación se lavaron los gránulos con 6 x tampón de lavado His (Cat # 21472A, PharMigen) con 2 veces 7,5 ml de 6x tampón de lavado de His.

20

Se prepare un lisado de células por re-suspensión de un pellet de células en tampón de lisis de células de insecto enfriado en hielo (Cat # 21425A, PharMigen) conteniendo un cóctel del inhibidor de proteasas reconstituido (Cat # 21426Z, PharMigen). Se rompieron las células en hielo durante 45 minutos utilizando 1 ml de tampón de lisis por 2 x 10<sup>7</sup> células). Se transfirió el lisado a un tubo de centrifuga limpio y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 minutos o se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Se separó el sobrenadante de la columna y se descartó el pellet. Se reservaron 150 µl del lisado para un ensayo sobre gel de SDS-PAGE o para un ensayo de membrana Western y determinación de la concentración de proteína.

25

30

Se añadió el lisado para equilibrar los gránulos de agarosa Ni-NTA por purificación de afinidad en una columna. Se cargó lentamente el sobrenadante o se unieron los gránulos en un tubo cónico de 15 ml con el lisado durante 1 hora a 4°C. Se reservó la fracción a través del flujo.

35

Se lavó la columna con 10-15 ml de tampón de lavado 6 x His (Cat # 21472A, PharMigen) y la columna se lavó para escurrir sin secado. Se repitió la etapa de lavado hasta que el A<sub>280</sub> de lavado fue menor de 0,01 (aproximadamente 4 lavados).

40

A continuación se eluyó la proteína de fusión con imidazol. Brevemente se añadieron 4,5 ml del 6 x tampón de elución His (Cat # 21476A, PharMigen) incluyendo imidazol del modo siguiente:

- i. 0,1 M de imidazol con 6 x tampón de elución His;
- ii. 0,2 M de imidazol con 6 x tampón de elución His;
- iii. 0,3 M de imidazol con 6 x tampón de elución His;
- iv. 0,4 M de imidazol con 6 x tampón de elución His;
- v. 0,5 M de imidazol con 6 x tampón de elución His;

50

Se mantuvo la velocidad de elución a un valor de menor o igual que 1 ml por minuto. Se recogieron las fracciones eluidas (200 µL).

55

Después del análisis con el gel SDS-PAGE y del ensayo de membrana Western, se recogieron y agruparon las fracciones limpias y correctas, se dializaron frente a PBS y se repitió de nuevo la purificación de Ni-NTA.

60

Una vez más después del análisis con el gel SDS-PAGE y del ensayo de membrana Western, se recogieron las fracciones limpias y correctas y se agruparon, se sometieron a diálisis frente a PBS. Además la purificación se llevó a cabo en una columna de sefarosa Q. Se equilibró 1,0 ml de la columna con tampón X de NaCl 50 mM (20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 20% glicerol, y 0,5 mM PMSF). Se cargó la muestra de proteína en la columna y se recogió la fracción mediante el flujo.

65

Se llevó a cabo una purificación adicional en una columna de sefarosa SP. Se cargó una columna de SP-sefarosa de 1,0 ml con tampón X de NaCl 50 mM (20 mM Hepes, 1 mM EDTA, 20% glicerol, y 0,5 mM PMSF). Se cargó la muestra de proteína en la columna y se recogió y reservó la fracción a través del flujo. Se eluyó la columna con un tampón de gradiente de sal (fracción de 50 mM del tampón X de NaCl - 1000 mM equivalente a 5,0 ml y 0,1 ml, respectivamente). La elución se llevó a cabo con 1000 mM de tampón X de NaCl.

## ES 2 286 104 T3

Se agruparon las fracciones correctas y se sometieron a diálisis frente a PBS.

La Figura 1 ilustra un análisis de RT-PCR de células de tumor de RCC. La Figura 2 ilustra el análisis de FACS de células dendríticas derivadas de cultivos de PBMC adherentes. La Figura 3 ilustra la sobre-regulación del antígeno de HLA en células dendríticas por la proteína de fusión del GM-CSF-G250. La Figura 4 ilustra la citotoxicidad del PMBC en bruto modulada por la proteína de fusión del G250-GM-CSF (paciente 1).

La Tabla 1 muestra la modulación fenotípica de los monocitos de la masa de la sangre periférica por la proteína de fusión del GM-CSF-G250, IL-4, y IL-2 (paciente # 1).

Fenotipo	Día 7	Día 21
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup>	60	94
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	10	3
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	21	25
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	40	68
CD3 <sup>+</sup> TcR <sup>+</sup>	54	90
CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	10	25

La Tabla 2 muestra la modulación fenotípica de los monocitos de la masa de la sangre periférica mediante la proteína de fusión del GM-CSF-G250, IL-4, y IL-2 para el paciente # 2.

Fenotipo	Día 7	Día 21	Día 42
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup>	70	90	100
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	13	1	0
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	21	22	17
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	48	74	86
CD3 <sup>+</sup> TcR <sup>+</sup>	62	91	97
CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	10	28	16

### Ejemplo 2

*Inducción de la Actividad Anti-tumoral Mediada por el G250 Objetivo y la Célula-T Contra el Carcinoma de Célula Renal Utilizando una Proteína de Fusión Quimérica que Consiste en el G250 y el Factor de Estimulación de las Colonias de Granulocitos-Monocitos*

La inmunoterapia dirigida a la inducción de una respuesta anti tumoral mediada por las células T en pacientes con carcinoma de células renales (RCC) continúa siendo una promesa significativa. En la presente memoria se describe una estrategia de vacuna de RCC que permite la liberación concomitante de activadores inmunes duales: el G250, un antígeno asociado al ampliamente expresado, y el factor de estimulación de la colonia de macrófagos-granulocitos (GM-CSF), un factor inmunomodulador para las células que presentan el antígeno (APC). Se construyó el gen de fusión del G250-GM-CSF y se expresó en células SF-9 utilizando un sistema del vector de expresión de baculovirus. Se purificó subsecuentemente la proteína de fusión de 66 kDa (FP) a través de una columna de afinidad de 6 x His-Ni-NTA y de una SP sefarosa/FPLC. La FP purificada poseyó una bioactividad del GM-CSF, comparable a la del GM-CSF recombinante cuando se ensayó en una línea celular dependiente del GM-CSF. Cuando se combinó con el IL-4 (1000 U/ml), la FP (0,34mg/ml) indujo la diferenciación de monocitos (CD14<sup>+</sup>) en células dendríticas (DC) que expresan el marcador de superficie característico para las APC. Se detectó la sobre-regulación de las DC maduras (CD83+CD19<sup>-</sup>) (17% vs 6%) con HLA la expresión del antígeno de clase I y de clase II intensificada en las DC cultivadas de la FP en comparación con las DC cultivadas con el GM-CSF recombinante. El tratamiento del PBMC con la FP sola (2,7 mg/10<sup>7</sup> células) aumentó tanto en la expresión del mRNA de la citoquina Th<sub>1</sub> como en

la de la citoquina Th<sub>2</sub> (IL-2, IL-4, GM-CSF, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ). Cuando se compararon las diferentes estrategias de manipulación inmune en los cultivos a largo plazo de las PBMC en masa, las células tratadas con la FP (0,34 mg/ml) además de IL-4 (1000U/ml) durante una semana y re-estimuladas semanalmente con la FP además de IL-2 (20IU/ml) indujeron el mayor crecimiento del receptor de las células T que expresa las células T (TcR). Además, bajo dicha manipulación inmunomoduladora, se demostró que la citotoxicidad específica del RCC pudo ser bloqueada por los anticuerpos anti HLA de clase I, anti-CD3 y anti-CD8 en cuatro de seis cultivos de de las PBMC ensayados. En un paciente ensayado, se determinó una citotoxicidad aumentada frente al nodo de la linfa (LN) derivado del objetivo del RCC en comparación al de los objetivos del tumor primario, que corresponden a una expresión del G250 en el tumor del LN en comparación con el tumor primario. La sustitución de la FP con el GM-CSF recombinante eliminó completamente la selección de células que matan específicamente el RCC. Todos los cultivos de PBMC moduladas de la FP con actividad antitumoral mostraron una sobre-regulación de la población de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>. Estos resultados indican que la FP del GM-CSF-G250 es un inmunoestimulante potente con la capacidad para activar las DC inmunomoduladoras e inducir una célula T-auxiliar soportada, dirigida al G250, y la respuesta anti-tumoral mediada por CD8<sup>+</sup>. Estos descubrimientos tienen implicaciones importantes para el uso de la FP del GM-CSF-G250 como una vacuna del tumor para el tratamiento de pacientes con cáncer de riñón avanzado.

### Introducción

El carcinoma de células renales metastático (mRCC) representa un desafío terapéutico debido a su resistencia a modos convencionales de terapia tales como la quimioterapia y la terapia de radiación (Figlin (1999) *J. Urol.* 61: 381-387). Los avances en el tratamiento del mRCC han evolucionado de forma significativa en la última década desde la aprobación por la FDA de la interleuquina-2 (IL-2) en 1992. Se ha hecho aparente que la inmunoterapia es capaz de producir remisiones duraderas en pacientes de RCC seleccionados, aunque los porcentajes de respuestas totales de la inmunoterapia permanecen aproximadamente en un 25% como mucho (Fisher y otros (1997) *Cancer J. Sci. Amer.*, 3: S70) a coste de toxicidades medibles para el paciente. La reciente identificación de los antígenos asociados al tumor (TAA) limitados a las MHC y la comprensión del papel crítico de las células dendríticas (DC) inmunomoduladoras ha proporcionado el racional para el desarrollo de las vacunas tumorales para la terapia del cáncer (Wang y otros (1999) *J. Mol. Med.*, 77:640-655; Xu y otros (2000) *Trends in Biotech.* 18: 167-172). Se han diseñado y ensayado muchas estrategias de vacunas del cáncer tanto en modelos animales como en ensayos en humanos con resultados prometedores. Estos incluyen vacunas basadas en péptidos (Rosenberg y otros (1999) *J. Immunol.*, 163:1690-1695; Parkhurst y otros (1996) *J. Immunol.*, 157: 2539-2548), vacunas basadas en células dendríticas (DC) (Yang y otros (2000) *J. Immunol.*, 164: 4204-4211; Condon y otros (1996) *Nature Med.*, 2:1122-1128; Zhou y otros (1996) *Human Gene Ther.*, 10: 2719-2724; Nestle y otros (1998) *Nature Med.*, 4: 328-332; Mulders y otros (1999) *Clin. Cancer Res.*, 5:445-454), vacunas basadas en ADN/ARN de virus recombinantes (Ulmer y otros (1998) *J. Virol.*, 72: 5648-5653; Ying y otros (1999) *Nature Med.*, 5: 823-827; Liu (1998) *Nature Med.*, 4: 515-519), y células tumorales que modifican el gen (Mach y otros (1999) *Cancer Res.*, 60: 3239-3246). A pesar del hecho de que se cree que el RCC es un tumor relativamente inmunogénico, no se han identificado antígenos asociados al RCC y caracterizados en asociación con un racional significativo para el desarrollo de una vacuna tumoral dirigida al cáncer de riñón (Gaugler y otros (1996) *Immunogenetics*, 44:323-330; Brändle y otros (1996) *J. Exp. Med.*, 183:2501-2508; Brossart y otros (1998) *Cancer Res.*, 58: 732-736).

El primer tumor del RCC ampliamente expresado que contiene epitopes de CTL que restringen HLA-A2 ha sido recientemente identificado y clonado a partir de una línea celular del RCC (Grabmaier y otros (2000) *Intl. J. Cancer*, 85: 865-870; Vissers y otros (1999) *Cancer Res.*, 59:5554-5559). Esta proteína de membrana asociada al RCC, designada como G250, ha probado ser idéntica a MN/CAIX, una TAA expresada en el cáncer cervical (Opavsk&yacut; y otros (1996) *Genomics*, 33: 480-487). La tinción inmunohistoquímica con mAbG250 reveló que más del 75% del RCC primario y metastático expresó la G250 mientras que se detectó poca o ninguna expresión en el riñón normal (Grabmaier y otros (2000) *Intl. J. Cancer*, 85: 865-870). Además, se encontró que la expresión de la G250 está casi totalmente limpia de cánceres de células del riñón, siendo la variante de RCC más común, que proporciona además base adicional para el uso de la G250 como un objetivo inmune significativo para la terapia del cáncer. La presentación del antígeno es una primera etapa crucial para la inmunoterapia de base de la vacuna. Por consiguiente, se ha realizado la hipótesis de que una proteína quimérica que consista en G250 y GM-CSF, como factor de inmunomodulación para la generación de la DC funcional, aumentaría la capacidad de la vacuna en comparación con el uso de cualquiera de ellos como agente sólo. Se han descrito varias proteínas de fusión quiméricas conteniendo el GM-CSF y han mostrado una variedad de efectos biológicos complejos en sus componentes de fusión (Hall y otros (1999) *Leukemia*, 13: 629-633; Tripathi y otros (1999) *Hybridoma* 18: 193-202; Battaglia y otros (2000) *Exp. Hematol.*, 28: 490-498; Batova y otros (1999) *Clin. Cancer Res.*, 5: 4259-4263). El GM-CSF ha sido bien caracterizado como un factor de crecimiento que induce la proliferación y la maduración de las células del progenitor mielóide (Hill y otros (1995) *J. Leukocyte Biol.* 58: 634-642). Esto intensifica la citotoxicidad natural de los macrófagos y granulocitos frente a las células del tumor (Parhar y otros (1992) *Europ. Cytokine Network*, 3: 299-306). La función del GM-CSF como un factor clave para la diferenciación de las DC sustancia además su impacto auxiliar en la terapia de vacuna de base inmune (Jonuleit y otros (1996) *Archives of Dermatological Res.* 289: 1-8). Se ha demostrado la evidencia directa de los efectos adyuvantes del GM-CSF en la vacuna basada en la inmunoterapia en modelos animales. La inmunización con péptido del tumor en los sitios de la piel que contienen DC epidérmicas recién obtenidas por pre-tratamiento con ADN que codifica el GM-CSF demostró una respuesta de la célula T específica del antígeno, mientras que la inmunización del péptido del sitio de la piel de control no mostró respuesta inmune (Bowne y otros (1999) *Cytokines Célulau. Mol Ther.*, 5: 217-225). De modo similar, el tratamiento del tumor establecido con una vacuna celular hibridada generada por fusión de DC modificadas del gen del GM-CSF con células del melanoma mostró una mayor eficacia terapéutica cuando se

comparó con el tratamiento con la vacuna hibridada generada con DC no modificadas (Cao y otros (1999) *Immunol.*, 97: 616-625). Un ensayo de fase I inicial demostró además que la inyección sistémica del GM-CSF y IL-4 fue capaz de inducir regresión del tumor y respuesta de la enfermedad estable en pacientes con RCC avanzado y cáncer de próstata (Roth y otros (2000) *Cancer Res.*, 60:1934-1941). De un modo similar, la vacunación de pacientes con RCC antólogo irradiado o células de melanoma diseñadas por ingeniería genética para segregar el GM-CSF humano también indujo una inmunidad anti tumoral potente (32 Simons y otros (1997) *Cancer Res.* 57: 1537-1546; Soiffer y otros (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 5: 13141-13146).

En este ejemplo, describimos una estrategia para generar proteínas de fusión (FP) que consisten en G250 y GM-CSF. Además, ensayamos la viabilidad de utilizar esta vacuna del tumor del RCC no viral y no celular como un inmunoestimulante para la modulación *in vitro* de las DC y la inducción de la respuesta anti tumor dirigida al G250 en cultivos de PBMC, que fueron derivados de pacientes con cáncer de riñón avanzado.

#### Materiales y métodos

##### Clonación del gen de fusión de GM-CSF-G250 en el vector pVL 1393

Se digirió el plásmido p91023(B)-GM-CSF (Wong y otros (1985) *Science* 228: 810-815) con *EcoR I*, y se utilizó el fragmento de 0,8 kb conteniendo la longitud completa del cADN del GM-CSF cADN para generar el fragmento de GM-CSF de 0,4 kb conteniendo el epítopo funcional flanqueado por un sitio de *EcoR I* en el lado 5' y un sitio *Not I* en el lado 3' sustituyendo el codón de interrupción del GM-CSF, por la PCR de ADN. Se subclonó el fragmento del GM-CSF del producto de la PCR en los sitios *EcoR I* y *Bgl II* de la localización del gen de polihedrina en base al vector de transferencia del baculovirus pVL1393 (Pharmigen, San Diego, CA). De un modo similar, se utilizó el pBM20CMVG250 (Osterwick (2000) *Int. J. Cancer*, 85: A65-A70) para amplificar el cADN de la G250 de longitud completa (1,6 kb) conteniendo el sitio *Not I* seguido por un enlazador de 6 nucleótidos que codifica 2 argininas por la PCR en la región 5'-flanqueada de la G250 después de la separación de su codón de inicio. Se diseñó la región 3'-flanqueada de la G250 para codificar 6 histidinas seguida por el codón de interrupción y el sitio *Bgl II*. Se purificó el fragmento de la G250 sobre gel. Se cortó tanto el vector pVL1393 ya contenido en el GM-CSF y como los fragmentos amplificados de la PCR de la G250 con *Not I* y *Bgl II*. Se ligaron el fragmento de la G250 y el vector durante 3 horas a 16°C, y más tarde se transformaron y colocaron en placas LB. Se purificaron las colonias conteniendo el plásmido correcto por ultracentrifugación flotante de cloruro de cesio. Se cortó el plásmido con un grupo de diferentes enzimas de restricción para verificar los plásmidos. Se verificaron además los clones de los plásmidos por fragmentos de histidina utilizando un Amplicycle SECuencing Kit (Perkin Elmer).

##### Generación y purificación de la proteína de fusión

Se generó el baculovirus recombinante conteniendo el gen de fusión de GM-CSF-G250 His-fragmentado por co-transfección de 0,5 mg de BaculoGold ADN (ADN de baculovirus de AcNPV modificado) (Pharmigen, San Diego, CA) y 5 mg of pVL1393/GM-CSF-G250 en células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Los virus se amplificaron de forma adicional a un MOI bajo (<1) en células de insecto Sf9 adherentes y se determinaron las valoraciones de los virus por un ensayo de placa. Se determine la expresión de FP de GM-CSF-G250 en células Sf9 por análisis inmunocitoquímico utilizando anticuerpos anti-G250 mAb, anti-GM-CSF (Genezyme, Cambridge, MA) y irrelevante Ab. Se infectaron las células Sf9 con virus recombinante de pVL1392-XyIE (Pharmigen) y las células de Sf9 no infectadas se utilizaron como control negativo para la expresión y el análisis de la FP. Se aislaron los virus utilizados para la producción de la proteína y se amplificaron a partir de una placa única. Se preparó el lisado de células a partir de células Sf9 infectadas con virus a MOI de 5 durante tres días con tampón de lisis de células de insectos conteniendo un cóctel de inhibidor de proteasa (Pharmigen, San Diego, CA). Se aplicó el lisado del filtrado (filtro de 0,22 mm) a una columna de azarosa de Ni<sup>2+</sup>-NTA con una alta afinidad por la 6xHis (Qiagen, Santa Clarita). Después de un lavado extensivo de la columna (50 mM fosfato Na, 300 mM NaCl, 10% glicerol, pH 8,0), se eluyó la proteína de fusión por la columna de fraccionamiento (50 mM fosfato Na, 300 mM NaCl, 10% glicerol, pH 6,0) incrementando la concentración de imidazol de 0,1 M hasta 0,5 M. Todas las etapas de purificación se llevaron a cabo a 4°C. Se analizaron las fracciones por el ensayo de membrana Western utilizando un anticuerpo del anti-GM-CSF. Se combinaron las fracciones del pico, se sometieron a diálisis y se aplicaron de nuevo a una columna de agarosa de Ni<sup>2+</sup>-NTA para la purificación repetida. Se agruparon las fracciones conteniendo la FP, se sometieron a diálisis y se aplicaron de nuevo a una columna de alta resolución de FPLC conteniendo sefarosa SP (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Se eluyó la proteína de fusión con un gradiente de sal incrementado desde 50 mM hasta 1 M de NaCl en tampón X (20 mM Tris, 1 mM EDTA, 10% glicerol) y se agruparon las fracciones conteniendo la FP, se sometieron a diálisis y se esterilizaron a través de un filtro de 0,2 m. Se utilizaron las tinciones de azul y plata de Coomassie para analizar la pureza de la proteína de fusión del GM-CSF-G250. Se determinó la concentración de la proteína concentración por un ensayo de proteína de Bio-Rad Dc (Bio-Rad, Hercules, CA 94547).

##### Ensayo de proliferación dependiente de GM-CSF

Se determinó la actividad biológica del componente del GM-CSF de la FP por medición de la proliferación del GM-CSF dependiente de las células TF (Kitamura y otros (1989) *J. Cellu. Physiol.*, 140: 323-334) en presencia de la FP. Se sembraron las células TF-1 en placas de 96 pocillos por triplicado en un medio de cultivo (medio RPMI + 10% FBS) a la concentración de 2 x 10<sup>4</sup> células/pocillo conteniendo la concentración valorada de la FP o la correspondiente cantidad del GM-CSF humano recombinante (rh-GM-CSF). Se incubaron los cultivos durante 5 días y se añadió

## ES 2 286 104 T3

timidina marcada con  $H^3$  (0,1 mCi/pocillo) 12 h antes de su recolección. Se midió la timidina marcada con  $H^3$  por conteo de centelleo con un contador de  $\beta$ .

### *Análisis Fenotípico de DC por Sorting de Células Activadas por Fluorescencia (FACS)*

5 Se determine el fenotipo de las DC generadas a partir de las PBMC tanto adherentes como en masa por tinción de inmunofluorescencia de dos colores tal como han descrito Hinkel y otros (2000) *J. Immunother.*, 23: 83-93. Se cultivaron tanto las PBMC adherentes como las PBMC en masa no fraccionadas con 1000U/ml de IL-4 junto con el GM-CSF (800U/ml) o bien la FP (0,34 mg/ml) durante 7 días y se determinó la identidad de las DC. Se re-suspendieron los cultivos de las células ( $1 \times 10^5$  células) en 50 ml de tampón de FACS (PBS, 2% suero de ternero recién nacido, 0,1% de azida sódica) y se incubaron con 10 ml de anticuerpos monoclonales marcados con el isocianato de fluoresceína apropiado (FITC) o ficoeritrina (PE) durante 30 min a 4°C. Después de la tinción, las células se lavaron dos veces con PBS y se suspendieron de nuevo en 200 ml de tampón de FACS más 200 ml de paraformaldehído al 2%. Se tomaron entre cinco y diez mil pruebas por muestra en citómetro de flujo Becton-Dickinson FACScan II que adquirió simultáneamente hacia delante (FSC) y hacia el lado de la dispersión (SSC), así como los datos de FL1 (FITC) y FL2 (PE), y se analizaron utilizando el Software de CellQuest (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Los ajustes para todos los parámetros se optimizaron al inicio del estudio y se mantuvieron constantes a lo largo de los análisis subsiguientes. Se controló la población de las DC en los cultivos de las PBMC en masa en base a su tamaño y a su granularidad. Se determine en todas las muestras la posición de los cursores del cuadrante mediante su ajuste en las muestras teñidas con el anticuerpo de control de isótopos apropiado. Se utilizaron los siguientes anticuerpos para la caracterización del fenotipo de las DCs: Anti-CD86 (B7-2; PharMingen, San-Diego, CA), Anti-CD40 (Caltag, Burlingame, CA), anti-HLA de clase I (W6/32, ATCC HB95), anti-HLA-DR (Immunocytometry System; Becton Dickinson, Mountain View, CA), anti-CD14 (Caltag Laboratories, San Francisco, CA) y control de isótopos IgG1/IgG2a (Beckton Dickinson). Se utiliza el marcador de superficie CD83<sup>+</sup> para delinear la maduración de las DC. Con el fin de discriminar las DC (CD83<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>) de las células B activadas (CD83<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup>), Se llevó a cabo una tinción de color dual utilizando CD19FITC y CD83PE (Immunotech, Marsella, Francia).

### *Análisis del perfil de citoquina en PBMC por reacción de la cadena de transcriptasa-polimerasa reversa semi-cuantitativa (RT-PCR)*

Se extrajo el ARN total de las PBMC tratadas con FP (2,7mg/107 células) para diferentes intervalos de tiempo de hasta 24 hr a 37°C, utilizando una extracción con ácido guanidín isotiocianate-fenolcloroformo. Se llevó a cabo la transcripción reversa del ARN mensajero en cADN por incubación de ARN valorado con transcriptasa reversa de AMV, oligo primero (dT), dNTP, e inhibidor de la ARNasa a 42°C durante 1 hora. Se amplificó un ml de cada muestra de cADN utilizando la PCR en un volumen total de 25 ml, (30ng [<sup>32</sup>P]-5'-oligonucleótido, 100ng del primero del 3'-oligonucleótido, 2,5 ml del tampón 10X PCR modificado, 1,25 unidades de polimerasa de Taq, y se autoclave con agua destilada dos veces hasta un volumen de 25ml). Se amplificó la mezcla de la PCR durante 25 ciclos en un Termociclador de ADN (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). Cada ciclo consistió en la desnaturalización a 94°C durante un minuto y anelación /extensión a 65°C durante 2 minutos. A continuación se visualizaron los productos de la PCR marcados con P32 directamente vía la electroforesis sobre gel de archilamida y se autoradiografiaron y a continuación se cuantificaron por escisión de las bandas y subsiguiente conteo de centelleo.

Se calibró la intensidad de la señal de cada producto amplificado a su correspondiente expresión de mRNA de  $\beta$ -actina como un control interno para la cuantificación de los niveles de expresión. Además, se elucidó de forma adicional el análisis cuantitativo por una dilución en serie de mRNA (1:3, 1:10, 1:30 y 1:300) y co-amplificación de  $\beta$ -actina y mRNA del GM-CSF. Las secuencias de los pares de oligonucleótido primero son las siguientes:  $\beta$ -actina: 5'-CAA CTC CAT CAT GAA GTG TGA C-3' (SEC ID NO:11), 3'-CCA CAC GGA GTA CTT GCG CTC-5' (SEC ID NO:12); GM-CSF: 5'-CCA TGA TGG CCA GCC ACT AC-3' (SEC ID NO: 13), 3'-CTT GTT TCA TGA GAG AGC AGC-5' (SEC ID NO:14), TNF- $\alpha$ : 5'-TCT CGA ACC CCG AGT GAC AA-3' (SEC ID NO: 15), 3'-TAC GAC GGC AAG GAT TAC ATC-5' (SEC ID NO:16); IFN- $\gamma$ : 5'-ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TT-3' (SEC ID NO:17), 3'-ATG CTC TTC GAC CTC GAA ACA GCA T-5' (SEC ID NO:18); IL-2: 5'-GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC-3' (SEC ID NO:19), 3'-GTT TCA GAT CCC CTT TAG TTC CAG-5' (SEC ID NO:20); IL-4: 5'-CTT CCC CCT CTG TTC TTC CT, 3' TTC CTG TCG AGC CGT TTC AG-3' (SEC ID NO:21).

### *Inmunomodulación de PBMC con proteína de fusión*

Se cultivaron PBMC recién aisladas de pacientes con RCC expresando G250 en un medio RPMI 1640 suplementado con suero antológico al 10%. Se llevaron a cabo varios programas de protocolos inmunomoduladores de cultivos de las PBMC con FP tal como se ha descrito en la tabla 3 y en la Figura 10. Se determinó el crecimiento de las PBMC por conteo de las células, y se ensayó la actividad citolítica de las PBMCs para diferentes objetivos en un ensayo de liberación de cromo 51 (Cr51) prolongado durante 18 horas. Se sembraron cinco mil células objetivo marcadas con Cr 51 por pocillo en una placa de microvalorador de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) y se mezclaron rindiendo varias relaciones E/T (40:1, 20:1, 10:1, y 5:1). Se expresó la citotoxicidad como unidades líticas (LU) por  $10^6$  células efector con unidad lítica siendo definido como el número de células efector que inducen el 30% de la lisis. Se confirmó la citotoxicidad específica de la RCC y mediada de la célula T por ensayos de bloqueo en los que se pre trataron las células del tumor autólogas objetivo con antígeno de leucocito anti-humano (HLA) de clase I, de clase II, o se pre trataron las PBMC con anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, o anticuerpos de control de isótopos (Becton Dickinson) durante

30 min a 4°C, antes de la adición de células para determinar la citotoxicidad de las placas de cultivo. La liberación espontánea de todos los objetivos fue igual o menor que el 20% de la liberación máxima de Cr 51. Se utilizaron las siguientes células objetivo: células antólogas de riñón normal (G250-), células antólogas de tumor de RCC (G250+), células de RCC alogénicas (G250+), células alogénicas de la próstata (CL-1), y fibroblastos humanos (hFb).

TABLA 3

*Modulación Fenotípica de PBMC en masa por la Proteína de fusión (FP)*

Fenotipo	Pre-cultivada	IL-2	IL-2 + FP	IL-2+IL-4+ FP	FP	FP+IL-4
			IL-2 + FP	IL-2 + FP	IL-2 + FP	IL-2+FP
CD56 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup>	25	13	11	4	9	1
CD56 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup>	46	47	70	84	88	94
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	31	28	39	42	66	46
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	3	10	20	29	4	28
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	22	24	31	24	22	25
CD3 <sup>+</sup> TcR <sup>+</sup>	40	45	72	69	79	96
CD3 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	19	43	61	54	17	86

### Resultados

#### *Generación de la proteína de fusión GM-CSF-G250 a partir de células SF-9 infectadas de baculovirus*

Se utiliza la tecnología de la expresión de baculovirus y el sistema de purificación de afinidad de 6x His para generar la FP del GM-CSF-G250 FP tal como se ha descrito anteriormente. Se verificó el éxito de la clonación de genes y la generación de baculovirus recombinante por la tinción inmunohistoquímica de virus infectados con células Sf-9 utilizando anti GM-CSF y anti-G250. Se detectaron abundantes expresiones de proteína G250 y GM-CSF que estaban infectadas con baculovirus recombinante de GM-CSF-G250 (Figura 6A, panel superior y central), mientras que no se detectó ninguna expresión del GM-CSF o G250 en células no infectadas (Figura 6A, panel inferior) o células infectadas con virus recombinante de pVL1392-XylE (datos no mostrados). Se utiliza el análisis de membrana de Western para evaluar la eficiencia del fragmento de afinidad de la 6xHis en la FP para la Ni<sup>2+</sup>-NTA azarosa. Una banda de 66-kDa esperada que se detectó con anti-GM-CSF apareció en las fracciones recogidas entre el número 5 y el número 25 con una concentración de pico en la fracción 15 a 19 (Figura 6B). Se mejoró de forma adicional la pureza de la proteína por hacer correr de nuevo las fracciones positivas a través de la columna de azarosa de Ni<sup>2+</sup>-NTA y sometido a las FPLC utilizando columna de Sefarosa SP. Se detectó una banda de 66 kDa única principal en el análisis de SDS-PAGE tiñendo con azul de coomassie (Figura 6C).

#### *Bioactividad del GM-CSF retenido de la proteína de fusión GM-CSF-G250*

Para determinar si se preservó la bioactividad del GM-CSF en la FP purificada, se analizó la FP para determinar su capacidad para soportar la proliferación de una línea celular dependiente del GM-CSF, TF-1. Se llevaron a cabo diluciones en serie de la FP para abarcar el intervalo de concentración efectiva. Se llevaron a cabo los experimentos en paralelo con el GM-CSF recombinante. Los resultados del ensayo de incorporación de la timidina <sup>3</sup>H demostraron que la FP puede estimular el crecimiento de la célula TF-1 de un modo dependiente de la dosis bifásica (Figura 7B). Cuando se comparó con el GM-CSF recombinante (Figura 7A), se determinó la bioactividad comparable en presencia de la FP con concentraciones equivalentes de GM-CSF en el intervalo comprendido entre 0-6,71 ng/ml (= 0-30,2 ng/ml FP). En presencia de concentraciones mayores que 30,2 ng/ml de la FP, la inducción del crecimiento de TF-1 por la FP excedió la inducción del crecimiento por el GM-CSF recombinante en 1,3 veces (Figura 7A, 7B).

#### *Efecto inmunomodulador de la proteína de fusión en las células que presentan antígeno en el cultivo de PBMC*

Con el fin de estudiar cómo la FP puede afectar al desarrollo del DC, se cultivaron PBMC derivadas de pacientes con RCC en presencia de la FP (0,34 mg/ml) más IL-4 (1000 U/ml) durante 7 días y se comparó con las cultivadas en el GM-CSF (800U/ml) más IL-4. El análisis FACS reveló un alto porcentaje de granulocitos mayores que expresan el B7-2<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> y HLA-DR<sup>+</sup> en ambas condiciones, mientras que las células de CD14<sup>+</sup> células fueron insignificantes (Figura 8A). Sin embargo, cuando se comparó las células dendríticas cultivadas con citoquinas recombinantes, se

detectó una expresión intensificada tanto de la HLA clase I (intensidad de fluorescencia lineal promedio = 4830 vs 3215) y HLA clase II (6890 vs 6290) en los cultivos de DC modulada de FP (Figura 8B). Además, hubo un incremento de tres veces de DC maduras (CD83<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>) en los cultivos de DC moduladas de FP (Figura 8C). Esta observación fue consistente en varios cultivos de PBMC en masa derivados de pacientes de RCC (n = 3) y donantes sanos (n = 2). También se determinó el perfil inmunomodulador similar mediado de la FP en cultivos de DC adherentes convencionales (datos no mostrados). Se observó una menor eficiencia de diferenciación de la DC cuando se cultivaron las DC en presencia de FP sola sin IL-4. Se determinó una mezcla de la población de CD14<sup>+</sup> y CD14-B7-2<sup>+</sup> en el día 7 (datos no mostrados).

#### 10 *La proteína de fusión induce la activación de los genes de la citoquina en PBMC*

Para identificar si la proteína de fusión tuvo un efecto directo en la regulación de los genes de citoquina en PBMC, se trataron células de PBMC, derivadas de pacientes de RCC, con sólo FP (2,7mg/10<sup>7</sup> células). Se siguieron las cinéticas de la activación del gen de citoquina mediante el análisis de la expresión de mRNA de citoquina múltiple a lo largo del curso del tiempo tal como se ha indicado en la Figura 9. Cuando se compare con las PBMC no tratadas, el tratamiento de las PBMC no cultivadas con la FP intensificó gradualmente la expresión del GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-2 mRNA con el nivel del pico a las 24 horas después del tratamiento excepto para la IL-4. Se detectó el pico de la expresión del mRNA de IL-4 a las 6 horas después del tratamiento (Figura 9).

#### 20 *La proteína de fusión induce la respuesta inmune mediada por la célula T y dirigida a G250 en cultivos de PBMC*

Se ensayaron y compararon cinco protocolos inmunomoduladores con y sin FP en cultivos de PBMC. Estas condiciones de los cultivos incluyeron 1) sólo IL-2 (40 IU/ml), 2) IL-2 + FP (0.34 mg/ml) (semanalmente re-estimulados), 3) IL-2 + IL-4 (1000 U/ml) + FP durante una semana y re-estimulados a continuación con FP+ IL-2, 4) sólo FP durante una semana y re-estimulados a continuación con FP + IL-2 y 5) FP + IL-4 durante una semana y re-estimulados a continuación con IL-2 + FP. Tal como se ha indicado en la Figura 10 (paciente #1), entre varios tratamientos inmunomoduladores ensayados, el estado con PBMC pre-tratadas con FP más IL-4 durante una semana y re-estimulación subsiguiente con IL-2 (40 IU/ml) y FP semanalmente, mostró la mayor expansión del crecimiento (6,0 x) (Figura 10A). Se determinó un perfil de crecimiento similar con una actividad de crecimiento intensificada en este estado en particular en otros 3 cultivos de PBMC que fueron derivados de pacientes con el RCC. En un paciente en particular (paciente # 1) que tuvo un nódulo linfático positivo (LN), se determinó una citotoxicidad intensificada frente al objetivo tumoral derivado del LN en cuatro cultivos de las PBMC modulados de la FP (3 ciclos de re-estimulación) cuando se comparó con la citotoxicidad frente al objetivo del tumor primario (Figura 10B). Notablemente, esta actividad de matar intensificada correspondió a un incremento de ocho veces de la expresión del mRNA en el tumor de RCC derivado del LN, tal como se determinó por una RT-PCR semi-cuantitativa, cuando se comparó con las células del RCC primario (Figura 10C). Cuando se pre-trataron las células objetivo del tumor del LN con anti HLA clase I (77%) o de forma alternativa, los efectores fueron pre-tratados con anti CD3 (66%) o anti CD8 (55%) antes del ensayo, la citotoxicidad dirigida al RCC se vio marcadamente reducida. Mientras que el tratamiento con anti HLA clase II (33%) o anti CD4 (33%) pudo conducir sólo a una menor inhibición de la citotoxicidad (Figura 10C). Aunque se detectó una pobre expansión del crecimiento (1,8 x) en el estado en que las PBMC pre-tratadas con sólo FP durante una semana y re-estimuladas con IL-2 más FP, se detectó la mayor citotoxicidad frente tanto al objetivo del RCC primario como al derivado del LN cuando se comparó con las otras condiciones ensayadas (Figura 10B).

Para identificar la identidad fenotípica de las PBMC moduladas de FP que poseen actividad anti-tumoral, se llevó a cabo el análisis fenotípico en el día en que se determinó la citotoxicidad. Se detectó una población de células T marcadamente incrementada (70-94%) que expresó el receptor de la célula T (72-96%) en todos los cultivos de PBMC estimulados de FP, cuando se comparó con las PBMC pre-cultivadas (46%) o las PBMC cultivadas con sólo IL-2 (47%) (Tabla 3). Notablemente, se determinó que la población de células T que expresan la mayor parte del receptor de IL-2 (CD3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) (86%) se presenta en el estado de las células pre-tratadas con FP más IL-4 antes de la re-estimulación con IL-2 y FP. Esto también correspondió a la mayor expansión del crecimiento en la población de células T en comparación con los otros protocolos ensayados de modo inmunomodulador (Figura 10A). De forma correspondiente, las PBMC que fueron pre-tratadas con FP durante una semana demostraron una mínima población de células T que expresan el receptor de IL-2 (19%) y demuestran la menor expansión del crecimiento (Tabla 3 y Figura 10A).

#### 55 *Sustitución de FP con GM-CSF abroga la selección de células T citotóxicas dirigidas a RCC*

Con el fin de confirmar que el componente del G250 en la FP es el determinante para la selección del crecimiento del CTL frente al RCC, se llevó a cabo el ensayo de citotoxicidad con las PBMC que fueron cultivadas en la presencia del GM-CSF y IL-4 durante una semana y a continuación fueron re-estimuladas continuamente con IL-2 y GM-CSF (800 U/ml). Se determinó la citotoxicidad mínima frente al RCC autólogo en todos los cultivos de las PBMC ensayadas sin estimulación de la FP. Mientras que los cultivos de las correspondientes PBMC estimuladas con FP mostraron una MHC restringida, la citotoxicidad mediada por la célula T frente al RCC autólogo (Figura 11A) que expresó un alto nivel de G250 (los datos no se muestran). Se detectó la población de células CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> predominantes en los tres cultivos de PBMC modulados de la FP (68%, 74%, y 66%) que expresaron actividad antitumoral, en comparación con la población de células de CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> (25%, 22%, y 30%) (Figura 11B). Además, se detectó tanto el mRNA de la citoquina Th1 como de la Th2 en estos cultivos de PBMC moduladas de la FP que incluyeron GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 y IL-4 (los datos no se muestran).

### Discusión

El carcinoma de células renales (RCC) responde a la inmunoterapia. Sin embargo, se cree que ningún protocolo de tratamiento de base inmune ha mostrado previamente que sería eficaz para erradicar las lesiones tumorales en la mayoría de los pacientes. Se cree que los medios de la estrategia inmune, el tipo de activadores inmunes utilizados, el método de administración, y el estatus inmune de pre-tratamiento de los pacientes puede influir en la respuesta inmune última en los pacientes de cáncer que son tratados con la terapia de base inmune. Por consiguiente, una cuestión importante para una vacuna del cáncer efectiva es el desarrollo de un potente adyuvante que pueda facilitar tanto la inducción como el aumento de una respuesta inmune con actividad antitumoral. Para conseguir esto, proponemos una construcción quimérica que consiste en G250 y GM-CSF. La demostración de la expresión del G250 en las células SF-9 y la bioactividad del GM-CSF en la banda de 66 kDa purificada de la molécula de proteína confirmó la eficacia de la construcción del gen y la efectividad del método de purificación de la proteína seleccionado.

La presentación del antígeno por la DC es importante, no solo para la inducción de las respuestas inmunes primarias, sino también puede ser importante para la regulación del tipo de respuesta inmune mediada por la célula T (Banchereau y otros (2000) *Ann. Rev. Immunol.*, 18: 767-811). Hemos desarrollado recientemente un sistema de cultivo de PBMC en masa para el estudio de la maduración y la función inmunomoduladora de la DC derivada de CD14<sup>+</sup> y la interacción entre la DC y los linfocitos co-cultivados (Hinkel y otros (2000) *J. Immunother.*, 23: 83-93). Utilizando este sistema, puede llevarse a cabo la carga del antígeno durante el periodo de cultivo inicial de las PBMC en presencia del GM-CSF y IL-4, cuando las DC/monocitos inmaduros pueden aumentar y elaborar el antígeno del tumor. Tal como se ha demostrado previamente los linfocitos co-cultivados modulados de la DC en el cultivo de las PBMC en masa pueden expandirse de forma adicional al CTL por estimulación repetitiva con bajas dosis de IL-2 y lisado del tumor del RCC. De modo parecido, el tratamiento directo de las PBMC en masa con IL-4 y FP no solo indujo la diferenciación de las células de CD14<sup>+</sup> en la DC sino que también incrementó la maduración de la DC cuando se comparó con la DC generada en el IL-4 y el GM-CSF. Esto sugiere que el camino de señalización en la maduración de la DC puede ser inducida por la estimulación de la FP (Rescigno y otros (1998) *J. Exp. Med.*, 188: 2175-2180). Además, cuando se compare con el GM-CSF recombinante, se determine la expresión del antígeno de HLA sobre-regulado en la DC modulada de la FP indicando además que la DC es capaz de internalizar, procesar, y presentar la FP a través de los antígenos de la HLA en la DC. Queda aún por determinar si la G250 aumentó por la APC a través de la internalización del receptor del GM-CSF o por medio del componente del G250 que queda por determinar.

Parece que la preincubación de las PBMC con FP y IL-4 antes de la exposición a IL-2 facilita una mejor expansión del efector. Esto puede ser explicado si la IL-4 exógena puede sinergizar la FP para la movilización de la diferenciación y maduración de la DC y la subsiguiente presentación de los péptidos del antígeno a las células inmunes que lo rodean. Aunque también puede alcanzarse una selección de la CTL de éxito por otros protocolos inmunomoduladores ensayados con la FP, la expansión del crecimiento de la CTL no fue favorable. Esto puede estar parcialmente asociado con una diferenciación de la DC "retrasada" bajo la concentración sub-óptima de IL-4 (nota: la FP puede inducir la secreción de IL-4 por las PBMC). Además, la pre-exposición de IL-2 a PBMC estimuladas por un no-antígeno da lugar a la expansión de las células matadoras activadas por la linfoquina no específica con actividad de matar a corto plazo (Roussel y otros (1990) *Clin. Exp. Immunol.*, 82: 416-421). Recientemente, Huang y otros (1994) *Science*, 264: 961-965, demostraron que incluso los tumores "inmunogénicos", tales como los modificados para expresar las moléculas co-estimuladoras, fracasan en estimular el sistema inmune, a no ser que el APC funcional sea asequible para procesar y presentar los antígenos. De este modo parece que la estrategia de vacuna anti cáncer más efectiva debe dirigir la manipulación de intensificar la célula T cebando al nivel del APC en pacientes.

La sustitución de la FP con dosis equivalentes del recombinante GM-CSF anuló la selección y la propagación de CTL específico de RCC sugiriendo que la activación y la propagación del CTL es dependiente del antígeno (G250). Mientras que el GM-CSF ha servido como un adyuvante efectivo para la presentación y amplificación del antígeno de la actividad de la célula T incluyendo la respuesta de la citoquina (Mach y otros (1999) *Cancer Res.*, 60: 3239-3246; Pulendran y otros (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96:1036-1041). Aunque la actividad antitumoral dirigida al G250 inducida por la FP está principalmente mediada por las células CD8<sup>+</sup> T, se detectó una sobre-regulación predominante de células CD4<sup>+</sup> T en la mayoría de los cultivos. La liberación de la citoquina Th1 y Th2 mediada por la FP y la intensificación de la expresión de la HLA clase II en las células DC sugiere además que la inmunidad antitumoral mediada por la FP puede implicar el cebado tanto de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> T específicas para el G250. El papel de las células auxiliares CD4<sup>+</sup> T en esta respuesta puede ser atribuida a proporcionar señales reguladoras requeridas para dicho cebado de CD8<sup>+</sup> CTL restringidas del MHC de clase I (Mach y otros (1999) *Cancer Res.*, 60: 3239-3246).

Los estudios que comparan la eficacia de varias formulaciones de vacunas tumorales en paralelo demostraron que el uso de la DC transfectada con ADN que codifica para TAA es superior a la vacuna basada en la DC pulsada del péptido y en el ADN desprotegido para obtener tanto la respuesta de la célula T específica del antígeno CD8 como CD4 T (Yang y otros (1999) *Intl. J. Cancer*, 83: 532-540). Esta observación indica que los péptidos predecidos por computador pueden no ser procesados ni estar presentes de forma natural en la superficie de las células tumorales para el reconocimiento por las células T reactivas del péptido. De este modo, algunas células T reactivas al péptido *in-vitro* pueden sólo lisar las células objetivo pulsadas del péptido pero no las células tumorales que expresan el antígeno del tumor entero (Vissers y otros (1999) *Cancer Res.*, 59:5554-5559; Rammensee y otros (1993) *Annual Rev. Immunol.*, 11: 213-244). De igual modo, una vacuna basada en un péptido puede obtener de forma efectiva la expansión de las células T específicas de la vacuna en las PBMC de los pacientes de cáncer, pero dicha respuesta no estuvo asociada con la regresión clínica del tumor (Lee y otros (1999) *J Immunol.*, 163: 6292-6300). Por consiguiente, la inmunización

## ES 2 286 104 T3

con la construcción actual del antígeno del G250 completo puede tener la ventaja respecto a los péptidos para la presentación de múltiples, o no identificados epitopes en asociación con moléculas de MHC de clase I y de clase II por APC. Sobre la base de la potencia y la especificidad de la proteína de fusión de GM-CSF-G250 en la activación de las células T reactivas al G250 con actividad antitumoral, nuestros datos indican que la vacuna con la FP del GM-CSF-G250 proporcionará un impacto terapéutico para el tratamiento del cáncer de riñón avanzado.

### Ejemplo 3

#### *Generación del vector de expresión de mamíferos pCEP4-GMCSF-G250*

##### *i) Amplificación del gen recombinante GMCSF-G250 sin el fragmento His y clonación en pGEM-T*

Se utiliza el pVL1393-GMCSF-G250 (His tag) como un molde en una reacción de la PCR que se llevó a cabo utilizando los primeros diseñados para introducir un KpnI antes del codón de inicio del GMCSF (primerero 5') y un sitio de XhoI después del codón de interrupción (primerero 3'). Además, el primerero 39 fue diseñado para eliminar la secuencia de codificación de la poli-Histidina previamente introducida para los objetivos de detección y purificación. Se utilizó un sistema de amplificación de alta fidelidad (Expand High Fidelity System, Boehringer-Mannheim) para evitar mutaciones en el producto de la PCR, que se clonó directamente en el vector de pGEM-T (Promega), un vector conveniente para las etapas de secuenciación y de clonación adicional, dando lugar a pGEMT-GMCSF-G250. La completa secuenciación del gen del GMCSF-G250 no reveló mutación y la ausencia esperada de la secuencia de codificación de la poli-histidina.

##### *ii) Clonación del GMCSF-G250 en el vector de expresión de mamíferos pCEP4*

El pCEP4 es un vector de expresión de mamíferos del vector episomal que utiliza el intensificador/promotor inicial inmediato del citomegalovirus (CMV) para la transcripción del nivel alto de genes recombinantes insertados en los sitios de clonación múltiples y también lleva el gen de resistencia de la higromicina B para la selección estable en células transfectadas. Se llevó a cabo la subclonación del GMCSF-G250 en pCEP4 con una digestión de vectores pGEMT-GMCSF-G250 y pCEP4 con enzimas de restricción KpnI y XhoI y una purificación sobre gel adicional y un ligamiento del pCEP4 y GMCSF-G250 resultante linearizado. El nuevo plásmido pCEP4-GMCSF-G250 (Figura 12) contuvo el gen recombinante en la orientación adecuada tal como se esperaba. Una digestión SalI del pCEP4-GMCSF-G250 liberó el casete de expresión completo *señal de poliadenilación-gen-promotor de CMV* (3,7 kb, Figura 13) que puede ser clonado en el adenovirus suprimido de E1 y E3 o en el esqueleto del adenovirus de *gutless* para la generación de adenovirus recombinante del gen de fusión. Estos virus recombinantes del gen de fusión pueden ser utilizados como una forma de virus para inmunizar pacientes directamente o de forma alternativa, para infectar células de RCC infectadas o DC para generar vacunas de cáncer de riñón para la inmunización directa de pacientes. De forma alternativa, las líneas de células del RCC pueden ser transfectadas de forma estable con el pCEP4-GMCSF-G250 y utilizadas como una vacuna del tumor del RCC. Estos diferentes tipos de formulaciones de vacuna de G250-GM-CSF también pueden ser utilizadas como un inmunoestimulante in-vitro para la activación y propagación del CTL dirigido al G250 a partir de cultivos de PBMC o de TIL, que derivan de pacientes con RCC, siendo re-infundidos a continuación estos CTL de nuevo a los pacientes como una inmunoterapia adoptiva.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción que comprende un antígeno específico del cáncer de riñón G250 unido a un factor de estimulación de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF).
2. La construcción de la reivindicación 1, en donde dicho GM-CSF es un GM-CSF humano.
3. La construcción de la reivindicación 1, en donde el antígeno G250 es un antígeno G250 humano.
- 10 4. La construcción de la reivindicación 1, en donde el antígeno G250 está acoplado de forma covalente al GM-CFS y el antígeno G250 está acoplado al GM-CSF por un enlazador codificado por la secuencia de nucleótidos gcggcg.
- 15 5. Una composición que comprende un antígeno específico de cáncer de riñón G250 unido a un factor de estimulación de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), y un diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
6. La composición de la reivindicación 5, que comprende además un adyuvante.
- 20 7. La construcción de la reivindicación 1 o la composición de la reivindicación 5, en donde el antígeno G250 está unido de forma covalente al GM-CSF.
8. La construcción de la reivindicación 1 o la composición de la reivindicación 5, en donde el antígeno G250 y el GM-CSF son componentes de una proteína de fusión.
- 25 9. Un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende un antígeno específico del cáncer de riñón G250 unido a un factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF).
10. El ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde dicho ácido nucleico es un ácido deoxirribonucleico (ADN).
- 30 11. El ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde dicho ácido nucleico está presente en un casete de expresión.
12. El ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde dicho ácido nucleico está presente en un vector.
- 35 13. El ácido nucleico de la reivindicación 12, en donde dicho vector es un vector baculoviral.
14. La composición de la reivindicación 5 o el ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde el GM-CSF y el antígeno G250 son un GM-CSF humano y un G250 humano respectivamente.
- 40 15. La construcción de la reivindicación 1, la composición de la reivindicación 5 o el ácido nucleico de la reivindicación 9, en donde el antígeno G250 y el GM-CSF están unidos por un enlazador de péptidos con una longitud comprendida entre 2 y aproximadamente 20 aminoácidos.
- 45 16. La construcción, la composición o el ácido nucleico de la reivindicación 15, en donde dicho enlazador de péptidos es -Arg-Arg-.
17. La construcción o la composición de la reivindicación 15, o el ácido nucleico de la reivindicación 16, en donde dicha construcción tiene la secuencia de la SEC ID NO: 1, la proteína de fusión tiene la secuencia de la SEC ID NO: 1 o dicho ácido nucleico codifica el polipéptido de la SEC ID NO: 1 respectivamente.
- 50 18. El ácido nucleico de la reivindicación 16, en donde dicho ácido nucleico comprende el ácido nucleico de la SEC ID NO: 2.
19. Una célula huésped transfectada con un ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 55 20. La célula huésped de la reivindicación 19, en donde dicha célula huésped es una célula eucariótica.
21. La célula huésped de la reivindicación 19, en donde dicha célula huésped es una célula de insecto.
- 60 22. Un método de producir una vacuna anti-tumoral, de modo que dicho método comprende:
- cultivar una célula transfectada con un ácido nucleico que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9 bajo condiciones en las que dicho ácido nucleico expresa una proteína de fusión de G250-GM-CSF;
- 65 y recuperar dicha proteína de fusión.
23. El método de la reivindicación 22, en donde dicha célula es una célula de insecto.

## ES 2 286 104 T3

24. El uso de una construcción que comprende un antígeno específico de cáncer de riñón (G250) unido a un factor estimulante de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) en la fabricación de un medicamento para la inducción de una respuesta inmune contra el antígeno específico del riñón G250 o una célula que muestra el antígeno específico de riñón G250, por activación de una célula de un sistema inmune con la construcción.
- 5 25. El uso de la reivindicación 24, en donde dicha respuesta inmune inhibe el crecimiento o la proliferación de una célula de riñón transformada.
- 10 26. El uso de la reivindicación 25, en donde dicha célula de riñón transformada es una célula del carcinoma de células renales.
27. El uso de la reivindicación 26, en donde dicha célula de riñón transformada es una célula metastática.
- 15 28. El uso de la reivindicación 24 ó 25, en donde dicho activador comprende poner en contacto una célula que presente el antígeno con dicha construcción.
- 20 29. El uso de la reivindicación 28, en donde dicha célula que presenta el antígeno es una célula dendrítica.
- 30 30. El uso de la reivindicación 28, en donde la célula activada es un linfocito-T citotóxico (CTL).
31. El uso de la reivindicación 24 ó 25, en donde dicho activante comprende la administración sistémica de dicha construcción.
- 25 32. El uso de la reivindicación 25, en donde dicho activante comprende la inyección a un mamífero con un ADN que comprende un casete de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica dicha construcción.
- 30 33. El uso de la reivindicación 31, en donde dicho activante comprende la administración sistémica de dicha construcción en un mamífero.
- 35 34. El uso de la reivindicación 33, en donde dicho mamífero es un mamífero seleccionado entre el grupo que consiste en un humano, un primate no humano, un roedor, un porcino, un lagomorfo, un canino, un felino, un equino, y un bovino.
36. El uso de la reivindicación 34, en donde dicho mamífero es un humano diagnosticado con un carcinoma de células renales o un cáncer cervical.
- 40 36. El uso de la reivindicación 24 ó 25, en donde dicho activante comprende poner en contacto una célula seleccionada entre el grupo que consiste en un linfocito sanguíneo periférico (PBL), una célula dendrítica, y un linfocito infiltrado en el tumor (TIL), con dicha construcción.
- 45 37. El uso de la reivindicación 24 ó 25, en donde dicho activante comprende cargar una célula que presente un antígeno (APC) con un polipéptido que comprende una proteína de fusión de GM-CSF-G250.
38. El uso de la reivindicación 24 ó 25, en donde dicho activante comprende cargar una célula dendrítica (DC) con un polipéptido que comprende una proteína de fusión GM-CSF-G250.
- 50 39. El uso de la reivindicación 24 ó 25, en donde dicho activante comprende introducir un ácido nucleico que codifique una proteína de fusión GM-CSF-G250 en un mamífero.
- 55 40. El uso de la reivindicación 39, en donde dicho activante comprende introducir un ácido nucleico que codifique una proteína de fusión GM-CSF-G250 en tejido muscular en dicho mamífero.
41. El uso de la reivindicación 24 ó 25, en donde dicho activante comprende inyectar un ácido nucleico que codifique una proteína de fusión GM-CSF-G250 en un mamífero.
- 55 42. El uso de la reivindicación 24 ó 25, que comprende además poner en contacto dicha célula con una citoquina o fármaco inmunomodulador.
- 60 43. El uso de la reivindicación 24 ó 25, en donde dicho activante comprende transfectar una célula con un ácido nucleico que codifique una proteína de fusión GM-CSF-G250.
- 65 44. El uso de la reivindicación 43, en donde dicha célula está seleccionada entre el grupo que consiste en una célula dendrítica (DC), un linfocito sanguíneo periférico (PBL), una célula que presente un antígeno (APC), un linfocito infiltrante del tumor (TIL), un fibroblasto, una célula de cáncer cervical, y una célula de tumor de carcinoma de células renales.

## ES 2 286 104 T3

45. El uso de la reivindicación 43, en donde dicha transfección es por uso de un agente que transfecta una célula, de modo que dicho agente esté seleccionado entre el grupo que consiste en un vector viral, un lípido, un liposoma, un dendrímero, y un lípido catiónico.

5 46. El uso de una proteína que comprende un antígeno específico del carcinoma de células renales (G250) unido a un factor estimulante de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF) o un fragmento del mismo en la fabricación de un medicamento para

10 inhibir la proliferación o el crecimiento de una célula renal transformada que soporta un antígeno G250, de modo que dicha inhibición sea llevada a cabo por la eliminación de una célula inmune de dicho activante del huésped de mamífero poniendo en contacto dicha célula con la proteína expandiendo de forma opcional la célula activada; e infundiendo la célula activada en un organismo que contiene una célula renal transformada que soporta un antígeno G250.

15 47. El uso de la reivindicación 46, en donde dicha separación comprende obtener linfocitos de sangre periférica o los TILs a partir de dicho huésped de mamífero.

20 48. El uso de la reivindicación 47, en donde dicha infusión comprende la infusión de las células activadas en el huésped del que se separó la célula inmune.

49. El uso de la reivindicación 47, en donde dicha célula inmune está seleccionada entre el grupo que consiste en una célula dendrítica, una célula que presente el antígeno, un linfocito B, una célula T, y un linfocito infiltrante del tumor.

25

30

35

40

45

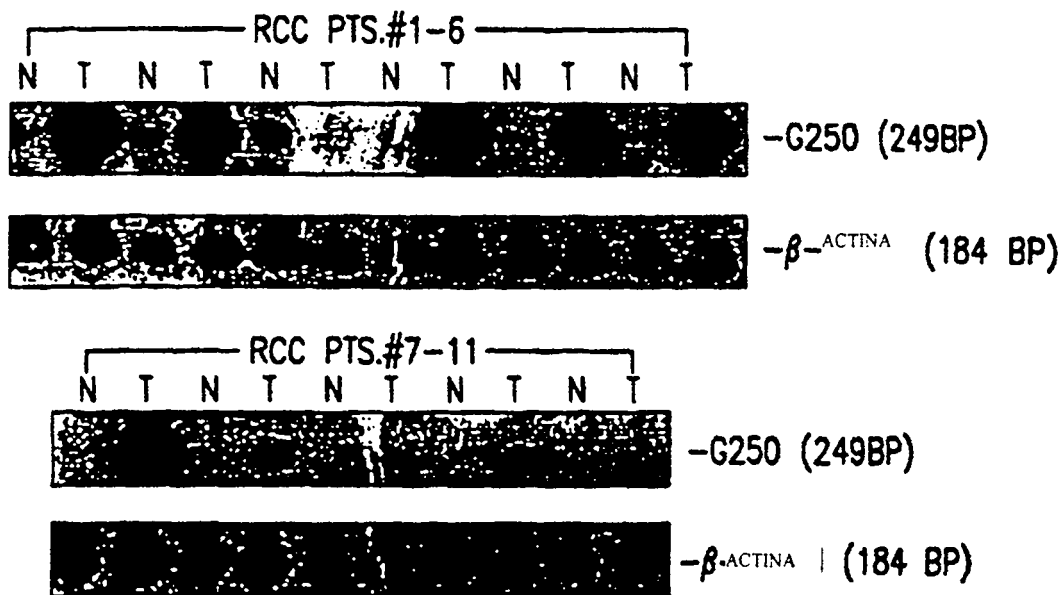
50

55

60

65

FIG. 1



M 1 2



FIG. 13

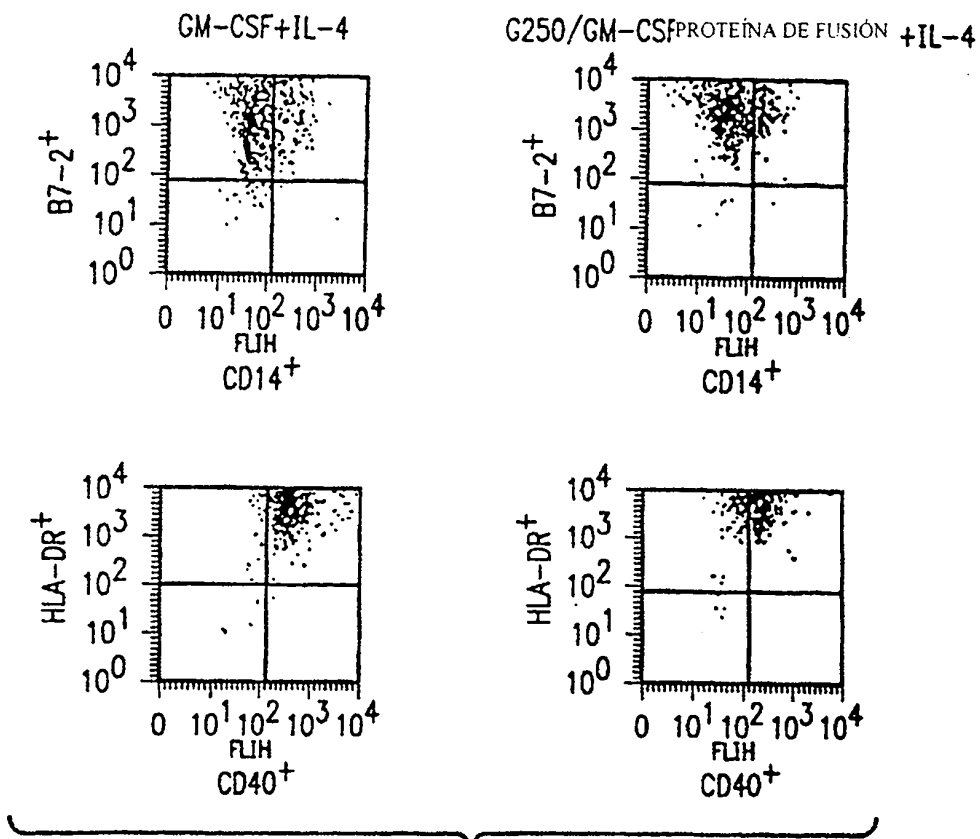


FIG. 2

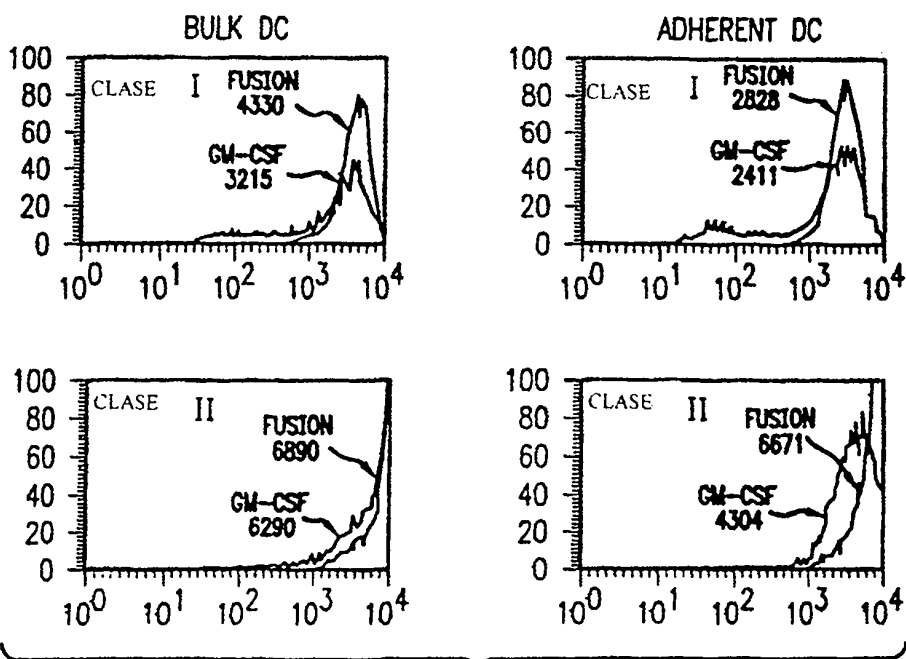
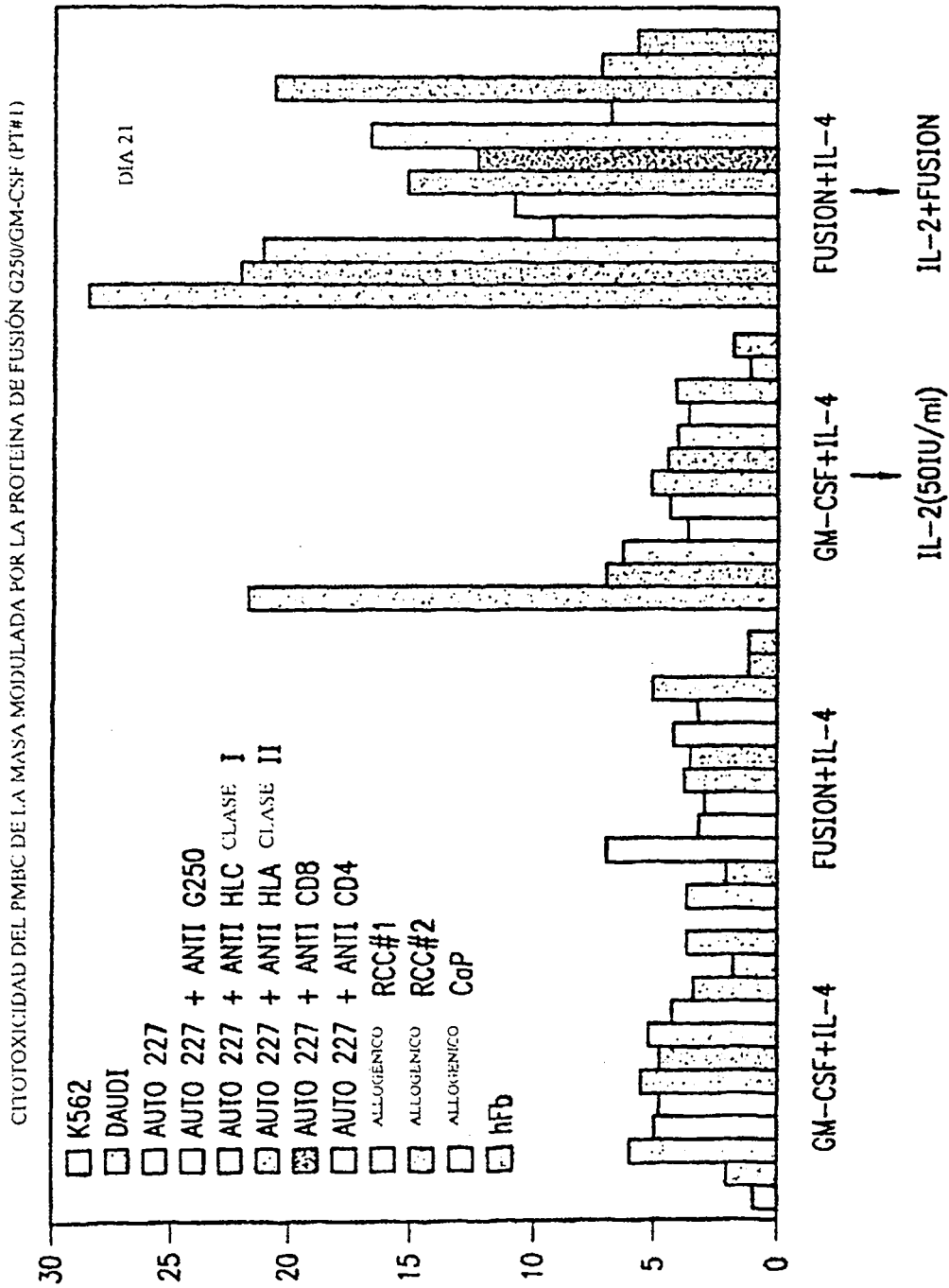


FIG. 3

FIG. 4



**FIG. 5**

CITOTOXICIDAD DEL PMBC DE LA MASA MODULADA POR LA PROTEÍNA DE FUSIÓN G250/GM-CSF (P1#2)

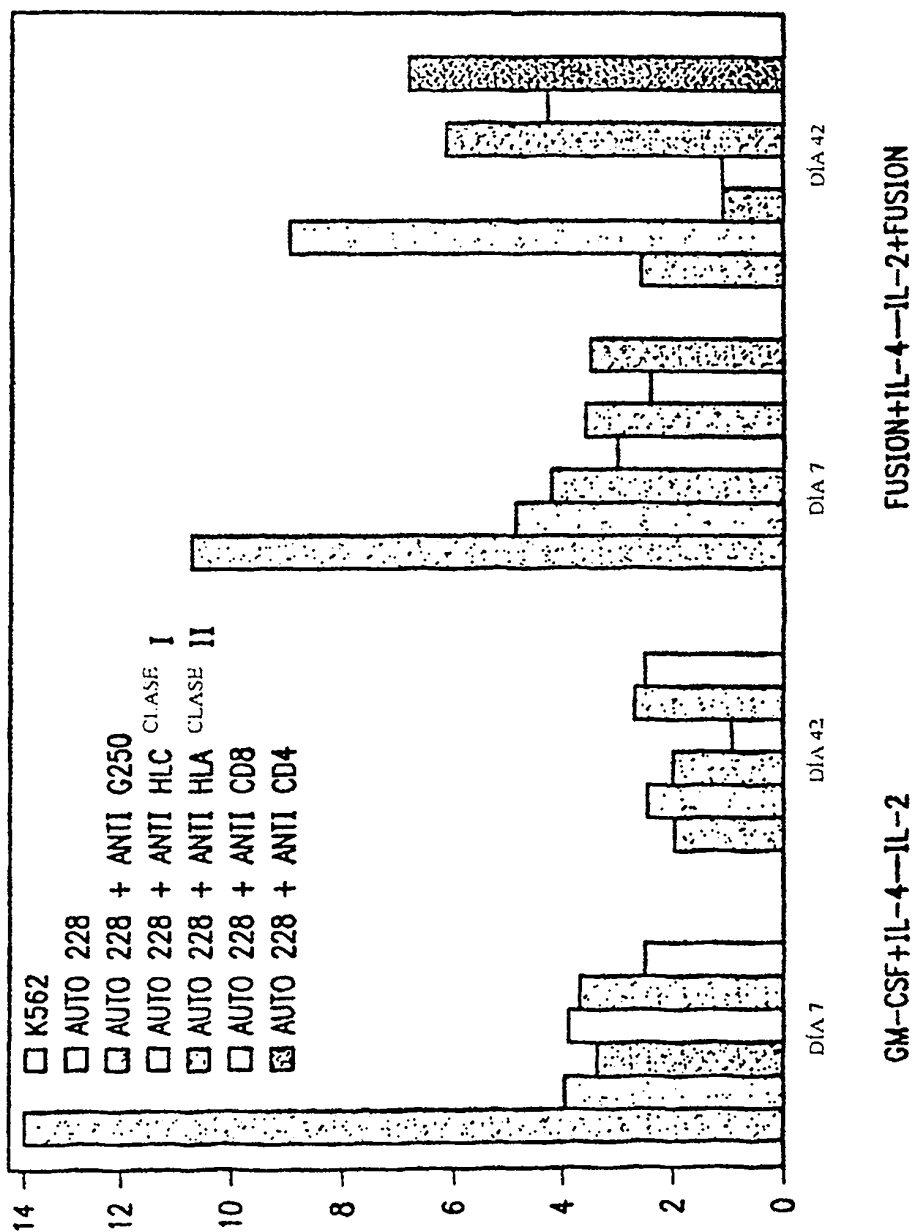


FIG. 6A

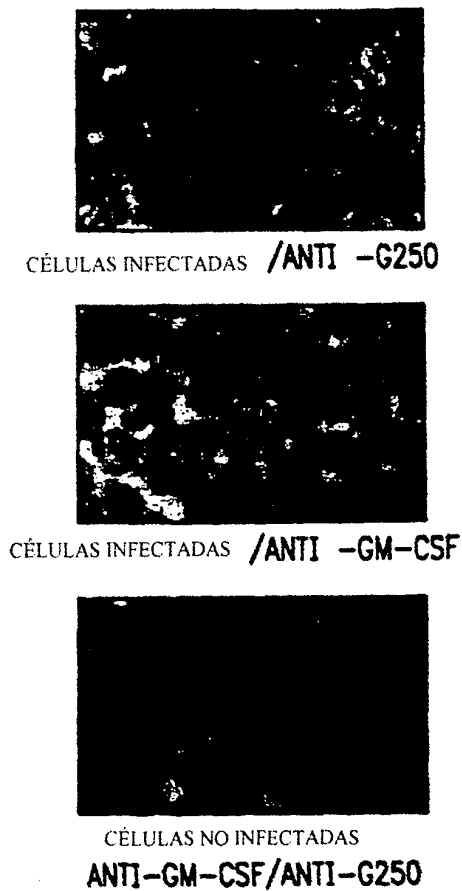


FIG. 6B

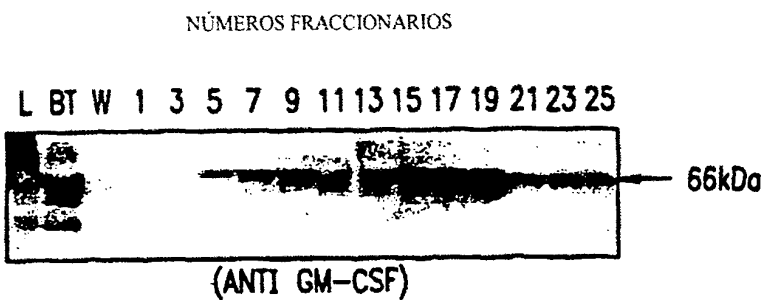


FIG. 6C

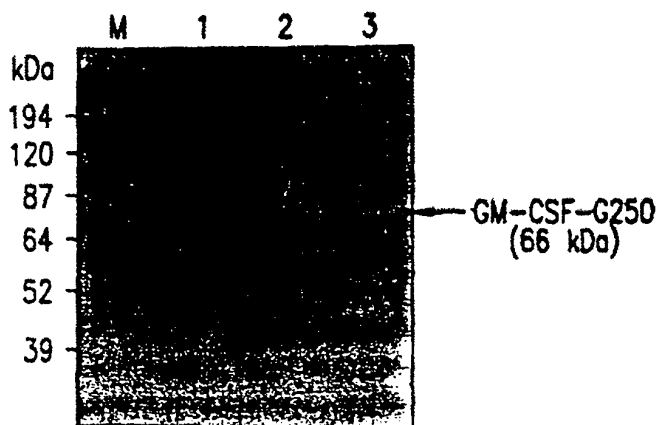


FIG. 7A

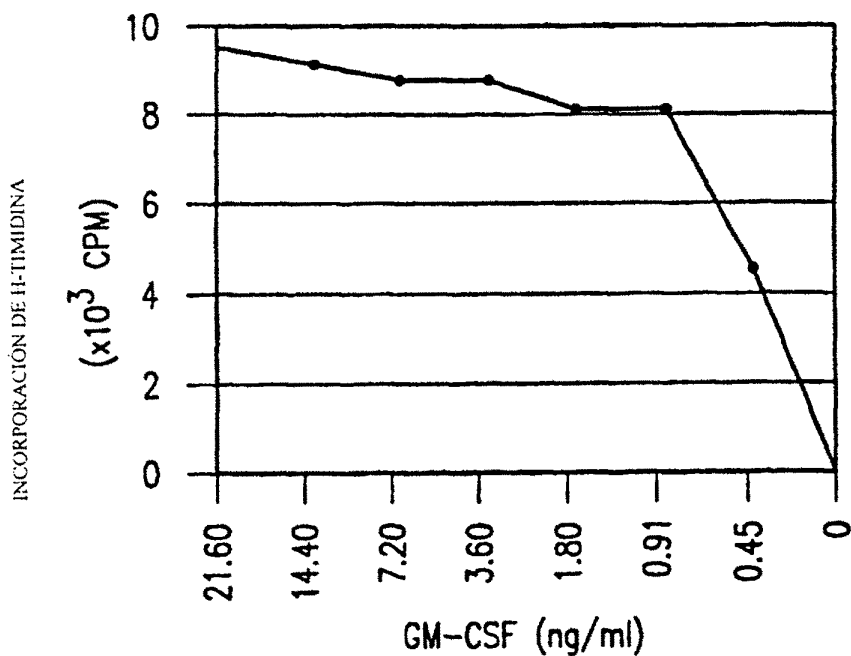
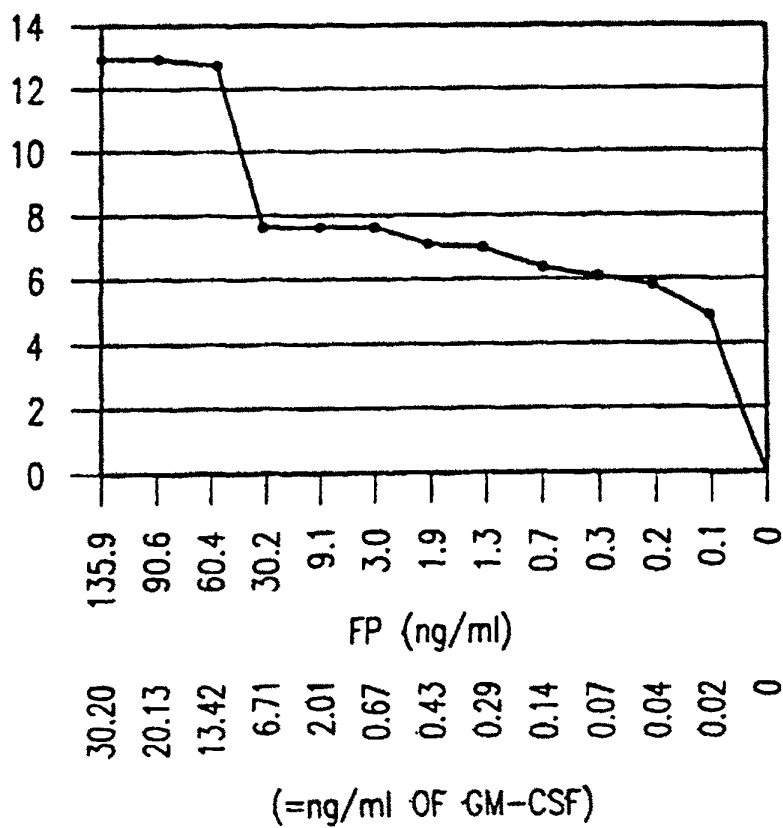


FIG. 7B



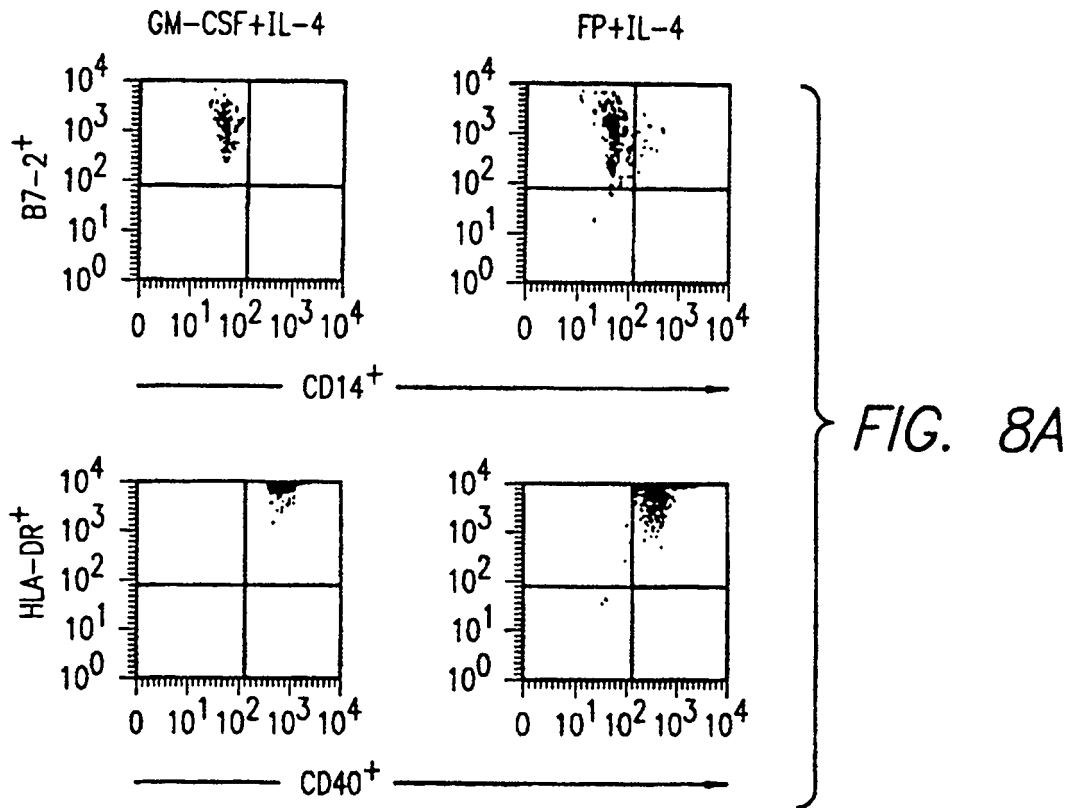


FIG. 8B

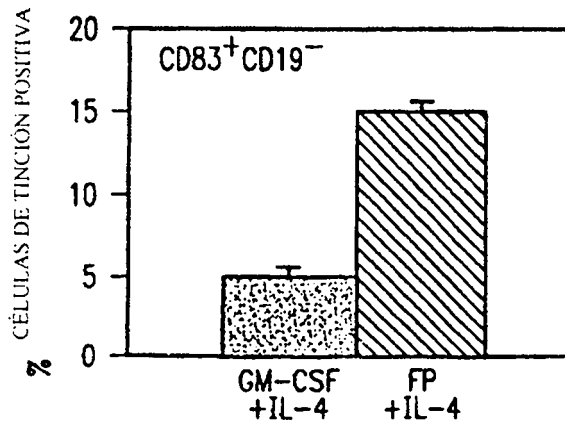
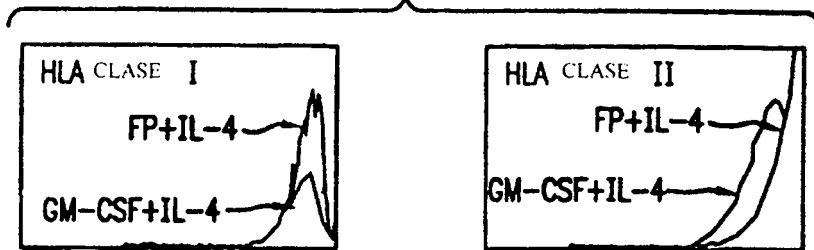


FIG. 8C

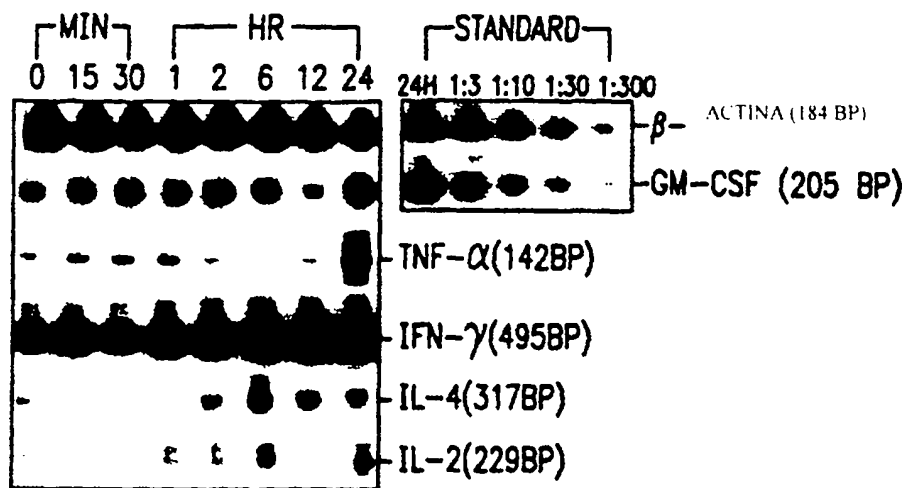


FIG. 9

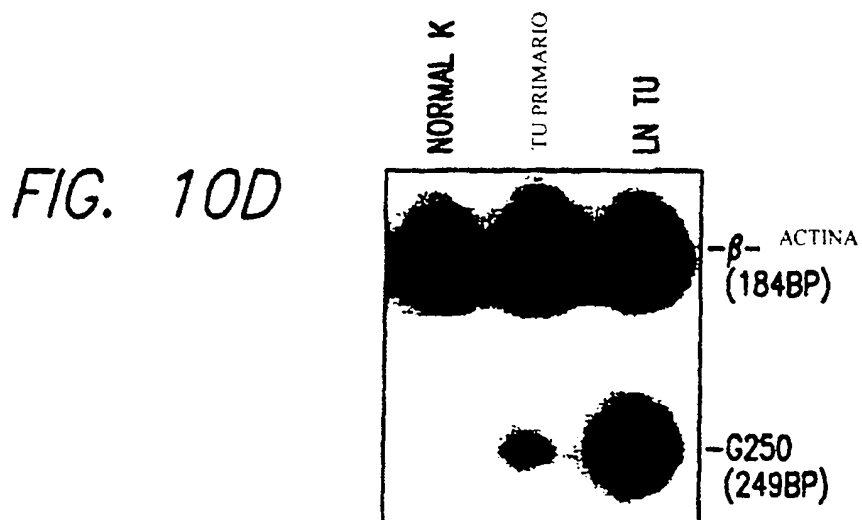
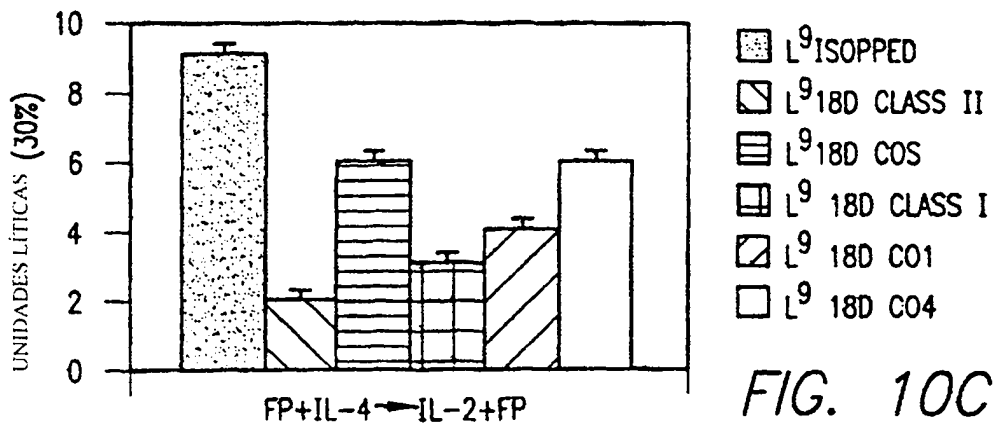
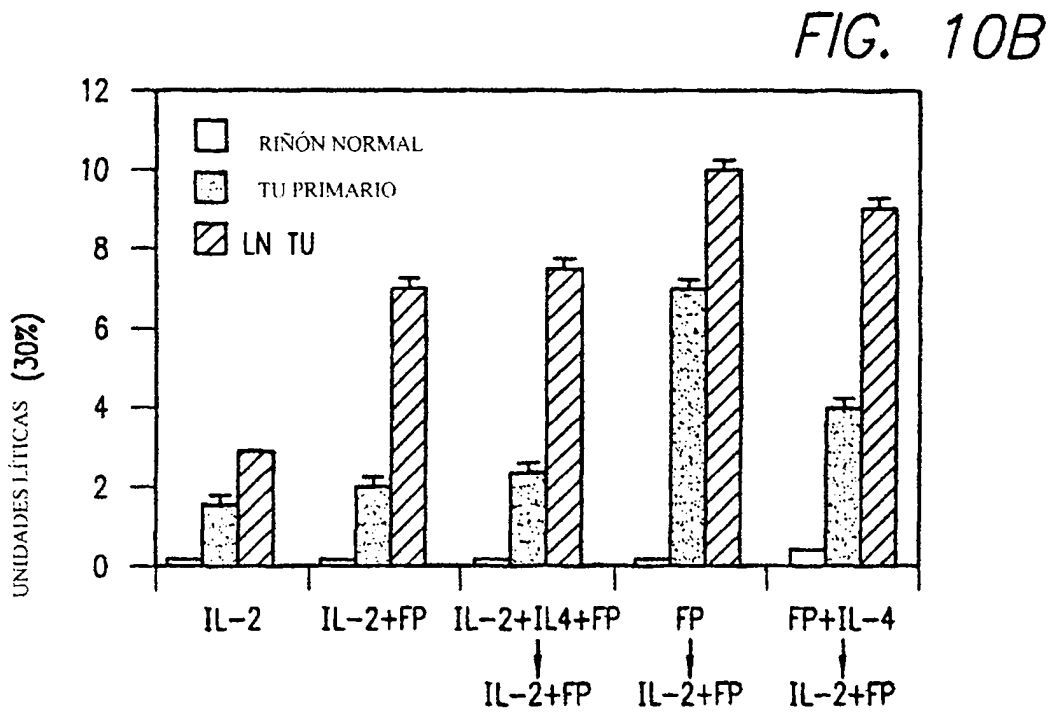
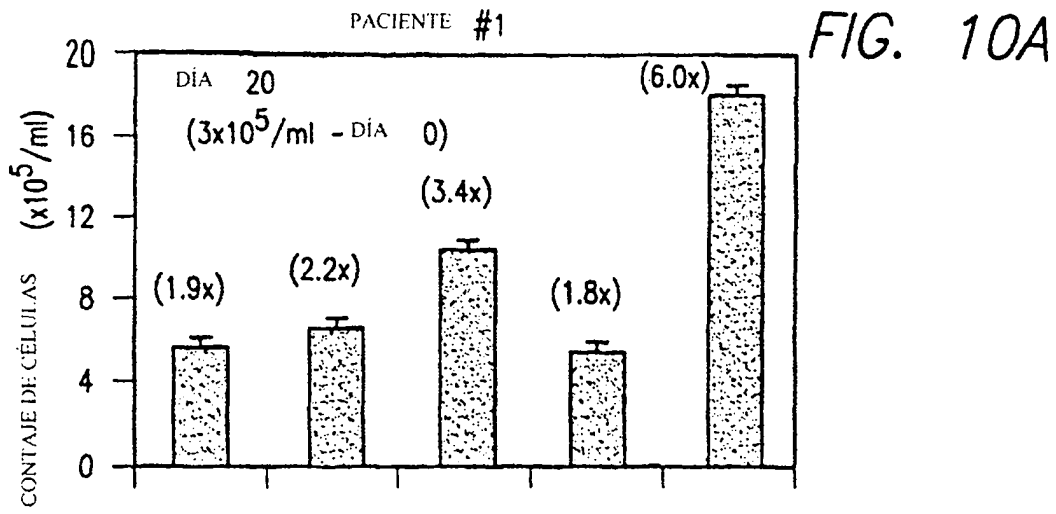


FIG. 10D



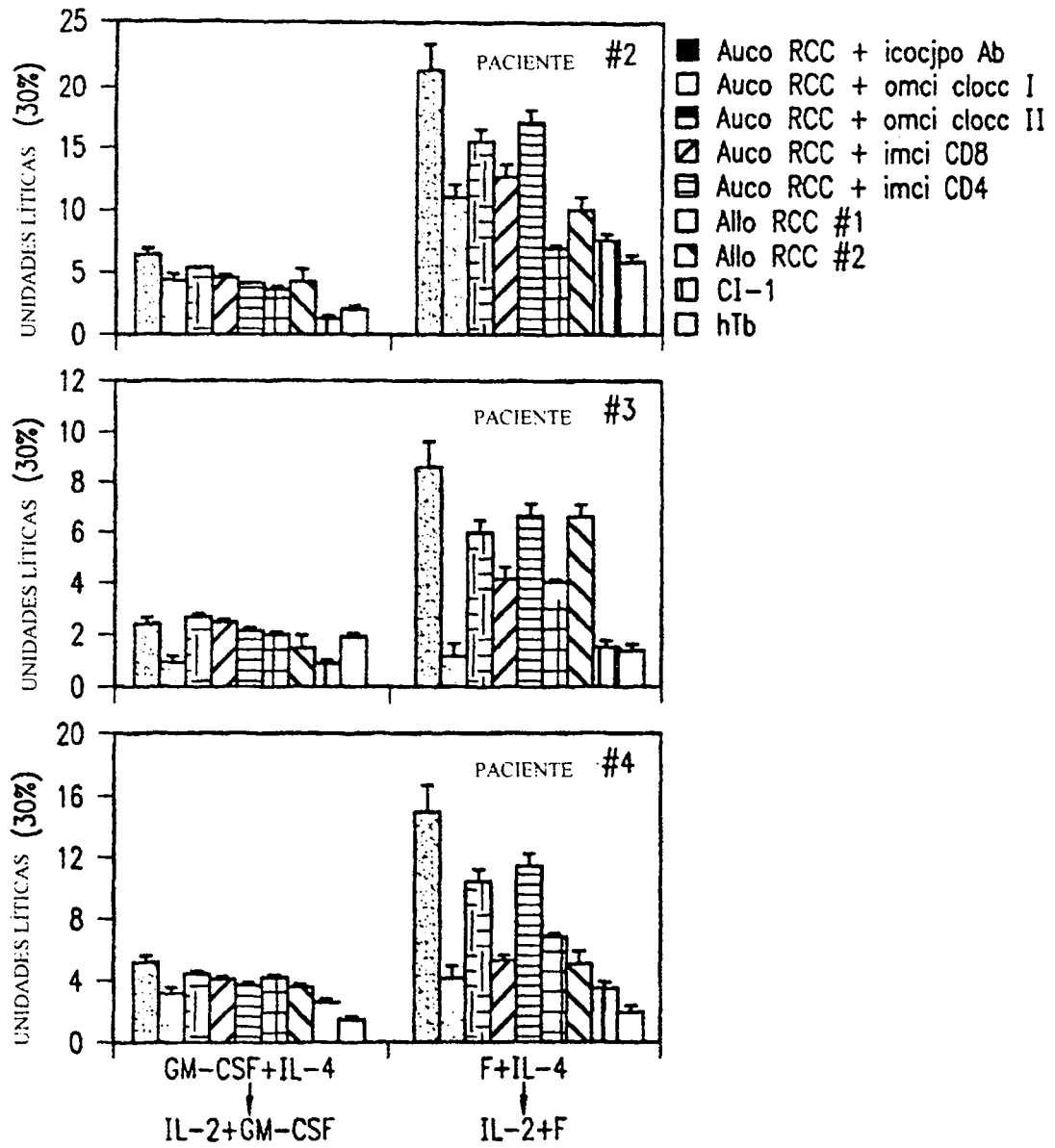


FIG. 11A

FIG. 11B

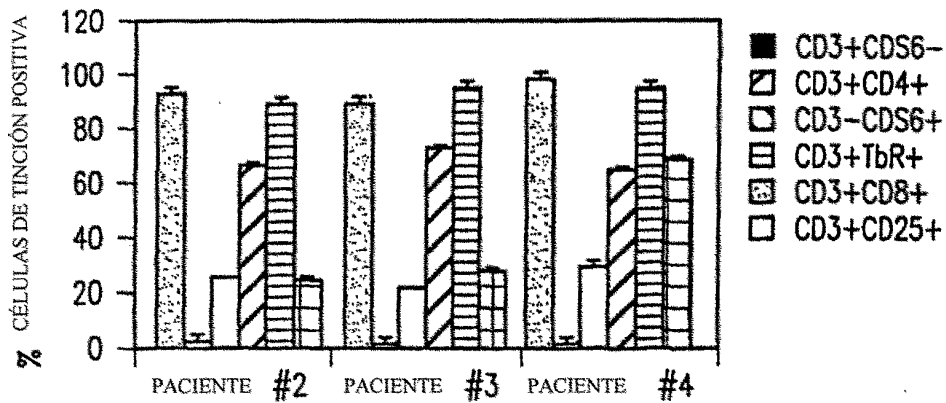
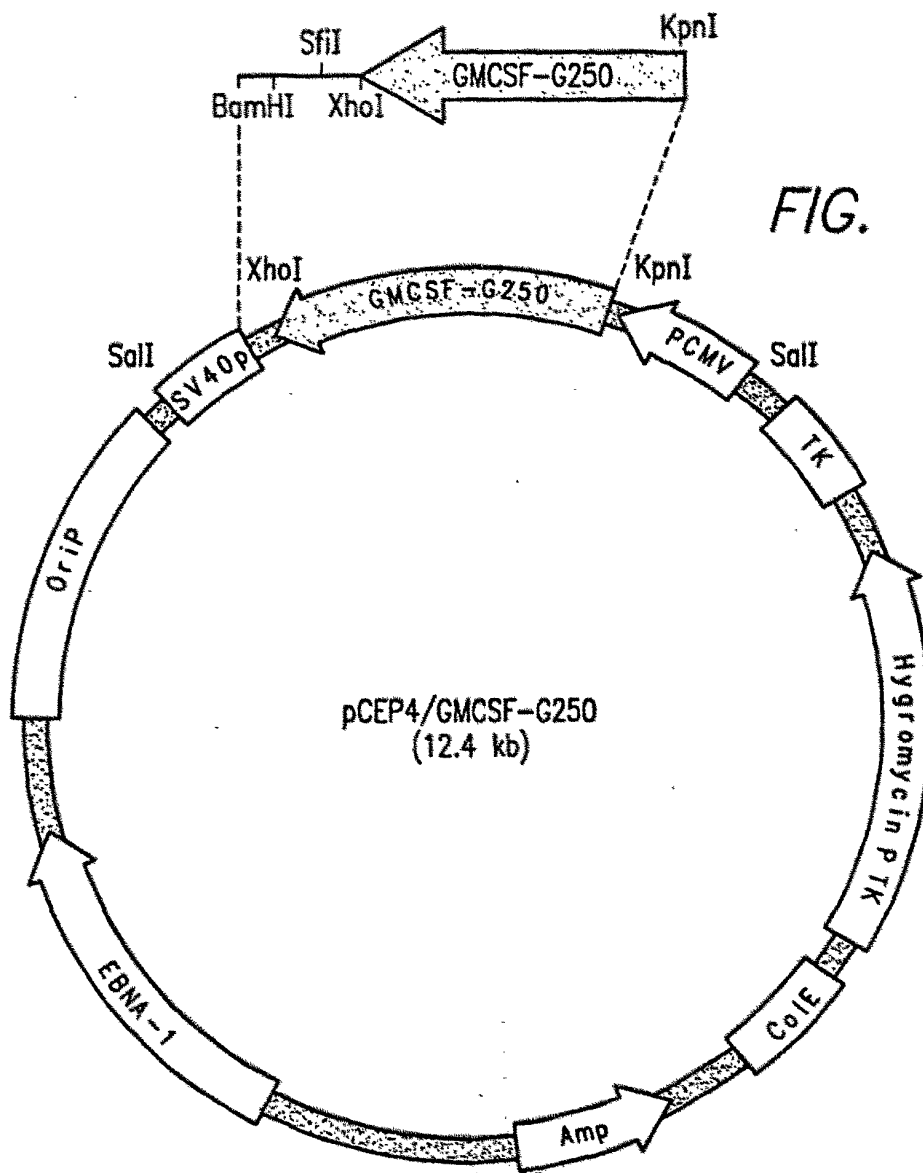


FIG. 12



# ES 2 286 104 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

SEC ID NO: 1 Secuencia de aminoácidos 1 G250-GM-CSF

5 La proteína de fusión expresada por el fragmento del gen del GM-CSF (Acceso # E02287) unido a la secuencia del gen del G250 (Acceso # X66839) a través de 6 nucleótidos que codifican para la Arginina (R):

10 MWLQSLLLLGTVACSSAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTA  
AEMNETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS�TKLKGPLTMMASH  
YKQHCPTPETSCATQITTFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQERRAPLCP  
15 PWLPLIPAPAPGLTVQLLSLLLLMPVHPQRLPRMQEDSPLGGGSSGED  
DPLGEEDLPSEEDSPREEDPPGEEDLPGEEDLPGEEDLPEVKPKSEEEGS  
LKLEDLPTVEAPGDPQEPQNNHRDKEGDDQSHWRYGGDPPWPRVSPACA  
GRFQSPVDIRPQLAAFCPALRPLELLGFQLPPLPELRLRNNGHSVQLTLP  
20 PGLEMALGPGREYRALQLHLHWGAAGRPGSEHTVEGHRFPAEIHVVHLST  
AFARVDEALGRPGGLAVLAAFLEEGPEENSAYEQLLSRLEEIAEEGSETQ  
VPGLDISALLPSDFSRYFQYEGSLTTPCAQGVWTVFNQTVMLSAKQLH  
TLDLWGPGRSRLQLNFRATQPLNGRVIEASFPAGVDSSPRAAEPVQLN  
25 SCLAAGDILALVFGLLFAVTSVAFLVQMRROHRRGTKGGVSYRPAEVAET  
GA\*HHHHHH

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 286 104 T3

SEC ID NO: 2 Secuencia de ácidos nucleicos 2 G250-GM-CSF

5 Casete de expresión del fragmento del gen del GM-CSF (Acceso # E02287) unido al gen del G250 (Acceso # X66839) por un enlazador de 6 nucleótidos (GCGGCC) e identificado con 18 nucleótidos que codifican para la histidina 6:

10 ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGCTCTTGGGCACCTGTGGCCTGCAGCATCTCTGC  
ACCCGCCCCGCTCGCCAGCCCCAGCACGCAGCCCTGGGAGCATGTGAATGCC  
ATCCAGGAGGCCCGGCGTCTCCTGAACCTGAGTAGAGACTGCTGCTGAGA  
15 TGAATGAAACAGTAGAAGTCATCTCAGAAATGTTTGACCTCCAGGAGCCGAC  
CTGCCTACAGACCCGCTGGAGCTGTACAAGCAGGGCCTGCGGGGCAGCCTC  
ACCAAGCTCAAGGGCCCCTTGACCATGATGGCCAGCCACTACAAGCAGCACT  
GCCCTCCAACCCCGGAAACTTCCCTGTGCAACCCAGATTATCACCTTTGAAAGT  
20 TTCAAAGAGAACCTGAAGGACTTTCTGCTTGTATCCCCCTTTGACTGCTGGGA  
GCCAGTCCAGGAGGCGGCCGCTCCCCTGTGCCCCAGCCCCTGGCTCCCTCTG  
TTGATCCCGGCCCTGCTCCAGGCCTCACTGTGCAACTGCTGCTGCTCACTGCT  
GCTTCTGATGCCTGTCCA'CCCCAGAGGTTGCCCCGGATGCAGGAGGATCCC  
25 CCTTGGGAGGAGGCTCTTCTGGGGAAGATGACCCACTGGGCGAGGAGGATCT  
GCCCAGTGAAGAGGATTCACCCAGAGAGGAGGATCCAQCCGGAGAGGAGGA  
TCTACCTGGAGAGGAGGATCTACCTGGAGAGGAGGATCTACCTGAAGTTAAG  
CCTAAATCAGAAGAAGAGGGCTCCCTGAAGTTAGAGGATCTACCTACTGTTG  
AGGCTCCTGGAGATCCTCAAGAACCCAGAAATAATGCCLACAGGGACAAAG  
AAGGGGATGACCAGAGTCATTGGCGCTATGGAGGCGACCCGCCCTGGCCCCG  
30 GGTGTCCCCAGCCTGCGCGGGCCGCTTCCAGTCCCCGGTGGATATCCGCCCC  
AGCTCGCCGCTTCTGCCCGGCCCTGCGCCCCCTGGAACTCCTGGGCTTCCAG  
CTCCC GCCGCTCCCAAGAACTGCGCCTGCGCAACAATGGCCACAGTGTGCAAC  
TGACCCTGCCTCCTGGGCTAGAGATGGCTCTGGGTCCCGGGCGGGAGTACCG  
GGCTCTGCAGCTGCATCTGCACTGGGGGGCTGCAGGTCTGTCGGGCTCGGAG  
35 CACTGTGGAAGGCCACCGTTTCCCTGCCGAGATCCACGTGGTTCACCTCAG  
CACCGCCTTTGCCAGAGTTGACGAGGCCTTGGGGCGCCCGGGAGGCCTGGCC  
GTGTTGGCCGCTTTCTGGAGGAGGGCCCCGGAAGAAAACAGTGCCTATGAGC  
AGTTGCTGTCTCGCTTGAAGAAATCGCTGAGGAAGGCTCAGAGACTCAGGT  
40 CCCAGGACTGGACATATCTGCACTCCTGCCCTCTGACTTCAGCCGCTACTTCC  
AATATGAGGGGTCTCTGACTACACCGCCCTGTGCCAGGGTGTCACTGACT  
GTGTTTAACCAGACAGTGATGCTGAGTGCTAAGCAGCTCCACACCCTCTCTGA  
CACCCTGTGGGACCTGGTACTCTCGGCTACAGCTGAACTTCCGAGCGACG  
45 CAGCCTTTGAATGGGCGAGTGATTGAGGCCTCCTTCCCTGCTGGAGTGGACA  
GCAGTCCCTCGGGCTGCTGAGCCAGTCCAGCTGAATTCCTGCCTGGCTGCTGGT  
GACATCCTAGCCCTGGTTTTTGGCCTCCTTTTTGCTGTACCAGCGTCGCGTTC  
50 CTTGTGCAGATGAGAAGGCAGCACAGAAGGGGAACCAAAGGGGGTGTGAGC  
TACCGCCAGCAGAGGTAGCCGAGACTGGAGCCTAGATGGTGATGGTGATG  
GTG

55

60

65