



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 335 396**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02803755 .4**

(96) Fecha de presentación : **29.11.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1448229**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

(54) Título: **Composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune en un ser humano o animal.**

(30) Prioridad: **29.11.2001 DK 2001 01770**
07.12.2001 US 336706 P

(73) Titular/es: **Dandrit Biotech A/S**
Symbion Science Park, Fruebjergvej 3
2100 Copenhagen Ø, DK

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.03.2010

(72) Inventor/es: **Kirkin, Alexei;**
Djandjougazian, Karine y
Zeuthen, Jesper

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.03.2010

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune en un ser humano o animal.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune en un ser humano o un animal. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener células dendríticas autólogas cargadas con al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y sin antígeno de diferenciación con especificidad de linaje 10 o sustancialmente sin antígeno de diferenciación con especificidad de linaje. En otro aspecto, la presente invención se refiere a una línea celular de melanoma aislada. En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición como una vacuna inmunoterapéutica y al uso de células dendríticas autólogas como células presentadoras de antígeno en una composición farmacéutica o una vacuna. En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para producir un medicamento que induce una respuesta inmune en un ser humano o en un animal.

15 Técnica antecedente

Los cánceres avanzados representan una de las causas principales de muerte en los seres humanos. Hasta ahora 20 no se ha sugerido ningún método de tratamiento eficaz. La inmunoterapia para el cáncer pretende destruir las células tumorales por mecanismos inmunológicos. La inmunoterapia, en comparación con métodos convencionales de terapia para el cáncer tales como la cirugía, la radiación y la quimioterapia, es mucho menos tóxica y hasta la fecha no se han descrito complicaciones graves. Además, la inmunoterapia puede actuar en diferentes estadios de la enfermedad. En los estadios iniciales podría ser un buen tratamiento complementario a la eliminación quirúrgica de tumores primarios, con el objetivo de impedir el desarrollo de la enfermedad diseminada. En estadios avanzados de la enfermedad podría 25 ser el único medio de tratamiento, ya que los métodos convencionales con frecuencia son ineficaces.

La función principal del sistema inmune es identificar y destruir sustancias extrañas (antígenos) que invaden el organismo. El sistema inmune puede discriminar lo “propio” de lo “ajeno” y en condiciones normales sólo desarrollar 30 una respuesta inmune contra antígenos extraños o “ajenos”. Aunque las células cancerosas proceden de las propias células de los organismos, se tratan como extrañas por el sistema inmune natural. Sin embargo, esta respuesta inmune natural no es suficientemente fuerte para bloquear la aparición y el crecimiento del tumor. La tarea de la inmunoterapia es aumentar la capacidad del sistema inmune de reconocer células tumorales y desarrollar mecanismos eficaces de eliminación de tumores. Las dos cuestiones principales en cualquier inmunoterapia específica son a qué antígenos dirigirse y encontrar la presentación óptima del antígeno al sistema inmune.

35 Los antígenos asociados a tumores (TAA) reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CTL) son el componente más eficaz para establecerse como diana entre los mecanismos efectores conocidos en la inmunidad antitumoral. Hay dos tipos principales de TAA: antígenos únicos, presentes sólo en unos pocos tumores y por lo tanto no útiles como dianas generales, y TAA compartidos o comunes, presentes en muchos tumores. Actualmente se están considerando 40 tres grupos principales de antígenos compartidos como posibles dianas para la inmunoterapia y se ha demostrado que todos ellos inducen la generación de linfocitos T citotóxicos. Los tres grupos son: antígenos de cáncer/testículo (antígenos CT), antígenos expresados en exceso en tumores y antígenos de diferenciación con especificidad de linaje.

45 Los antígenos CT se codifican por genes específicos de la línea germinal o de una línea cancerosa, representando uno de los grupos más grandes de antígenos asociados a tumores compartidos. Los antígenos CT se descubrieron originalmente en melanomas, pero también se han encontrado en muchas otras malignidades humanas. Entre los tejidos normales sólo se expresan en testículo y en algunos casos en placenta. Las células normales que expresan estos antígenos no pueden expresar moléculas del MHC y, por lo tanto, estos antígenos normalmente no están accesibles para el reconocimiento por los linfocitos T.

50 Esto hace que los antígenos CT sean dianas muy atractivas para una inmunoterapia específica para cánceres.

Ciertos ensayos clínicos recientes han demostrado regresión tumoral en un número significativo de melanomas y pacientes con cáncer de vejiga mediante el establecimiento como diana de un antígeno CT específico ((Ni-shiyama *et al.*, 2001, Clin. Cancer Res., v. 7, págs. 23-31; Thurner *et al.*, 1999, J. Exp. Med., v. 190, págs. 1669-1678)). Sólo 55 se ha notificado reconocimiento de antígenos CT por las células T para algunos antígenos CT y se han determinado los epítopos de péptidos correspondientes. Sin embargo, todos los antígenos CT podrían considerarse posibles dianas para inmunoterapia. Se ha encontrado una correlación de la expresión de antígenos MAGE-A y progresión tumoral en varias malignidades ((Brasseur *et al.*, 1995, Int. J. Cancer, v. 63, págs. 375-380; Eura *et al.*, 1995, Int. J. Cancer, v. 64, págs. 304-308; Katano *et al.*, 1997, J. Surg. Oncol., v. 64, págs. 195-201; Patard *et al.*, 1995, Int. J. Cancer, v. 64, págs. 60-64)). Otro grupo de antígenos CT, los antígenos MAGE-B, muestran una expresión específica de tumor 60 significativamente menor que los antígenos MAGE-A. Un tercer grupo, los antígenos MAGE-C, presentan un patrón de expresión que se parece al patrón de los antígenos MAGE-A. Aún no se ha notificado ninguna respuesta de CTL contra los antígenos MAGE-C.

65 Se han descrito varias proteínas no pertenecientes al grupo MAGE con las características de los antígenos CT. Una de ellas, NY-ESO-1, es uno de los antígenos tumorales más inmunogénicos identificados hasta la fecha. Ciertos ensayos clínicos con inmunización con péptidos de pacientes con melanoma demostraron la estabilización de la enfer-

ES 2 335 396 T3

medad y la regresión de algunas metástasis en algunos pacientes ((Jäger *et al.*, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A, v. 97, págs. 12198-12203)).

A diferencia de los antígenos CT, los antígenos expresados en exceso en tumores carecen absolutamente de expresión con especificidad tumoral, ya que su expresión podría detectarse a bajos niveles en algunos tipos de tejidos normales distintos del testículo. El desarrollo de inmunoterapia para algunos de estos antígenos podría ser beneficioso para pacientes con cáncer, y actualmente estos antígenos, tales como CEA, p53, HER-2/Neu, MUC-1 y alfa-fetoproteína se están investigando intensivamente como posibles dianas en ensayos clínicos. El grupo de antígenos tumorales expresados en exceso sólo se ha usado recientemente como dianas en ensayos clínicos, y por lo tanto no se dispone de datos sobre la eficacia de la inducción de respuestas inmunes terapéuticas.

Los antígenos con especificidad de linaje, los antígenos de diferenciación de melanocitos y los antígenos asociados con la próstata, hasta ahora sólo se han descrito para dos tipos de cánceres humanos: melanomas y cáncer de próstata. Este grupo de antígenos se expresa tanto en tejido normal diferenciado como en dos tipos de cánceres humanos. En tejido normal diferenciado estos antígenos muy rara vez inducen una respuesta inmune, sin embargo, estas proteínas se vuelven inmunogénicas en células cancerosas y en el caso de los melanomas es posible detectar células T destructoras que reaccionan con antígenos de diferenciación de melanocitos. Un número importante de ensayos clínicos dirigidos contra melanomas o cáncer de próstata emplean el establecimiento como diana de antígenos de diferenciación.

Entre los grupos de antígenos asociados a tumores se obtuvieron los datos más prometedores usando TAA como dianas para la inmunoterapia con algunas de las proteínas MAGE. Sin embargo, especialmente en el caso de los melanomas, el efecto terapéutico era inestable y algunas metástasis continuaron creciendo. Estas metástasis normalmente eran negativas para la expresión de los antígenos MAGE usados para la inmunización ((Thurner *et al.*, 1999, J. Exp. Med., v. 190, págs. 1669-1678)).

Una posibilidad para inducir una respuesta inmune polivalente es emplear células tumorales enteras o material procedente de células enteras. Los documentos WO 9003183, US 5.840.317 y US 6.187.306 describen varias preparaciones de vacunas basadas en células de melanoma. El documento US 4.108.983 describe una vacuna de melanoma de primera generación derivada de células de melanoma lisadas por un virus vaccinia.

Los documentos US 5.635.188 y US 5.030.621 describen una vacuna de antígenos de la superficie celular procedentes de células de melanoma que se han echado en el medio de cultivo y que posteriormente se usa como vacuna anti-melanoma. De forma similar, el documento US 5.484.596 describe un método de terapia para cánceres en el que se inyectan células tumorales irradiadas en un paciente humano como vacuna. El documento US 6.187.306 se refiere a líneas celulares de melanoma que expresan antígenos de melanoma inmunodominantes compartidos y métodos de uso.

Un aspecto importante de cualquier terapia de vacuna es la forma de administración de la vacuna. En los últimos años se ha sabido que la forma más eficaz de administración de antígenos a las células T, especialmente a células T vírgenes, es por medio de células dendríticas. Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígeno más eficaces y ya se ha usado la inmunoterapia basada en DC en diferentes escenarios para el tratamiento de cánceres ((Kugler *et al.*, 2000, Nat. Med., v. 6, págs. 332-336; Nestle *et al.*, 1998, Nature (Med.), v. 4, págs. 328-332; Thurner *et al.*, 1999, J. Exp. Med., v. 190, págs. 1669-1678)), lo que demuestra la alta potencia de esta forma de inmunización.

Una de las propiedades únicas de las DC es su capacidad de captar proteínas exógenas por endocitosis, que después se procesan y se presentan como epítopos peptídicos en su superficie junto con antígenos del MHC de clase I. Las células dendríticas presentadoras de antígenos pueden reconocerse por células T citotóxicas. Esta propiedad es extremadamente importante cuando se aplican antígenos de células tumorales en forma de lisados tumorales o cuerpos apoptóticos añadidos exógenamente. Se cree que la alta actividad endocítica está asociada con el estado inmaduro de diferenciación de las DC basándose en la comparación de DC maduras e inmaduras ((Sallusto *et al.*, 1995, J. Exp. Med., v. 182, págs. 389-400)). Nunca se ha considerado la posibilidad de que puedan existir diferencias en la actividad endocítica entre DC inmaduras.

El documento WO 0127245 describe un método para obtener células precursoras dendríticas a partir de sangre periférica por leucoféresis convencional, centrifugación en gradiente de densidad creciente y cultivo de las células *ex vivo* en medio sin suero durante 40 horas en ausencia de citocinas añadidas exógenamente.

El documento WO 0146389 se refiere a un método para generar células dendríticas a partir de productos de leucoféresis en sistemas cerrados, por medio del uso de un medio de cultivo que carece de proteínas no humanas. En el medio de cultivo se usan citocinas de calidad clínica (IL-4 y GM-CSF) y se añaden TAA para la carga de las DC.

Thurner *et al.*, 1999, J. of Immunological Methods 223: 1-15, menciona un método para la generación reproducible de grandes números de DC maduras a partir de monocitos CD14+ por medio de un método de dos etapas en el que se añaden citocinas después del día 1.

La combinación de células dendríticas con TAA también se describe en el documento WO 0128583, que está relacionado con una vacuna inmunoterapéutica que proporciona células presentadoras de antígeno que se han sometido a pulsos con una preparación de células rotas que incluye membranas celulares de células cancerosas infectadas

con virus vaccinia recombinante que codifica al menos una molecular inmunoestimuladora. También se incluyen DC autólogas que presentan una mezcla de antígenos de líneas celulares de melanoma infectadas con un virus vaccinia recombinante que codifica IL-2. En el documento WO 0129192 se describe un método para inducir una respuesta inmune con especificidad tumoral en un paciente, en el que se incuban células presentadoras de antígeno del paciente 5 con partes de células muertas que poseen al menos un antígeno tumoral y las células presentadoras de antígeno cargadas resultantes se administran al paciente.

Aunque las vacunas inmunoterapéuticas para el tratamiento de cánceres han mejorado durante los últimos años, sigue existiendo la necesidad de composiciones más seguras y más eficaces para uso en la inmunoterapia de cánceres. 10 Estas vacunas deberían ser polivalentes al dirigirse a varios antígenos CT para evitar la extensión de variantes de pérdida de antígeno. Deberían ser más seguras sin los riesgos potenciales de dirigirse a antígenos expresados en tejidos normales. Deberían optimizarse para la presentación y administración de los antígenos a las células T y también debería tenerse cuidado de seleccionar los TAA más eficaces como dianas.

15 Descripción de la invención

La presente invención ha solucionado estos problemas por medio de una selección cuidadosa de las líneas celulares de melanoma para suministrar los TAA más eficaces seguido de una posterior exploración para evitar cualquier antígeno que pueda ser perjudicial para el paciente. Además, las células presentadoras de antígeno se han optimizado 20 con respecto a su actividad endocítica antes de cargar las DC con el lisado de células de melanoma enteras.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune en un ser humano o un animal, que comprende células dendríticas que presentan una multiplicidad de antígenos de cáncer/testículo, en la que

- 25 a) las células dendríticas presentan al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje, proporcionándose dichos antígenos por al menos una línea celular de cáncer que expresa al menos cinco antígenos de cáncer/testículo diferentes y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje, significando esto que en un ensayo de citotoxicidad de 4 horas en presencia de antígenos de diferenciación de melanocitos/con especificidad de linaje, dichas células experimentan menos de 10% de lisis
- 30 b) las células dendríticas se han cultivado *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas antes de cargar las células dendríticas con los antígenos de cáncer/testículo,
- 35 c) las células dendríticas son inmaduras, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83, durante la carga de los antígenos de cáncer/testículo, y
- 40 d) las células dendríticas se han hecho madurar por la adición de factores de maduración después de la carga de los antígenos.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para obtener células dendríticas autólogas 45 humanas o animales cargadas con al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y sin antígenos de diferenciación con especificidad de linaje o sustancialmente sin antígenos de diferenciación con especificidad de linaje, que comprende las etapas de:

- 50 a) cultivar células dendríticas inmaduras autólogas, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83 obtenidas a partir de dicho ser humano o animal *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas, y
- 55 b) cargar dichas células dendríticas inmaduras autólogas, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83 procedentes de a) con los antígenos de cáncer/testículo obtenidos a partir de un lisado de células enteras de dicha al menos una línea celular de cáncer que expresa al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje como se define en la reivindicación 1, y
- 60 c) conseguir la maduración de las células dendríticas cargadas de b) por medio de la adición de factores de maduración.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una línea celular de melanoma aislada, que expresa al menos 65 cinco antígenos de cáncer/testículo y sin antígenos de diferenciación de melanocitos o sustancialmente sin antígenos de diferenciación de melanocitos como se define en la reivindicación 28.

ES 2 335 396 T3

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de una multiplicidad de antígenos de cáncer/testículo que pueden obtenerse a partir de una línea celular de cáncer aislada de la reivindicación 28 en una composición farmacéutica o formulación de vacuna.

5 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere al uso de células dendríticas como células presentadoras de antígeno en una composición farmacéutica o una vacuna, y donde dichas células dendríticas se cargan con los antígenos en su estado inmaduro, momento en el que las células dendríticas son positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83, donde las células dendríticas se han cultivado *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende 10 citocinas antes de cargar la célula dendrítica con al menos cinco antígenos de cáncer/testículo.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir un medicamento para inducir una respuesta inmune en un ser humano o animal, que comprende las etapas de:

- 15 a) cultivar células dendríticas inmaduras autólogas, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83 obtenidas a partir de dicho ser humano o animal *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio nuevo que comprende citocinas, y
- 20 b) cargar dichas células dendríticas inmaduras autólogas, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83 de a) con los antígenos de cáncer/testículo obtenidos a partir de un lisado de células enteras de dicha al menos una línea celular de cáncer que expresa al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje como se define en la reivindicación 1, y
- 25 c) conseguir la maduración de dichas células dendríticas cargadas de b) por la adición de factores de maduración después de cargar los antígenos.

Breve descripción de los dibujos

30 La invención se explica con detalle a continuación haciendo referencia a los dibujos, en los que

La Figura 1 muestra la sensibilidad a la lisis por clones de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos para gp100 y MART-1/Melan A de varios clones de melanoma DDM-1.

35 La Figura 2 muestra la expresión de antígenos de diferenciación de melanocitos gp 100 y MART-1/Melan A en tres clones de células de melanoma, DDM-1.7, DDM-1.13 y DDM-1.29 analizados por RT-PCR.

La Figura 3 muestra la expresión del antígeno de diferenciación de melanocitos gp 100 en células DDM-1.7 y 40 DDM-1.29, determinada por inmunotinción.

La Figura 4 muestra la expresión de MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A12, NY-ESO-1 y GAPDH en los tres clones de células de melanoma DDM-1.7, DDM-1.13 y DDM-1.29, analizada por análisis de RT-PCR.

45 La Figura 5 muestra la expresión de MAGE-A y NY-ESO-1 en células DDM-1.13 después del tratamiento con el agente de desmetilación de ADN 5-aza-2'-desoxicitidina.

La Figura 6 muestra la captación por endocitosis de fluoroesferas por cuatro cultivos de células dendríticas inmaduras.

La Figura 7 muestra la producción de IFN- γ por un clon de CTL con especificidad de gp100 después de la interacción con cuatro cultivos de células dendríticas (igual que en la Fig. 6) cargadas con lisado de células DDM-1.29.

55 La Figura 8 muestra la actividad citolítica de linfocitos inmunes del donante ANBI contra células de melanoma, células B transformadas con EBV y células K562.

La Figura 9 muestra la actividad citolítica de linfocitos inmunes del donante 19/00 contra líneas celulares de carcinoma de células escamosas y de mama.

La Figura 10 muestra la expresión de genes *MAGE-A* y *GAPDH* en líneas de células de cáncer de mama, analizada por análisis de RT-PCR

65 Mejor modo para realizar la invención

Antes de una descripción de las realizaciones detalladas de la invención, se proporciona una definición de términos específicos relacionados con los aspectos principales de la invención.

ES 2 335 396 T3

Definiciones

Linfocitos T citotóxicos: Los linfocitos son glóbulos blancos mononucleares pequeños presentes en los tejidos linfoides y en la sangre y linfa circulantes. Hay dos tipos funcionales principales, linfocitos B y linfocitos T, que intervienen en reacciones inmunes con especificidad de antígeno. Los linfocitos T (células T) son un tipo de linfocitos pequeños con especificidad de antígeno que se originan en el timo (en mamíferos) y están presentes en tejidos linfoides secundarios (por ejemplo, ganglios linfáticos, bazo) y en la sangre, y que están implicados en reacciones inmunes celulares y ayudan a la producción de anticuerpos. Los linfocitos T llevan receptores con especificidad de antígeno en su superficie y sólo reaccionan con el antígeno extraño que se les presenta en la superficie de una célula. Los tipos principales de linfocitos T son: células T citotóxicas que reconocen y destruyen células corporales que se han alterado antigenicamente de alguna manera (por ejemplo, por infección por un virus), células T auxiliares que se activan por un antígeno extraño en la superficie de células presentadoras de antígeno y que a su vez activan a las células B apropiadas, y células T supresoras que están implicadas en la represión de respuestas inmunes y en la regulación general del sistema inmune.

Antígenos de cáncer/testículo (antígenos CT): Antígenos codificados por genes específicos de línea cancerosa o de línea germinal, que representan uno de los grupos más grandes de antígenos asociados a tumores compartidos. Los antígenos CT se descubrieron originalmente en melanomas, pero también se han encontrado en muchas otras malignidades humanas. Entre los tejidos normales sólo se expresan en testículo y en algunos casos en placenta. Las células normales que expresan estos antígenos carecen de la expresión de moléculas del MHC y por lo tanto estos antígenos normalmente no están accesibles para el reconocimiento por los linfocitos T.

Antígenos de diferenciación con especificidad de linaje: Un grupo de antígenos de diferenciación, hasta ahora sólo descritos para melanomas y cáncer de próstata. Estos antígenos son sólo inmunogénicos en células cancerosas y el grupo comprende los antígenos de diferenciación de melanocitos gp100, Melan-A/MART-1, Tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MC1R, AIM-1 y los antígenos asociados a la próstata PSA (antígeno prostático específico), PSMA (antígeno prostático específico de membrana), PAP (fosfatasa asociada a la próstata) y PSCA (antígeno de células madre de la próstata).

Antígenos de diferenciación de melanocitos: Un grupo de antígenos expresados tanto en melanocitos diferenciados normales como en melanomas. En los melanocitos diferenciados normales estos antígenos muy rara vez inducen una respuesta inmune, sin embargo, estas proteínas se vuelven inmunogénicas en células cancerosas y en el caso de melanomas es posible detectar células T destructoras reactivas contra antígenos de diferenciación de melanocitos. Se cree que las proteínas son responsables de la síntesis del pigmento melanina.

Células dendríticas: Tipo de célula no linfocítica presente en algunos tejidos linfoides, que actúa como célula presentadora de antígenos por endocitosis de proteínas exógenas que después se procesan y se presentan como epítopos en su superficie junto con antígenos del MHC de clase I y II. Las células dendríticas presentadoras de antígenos pueden reconocerse por las células T citotóxicas y las células T auxiliares. El estado de maduración de las células dendríticas es importante para su actividad fagocítica/endocítica. Las células dendríticas inmaduras son las células más eficaces para cargar antígenos.

Células dendríticas inmaduras: Células dendríticas en las que la expresión de ciertos marcadores celulares CD1a, CD14 y CD83 se caracteriza por una alta expresión de CD1a (más de 50% de las DC de la población son positivas para CD1a), sin expresión o con una baja expresión de CD14 (menos de 15% de las DC de la población son positivas para CD14) y con una baja expresión de CD83 (menos de 25% de las DC de la población son positivas para CD83).

Exosomas: Los exosomas son vesículas de membrana de 30 a 100 nm de diámetro, de origen endocítico, y se producen y secretan *in vitro* por células vivas de diversos orígenes.

Citocinas: Proteínas del sistema inmune que son modificadoras de la respuesta biológica. Coordinan interacciones del sistema inmune mediado por anticuerpos y el sistema inmune mediado por células T y amplifican la inmunorreactividad. Las citocinas incluyen monocinas sintetizadas por macrófagos y linfocinas producidas por linfocitos T activados y células destructoras naturales. Las monocinas incluyen la interleucina (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón α y β (IFN) y factores estimuladores de colonias. Las linfocinas incluyen IL, γ -IFN, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y linfotoxina. Las células endoteliales y los fibroblastos y otros tipos celulares seleccionados también pueden sintetizar citocinas. Los ejemplos de citocinas adecuadas de acuerdo con la invención incluyen IL-4, GM-CSF, IL-13, IFN- γ , Flt-31, SCF y TNF- α .

Melanoma: Un cáncer o tumor maligno con un grado variable de gravedad, que tiende a extenderse o metastatizar en estadios avanzados de la enfermedad.

Carga de células dendríticas: La captación de proteínas exógenas por endocitosis y la presentación de epítopos peptídicos en la superficie de la célula dendrítica. Algunas veces también se denomina "pulso".

La expresión "sustancialmente sin antígenos de diferenciación de melanocitos/con especificidad de linaje" en relación con la presente invención significa que la línea celular de cáncer/melanoma a usar para preparar un lisado de células enteras no debe expresar antígenos de diferenciación de melanocitos/con especificidad de linaje en cantidades

ES 2 335 396 T3

- que ocasionen la estimulación de una respuesta inmune contra el antígeno de diferenciación de melanocitos/con especificidad de linaje. En la práctica, esto significa que las células de cáncer/melanoma son insensibles a la lisis por linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos de diferenciación de melanocitos/con especificidad de linaje (la lisis es menor de 10%, particularmente menor de 5% y más particularmente menor de 2% en un ensayo de citotoxicidad de 4 horas) y sólo 1-2% de las células se tiñen positivamente por anticuerpos contra antígenos de diferenciación de melanocitos/con especificidad de linaje. Además, la cantidad de transcritos de ARN de los genes que codifican los antígenos de diferenciación de melanocitos/con especificidad de linaje es al menos aproximadamente 100 veces menor en estas líneas celulares que en líneas celulares de alta sensibilidad, como se determina por RT-PCR semicuantitativa.
- 10 Respuesta inmune: Una respuesta selectiva montada por el sistema inmune de vertebrados en la que se producen anticuerpos y/o células citotóxicas específicas contra microorganismos invasores, parásitos, tejido trasplantado y muchas otras sustancias que se consideran extrañas por el cuerpo (antígenos). La producción de anticuerpos que circulan en la sangre se conoce como respuesta inmune humoral y la producción de células citotóxicas se conoce como respuesta inmune celular o mediada por células.
- 15 Vacuna inmunoterapéutica: Una vacuna administrada para tratar y/o prevenir la progresión adicional de una enfermedad en un hospedador al que ya se le ha diagnosticado la enfermedad.
- 20 Células autólogas: Células que son células del propio individuo.
- 20 Alogénico: Genéticamente diferente, pero de la misma especie.
- 25 Célula presentadora de antígenos: Célula linfoide especializada tal como células dendríticas, células B y células monocíticas, que pueden inducir la activación de células T.
- 30 Monocitos: Glóbulos blancos fagocíticos relacionados con macrófagos. Los monocitos representan otro tipo de células presentadoras de antígenos, que principalmente reactivan a los linfocitos T citotóxicos sensibilizados previamente.
- 35 Células dendríticas precursoras: Monocitos CD14+ presentes en sangre periférica o células CD34+ presentes en médula ósea o en sangre periférica (especialmente después de la movilización).
- 40 Inmunodominante: Antígeno presente junto con otros antígenos que predominantemente estimula la respuesta inmune contra sí mismo.
- 45 La presente invención se refiere a una composición terapéutica mejorada que se usará, por ejemplo, como una vacuna inmunoterapéutica. La forma más eficaz de administrar un antígeno a células T, especialmente a células T vírgenes, es por medio de células dendríticas autólogas. En ensayos clínicos se han usado varios antígenos asociados a tumores diferentes de cualquiera de los tres grupos: antígenos CT, antígenos expresados en exceso en tumores y antígenos con especificidad de linaje, y hasta ahora los resultados más prometedores se han visto con antígenos del grupo de los antígenos de cáncer/testículo.
- 50 Los antígenos expresados en exceso en tumores, a diferencia de los antígenos CT, carecen absolutamente de expresión con especificidad tumoral, ya que su expresión puede detectarse en algunos tejidos normales distintos de testículo, aunque a niveles significativamente menores que en las células tumorales. Esta distribución impide el desarrollo de una inmunidad de rechazo tumoral fuerte (debido a la eliminación de linfocitos T muy reactivos en el transcurso de la inducción de tolerancia) y en caso de que pueda generarse una respuesta, el posible riesgo de desarrollar autoinmunidad será elevado. El grupo comprende un gran número de antígenos y varios han sido dianas recientemente en ensayos clínicos.
- 55 Las mismas restricciones mencionadas anteriormente también se aplican a los antígenos con especificidad de linaje, grupo que incluye los antígenos de diferenciación. Este grupo de antígenos también se expresa en tejido diferenciado normal correspondiente, y en individuos sanos muy rara vez inducen un ataque inmune debido a la tolerancia a las proteínas "propias". Por razones desconocidas estas proteínas normales se vuelven inmunogénicas en células cancerosas y, en el caso de los melanomas, pueden detectarse fácilmente en los pacientes células T destructoras reactivas con antígenos de diferenciación de melanocitos, pero no en los individuos sanos. Un número importante de ensayos clínicos dirigidos contra melanomas o cáncer de próstata emplean el establecimiento como diana de antígenos de diferenciación.
- 60 Es un objeto de la presente invención evitar específicamente la presencia de antígenos de diferenciación expresados en exceso y con especificidad de linaje en la mezcla de antígenos usada para la inmunización. En el caso de las líneas celulares de melanomas, el grupo de antígenos expresados en exceso en muy raras ocasiones puede inducir una respuesta inmune, excluyéndose por lo tanto la necesidad de la selección negativa para este grupo de antígenos. Por lo que respecta a los antígenos de diferenciación de melanocitos, éstos no deberían estar presentes, pero si están presentes la cantidad no debe ser suficiente para producir la estimulación de una respuesta inmune contra ellos (en la práctica esto significa que la cantidad de transcritos de ARN de los genes que codifican los antígenos de diferenciación de melanocitos es al menos aproximadamente 100 veces menor en las líneas celulares de la invención que en líneas celulares muy sensibles, según se determina por RT-PCR semicuantitativa). Debe evitarse la presencia de estas

ES 2 335 396 T3

proteínas inmunodominantes y, particularmente, no deben estar presentes las proteínas gp100, Melan A/MART-1 y tirosinasa.

También es un objeto de la presente invención proporcionar líneas celulares que expresan al menos tres, particularmente al menos cinco antígenos CT y más particularmente tantos antígenos CT como sea posible, que deben ser inmunodominantes. Sorprendentemente, estas líneas celulares podrían proporcionarse a partir de pacientes con melanoma que, después de retirar el tumor en estadio III o en estadio IV han tenido un largo periodo sin enfermedad (más de cinco años), lo que indica la inmunogenicidad de las células tumorales *in vivo*. Posteriormente deben explorarse subclones individuales de estas líneas celulares con respecto a la ausencia de cualquier antígeno de diferenciación de melanocitos, particularmente gp100, Melan A/MART-1 y tirosinasa.

Además de la inmunoterapia de melanomas, la presente invención también proporciona un método para inducir una respuesta inmune en un ser humano o animal para otros tipos de cáncer. Se necesita que los antígenos establecidos como diana sean antígenos compartidos y estén presentes en otros tipos de malignidades, predominantemente en tumores sólidos. Particularmente, estos tipos de cáncer pueden comprender carcinoma colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de células renales, hepatoma, cáncer cervical, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico o carcinoma de vejiga.

Por lo tanto, en una realización la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune en un ser humano o un animal, que comprende células dendríticas que presentan una multiplicidad de antígenos de cáncer/testículo, en la que

- a) las células dendríticas presentan al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje o sustancialmente ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje,
- b) los antígenos de cáncer/testículo se proporcionan a partir al menos una línea celular de cáncer que expresan al menos cinco antígenos de cáncer/testículo diferentes y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje o sustancialmente ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje y
- c) las células dendríticas son inmaduras (positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83) durante la carga de los antígenos de cáncer/testículo.

Ventajosamente, las células dendríticas cargadas posteriormente pueden madurar por la adición de factores de maduración.

Como se ha descrito anteriormente, las células dendríticas son las células presentadoras de antígeno más eficaces y es otro objeto de la presente invención proporcionar células dendríticas y particularmente células dendríticas autólogas generadas a partir de monocitos CD14+ aislados a partir de sangre periférica o células CD34+ procedentes de sangre periférica o médula ósea, que se han optimizado con respecto a su actividad endocítica/fagocítica y la expresión de CD1a. Se cree que esta actividad se relaciona con las células dendríticas en su estado inmaduro. Para obtener dichas células activadas, la mayoría de los informes han empleado el “método de GM-CSF + IL-4” de Sallusto y Lanzavecchia, (1994, J. Exp. Med. 179: 1109). Otras citocinas adecuadas incluyen IL-4, GM-CSF, IL-13, IFN- γ , Flt-31, SCF, TNF- α (Alters *et al.*, 1999, J. Immunother., v. 22, págs. 229-236), en particular, en relación con la presente invención, las citocinas se seleccionan entre GM-CSF e IL-4.

Sorprendentemente, ahora se ha descubierto, como se muestra en el Ejemplo 2 presentado más adelante, que este método puede optimizarse adicionalmente y que el cultivo *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio nuevo que comprende citocinas antes de la carga de las células dendríticas produce DC con una mayor actividad endocítica. La fase de crecimiento inicial de acuerdo con la presente invención es de 6-48 horas, particularmente de 12-34 horas y más particularmente de 20-28 horas.

Previamente se creía que la actividad endocítica de todas las células dendríticas inmaduras era igualmente buena independientemente del método de cultivo. Ahora se ha descubierto que por medio de la aplicación de un método presentado para la producción de células dendríticas maduras estables y la carga de las células dendríticas en su estado inmaduro antes de la adición de factores de maduración, es posible obtener células dendríticas inmaduras que se han optimizado con respecto a su actividad endocítica.

Por lo tanto, en otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica como se ha indicado anteriormente, en la que las células dendríticas se han cultivado *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas antes de cargar las células dendríticas con al menos un antígeno de cáncer/testículo.

Como deben proporcionarse múltiples antígenos CT y particularmente más de cinco antígenos CT, la presente invención en una realización adicional se refiere a una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente,

ES 2 335 396 T3

en la que dichos al menos cinco antígenos de cáncer/testículo se proporcionan a partir de un lisado de células enteras de dicha al menos una línea celular de cáncer que no expresa ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje o sustancialmente ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje. Un lisado de células enteras puede obtenerse de varias formas a partir de células tales como, por ejemplo, células tumorales u otros tipos celulares, rompiendo las células, por ejemplo, por varios ciclos de congelación y descongelación. En el lisado celular, que comprende el material soluble, normalmente las partículas se retiran por centrifugación y/o filtración.

En una realización particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente en la que la línea celular de cáncer es una línea celular de melanoma, y los antígenos de diferenciación con especificidad de linaje son antígenos de diferenciación de melanocitos.

En una realización adicional, los antígenos de diferenciación de melanocitos comprenden gp100, Melan A/Mart-1 y tirosinasa.

Las células dendríticas cultivadas *ex vivo* de acuerdo con la presente invención se optimizarán con respecto a su actividad endocítica y expresión de CD1a, y ventajosamente pueden aplicarse para la presentación de antígenos en cualquier composición o vacuna para uso en inmunoterapia. Por consiguiente, en una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de células dendríticas autólogas como células presentadoras de antígeno en una composición farmacéutica o una vacuna, donde dichas células dendríticas autólogas se han cultivado *ex vivo* en medio del crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas antes de cargar las células dendríticas en su estado inmaduro con al menos cinco antígenos de cáncer/testículo.

También serían posibles otras formas para obtener células dendríticas presentadoras de antígenos de acuerdo con la invención, por ejemplo, por fusión de células enteras. Esto podría conseguirse por fusión de células dendríticas con las líneas celulares de acuerdo con la invención.

En otra realización, la presentación de antígenos se realiza por medio del uso de exosomas. Los exosomas son pequeñas vesículas de membrana de origen endocítico que se secretan por la mayoría de las células en cultivo y recientemente se han descrito en células presentadoras de antígeno y pueden estimular respuestas inmunes *in vivo* (Théry *et al.*, 2002, Nature Reviews Immunology 2: 569-579).

En otra realización adicional, la presente solicitud describe un método para obtener células dendríticas autólogas cargadas con al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y sin antígenos de diferenciación con especificidad de linaje o sustancialmente sin antígenos de diferenciación con especificidad de linaje, que comprende las etapas de:

- a) proporcionar al menos una línea celular de cáncer que exprese al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje o sustancialmente ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje,
- b) proporcionar células dendríticas autólogas a partir de dicho ser humano o animal,
- c) cultivar dichas células dendríticas *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas, y
- d) cargar dichas células dendríticas de c) con los antígenos de cáncer/testículo obtenidos a partir de un lisado de células enteras de dicha al menos una línea celular de cáncer de a).

Ventajosamente, las células dendríticas posteriormente pueden madurar después de la etapa d) por medio de la adición de factores de maduración tales como, por ejemplo, IL-1 β , IL-6, TNF- α y PGE2.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que puede obtenerse realizando las etapas a) a d) anteriores, seguido de una etapa de maduración.

Empleando los métodos conocidos para la generación de células dendríticas a partir de poblaciones de células mononucleares ha sido difícil obtener buenos rendimientos de células dendríticas. El rendimiento medio de células dendríticas a partir de una población de partida de células mononucleares, según se ha notificado previamente, es de aproximadamente 5% (Marovitch *et al.*, 2002, J. Infect. Dis. 186: 1242-1252). Para conseguir 50×10^6 células dendríticas, que es lo que se necesita para un ciclo completo de vacunación, es necesario empezar con 10^9 células mononucleares.

Suponiendo que la concentración celular durante la adsorción es normalmente de 5×10^6 /ml, esta cantidad de células necesitará 0,2 l de medio para la etapa de adsorción y la misma cantidad de medio para el cultivo celular adicional. Se necesitarán aproximadamente 60 μ g de GM-CSF y 30 μ g de IL-4 para la generación de células dendríticas, así como una gran cantidad de recipientes de plástico para el cultivo de tejidos. Esto dará como resultado un precio neto por vacuna que será bastante alto. Además, para aislar 10^9 células mononucleares a partir de la sangre se necesitará hasta 1 l de sangre, que es muy difícil de extraer de un paciente aunque se realicen dos extracciones separadas significativamente en el tiempo considerando el mal estado de salud del paciente.

ES 2 335 396 T3

Una posibilidad es emplear leucoféresis, que permite el aislamiento de un número significativo de células mononucleares. Este procedimiento con frecuencia se usa para producir un gran número de células dendríticas (véase, por ejemplo, Thurner *et al.*, 1999, J. Immunol. Methods 223: 1-15). Sin embargo, el procedimiento de leucoféresis requiere mucho tiempo y es costoso, lo cual a su vez aumentará el precio total de producción de la vacuna. Además, 5 sólo puede someterse al proceso un paciente en un solo equipo de leucoféresis. Esto limitará la capacidad productiva de los procedimientos de fabricación.

Como alternativa, podría aumentarse la eficacia de la generación de células dendríticas a partir de monocitos. Por ejemplo, Tuyaerts *et al.* 2002, (J. Immunol. Methods 264: 135-151) han informado sobre la adaptación del método 10 de producción de células dendríticas para Nunc Cell Factories, y notificaron un rendimiento de células dendríticas de hasta 40% del número de partida de monocitos (o 13% del número de partida de células mononucleares, ya que los monocitos representan en promedio un tercio de las células mononucleares). Sin embargo, las células dendríticas generadas carecían de la expresión del marcador CD1a, lo cual puede indicar que no se han diferenciado completamente. Como la expresión de CD1a es esencial para los fines de la presente invención, este método no puede emplearse para 15 el objetivo de los presentes solicitantes.

Por lo tanto, en su lugar, los presentes solicitantes han optimizado el procedimiento para la generación de células dendríticas inmaduras a partir de monocitos de sangre, controlando de forma precisa la eficacia creciente de la transformación de monocitos en células dendríticas, así como la generación de células dendríticas inmaduras completamente competentes. Como sistema de lectura para la generación de células dendríticas inmaduras competentes, se 20 han seleccionado los siguientes criterios: una expresión elevada (más de 50%) del marcador CD1a, sin expresión o con una expresión baja (menor de 15%) de CD14 y con expresión baja (menor del 25%) de CD83.

Los resultados de la optimización de los presentes solicitantes como se describen en los ejemplos proporcionados 25 más adelante han demostrado la importancia de la adición de citocinas retardada sobre la expresión especialmente del marcador CD1a.

Además, los estudios de los presentes solicitantes han revelado que es posible obtener un rendimiento de aproximadamente 50% de células dendríticas inmaduras con una alta expresión de marcador CD1a generadas a partir de 30 monocitos, por medio del control de la concentración inicial de monocitos en la población de siembra de células mononucleares.

En otro aspecto, la presente invención por lo tanto se refiere a un método para optimizar el rendimiento de células dendríticas generadas a partir de una muestra de células mononucleares, en el que la densidad de siembra de monocitos 35 está comprendida entre 5×10^6 y 20×10^6 células por 25 cm^2 es 6-8 ml de medio. Cuando se usa un matraz T25, esto significa un número de partida de monocitos comprendido entre 5×10^6 y 20×10^6 células. En una realización particular, la densidad está comprendida entre 6×10^6 y 15×10^6 células por 25 cm^2 , y más particularmente entre 8×10^6 y 12×10^6 células por 25 cm^2 .

40 En una realización particular se proporcionan al menos dos líneas celulares de melanoma alogénicas en la etapa a). El número de líneas celulares alogénicas depende del número de subclones adecuados que se han aislado y explorado con respecto a la ausencia de antígenos de diferenciación de melanocitos. Cuantas más líneas celulares se proporcionen mejores serán las probabilidades de que se representen varios antígenos de cáncer/testículo inmunodominantes en el lisado de células enteras. En una realización, dichos al menos cinco antígenos CT se proporcionan a partir de al menos 45 dos líneas celulares alogénicas. En una realización particular, las líneas celulares alogénicas se seleccionan entre DDM-1.7 (ECACC 01112339) o DDM-1.13 (ECACC 01112338) (ambas líneas celulares depositadas en la Colección Europea de Cultivos de Células Animales, CAMR, GB-Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Reino Unido, 23 de noviembre de 2001).

50 Otro aspecto de la invención se refiere a las líneas celulares particulares anteriores y también a otras líneas celulares que expresan al menos cinco antígenos CT y ningún antígeno de diferenciación de melanocitos o sustancialmente ninguno de diferenciación de melanocitos. Por consiguiente, la presente invención se refiere a una línea celular de melanoma aislada que expresa al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación de melanocitos o sustancialmente ninguno de diferenciación de melanocitos, y particularmente a las líneas 55 celulares aisladas DDM-1.7 (ECACC 01112339) o DDM-1.13 (ECACC 01112338). Por consiguiente, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica o a un método de la presente invención en el que al menos una línea celular de melanoma se selecciona entre las líneas celulares alogénicas DDM-1.7 (ECACC 01112339) o DDM-1.13 (ECACC 01112338).

60 La composición farmacéutica, cuando se administra a un ser humano o un animal, inducirá una respuesta inmune en dicho ser humano o animal que tiene como resultado la estimulación de la producción de linfocitos T citotóxicos en el ser humano o animal. Además, en la presente memoria se describe un método para inducir una respuesta inmune en un ser humano o animal, que comprende las etapas de:

65 a) proporcionar al menos una línea celular de cáncer que expresa antígenos de cáncer/testículo y sin antígenos de diferenciación con especificidad de linaje o sustancialmente sin antígenos de diferenciación con especificidad de linaje,

ES 2 335 396 T3

- b) proporcionar células dendríticas autólogas a partir de dicho ser humano o animal,
- c) cultivar dichas células dendríticas *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas,
- d) cargar dichas células dendríticas de c) con los antígenos de cáncer/testículo obtenidos a partir de un lisado de células enteras de dicha al menos una línea celular de cáncer de a), y
- e) administrar dichas células dendríticas cargadas de d) a dicho ser humano o animal.

10

En una realización particular del método anterior, la línea celular de cáncer es una línea celular de melanocitos, y los antígenos de diferenciación con especificidad de linaje son antígenos de diferenciación de melanocitos.

15 En algunos casos será difícil proporcionar cantidades suficientes de células dendríticas autólogas a partir del paciente. En este caso, es posible administrar sustancias que induzcan la movilización de monocitos CD14+ antes de la etapa b). Estas sustancias comprenden G-CSF y/o GM-CSF.

20 Los precursores de células dendríticas, monocitos CD14+ o células CD34+, pueden obtenerse a partir de una muestra de sangre, a partir de sangre periférica. También es posible pero no necesario empezar con células de aféresis.

También se contempla que el método comprende además la etapa de administrar al ser humano o animal una sustancia que induce la activación de linfocitos T después de la etapa e). Esto podría conseguirse por medio de la administración de, por ejemplo, IL-2 o IL-12.

25

La presente invención también contempla el uso de agentes que pueden aumentar el nivel de expresión de los antígenos de cáncer/testículo antes de la preparación del lisado de células enteras de dicha al menos una línea de células de melanoma. Se ha sugerido que la metilación de ADN influye en el nivel de expresión de algunos genes específicos de testículo. Se ha demostrado que el agente de desmetilación 5-aza-2'-desoxicitidina (5azaCdR) puede inducir la expresión del gen *MAGE-A1* en células de melanoma negativas para *MAGE-A1* ((De Smet *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v. 93, págs. 7149-7153; Weber *et al.*, 1994, Cancer Res., v. 54, págs. 1766-1771)). 5azaCdR es un análogo de citosina que actúa como sustrato suicida para la ADN metiltransferasa cuando se incorpora en el ADN en el sitio diana para la metilación del ADN, dinucleótidos CpG. La desmetilación en células eucariotas normalmente conduce a un aumento de la expresión génica *in vivo*. Se ha propuesto que la activación de *MAGE-A1* se debe a la desmetilación de la región promotora, después de un proceso de desmetilación global, que tiene lugar en muchos tumores. También se ha mostrado el efecto de activación de 5azaCdR sobre la expresión génica para otros miembros de la familia *MAGE* ((Lucas *et al.*, 1998, Cancer Res., v. 58, págs. 743-752; Lurquin *et al.*, 1997, Genomics, v. 46, págs. 397-408)) y para las familias de genes *GAGE* ((De Backer *et al.*, 1999, Cancer Res., v. 59, págs. 3157-3165; Li *et al.*, 1996, Clin. Cancer Res., v. 2, págs. 1619-1625)) y *LAGE* ((Li *et al.*, 1996, Clin. Cancer Res. v. 2, págs. 1619-1625)). El papel de la desmetilación en la expresión de genes *MAGES* en células tumorales se confirma por el hecho de que la expresión de muchos otros genes específicos de testículo, cuya presencia no se detectó en tumores, no estaba regulada positivamente por el tratamiento con 5azaCdR ((De Smet *et al.*, 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 241, págs. 653-657)) y entre los genes *MAGE-B* se ha detectado expresión en tumores sólo para los que se activan por el tratamiento con 5azaCdR ((Lurquin *et al.*, 1997, Genomics, v. 46, págs. 397-408)). Además, se ha observado una buena correlación de la desmetilación de sitios CpG en la región promotora del gen *MAGE-A1* y la expresión del gen ((De Smet *et al.*, 1999, Mol. Cell Biol., v. 19, págs. 7327-7335)).

50 En una realización, por lo tanto, podría realizarse la regulación positiva de la expresión de los antígenos CT por medio de la desmetilación del ADN que codifica los antígenos CT. En particular, esta desmetilación podría inducirse por tratamiento con 5azaCdR. Otra forma de regulación positiva de la expresión de antígenos CT podría ser la inhibición de la desacetilación de histonas. Estos dos tipos de tratamiento podrían usarse por separado o en combinación. Dicho tratamiento puede emplearse únicamente si siguen siendo inmunodominantes los antígenos de cáncer/testículo.

55 Muchos antígenos CT pueden agruparse en subfamilias que incluyen varios miembros (véase la Tabla 1). Son las subfamilias *MAGE-A*, *MAGE-B*, *MAGE-C*, *GAGE*, *LAGE* y *SSX*. Para los otros antígenos sólo se ha descubierto hasta ahora un miembro individual. Éstos son los antígenos *BAGE*, *SCP-1*, *TSP50*, *TRAG-3*, *SAGE*, *IL13R alfa*, *CT9* y *CTp11*. Todos los antígenos CT, para los fines de la presente invención, podrían considerarse posibles dianas para la inmunoterapia.

60

65

ES 2 335 396 T3

TABLA 1
Antígenos de cáncer/testículo humanos

Familia	Miembros
MAGE-A	MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12
MAGE-B	MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17
MAGE-C GAGE	MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GA-GE-7, GAGE-8 PAGE-1, PAGE-2, PAGE-3, PAGE-4 XAGE-1, XAGE-2, XAGE-3
LAGE	LAGE-1a, LAGE-1b, Ny-ESO-1
SSX	SSX-1, SSX-2, SSX-3, SSX-4, SSX-5
Miembros separados:	BAGE, SCP-1, TSP50, TRAG-3, SAGE, IL13R alfa, CT9, CTp11

Uno de los grupos más grandes de antígenos CT es el grupo de proteínas MAGE, que comprende tres familias, 40 MAGE-A, MAGE-B y MAGE-C.

Los genes *MAGE-A* representan una familia de 15 genes muy relacionados localizados en el brazo largo del cromosoma X (región Xq28) ((Chomez *et al.*, 2001, *Cancer Res*, v. 61, págs. 5544-5551; De Plaen *et al.*, 1994, *Immunogenetics*, v. 40, págs. 360-369)), que incluye el primer gen identificado que codifica el antígeno MAGE-A1 (previamente denominado MAGE-1) ((van der Bruggen *et al.*, 1991, *Science*, v. 254, págs. 1643-1647)). En la mayoría de los tumores investigados sólo se ha demostrado la expresión de los genes *MAGE-A1*, -A2, -A3, -A4, -A6 y -A12. Recientemente, también se ha detectado en varios tumores la expresión de otros genes *MAGE-A*, incluyendo *MAGE-A11* ((Jurk *et al.*, 1998, *Int. J. Cancer*, v. 75, págs. 762-766)), *MAGE-A10* ((Huang *et al.*, 1999, *J. Immunol.*, v. 162, págs. 6849-6854)), *MAGE-A5*, *MAGE-A8* y *MAGE-A9* ((Serrano *et al.*, 1999, *Int. J. Cancer*, v. 83, págs. 664-669)).

Se ha demostrado la capacidad de presentar epítopos de péptidos reconocidos por linfocitos T citotóxicos (CTL) para *MAGE-A1* ((van der Bruggen *et al.*, 1991, *Science*, v. 254, págs. 1643-1647)), *MAGE-A2* ((Visseren *et al.*, 1997, *Int. J. Cancer*, v. 73, págs. 125-130)), *MAGE-A3* ((Gaugler *et al.*, 1994, *J. Exp. Med.*, v. 179, págs. 921-930)), *MAGE-A4* ((Duffour *et al.*, 1999, *Eur. J. Immunol.*, v. 29, págs. 3329-3337)), *MAGE-A6* ((Tanzarella *et al.*, 1999, *Cancer Res.*, v. 59, págs. 2668-2674)), *MAGE-A10* ((Huang *et al.*, 1999, *J. Immunol.*, v. 162, págs. 6849-6854)) y *MAGE-A12* ((Panelli *et al.*, 2000, *J. Immunol.*, v. 164, págs. 4382-4392)). Las células T auxiliares también pueden reconocer antígenos MAGE y se han identificado epítopos correspondientes de los antígenos *MAGE-A1* y *MAGE-A3* ((Chaux *et al.*, 1999, *J. Exp. Med.*, v. 189, págs. 767-778; Chaux *et al.*, 2001, *Eur J Immunol*, v. 31, págs. 1910-1916; Manici *et al.*, 1999, *J. Exp. Med.*, v. 189, págs. 871-876)).

Se ha detectado expresión de MAGE en muchos tipos de malignidades humanas. Los melanomas cutáneos tienen el máximo nivel de expresión de MAGE (hasta 65% en el caso de *MAGE-A3*) ((De Plaen *et al.*, 1994, *Immunogenetics*, v. 40, págs. 360-369)), mientras que los melanomas oculares normalmente son negativos para la expresión de MAGE ((Mulcahy *et al.*, 1996, *Int. J. Cancer*, v. 66, págs. 738-742)). Los antígenos MAGE se expresan en una menor medida en otros tipos de tumores tales como carcinomas mamarios, tumores de cabeza y cuello, carcinomas pulmonares, sarcomas y carcinomas de vejiga (como revisión, véase (van Pel *et al.*, 1995, *Immunol. Rev.*, v. 145, págs. 229-250)). Se encontró una alta expresión de *MAGE-A1* (80%) en hepatocarcinomas ((Yamashita *et al.*, 1996, *Hepatology*, v. 24, págs. 1437-1440)). *MAGE-A4*, a diferencia de otros antígenos MAGE-A, se expresa en proporciones significativas de

ES 2 335 396 T3

linfomas, incluyendo linfomas de Hodgkin, donde su expresión se restringe a células de Reed-Sternberg ((Chambost *et al.*, 2000, Blood, v. 95, págs. 3530-3533)). Cuando se descubre que una muestra de tumor es positiva para MAGEA4, el gen normalmente se expresa a niveles muy altos.

- 5 Los genes *MAGE-B* representan una familia de 17 genes localizados en las regiones p21.3 y p22 del cromosoma X, siendo 8 de ellos pseudogenes ((Chomez *et al.*, 2001, Cancer Res, v. 61, págs. 5544-5551; Lucas *et al.*, 2000, Int. J. Cancer, v: 87, págs. 55-60; Lurquin *et al.*, 1997, Genomics, v. 46, págs. 397-408)). Sólo dos genes, *MAGE-B1* y *MAGEB2*, se expresan en una fracción significativa de tumores de diversos tipos histológicos. La expresión de *MAGE-B5* y *MAGE-B6* se detectó en un número limitado de muestras de tumor ((Lucas *et al.*, 2000, Int. J. Cancer, v. 87, págs. 55-60)).

10 Los siete miembros de la familia *MAGE-C* están localizados en la región Xq26-q27. El gen *MAGE-C1* se ha identificado por análisis de la expresión selectiva de genes en testículo y melanomas ((Lucas *et al.*, 1998, Cancer Res., v. 58, págs. 743-752)). Su patrón de expresión se parece mucho al patrón de expresión de los genes *MAGE-A*. Otro gen 15 *CT7* ((Chen *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v. 95, págs. 6919-6923)), probablemente representa un alelo de *MAGEC-1* diferente. *MAGE-C2/CT10* se localiza en la región Xq27 pero, a diferencia de *MAGE-C1*, esta proteína no tiene ninguna parte repetitiva. El tercer y cuarto miembros, *MAGE-C3* y *MAGE-C4*, se identificaron por búsqueda de bases de datos ((Chomez *et al.*, 2001, Cancer Res, v. 61, págs. 5544-5551; Lucas *et al.*, 2000, Int. J. Cancer, v. 87, págs. 55-60)).

20 25 Se han descrito varias proteínas que no son MAGE con características de antígenos de cáncer/testículo. Una de éstas fue el antígeno BAGE ((Boël *et al.*, 1995, Immunity, v. 2, págs. 167-175)). Su patrón de expresión en muestras de tumor es muy similar al patrón de expresión de antígenos MAGE, con una frecuencia global menor de expresión (22% en melanomas, 15% en carcinomas de vejiga, 10% en carcinomas mamarios y 8% en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello). Como ocurre para los antígenos MAGE, la expresión de BAGE se correlaciona con el estadio de progresión del tumor. El antígeno BAGE podría reconocerse por los CTL y se identificaron epítopos de péptidos antigenicos.

30 Otro antígeno se identificó como un epítopo restringido al HLA-Cw6 codificado por el gen *GAGE-1* ((Van den Eynde *et al.*, 1995, J. Exp. Med., v. 182, págs. 689-698)). Este gen pertenece a una gran familia de genes, que incluye los genes *GAGE-1 - GAGE-8* ((Chen *et al.*, 1998, J. Biol. Chem., v. 273, págs. 17618-17625; De Backer *et al.* 1999, Cancer Res., v. 59, págs. 3157-3165; Van den Eynde *et al.*, 1995, J. Exp. Med., v. 182, págs. 689-698)), los genes *PAGE-1-PAGE-4* ((Brinkmann *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v. 95, págs. 10757-10762; Chen *et al.*, 1998, J. Biol. Chem., v. 273, págs. 17618-17625)) y los genes *XAGE-1 - XAGE-3* ((Brinkmann *et al.*, 1999, Cancer Res., v. 59, págs. 1445-1448)). Los dos genes de la familia GAGE que codifican una proteína, *GAGE-1* y *GAGE-2*, se expresan en una proporción significativa de melanomas (24%), sarcomas (25%), cánceres de pulmón no microcíticos (19%), tumores de cabeza y cuello (19%) y tumores de vejiga (12%).

40 Recientemente se han identificado varios antígenos CT usando el método SEREX (*serological expression cloning of recombinant cDNA libraries of human tumors* (clonación de expresión serológica de bibliotecas de ADNC recombinante de tumores humanos)) ((Sahin *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v. 92, págs. 11810-11813)). Uno de ellos, NY-ESO-1, codificado por el gen *CTAG* ((Chen *et al.*, 1997, Cytogenet. Cell Genet., v. 79, págs. 237-240)), se expresó en 23 de 67 muestras de melanoma, 10 de 33 cánceres de mama, 4 de 16 cánceres de próstata, 4 de 5 cánceres de vejiga, así como en una proporción de otros tipos de tumores, pero sólo en 2 de 11 líneas celulares de melanoma 45 cultivadas ((Chen *et al.*, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v. 94, págs. 1914-1918)). En un paciente con melanoma, la respuesta de CTL se restringía por HLA-A2 y se han identificado tres péptidos reconocidos por una línea de CTL específica de melanoma. También se descubrió que este antígeno inducía una respuesta de CTL restringida a HLA-A31 en un paciente con melanoma ((Wang *et al.*, 1998, J. Immunol., v. 161, págs. 3596-3606)). Además, se ha descrito la restricción al MHC de clase II por linfocitos T CD4+ T, con la identificación de tres epítopos peptídicos ((Jäger *et al.*, 2000, J. Exp. Med., v. 191, págs. 625-630)). Recientemente se ha descrito un homólogo genético a *CTAG*. Este gen, *LAGE-1* ((Lethé *et al.*, 1998, Int. J. Cancer, v. 76, págs. 903-908)) tiene una distribución en diferentes tumores similar a NY-ESO-1. Los dos genes están localizados en la banda q28 del cromosoma X, cerca de los genes *MAGE* ((Lethé *et al.*, 1998, Int. J. Cancer, v. 76, págs. 903-908)). NY-ESO-1 es uno de los principales antígenos tumorales inmunogénicos identificados hasta la fecha.

55 55 Por consiguiente, en una realización adicional de la presente invención, los antígenos de cáncer/testículo comprenden antígenos seleccionados entre las subfamilias *MAGE-A*, *MAGE-B*, *MAGE-C*, *GAGE*, *LAGE* y *SSX*.

En una realización particular, los antígenos CT comprenden antígenos seleccionados entre *MAGE-A1*, *MAGE-60 A2*, *MAGEA3*, *MAGE-A4*, *MAGE-A5*, *MAGE-A6*, *MAGE-A8*, *MAGE-A9*, *MAGE-A10*, *MAGE-A11*, *MAGE-A12*, *MAGE-B1*, *MAGEB2*, *MAGE-B3*, *MAGE-B4*, *MAGE-B5*, *MAGE-B6*, *MAGE-B10*, *MAGE-B16*, *MAGE-B17*, *MAGE-C1*, *MAGE-C2*, *MAGE-C3*, *MAGE-C4*, *BAGE*, *GAGE-1*, *GAGE-2*, *GAGE-3*, *GAGE-4*, *GAGE-5*, *GAGE-6*, *GAGE-7*, *GAGE-8*, *NY-ESO-1*, *LAGE*, *PAGE-1*, *PAGE-2*, *PAGE-3*, *PAGE-4*, *XAGE-1*, *XAGE-2*, *XAGE-3*, *SSX-1*, *SSX-2*, *SSX-3*, *SSX-4* y *SSX-5*. Y en otra realización particular, los antígenos CT comprenden antígenos seleccionados entre *SCP-1*, *TSP-50*, *TRAG-3*, *SAGE*, *IL-13R alfa* y *CTp11*.

65 En otra realización particular adicional, los antígenos CT comprenden antígenos seleccionados entre *MAGE-A1*, *MAGE-A3*, *MAGE-A4*, *MAGE-A6*, *MAGE-A10*, *MAGE-A12* y *NY-ESO-1*.

ES 2 335 396 T3

Los antígenos anteriores representan antígenos que se consideran particularmente útiles en el contexto de la presente invención, sin embargo, también podrían usarse otros antígenos no mencionados específicamente siempre que se use una multiplicidad de antígenos de cáncer/testículo y particularmente al menos cinco, más particularmente al menos 6, e incluso más particularmente al menos siete antígenos CT.

5

Otra realización de la presente invención se refiere al uso de la composición anterior para la fabricación de una vacuna inmunoterapéutica para el tratamiento de cánceres.

Una condición para emplear composiciones o vacunas basadas en células de melanoma es la presencia en un 10 hospedador de una malignidad en un estadio avanzado de la enfermedad. Otra condición podría ser la presencia del tumor primario, y en este caso el objetivo del tratamiento no es sólo inducir rechazo del tumor primario, sino también prevenir el desarrollo de metástasis, ya que un grupo de antígenos CT se expresa predominantemente en metástasis. Otra condición podría ser la eliminación del tumor primario o metastásico por otros medios (cirugía, irradiación), y en este caso el objetivo del tratamiento sería la prevención de la recurrencia del tumor.

15

Los tumores que expresan varios antígenos CT tienen mayores probabilidades de rechazarse o de restringir su crecimiento que los tumores que no tienen o tienen sólo un antígeno CT. Por lo tanto, la determinación de la expresión de antígenos CT en biopsias de tumores puede tener significado para predecir la eficacia del empleo de una vacuna universal basada en células de melanoma.

20

Ejemplos

En lo sucesivo, la presente invención se ilustrará adicionalmente por medio de varias realizaciones no limitantes.

25

Ejemplo 1

Aislamiento de clones deficientes en antígeno de diferenciación de melanocitos de la línea celular de melanoma DDM-1

Se obtuvieron líneas celulares de melanoma DDM-1 a partir de un paciente con un largo periodo sin enfermedad. Se clonaron células de melanoma DDM-1, se exploraron 8 clones y se descubrió que eran negativos para la expresión de tirosinasa. La tirosinasa es uno de los antígenos de diferenciación de melanocitos conocidos. Estos clones (DDM-35 1.5, DDM-1.6, DDM-1.7, DDM-1.10, DDM-1.11, DDM-1.13, DDM-1.24 y DDM-1.25) se ensayaron adicionalmente con respecto a la expresión de dos antígenos de diferenciación de melanocitos inmunodominantes, gp100 y Melan A/MART-1.

Se cultivaron rutinariamente células de melanoma en matraces de cultivo de tejidos T75 (Nunc) en 20 ml de medio 40 RPMI 1640 (BioWhittaker) suplementado con 10% de suero bovino fetal. Para uso en los experimentos de inducción de la respuesta inmune contra células dendríticas cargadas con lisado de células de melanoma, el crecimiento celular se adaptó a medio que contenía 2% de suero humano (HuS). Las células se recogieron retirando el medio del matraz de cultivo y añadiendo 5 ml de EDTA al 0,02% en PBS sin Ca, Mg (BioWhittaker), incubando en un incubador con CO₂ durante 10-20 min, añadiendo 10 ml de PBS y transfiriendo las células separadas a un tubo de centrífuga. 45 Después de la centrifugación a 200 g durante 5 min, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en medio de cultivo, las células se contaron y se pusieron 1,5 x 10⁶ células en un matraz T75 en 20 ml de medio de cultivo.

La expresión de los antígenos gp100 y Melan-A/MART-1 se ensayó por determinación de la sensibilidad de las 50 células de melanoma a la lisis inducida por clones de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos contra estos antígenos. Se han descrito las propiedades de estos clones de CTL previamente (Kirkin *et al.*, 1999, Cancer Immunol. Immunother., v. 48, págs. 239-246). Se recogieron células de melanoma como se ha descrito anteriormente, se resuspendieron en medio de cultivo, se contaron y se transfirieron 0,5 x 10⁶ células de cada clon a un tubo cónico de 11 ml (Nunc). Las células se centrifugaron a 200 g durante 5 min, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 0,1 ml de medio de cultivo. Se añadieron 0,1 ml de solución de Na₂CrO₄ (0,1 mCi, Amersham) y las células se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 60 min. Despues de lavar tres veces con RPMI-1640, las dietas se ajustaron a una concentración a 5 x 10⁴ células/ml en RPMI-1640 con FCS al 10%. Los linfocitos citotóxicos se usaron a una concentración de 5 x 10⁵ células/ml. Se sembraron CTL y células de melanoma diana en alícuotas de 100 µl por triplicado en 96 placas de microtitulación de fondo en U (Nunc), se centrifugaron a 200 g durante 2 55 min y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂. Despues de 4 horas, las placas se centrifugaron a 250 g durante 3 min, se recogieron 100 µl de sobrenadante y se determinó la radiactividad (Cobra 5005, Packard Instruments, Meriden, Conn., USA). La lisis específica se calculó de acuerdo con la fórmula convencional. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 1. A partir de estos resultados se deduce que sólo dos de los clones de melanoma investigados, DDM-1.7 y DDM-1.13, son completamente resistentes al ataque lítico por CTL, indicando 60 una posible pérdida de la expresión de los antígenos de diferenciación de melanocitos indicados en estos clones de melanoma.

ES 2 335 396 T3

Para conseguir pruebas adicionales de la pérdida de expresión de antígenos, se realizó un análisis de expresión del ARN que codificaba esas proteínas por análisis de RT-PCR. Se centrifugaron 2×10^6 células, el sobrenadante se desechó y el sedimento se solubilizó en 0,3 ml de solución de lisis de células (kit de aislamiento de ARN Purescript^R, Gentra). El ARN se aisló de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se precipitó añadiendo dos volúmenes de isopropanol al 100% sobre la solución de lisis, se lavó con etanol al 70% y se rehidrató en 10 μl de agua destilada sin ARNasa. El ARN aislado se trató por ADNasa para destruir cualquier pequeña cantidad que quedara de ADN en la preparación. Para este fin, se usaron los reactivos del kit DNA-freeTM (Ambion). Se añadieron 1 μl de tampón ADNasa 10x y 1 μl de ADNasa (2 unidades) a la muestra, la mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C y la reacción se terminó por la adición de 1,2 μl de reactivo de inactivación de ADNasa. La síntesis de ADNc se realizó por transcripción inversa en un volumen total de 20 μl usando 10 μl de ARN. Para este fin, se usó Super Script II RT cebado con oligo (dT) (Gibco BRL) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. La incubación se realizó a 42°C durante 30 min, seguido de 45°C durante 30 min y 72°C durante 2 min. Se usó 1 μl de ADNc en la amplificación por PCR que contenía el siguiente tampón de PCR 1x: KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM (pH 9,0), MgCl₂ 1,5 mM, cresol 0,2 mM, sacarosa al 12%, albúmina de suero bovino al 0,005%, 2,5 pmol de cada cebador, una concentración 40 μM de dNTP (Pharmacia LKB) y 1,25 U (1 μl) de polimerasa AmpliTaq (Perkin-Elmer). Los cebadores se seleccionaron de tal forma que el producto de amplificación pudiera acumularse eficazmente en las mismas condiciones de reacción, permitiendo de esta manera comparar la expresión en las células tumorales de una diversidad de antígenos seleccionados en reacciones realizadas simultáneamente. En la Tabla 2 se presentan secuencias de cebadores usados en estos experimentos y en experimentos descritos más adelante. En todas las reacciones se usó un procedimiento de "inicio en caliente" ("hot start") en el que se añadieron Taq polimerasa y dNTP al tubo de reacción a una etapa de 80°C entre la etapa de desnaturización y de templado del primer ciclo. Los parámetros usados para la amplificación fueron 30-38 ciclos (94°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 40 s) seguido de 10 minutos a 72°C y refrigeración a 4°C. Las amplificaciones se realizaron en un GeneAmp PCR System 9600 de Perkin-Elmer. Los controles negativos contenían alícuotas de agua en lugar de ADNc. El GAPDH se amplificó como control positivo para la reacción así como para proporcionar una estimación del porcentaje de expresión de los antígenos con respecto a este gen habitual. Los resultados negativos se repitieron al menos dos veces, con un número mayor de ciclos. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis a través de un gel de agarosa al 2% a 100V, teñido con bromuro de etidio, visualizado con iluminación UV y registrado con un sistema de registro de imágenes. Cuando se realizó la RT-PCR semi-cuantitativa, el número de ciclos se redujo a 22, con lo que se aseguraba un aumento lineal en la cantidad de secuencias seleccionadas con el número de ciclos de amplificación. La reacción de PCR se realizó usando diluciones de 3 ó 5 veces de la plantilla de ADNc. La intensidad de las bandas de producto resultantes después de la separación electroforética se analizó por análisis de imágenes, se normalizó por la intensidad del producto de GAPDH obtenido usando la misma plantilla y a las mismas diluciones, y el nivel de transcritos de ARN correspondientes se comparó en diferentes líneas celulares.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 335 396 T3

TABLA 2
Secuencias oligonucleotídicas 5'-3'

5	Gen	Cebador
10	GADPH	Con sentido AGGGGGGAGCCAAAAGGG Antisentido GAGGAGTGGGTGTCGCTGT
	Gp100	Con sentido GGCTGGTGAAGAGACAAGTCC Antisentido AGAGATGCAAGGACCACAGCC
15	Mart-1	Con sentido GAAGGTGTCTGTGCCCTGACCC Antisentido GGCTTGCATTTTCTACACCATTCC
	MAGE-A1	Con sentido GATTCCCTGGAGGCCACAG Antisentido CCTCACTGGGTTGCCTCTGTC
20	MAGE-A3	Con sentido ACCAGAGGCCCGGAGGAG Antisentido CTGCCAATTCCGACGACACTCC
	MAGE-A4	Con sentido GAGCAGACAGGCCAACCG Antisentido AAGGACTCTCGTCAGGC
25	MAGE-A6	Con sentido AGGACCAGAGGCC Antisentido GGATGATTATCAGGAAGCCTGT
	MAGE-A10	Con sentido CACAGAGCAGCACTGAAGGAG Antisentido CTGGGTAAAGACTCACTGTCTGG
30	MAGE-A12	Con sentido TGGAAGTGGTCCGCATCG Antisentido GCCCTCCACTGATCTTAGCAA
	NY-ESO-1	Con sentido GGCACAGGGGTTC Antisentido GCTTAGCGGCCTCTGCCCT

45

Los resultados de la determinación de la expresión de los antígenos de diferenciación de melanocitos gp100 y MART-1 en 3 clones de células de melanoma DDM-1.7, DDM-1.13 y DDM-1.29, mostrados en la Figura 2, demuestra claramente que el nivel de transcritos de ARN en los clones de melanoma DDM-1.7 y DDM-1.13 desarrollados en FCS al 10% también es mucho menor que en DDM-1.29 y que la intensidad de las bandas de producto correspondientes se reduce con las diluciones seriadas de la plantilla de ADNc mucho más rápidamente para DDM-1.7 y DDM-1.13 en comparación con DDM-1.29. De acuerdo con la RT-PCR semicuantitativa y después de la normalización de los datos por el nivel de transcripción de la proteína habitual GAPDH, el nivel de los transcritos de ARN de los antígenos de melanocitos en DDM-1.7, DDM-1.13 era menor de 1% del nivel correspondiente en DDM-1.29. Después de la adaptación de las células al crecimiento en suero humano al 2%, pudo verse un ligero aumento en la expresión de los antígenos de diferenciación de melanocitos (no mostrado) por RT-PCR que no superaba 1% del nivel correspondiente en DDM-1.29.

La expresión de gp100 en las células adaptadas al crecimiento en suero humano al 2% también se investigó por inmunotinción. Para esto, se cultivaron células en cubreobjetos de vidrio puestos en placas petri. Después de aclarar con PBS frío, las células se fijaron con una mezcla enfriada con hielo de metanol-acetona (1:1) durante 15 min. Después del secado, los cubreobjetos se incubaron en PBS durante 1 min y se tiñeron de acuerdo con el procedimiento convencional conocido en la técnica usando como primer anticuerpo una mezcla de anticuerpos HMB45 y HMB50 (NeoMarkcrs), como segundos anticuerpos - anticuerpos Ig de oveja anti-ratón biotinilados (Amersham) y como tercer reactivo - estreptavidina-rojo de Texas (Amersham). Como se ve en la Figura 3, no pudo verse tinción en células DDM-1.7, en comparación con la tinción intensa detectada en células DDM-1.29. La visualización de un gran número de células demostró que una población muy pequeña de las células (menos de 1%) era positiva en el cultivo de DDM-1.7

ES 2 335 396 T3

(no mostrado). Entre las células DDM-1.13 cultivadas en las mismas condiciones, aproximadamente 1% de las células se teñía positivamente para gp100 (no mostrado).

Para determinar los niveles de expresión de antígenos MAGE-A y NY-ESO-1, se realizaron reacciones de RT-PCR usando cebadores para estos antígenos (las secuencias de los cebadores se presentan en la Tabla 2). Los resultados de la comparación de la expresión del ARNm que codificaba las proteínas MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12 y NY-ESO-1 se presentan en la Figura 4. DDM-1.29 expresa todos los antígenos ensayados, mientras que DDM-1.7, y DDM-1.13 expresan sólo 4-5 de ellos.

Se sabe que la expresión de antígenos CT está regulada positivamente por el tratamiento de las células con los agentes de desmetilación del ADN 5-aza-2'-desoxicitidina. Se decidió ensayar si la expresión de proteínas MAGE-A y NY-ESO-1 podía estar regulada positivamente en el clón de células de melanoma DDM-1.13 por dicho tratamiento. Se sembraron células en matraces de cultivo T25 y, después de 24 horas, se añadió 5-aza-2'-desoxicitidina a una concentración final de 1 μ M.

Las células se incubaron 3 días, después el medio se cambió, y después de una incubación adicional durante dos días, las células se recogieron como se ha descrito anteriormente. La determinación de la expresión del antígeno se realizó como se ha descrito anteriormente y los resultados, presentados en la Figura 5, demuestran que después del tratamiento de las células con 5-aza-2'-desoxicitidina la expresión aumentaba para todos los antígenos CT ensayados.

Ejemplo 2

Generación de células dendríticas con mayores capacidades de presentar proteínas exógenas

La propiedad característica de las células dendríticas es que pueden presentar proteínas exógenas para el reconocimiento por CTL CD8⁺. La capacidad máxima de captar proteínas exógenas está asociada con el estadio inmaduro de la diferenciación de las DC. Sin embargo, no se dispone de datos sobre la asociación directa entre la actividad fagocítica de las DC y su capacidad de presentar antígenos captados para el reconocimiento por CTL específicos contra estos antígenos. Por lo tanto, se realizaron experimentos que pretendían: a) optimizar la generación de células dendríticas inmaduras con alta capacidad de captar proteínas exógenas y b) demostrar la correlación entre la actividad fagocítica de células dendríticas y su capacidad de presentar antígenos procedentes de lisados de melanoma añadidos exógenamente.

En la primera serie de experimentos se optimizó la generación de células dendríticas fagocíticas variando el momento de adición de linfocina y el uso de TGF-beta 1, que se demostró que mejoraba la generación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica (Yang *et al.*, 1999, J. Immunol., v. 163, págs. 1737-1741). Las células dendríticas típicamente se generaron a partir de 50 ml de sangre periférica de donantes positivos para HLA-A2 que contenía 25 UI/ml de heparina. La sangre se repartió en dos tubos de 50 ml que contenían 12,5 ml de PBS sin Ca, Mg (denominado más adelante PBS), y se aplicaron sobre Lymphoprep (12,5 ml puestos en dos tubos de 50 ml). Después de la centrifugación (800 g, 25 min), se cogieron 10 ml de la capa superior en una jeringa, se pasaron a través de un filtro de 0,2 μ m y se usaron como fuente de plasma. Se recogieron células mononucleares a partir de la capa interfase y después de al menos una dilución de dos veces con PBS, se centrifugaron 6 veces, primero a 650 g durante 10 min, después a 450 g durante 7 min y posteriormente a 250 g durante 5 min. Después de cada centrifugación, el sobrenadante se desecharon y el sedimento se resuspendió en 5 ml de PBS hasta la desaparición completa de los agregados celulares. Se añadió PBS nuevo para llenar el tubo hasta la parte superior y se repitió la centrifugación. Después de la última centrifugación, el sedimento se resuspendió en 5 ml de medio de adhesión, consistente en medio RPMI 1640 con la adición de 2% de plasma y, después del recuento, la concentración celular se ajustó a 5x10⁶/ml. Se pusieron 3 ml de suspensión celular en los pocillos de una placa de 6 pocillos (Falcon, no tratada con TC), en total 4 pocillos, y se incubaron en un incubador con CO₂ durante 1,5 horas. Después de esta incubación se recogieron las células no adherentes y la monocapa de células adherentes se lavó dos veces con medio RPMI 1640 caliente y 3 ml de medio de cultivo consistente en medio RPMI con la adición de 1% de plasma (medio DC). Se añadieron IL-4 y GM-CSF humanos recombinantes a una concentración de 1000 U/ml en dos pocillos (cultivos 1 y 3). Después de una incubación de una noche, el medio se cambió completamente en dos pocillos (cultivos 2 y 4). Para esto, se recogió el medio en un tubo de centrífuga y se añadieron 2,5 ml de nuevo medio DC precalentado en cada pocillo. Las células recogidas se centrifugaron (250 g, 5 min), se desecharon el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 1 ml de medio DC precalentado y se pusieron 0,5 ml de suspensión celular de nuevo en los cultivos 2 y 4. A los cultivos 3 y 4 se les añadió TGF-beta 1 a una concentración final de 100 ng/ml.

Después de 5 días más, se detectó la actividad fagocítica de las células dendríticas generadas. Se puso medio RPMI 1640 que contenía FCS (suero bovino fetal) al 10% en varios pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano (Falcon) no tratada con TC así como en tubos de centrífuga durante 30-60 min. Se transfirieron 0,5 ml de cada cultivo de DC a tubos de centrífuga pretratados y, después de la centrifugación (200 g, 5 min), el sobrenadante se desecharon y los sedimentos se resuspendieron en 0,5 ml de medio DC. El medio se retiró de los pocillos de la placa de 96 pocillos y se añadieron 0,2 ml de cada suspensión celular a los pocillos, dos pocillos para cada tipo de cultivo. Se añadieron 10 μ l de solución madre de FluoSpheres a cada tubo y la placa se puso en un incubador con CO₂. Después de 4 horas, los cultivos se recogieron en tubos de centrífuga pretratados como se ha descrito anteriormente y después de dos lavados por centrifugación a 200 g, 5 min en medio RPMI 1640 con FCS al 10%, los sedimentos se resuspendieron en 25 μ l de medio RPMI. Los tubos se pusieron en hielo. Se pusieron 5 μ l de suspensión celular en

ES 2 335 396 T3

portaobjetos de microscopio y los portaobjetos se pusieron en una cámara húmeda (normalmente se emplearon placas petri grandes con papel humedecido) y se incubaron durante 10-15 min en un incubador con CO₂. Después de esto, una gota de suspensión celular se cubrió con un cubreobjetos de vidrio de 13 mm y se observaron las células con un microscopio de fluorescencia. Usando una cámara digital Leica DC100 las imágenes se transfirieron a un ordenador y se almacenaron como archivos de mapa de bits.

Los resultados de un experimento sobre la determinación de la actividad fagocítica de las células dendríticas generadas en las condiciones investigadas se presentan en la Figura 6. Claramente se ve que la adición de GM-CSF e IL-4 el día después del inicio del cultivo junto con un cambio total de medio tiene ventajas significativas en comparación con los cultivos en los que se añadieron GM-CSF e IL-4 desde el principio de los cultivos. Debe indicarse que en la mayoría de los documentos que describen el establecimiento de células dendríticas para uso en inmunización en combinación con lisados de células tumorales, se añadieron linfocinas desde el principio de los cultivos (véase, por ejemplo, (Chakraborty *et al.*, 1998, Cancer Immunol. Immunother., v. 47, págs. 58-64; Nestle *et al.*, 1998, Nature Med., v. 4, págs. 328-332)).

Los resultados presentados en la Figura 6 también demuestran que TGF-beta 1, que se usó por los investigadores como linfocina adicional durante la generación de células dendríticas (Yang *et al.*, 1999, J. Immunol., v. 163, págs. 1737-1741), no tiene ningún efecto potenciador sobre la actividad fagocítica de las células dendríticas y, de hecho, reducía la actividad fagocítica en varios experimentos (no mostrados).

La capacidad de presentar péptidos antigenicos procedentes de proteínas añadidas exógenamente se investigó usando un modelo de reconocimiento de células dendríticas cargadas con lisado de células DDM-1.29, que tienen altos niveles de expresión del antígeno de diferenciación de melanocitos gp100, por CTL con especificidad por gp100 establecidos por los presentes solicitantes (Kirkin *et al.*, 1999, Cancer Immunol. Immunother., v. 48, págs. 239-246) y usados en el ejemplo 1 para la detección de la expresión de este antígeno en diferentes clones de células de melanoma.

Se preparó un lisado de células DDM-1.29 como se describe más adelante. Las células de melanoma se cultivaron como se describe en el ejemplo 1, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en medio de RPMI 1640 (Gibco) a 10⁷ células/ml. Las células se sometieron a cinco ciclos de congelación (nitrógeno líquido) - descongelación, se sonicaron 15 min en un baño de ultrasonidos (Metason 200, Struer) y después se centrifugaron, primero a 800 g durante 15 min a 4°C y después a 13000 g durante 60 min a 4°C. El sobrenadante se recogió, se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y la concentración de proteínas se determinó usando el reactivo de ensayo de proteínas ácido bicinconílico (Pierce) de acuerdo con el procedimiento proporcionado por el fabricante. La concentración de proteínas estaba en el intervalo de 3,5-5 mg/ml. Se almacenaron alícuotas de sobrenadante congeladas a -80°C.

Para cargar las células dendríticas con lisado tumoral, se transfirieron diferentes cultivos de células dendríticas en tubos de centrífuga, se centrifugaron y, después de desechar los sobrenadantes, los sedimentos se resuspendieron en 2 ml de medio DC, las células se contaron y la suspensión celular se diluyó hasta 5x10⁵/ml. Se pusieron 1,8 ml de suspensión celular en un pocillo de una placa Falcon de 24 pocillos no tratada con TC y se añadieron 0,2 ml de lisado tumoral junto con GM-CSF e IL-4 (1000 U/ml de cada uno). Después de una incubación de una noche, se añadieron 20 ng/ml de TNF-alfa. Después de una incubación adicional durante 24 horas, los cultivos se recogieron por pipeteo intensivo, se transfirieron a tubos de centrífuga pretratados, se centrifugaron a 200 g durante 5 min y los sobrenadantes se decantaron, y los sedimentos se resuspendieron en 2 ml de medio DC. Después del recuento, la suspensión celular se diluyó a 3x10⁵ células/ml y 1 ml de suspensión celular se puso en pocillos de una placa TC de 24 pocillos (Nunc), dos pocillos para cada tipo de cultivo de células dendríticas. A uno de los pocillos se le añadió 1 ml de medio y a otro 1 ml de suspensión de CTL (10⁶/ml). Los cultivos se incubaron durante 24 horas, después de lo cual se transfirió 1 ml de sobrenadante a un tubo eppendorf, se centrifugó, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf, y el análisis de la cantidad de interferón gamma producido (IFN-γ) se realizó por el método ELISA como se indica a continuación. Se recubrieron placas Immunoplate MaxiSorp (Nunc) con 100 µl de anticuerpo monoclonal purificado anti-IFN-γ humano (Endogen) diluido a 2 µg/ml en tampón de recubrimiento (PBS, pH 7,4) por incubación durante una noche a temperatura ambiente. La solución de recubrimiento se retiró, se añadieron 200 µl de solución de bloqueo (BSA al 4% en PBS) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS suplementado con Tween-20 al 0,05% (tampón de lavado) y se añadieron por duplicado 50 µl de diluciones convencionales de dos veces del patrón (IFN-γ recombinante, Endogen) en el medio de cultivo, que variaban de 15 a 1000 pg/ml. Los sobrenadantes recogidos se centrifugaron a 3.000 g durante 5 min y se aplicaron 50 µl de las muestras y dos diluciones de dos veces por triplicado. Las placas se incubaron durante una noche a 4°C. Sin lavar la placa, se añadieron 50 µl de anticuerpo de detección marcado con biotina (anti-IFN-γ marcado con biotina, Endogen) diluido a 0,5 µg/ml en la solución de bloqueo y la incubación se continuó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de un lavado de cuatro veces con el tampón de lavado, se añadieron 100 µl/pocillo de estreptavidina conjugada con HRP (Genzyme) diluida a 1:1000 en el tampón de bloqueo y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces con el tampón de lavado y se secaron sobre una toalla de papel. Se añadieron 100 µl de la solución de sustrato (5 mg de OPD se disolvieron en 11 ml de tampón citrato y se suplementaron con 5 µl de peróxido de hidrógeno) a cada pocillo. La reacción se desarrolló durante 15-40 min a temperatura ambiente y se terminó por la adición de 50 µl de ácido sulfúrico al 10%. La absorbancia diferencial se midió en un lector ELISA como una diferencia entre los valores a 490 y 650 nm. Se restaron los valores de control, en los que sólo se añadió medio celular en lugar de IFN-γ, y la concentración de IFN-γ liberado en el experimento se determinó y expresó en pg/ml usando la curva de calibración de IFN-γ representada en el mismo experimento.

ES 2 335 396 T3

La Figura 7 presenta datos de uno de estos experimentos. Pudo verse que la producción específica máxima de IFN- γ , que representa la diferencia entre la producción de IFN- γ en presencia de células dendríticas cargadas con lisado y células dendríticas “vacías”, es máxima para los cultivos de células dendríticas 1 y 3, los mismos cultivos que tienen una actividad fagocítica máxima.

En resumen, la capacidad de las células dendríticas de estimular específicamente CTL con antígenos captados procedentes de un lisado de células tumorales se correlaciona con la actividad fagocítica de las células dendríticas, es independiente de la presencia de TNF- α durante la diferenciación de las DC y es máxima en cultivos de DC en los que la adición de GM-CSF e IL-4 se retrasó un día y estaba asociada con un cambio completo de medio.

Ejemplo 3

Desarrollo de linfocitos T citotóxicos con amplia actividad antitumoral después de la estimulación de linfocitos de sangre periférica de donantes normales con células dendríticas autólogas cargadas con lisado derivado de células de melanoma

Se ensayó la capacidad de células dendríticas cargadas con lisado de células de melanoma para estimular el desarrollo de linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos tumorales *in vitro* en cultivos mixtos de linfocitos y células dendríticas. Se generaron células dendríticas a partir de sangre periférica de donantes normales positivos para HLA-A2 como se describe en el Ejemplo 2. Despues de la etapa inicial de adsorción de monocitos, se recogieron los linfocitos no adsorbidos y se congelaron en plasma autólogo más DMSO al 10% para un uso posterior. Se recogieron las células dendríticas cargadas con lisado tumoral, se irradiaron (6000 Rad), se lavaron, se resuspendieron en medio X-VIVO 15 suplementado con 1% de plasma autólogo (medio completo) a $3 \times 10^5/\text{ml}$ y se pusieron en cinco pocos de placas de 24 pocillos, 1 ml en cada pocillo. El resto de las células dendríticas se congeló en suero humano reunido que contenía DMSO al 10%. Se descongelaron linfocitos no adherentes autólogos congelados, se lavaron una vez, se contaron y se resuspendieron 15×10^6 células después de un lavado adicional en 5 ml de medio completo que contenía IL-7 (20 ng/ml) e IL-12 (100 pg/ml). Se añadió 1 ml de suspensión de linfocitos a pocillos con células dendríticas. Despues de 7 días, se retiró 1 ml de medio y se añadió 1 ml de medio nuevo que contenía IL-7 (20 ng/ml). Despues de 5 días, las células se recogieron, las células vivas se separaron en Lymphoprep (Nycomed, Noruega) y, despues del lavado, se resuspendieron en medio completo a $1,5 \times 10^6/\text{ml}$. Se puso 1 ml de suspensión de linfocitos en pocillos de placas de 24 pocillos. Las células dendríticas irradiadas congeladas cargadas con lisado se descongelaron, se lavaron una vez, se resuspendieron en medio completo a $10^5/\text{ml}$ y se añadió 1 ml en pocillos con linfocitos. Despues de 2 días, se retiró 1 ml de medio y se añadió 1 ml de medio nuevo que contenía IL-2 (20 UI/ml). Este procedimiento de la reestimulación se repitió cada semana, 2-4 veces para cada cultivo.

La actividad lítica de los linfocitos se determinó despues de 3-5 vueltas de estimulaciones.

En este momento, los linfocitos en proliferación representan una población casi pura de células positivas para CD3 con una proporción creciente de células CD8 $^{+}$ despues de cada reestimulación que alcanza 70-90% en una semana despues de la 4^a-5^a vuelta de estimulación (el fenotipo de las células se determinó por el análisis FACS conocido en la técnica usando anticuerpos específicos contra ciertos marcadores de la superficie).

Además de los cultivos de células de melanoma mencionados anteriormente, se emplearon las siguientes líneas de células de melanoma: FM28, FM55p, FM60 (positiva para HLA-A2), FM45 y FM48 (negativa para HLA-A2). Estas líneas celulares se han descrito en otras partes (Bartkova *et al.*, 1996, Cancer Res., v. 56, págs. 5475-5483; Kirkin *et al.*, 1995, Cancer Immunol. Immunother., v. 41, págs. 71-81). DDB-1 y ANBI-EBV son líneas de células linfoblastoides transformadas con EBV establecidas en el laboratorio de los presentes solicitantes por métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Como diana para la lisis mediada por NK se usaron células eritroleucémicas K562. Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7, CAMA-1, HBL-100, MDA-MB-231 (positiva para HLA-A2) y BT-20 (negativa para HLA-A2) fueron una amable donación del Dr. Per Briand, Danish Cancer Society. Las líneas de células de carcinoma de células escamosas positivas para HLA-A2 SCC4 y SCC9 se obtuvieron en la ATCC. Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con FCS al 10%. La actividad citotóxica se determinó como se describe en el Ejemplo 1. En experimentos con anticuerpos bloqueantes, se añadió el anticuerpo monoclonal W6/32, específico contra el determinante común de las moléculas HLA de clase I, a los pocillos a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

En los primeros experimentos se ensayó la citotoxicidad contra un panel de células de melanoma, así como contra células B transformadas con EBV y células eritroleucémicas K562. La actividad lítica de tipo NK, determinada por lisis de las células K562, fue significativa despues de dos vueltas de estimulaciones, pero se redujo gradualmente despues de las estimulaciones posteriores. Para detectar principalmente la lisis específica mediada por CTL, todos los experimentos sobre la actividad lítica se realizaron en presencia de un exceso de 20 veces de células K562 no marcadas. Los resultados del experimento representativo sobre la citotoxicidad de los linfocitos procedentes de donante ANBI despues de 4 vueltas de estimulaciones con células dendríticas cargadas con lisado de células DDM-1.13 se muestran en la Figura 8. Las células de melanoma positivas para HLA-A2 se lisaron en diferentes grados, mientras que K562, ANBI-EBV (células EBV-B establecidas a partir del mismo donante), DDB-1 (autólogas para células de melanoma DDM-1) y las líneas celulares de melanoma FM45 y FM48 (que no tenían antígenos comunes del MHC de clase I con células del donante ANBI) fueron relativamente resistentes a la lisis. Debe indicarse que FM9, una línea celular de melanoma negativa para HLA-2 pero que comparte con donante ANBI HLA-A1 (no mostrado) tambien es sensible a la lisis, lo que indica que la restriccion de la lisis a HLA es compleja y no se restringe sólo por los antígenos HLA-A2.

ES 2 335 396 T3

El uso de células dendríticas no tratadas también indujo la proliferación de linfocitos, aunque a una menor densidad, pero en dichos cultivos se observó el desarrollo únicamente de citotoxicidad no específica (no mostrado). La falta de citotoxicidad contra células DDB-1, generadas a partir de PBMC (monocitos de sangre periférica) de pacientes con melanoma a partir de los cuales se han establecido células de melanoma DDM-1, indica que los aloantígenos 5 posiblemente presentes en la preparación del lisado no inducen una respuesta inmune significativa, y que la respuesta inmune resultante es principalmente específica de tumor. El anticuerpo W6/32 contra la molécula del MHC de clase I se inhibía significativamente, indicando la naturaleza restringida al MHC de clase I de la citotoxicidad. Se obtuvieron resultados similares con el lisado aislado a partir del clon de melanoma DDM-1.7 (no mostrado).

10 Para ensayar la posibilidad de que antígenos reconocidos pertenezcan a un grupo de antígenos de cáncer/testículo compartidos entre diferentes tipos de malignidades humanas, los presentes solicitantes investigaron la sensibilidad de varias líneas de carcinoma de células escamosas y de mama a la lisis por CTL generados. En la Figura 9 se muestran los resultados de un experimento. Tres de cuatro líneas de cáncer de mama positivas para HLA-A2 tienen una sensibilidad de moderada a alta a la lisis, mientras que una línea negativa para HLA-A2 era completamente resistente a la lisis. 15 Una de dos líneas de células de carcinoma de células escamosas investigadas también era sensible a la lisis. La lisis de las líneas de células de cáncer de mama era sensible a la inhibición por el anticuerpo específico de HLA de clase I W6/32. Estos datos demuestran que la inmunización *in vitro* de PBL (linfocitos de sangre periférica) de un donante normal con células dendríticas autólogas cargadas con lisado de líneas celulares de melanoma DDM-1.7 o DDM-1.13 inducía la generación de CTL que reconocían específicamente los antígenos asociados a tumores presentes en varios 20 tipos de tumores humanos.

Un posible grupo de antígenos que podía reconocerse por CTL generados de esta forma es el de los antígenos MAGE-A. Para correlacionar la expresión de estos antígenos con la sensibilidad de células diana a CTL generados, se compararon los niveles de expresión de estos antígenos en tres líneas de cáncer de mama que muestran diferente 25 sensibilidad a la lisis. Los resultados se presentan en la Figura 10. El número máximo de antígenos investigados se expresa en células HBL-100, mientras que el número mínimo se expresa en células MCF-7. Estos resultados demuestran que de hecho existe una correlación entre el número de genes expresados de grupos de MAGE-A y la sensibilidad a la lisis, sugiriendo la posibilidad de que estos antígenos o antígenos regulados de forma similar sean dianas importantes en este tipo de inmunización.

30 Ejemplo 4

Ensayo de inmunodominancia de antígenos de diferenciación

35 Se emplearon dos líneas celulares de melanoma que expresaban altos niveles de antígenos de diferenciación, DDM-1.29, y bajos niveles de antígenos de diferenciación, DDM-1.P (variante de la línea celular DDM-1) en los experimentos sobre la generación de linfocitos T citotóxicos por estimulación *in vitro* de linfocitos de sangre periférica con células tumorales autólogas de acuerdo con el método descrito por Hérin *et al.*, 1987, Int. J. Cancer, v. 39, págs. 390-396. Después de 3 vueltas de estimulaciones semanales de linfocitos con células tumorales irradiadas (10.000 Rad), 40 los cultivos celulares se clonaron por diluciones limitantes y la actividad lítica de los clones en crecimiento primero se ensayó contra la línea celular de melanoma original en un ensayo de liberación de Cr⁵¹. Los clones de células se consideraron citotóxicos si tenían más de 20% de actividad lítica contra la línea celular de melanoma original. Despues se ensayó la especificidad de los clones de células T citotóxicas en los experimentos con células T2 cargadas con diferentes péptidos restringidos a HLA-A2 procedentes de los antígenos gp100 y MART-1. Como control sirvieron 45 células T2 no tratadas con péptidos. Se analizaron aproximadamente 100 clones para cada línea celular de melanoma. Los lisados se cargaron en células dendríticas como se ha descrito previamente y se inmunizaron linfocitos autólogos. Se calculó la proporción de clones de CTL que reconocían los antígenos de diferenciación gp100 y MART-1 después de la inmunización y los resultados se muestran en la Tabla 3 proporcionada a continuación.

50

TABLA 3

Proporción (% del número total de clones generados) de los clones de CTL que reconocen antígenos de diferenciación

55	Línea celular de melanoma	Expresión de antígenos de diferenciación	Proporción (% del número total de clones generados) de clones de CTL que reconocen	
			Gp100	MART-1
60	DDM-1.29	Alta	51	44
65	DDM-1.P	Baja (menor de 5% de los niveles en DDM-1.29)	0	0

ES 2 335 396 T3

Los datos demuestran que los antígenos de diferenciación son inmunodominantes. En caso de altos niveles de expresión de antígenos de diferenciación, la respuesta inmune se dirige principalmente hacia los antígenos de diferenciación gp100 y MART-1, aunque no se observa ninguna inducción de la respuesta inmune cuando para la inmunización se usa una línea celular que expresa bajos niveles de antígenos de diferenciación. Debe indicarse que las dos líneas celulares inducen una proliferación intensiva de linfocitos autólogos con la generación de grandes números de clones de células T citotóxicas.

Ejemplo 5

10 Fenotipo de células dendríticas generadas en diferentes condiciones de cultivo

Para investigar cómo influirían diferentes regímenes de la adición de linfocinas combinados con el cambio de medio en el día 1 sobre las propiedades fenotípicas de las células dendríticas inmaduras generadas, se investigaron cuatro condiciones de crecimiento diferentes. Se generaron células dendríticas esencialmente como se describe en el ejemplo 2. Las diferentes condiciones fueron:

- 1) se añadieron citocinas (GM-CSF e IL-4) el día 0 inmediatamente después de la terminación de la etapa de adsorción y se añadió un suministro adicional de citocinas el día 1 sin cambio de medio;
- 20 2) como en el grupo 1 pero con un cambio completo de medio el día 1 con un suministro adicional de citocinas;
- 3) la adición de citocinas se retrasó hasta el día 1 sin cambio de medio el día 1; y
- 25 4) igual que el grupo 3, pero con un cambio completo de medio el día 1.

Las condiciones del grupo 4 corresponden a las condiciones descritas por Thurner *et al.* (1999) para la generación de células dendríticas maduras a partir de un producto de leucoférésis (de acuerdo con Thurner, su optimización funcionaría sólo para células dendríticas generadas a partir de productos de leucoférésis, pero no a partir de muestras de sangre recién extraídas).

Después de 5 de incubación, las células se recogieron y el número de células grandes se contó en un Coulter Counter (Beckman, modelo Z2) y las células se congelaron en plasma autólogo con la adición de DMSO al 10% para el análisis adicional de la expresión del marcador de la superficie por FACS. Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales (todos de BD Biosciences): CD1a-PE, CD14-FITC y CD83-PE, con anticuerpos de control correspondientes.

Los recuentos de células demostraron que no había diferencia en el rendimiento de células (ni en número ni en tamaño), lo cual está en una buena correspondencia con los datos de Thurner *et al.*, 1999 (J. Immunol. Methods. 223: 1-15), ya que sólo usaron criterios morfológicos y el rendimiento como indicadores de la optimización de crecimiento. 40 Por el contrario, se observó una diferencia significativa en el presente estudio, cuando se midieron los marcadores de superficie (los resultados de uno de los experimentos se presentan en la Tabla 4).

TABLA 4

45 Fenotipo de células dendríticas generadas en diferentes condiciones de cultivo

50 Inicio de adición de citocina	Cambio de medio el día 1	Fenotipo de DC (%)		
		CD1a	CD14	CD83
Día 0	No	20,6	12,9	26,1
Día 0	Sí	18,3	9,0	34,2
Día 1	No	51,0	15,4	24,9
Día 1	Sí	52,0	10,9	32,8

60 El inicio de la adición de citocina el día 1 regula significativamente de forma positiva la expresión del marcador CD1a, mientras que no influye de forma significativa en la expresión de los demás marcadores. También pudo verse que, efectivamente no es necesario el cambio de medio el día 1, como se propuso originalmente por Thurner *et al* (1999), ya que se conseguía el mismo efecto tanto con como sin cambio de medio. De hecho, un cambio de medio el día 1 reducía significativamente la actividad endocítica de las células dendríticas en el estado inmaduro. 65 Estas condiciones - adición retardada de citocinas durante 1 día sin ningún cambio de medio, se seleccionaron para experimentos adicionales.

ES 2 335 396 T3

Ejemplo 6

Optimización del rendimiento de células dendríticas que pueden producirse a partir de monocitos

5 Durante la optimización descrita anteriormente, sorprendentemente se descubrió que el rendimiento de células dendríticas que pueden obtenerse a partir de la población de células mononucleares depende de la densidad de monocitos durante la etapa de adsorción. Como se ha indicado anteriormente en la mayoría de métodos publicados, cuando se realiza la etapa de adsorción se tiene en cuenta la concentración de células mononucleares en lugar de la de monocitos. Sin embargo, las células mononucleares representan una mezcla de dos poblaciones, linfocitos y monocitos, 10 y la proporción de cada población puede variar significativamente. Son los monocitos los que predominantemente se adsorben en el plástico.

15 Para estimar la concentración de monocitos en la población de células mononucleares se usó un Coulter Counter para contar el número de células, ya que esto también permite la observación de las distribuciones de los tamaños celulares (Beckman, Modelo Z2). Se observan dos poblaciones principales de células, con tamaños medios de 7 nm (linfocitos) y 9 nm (monocitos) después del recuento, y una cuadrícula apropiada permite la estimación de la proporción de estas dos poblaciones.

20 Previamente se ha descubierto que a una densidad celular de siembra de aproximadamente 15×10^6 monocitos por matraz T25, la adsorción de los monocitos era casi completa (más de 90%) y, por lo tanto, en los experimentos de los presentes solicitantes se usó esta densidad celular con variaciones entre 12×10^6 y 20×10^6 . Se observó una variación significativa en los rendimientos de células dendríticas y con la intención de comprender la razón de dicha variación, se decidió relacionar el rendimiento de células dendríticas en diferentes experimentos con la densidad original de monocitos. Los resultados de dicho análisis sobre cinco cultivos generados a partir de diferentes donantes indican 25 claramente la correlación inversa entre la eficacia de la generación de células dendríticas y la densidad de monocitos sembrados.

30 Se diseñó un experimento para evaluar esta relación, sembrando monocitos del mismo donante a diferentes densidades. Se aislaron células mononucleares a partir de una capa leucocitaria (preparada a partir de la sangre de un donante sano) por centrifugación en un gradiente de Lymphoprep. Después del aislamiento de las células de la interfase y el lavado intensivo para retirar las plaquetas, las células mononucleares se suspendieron en el medio de cultivo consistente en medio RPMI 1640 con la adición de 1% de plasma heparinizado autólogo, y se sembraron en matraces T25 (área de superficie de 25 cm^2) en 7 ml de medio por matraz a diferentes cantidades de células mononucleares por matraz (de 10×10^6 a 20×10^6 monocitos por matraz). Después de 1 hora de adsorción, las células no adsorbidas se 35 retiraron lavando dos veces con medio de cultivo precalentado y se añadieron 7 ml de medio nuevo a cada matraz. Al día siguiente, se añadieron GM-CSF (100 ng/ml) e IL-4 (50 µg/ml) al cultivo. La adición de citocinas se repitió el día 3. El día 5, se cambió la mitad del medio y se añadió una nueva parte de GM-CSF e IL-4. El día 6, se añadió TNF-α a una concentración de 20 ng/ml. Los cultivos se recogieron el día 7 y, después de contar el número total de células, se congelaron en suero autólogo con 10% de DMSO y se mantuvieron hasta que se analizaron por análisis FACS. El 40 análisis FACS se realizó con anticuerpos para CD1a y CD14.

Los resultados de uno de los experimentos en relación con el rendimiento de células dendríticas (células grandes con un tamaño medio comprendido entre 14 y 16 nm) se presentan en la Tabla 5.

45

TABLA 5

Rendimiento y fenotipo de células dendríticas en cultivos con diferentes densidades iniciales de los monocitos

50	Nº de monocitos por matraz T25 ($\times 10^6$)	Nº de DC por matraz T25 ($\times 10^6$)	Rendimiento de DC, % de monocitos	Fenotipo de DC, % de células seleccionadas	
				CD1a	CD14
55	10	5,28	52,8	54,9	11,0
	12,5	5,43	43,4	44,9	16,9
	15	4,67	31,1	46,4	14,9
60	17,5	4,47	25,5	46,2	14,5
	20	4,69	23,4	44,2	7,4

65 El rendimiento de células dendríticas se redujo significativamente al aumentar la densidad de los monocitos sembrados, siendo de 50% a la mínima densidad celular. En la tabla también se presentan los resultados de un análisis FACS realizado sobre las mismas células dendríticas e indican que no se observó ninguna diferencia significativa en las propiedades de las células dendríticas generadas a una densidad inicialmente diferente de los monocitos.

ES 2 335 396 T3

La reducción de la densidad celular inicial de los monocitos por debajo de 10×10^6 por matraz T25 conduce a una reducción en la expresión del marcador CD1a (datos no mostrados). Por lo tanto, la densidad celular óptima de la población inicial de monocitos que conduce a una eficacia máxima de la producción de células dendríticas con una competencia máxima (a juzgar por la expresión de los marcadores principales de DC) es de aproximadamente 10×10^6 por 25 cm^2 de superficie de cultivo.

Basándose en estos datos, ahora es posible calcular el volumen de sangre que será necesario extraer. Si el rendimiento esperado de células dendríticas es aproximadamente 50% del número inicial de monocitos, entonces se necesitarán sólo 300 ml de sangre para obtener 50×10^6 células dendríticas. Esto significa que una sola muestra de sangre de 300 ml de sangre sería suficiente para la preparación de una vacuna para dos vueltas de vacunaciones. La cantidad necesaria de citocinas (21 ng para GM-CSF y 10,5 ng para IL-4), así como otros materiales es tres veces menor que en el método convencional no optimizado.

Por lo tanto, también el coste de materiales necesarios para la producción de DC será al menos tres veces menor y además no habrá necesidad de realizar los procedimientos de leucoféresis caros.

Ejemplo 7

Uso de vacuna basada en células dendríticas

Un ciclo de vacunación de pacientes con cáncer con células dendríticas cargadas con el lisado de dos líneas celulares de melanoma preparadas de acuerdo con la invención, preferiblemente debe diseñarse de tal forma que los pacientes reciban un primer ciclo de cinco vacunaciones intradérmicas con intervalos de 3 semanas, cada vez con 5×10^6 células dendríticas. Si se observa una respuesta clínica después del ciclo inicial de vacunaciones, se realizará un segundo ciclo similar. Para el periodo total del ensayo será necesario un total de hasta 50×10^6 células. Considerando el estado de los pacientes (la mayoría de los pacientes está en un estadio avanzado de la enfermedad, donde ya no están funcionando otros tratamientos), es importante minimizar el número de extracciones de sangre, restringiéndolas a una o dos.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmune en un ser humano o un animal, que comprende células dendríticas que presentan una multiplicidad de antígenos de cáncer/testículo, **caracterizada** por

- 5 a) que las células dendríticas presentan al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje, proporcionándose dichos antígenos por al menos una línea celular de cáncer que expresa al menos cinco antígenos de cáncer/testículo diferentes y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje, significando esto que en un ensayo de citotoxicidad de 4 horas en presencia de antígenos de diferenciación de melanocitos/con especificidad de linaje dichas células experimentan menos de 10% de lisis
- 10 b) que las células dendríticas se han cultivado *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas antes de cargar las células dendríticas con los antígenos de cáncer/testículo,
- 15 c) que las células dendríticas son inmaduras, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83 durante la carga de los antígenos de cáncer/testículo, y
- 20 d) que las células dendríticas se han madurado por la adición de factores de maduración después de la carga de los antígenos.

2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células dendríticas son células dendríticas autólogas.

3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que se usa un lisado de células enteras de al menos una línea celular de cáncer que no expresa ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje como se define en la reivindicación 1, para cargar las células dendríticas.

30 4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la presentación de dichos al menos cinco antígenos de cáncer/testículo en las células dendríticas se realiza por fusión de células enteras.

35 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la presentación de dichos al menos cinco antígenos de cáncer/testículo se realiza por medio del uso de exosomas.

40 6. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la línea celular de cáncer es una línea celular de melanoma y los antígenos de diferenciación con especificidad de linaje son antígenos de diferenciación de melanocitos.

45 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que los antígenos de diferenciación de melanocitos comprenden gp100, Melan A/Mart-1 y tirosinasa.

8. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que se proporcionan precursores de células dendríticas en forma de monocitos a partir de sangre periférica del ser humano o el animal.

45 9. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que se proporcionan precursores de células dendríticas procedentes de médula ósea del ser humano o animal.

50 10. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que como fuente de células dendríticas o monocitos no está implicado ningún producto de leucoférésis.

55 11. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que las células dendríticas proceden de monocitos CD14+.

12. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, en la que las células dendríticas proceden de células CD34+.

60 13. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los antígenos de cáncer/testículo comprenden antígenos seleccionados entre las subfamilias MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C, GAGE, LAGE, SSX.

65 14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que los antígenos de cáncer/testículo comprenden antígenos seleccionados entre MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, BA-GE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, NY-ESO-1, LAGE, PAGE-1, PAGE-2, PAGE-3, PAGE-4, XAGE-1, XAGE-2, XAGE-3, SSX-1, SSX-2, SSX-3, SSX-4 y SSX-5.

ES 2 335 396 T3

15. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que los antígenos de cáncer/testículo comprenden antígenos seleccionados entre SCP-1, TSP-50, TRAG-3, SAGE, IL-13R alfa y CTp11.
- 5 16. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16, en la que los antígenos de cáncer/testículo comprenden antígenos seleccionados entre MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12 y NY-ESO-1.
- 10 17. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos al menos cinco antígenos de cáncer/testículo se proporcionan a partir de al menos dos líneas celulares de melanoma alogénicas.
- 15 18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, en la que las líneas celulares de melanoma alogénicas se seleccionan entre DDM-1.7 que puede obtenerse a partir de la línea celular depositada ECACC 01112339 o DDM-1.13 que puede obtenerse a partir de la línea celular depositada ECACC 01112338.
- 20 19. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-18, en la que la expresión de dichos al menos cinco antígenos de cáncer/testículo en dicha al menos una línea celular de cáncer se aumenta adicionalmente por desmetilación del ADN antes de proporcionar el lisado de células enteras de dicha al menos una línea celular de cáncer.
- 25 20. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, en la que dicha desmetilación se proporciona por tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina.
21. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las citocinas se seleccionan entre el grupo que comprende IL-4, GM-CSF, IL-13, IFN- γ , Flt-31, SCF y TNF- α .
- 30 22. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 21, en la que las citocinas comprenden IL-4 y GM-CSF.
- 35 23. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la fase de crecimiento inicial es de 6 a 48 horas, particularmente de 12 a 34 horas y más particularmente de 20 a 28 horas.
24. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en la que los factores de maduración comprenden IL-1 β , IL-6, TNF- α y PGE2.
- 40 25. Un método para obtener células dendríticas autólogas humanas o animales cargadas con al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje, que comprende las etapas:
- a) cultivar células dendríticas inmaduras autólogas, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83 obtenidas a partir de dicho ser humano o animal *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas, y
- 45 b) cargar dichas células dendríticas inmaduras autólogas, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83 de a) con los antígenos de cáncer/testículo obtenidos a partir de un lisado de células enteras de dicha al menos una línea celular de cáncer que expresa al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje como se define en la reivindicación 1, y
- c) conseguir la maduración de las células dendríticas cargadas de b) por la adición de factores de maduración.
- 50 26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en el que en la etapa c) se usa una densidad de siembra de monocitos comprendida entre 5×10^6 y 20×10^6 células por 25 cm^2 .
- 55 27. El método de acuerdo con la reivindicación 25 ó 26, en el que las células dendríticas autólogas se proporcionan a partir de sangre recién extraída.
28. Una línea celular de melanoma aislada que expresa al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación de melanocitos como se define en la reivindicación 1, seleccionada entre el grupo consistente en DDM-1.7 que se puede obtener a partir de las líneas celulares depositadas ECACC 01112339 o DDM-1.14 que se puede obtenerse a partir de las líneas celulares depositadas ECACC 01112338.
- 60 29. Exosomas derivados de una línea celular aislada de acuerdo con la reivindicación 28.
- 65 30. Un uso de células dendríticas como células presentadoras de antígeno en una composición farmacéutica o una vacuna, y donde dichas células dendríticas están cargadas con al menos cinco antígenos de cáncer/testículo diferentes y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje como se define en la reivindicación 1 en su estado inmaduro, momento en el que las células dendríticas son positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para

ES 2 335 396 T3

CD83, donde las células dendríticas se han cultivado *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas antes de cargar la célula dendrítica con dichos al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y donde las células dendríticas se han hecho madurar por la adición de factores de maduración después de la carga de los antígenos.

5 31. El uso de acuerdo con la reivindicación 30, donde las células dendríticas son células dendríticas autólogas.

10 32. El uso de acuerdo con la reivindicación 31, en el que las células dendríticas autólogas se proporcionan a partir de sangre recién extraída.

15 33. El uso de al menos cinco antígenos de cáncer/testículo obtenidos a partir de una línea celular de cáncer aislada de la reivindicación 28 en una composición farmacéutica o formulación de vacuna.

20 34. El uso de las líneas celulares aisladas DDM-1.7 que puede obtenerse a partir de la línea celular depositada ECACC 01112339 o DDM-1.13 que puede obtenerse a partir de la línea celular depositada ECACC 01112338, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cánceres.

25 35. Un método para producir un medicamento para inducir una respuesta inmune en un ser humano o animal, que comprende las etapas de:

30 a) cultivar células dendríticas inmaduras autólogas, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83 obtenidas a partir de dicho ser humano o animal *ex vivo* en medio de crecimiento sin ninguna citocina en una fase de crecimiento inicial, seguida de una segunda fase de crecimiento en medio que comprende citocinas, y

35 b) cargar dichas células dendríticas inmaduras autólogas, positivas para CD1a, negativas para CD14 y negativas para CD83 de a) con los antígenos de cáncer/testículo obtenidos a partir de un lisado de células enteras de dicha al menos una línea celular de cáncer que expresa al menos cinco antígenos de cáncer/testículo y ningún antígeno de diferenciación con especificidad de linaje como se define en la reivindicación 1, y

40 c) madurar dichas células dendríticas cargadas procedentes de b) por la adición de factores de maduración después de la carga de los antígenos.

45 36. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en el que las células dendríticas después de la carga con los antígenos de cáncer/testículo se hacen madurar por la adición de factores de maduración que comprenden IL-1 β , IL-6, TNF- α y PGE2.

50 37. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-36, en el que dicha al menos una línea celular de cáncer es una línea celular de melanoma y los antígenos de diferenciación con especificidad de linaje son antígenos de diferenciación de melanocitos.

55 38. El método de acuerdo con la reivindicación 37, en el que los antígenos de diferenciación de melanocitos comprenden gp100, Melan A/Mart-1 y tirosinasa.

40 39. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-38, en el que las células dendríticas autólogas se proporcionan a partir de sangre periférica del ser humano o animal.

45 40. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-39, en el que las células dendríticas autólogas se proporcionan a partir de la médula ósea del ser humano o animal.

50 41. El método de acuerdo con la reivindicación 39, en el que las células dendríticas autólogas proceden de monocitos CD14+.

55 42. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 ó 40, en el que las células dendríticas autólogas proceden de células CD34+.

60 43. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-42, en el que los antígenos de cáncer/testículo comprenden antígenos seleccionados entre las subfamilias MAGE-A, MAGE-B, MAGE-C, GAGE, LAGE y SSX.

65 44. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-43, en el que los antígenos de cáncer/testículo comprenden antígenos seleccionados entre MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, BA-GE, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, NY-ESO-1, LAGE, PAGE-1, PAGE-2, PAGE-3, PAGE-4, XAGE-1, XAGE-2, XAGE-3, SSX-1, SSX-2, SSX-3, SSX-4 y SSX-5.

ES 2 335 396 T3

45. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-42, en el que los antígenos de cáncer/testículo comprenden antígenos seleccionados entre SCP-1, TSP-50, TRAG-3, SAGE, IL-13R alfa y CTp11.
46. El método de acuerdo con la reivindicación 44, en el que los antígenos de cáncer/testículo comprenden antígenos seleccionados entre MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12 y NY-ESO-1.
47. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-46, en el que la expresión de dichos al menos cinco antígenos de cáncer/testículo en dicha al menos una línea celular de cáncer se aumenta adicionalmente por desmetilación de ADN antes de la lisis.
48. El método de acuerdo con la reivindicación 47, en el que dicha desmetilación se proporciona por tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina.
49. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-48, en el que dichas al menos dos líneas celulares de cáncer alogénicas se proporcionan en la etapa a).
50. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-49, en el que las líneas celulares de melanoma alogénicas se seleccionan entre DDM-1.7 que se puede obtener a partir de la línea celular depositada ECACC 01112339 o DDM-1.13 que se puede obtener a partir de la línea celular depositada ECACC 01112338.
51. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-50, en el que las citocinas se seleccionan entre el grupo que comprende IL-4, GM-CSF, IL-13, IFN- γ , Flt-31, SCF y TNF- α .
52. El método de acuerdo con la reivindicación 51, en el que las citocinas comprenden IL-4 y GM-CSF.
53. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35-52, en el que la fase de crecimiento inicial es de 6 a 48 horas, particularmente de 12 a 34 horas y más particularmente de 20 ó 28 horas.
54. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35-53, en el que las células dendríticas inmaduras autólogas de la etapa a) se obtienen a partir de un ser humano o animal al que previamente se le ha administrado una sustancia que comprende G-CSF y/o GM-CSF.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Figura 1

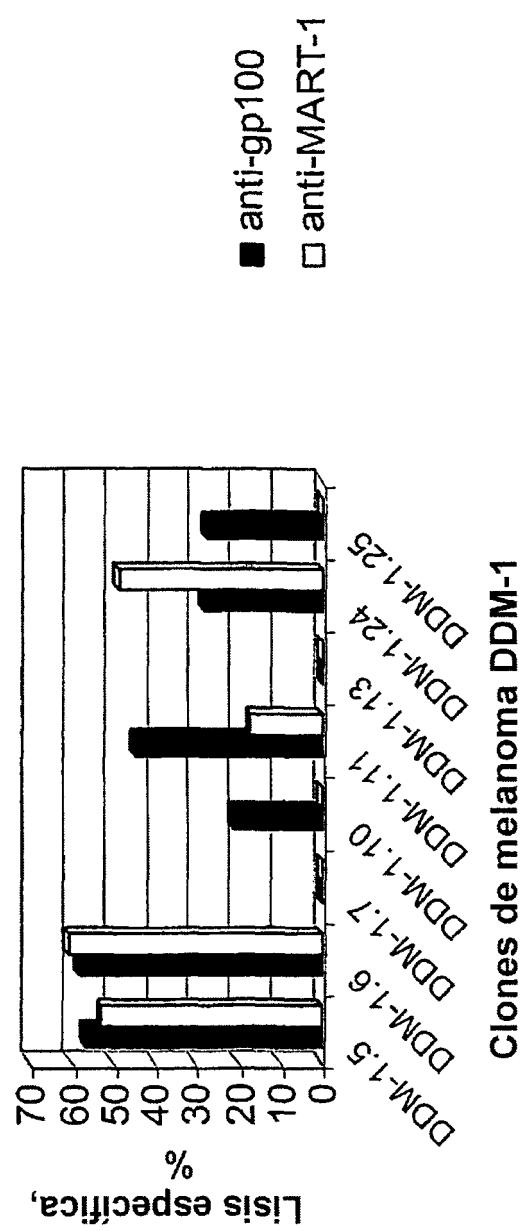


Figura 2

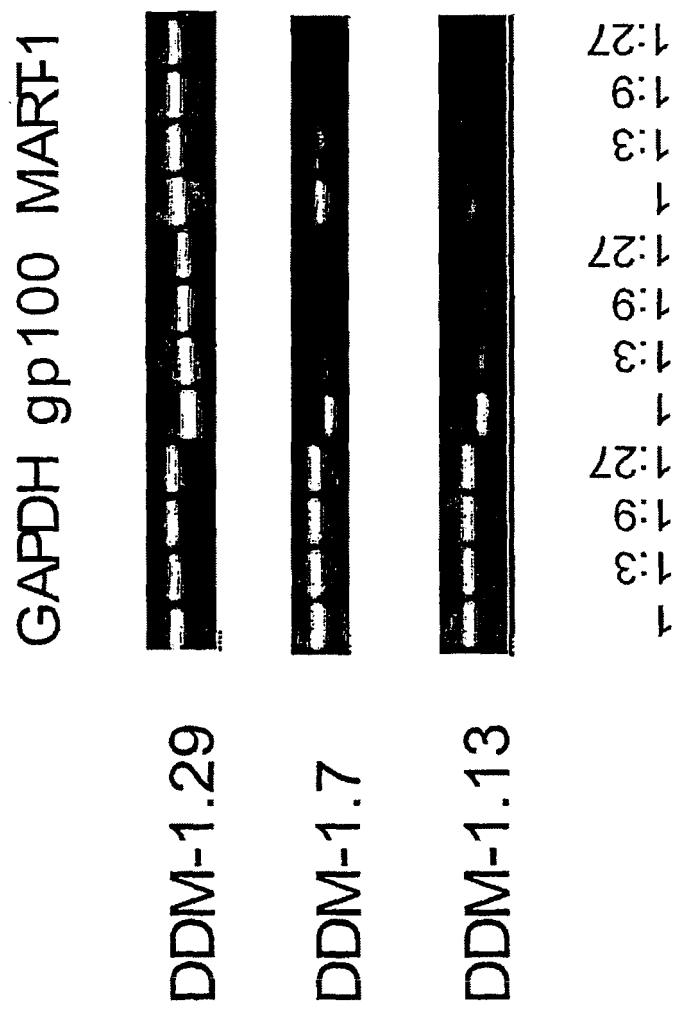
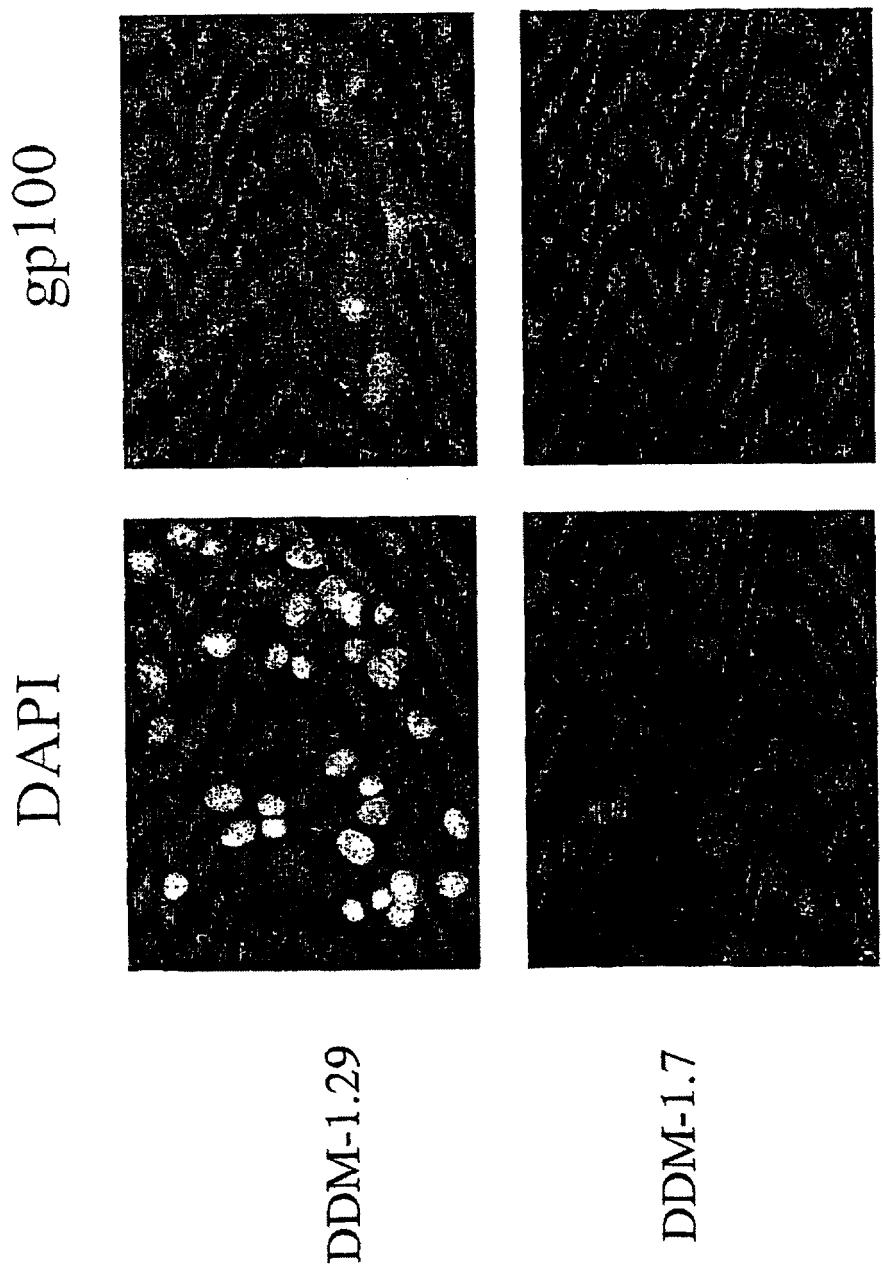


Figura 3



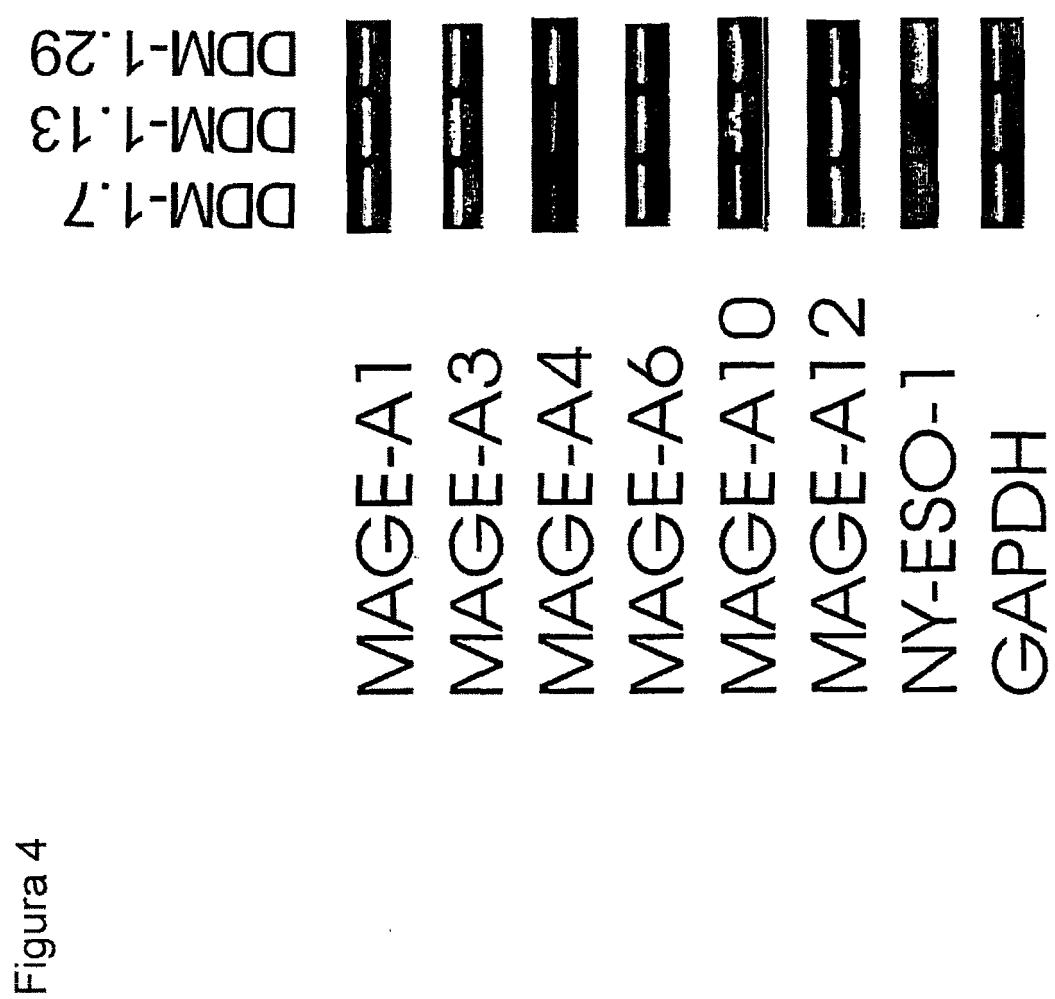


Figura 4

Figura 5

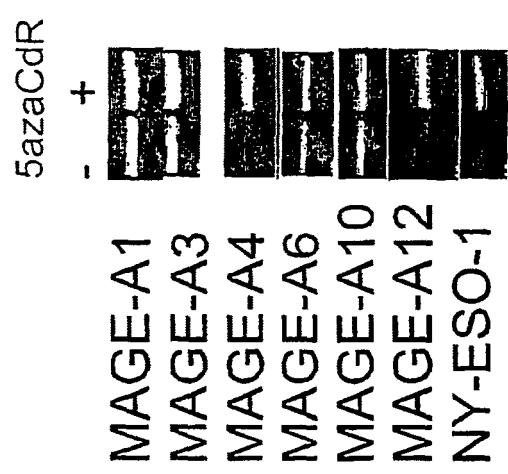
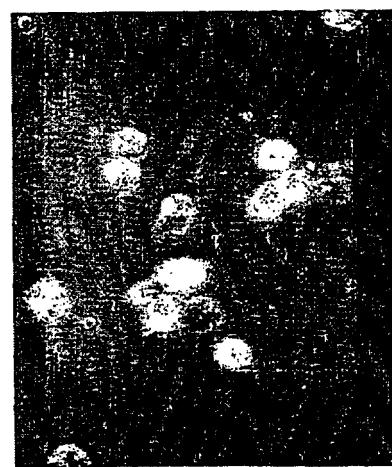
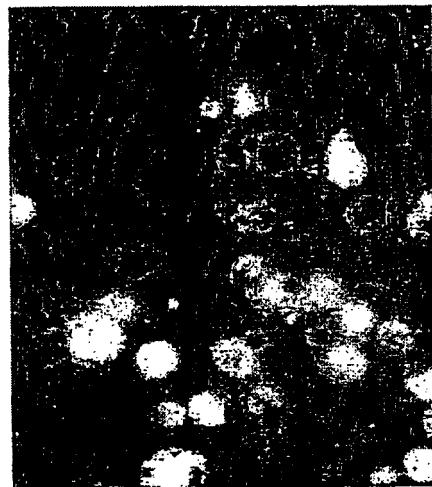


Figura 6

DC73-2 DC73-1



DC73-3



DC73-4

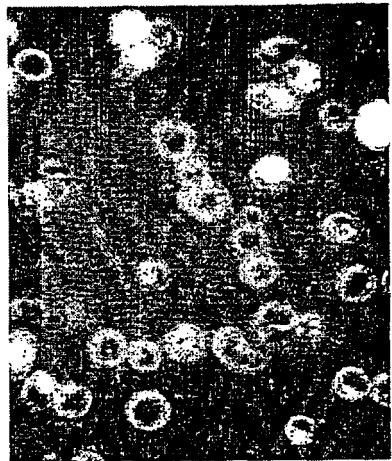
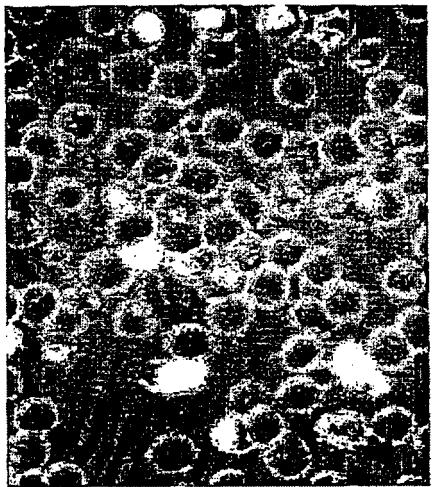
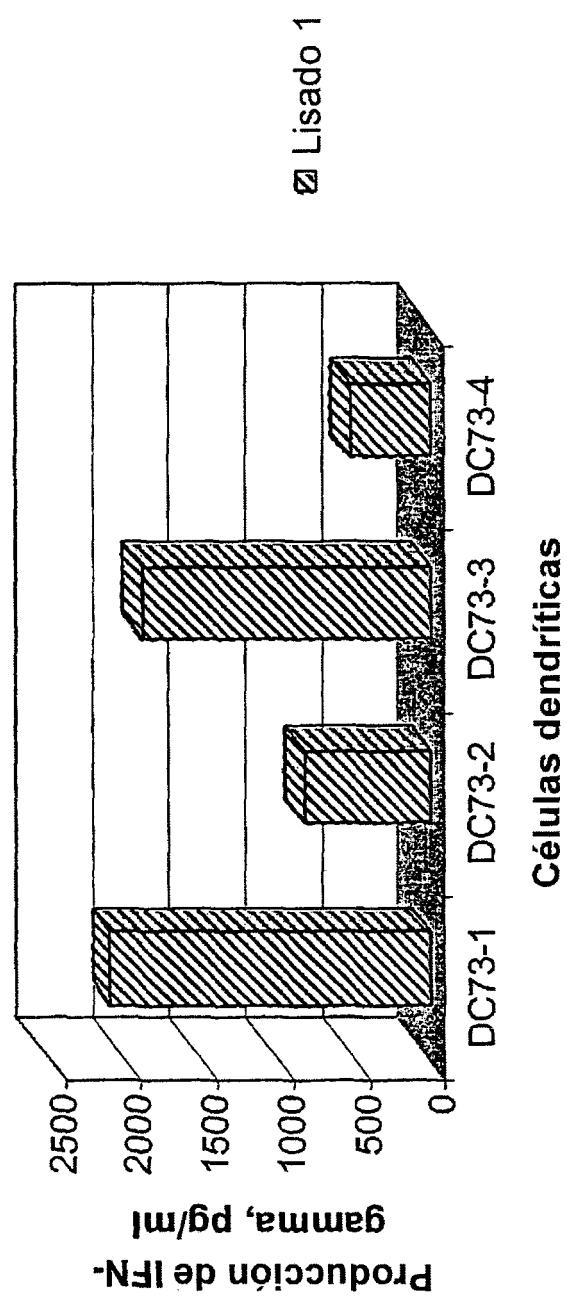


Figura 7



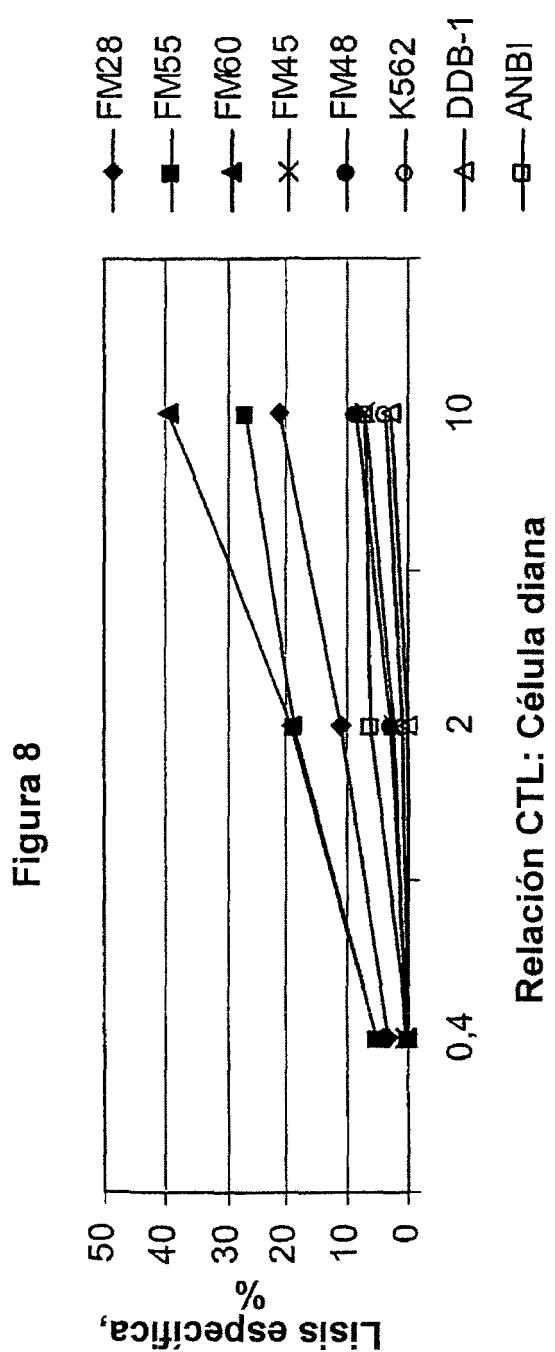
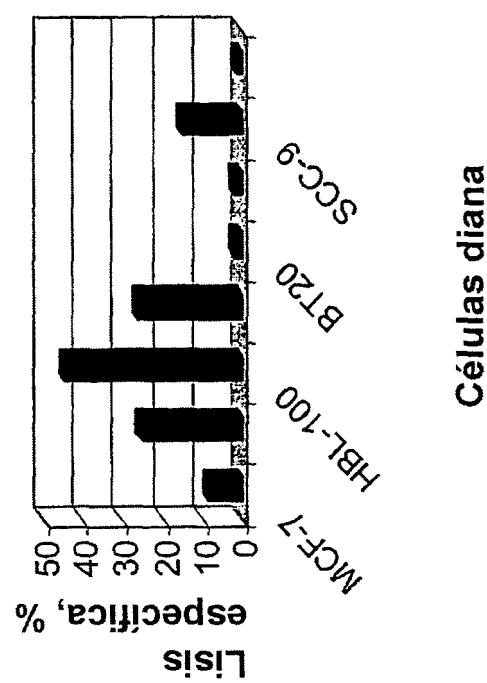


Figura 9



Células diana

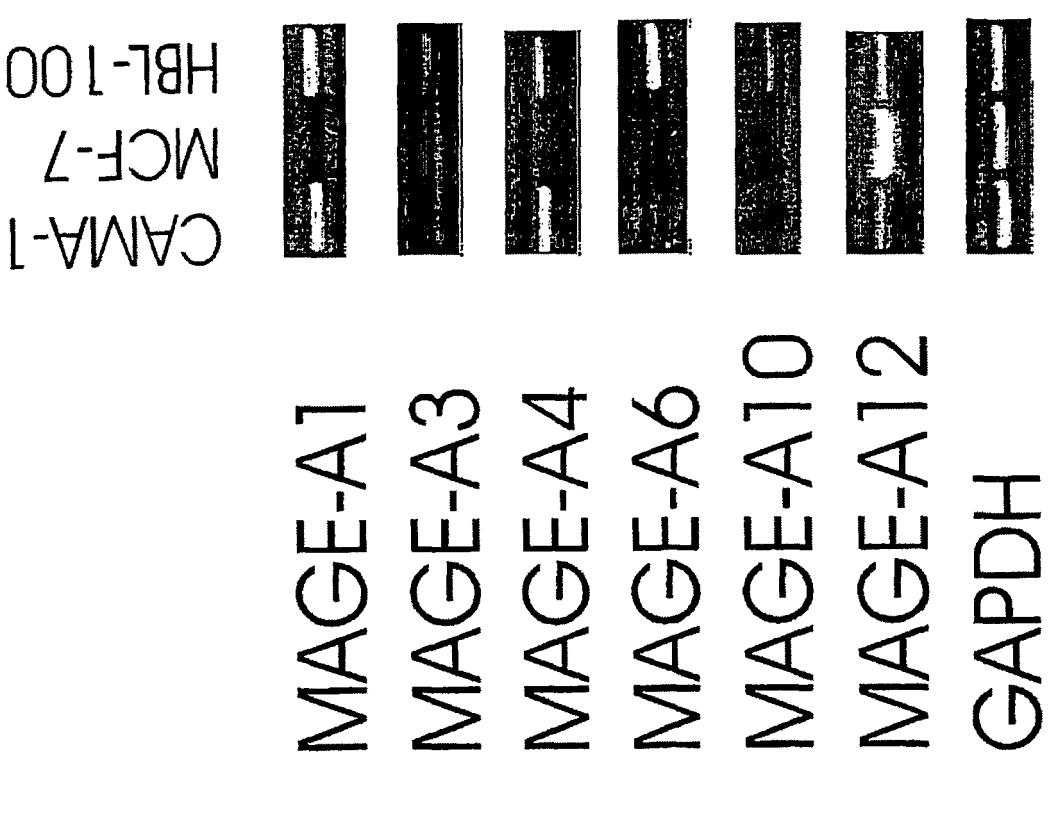


Figura 10