



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 256**

51 Int. Cl.:
C12N 5/10 (2006.01)
C12Q 1/48 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02791520 .6**
96 Fecha de presentación : **25.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1412485**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2004**

54 Título: **Células presentadoras de antígeno, método para su preparación y su uso para vacunas contra el cáncer.**

30 Prioridad: **30.07.2001 PCT/IT01/00419**

73 Titular/es: **EPIGEN THERAPEUTICS S.R.L.**
C/O Polo Tecnologico Pn Via Roveredo 20/B
33170 Pordenone, IT

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2011

72 Inventor/es: **De Santis, Rita**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2011

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Células presentadoras de antígeno, método para su preparación y su uso para vacunas contra el cáncer

5 La presente invención se refiere al campo de la medicina, en particular a productos, sustancias y composiciones para su uso en métodos para el tratamiento de sujetos humanos o animales, más en particular para el diagnóstico, tratamiento y prevención del cáncer. La presente invención se refiere a vacunas contra el cáncer y a métodos para su preparación.

10 Antecedentes de la invención

Recientemente se han identificado varios antígenos asociados a tumores (AAT) expresados constitutivamente por células transformadas de diferente histotipo (Renkvist N. y col. *Cancer Immunol. Immunother.* 50:3-15, 2001).

15 Una serie de estos AAT pueden proporcionar múltiples péptidos antigénicos inmunodominantes reconocidos por linfocitos T citotóxicos (LTC) CD8+ en el contexto de aloespecificidades HLA de clase I específicas (Renkvist N. y col. *Cancer Immunol. Immunother.* 50:3-15, 2001); además AAT seleccionados como, por ejemplo, MAGE (Jager E. y col., *J. Exp. Med.*, 187: 265-270, 1998), NY-ESO-1 (Jager E. y col., *J. Exp. Med.*, 187: 265-270, 1998), SSX (Tureci O., y col. *Cancer Res.* 56(20):4766-72 1996), tirosinasa (Topalian S.L. y col., *J. Exp. Med.*, 183: 1965-1971, 1996),
20 Melan-A/MART-1 (Zarour H.M. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 400-405, 2000) incluyen simultáneamente epítomos reconocidos por linfocitos T CD4+ en el contexto de aloespecificidades HLA de clase II específicas, siendo así capaces de inducir una respuesta inmunitaria humoral dirigida por AAT (Wang R.F., *Trends Immunol.*, 22: 269-276, 2001).

25 Se han identificado diferentes clases de AAT que pueden desempeñar un papel importante como dianas terapéuticas:

i) antígenos de cáncer de testículo (ACT), expresados en tumores de diversa histología pero no en tejidos normales, aparte del testículo y la placenta como, por ejemplo, MAGE, GAGE, SSX SART-1, BAGE, NY-ESO-1, XAGE-1,
30 TRAG-3 y SAGE, algunos de los cuales representan múltiples familias (Traversari C., *Minerva Biotech.*, 11: 243-253, 1999);

ii) antígenos específicos de diferenciación, expresados en melanocitos normales y neoplásicos, como, por ejemplo, tirosinasa, Melan-A/MART-1, gp100/Pmel17, TRP-1/gp75, TRP-2 (Traversari C., *Minerva Biotech.*, 11: 243-253,
35 1999);

iii) antígenos sobreexpresados en tejidos malignos de diferente histología pero presentes también en su contrapartida benigna, por ejemplo PRAME (Ikeda H. y col., *Immunity*, 6: 199-208, 1997), HER-2/neu (Traversari C., *Minerva Biotech.*, 11: 243-253, 1999), CEA, MUC-1 (Monges G.M. y col., *Am. J. Clin. Pathol.*, 112: 635-640, 1999),
40 alfa-fetoproteína (Meng W. S. y col., *Mol. Immunol.*, 37: 943-950, 2001);

iv) antígenos derivados de mutaciones puntuales de genes que codifican proteínas expresadas ubicuamente, como MUM- 1, β -catenina, HLA-A2, CDK4, y caspasa 8 (Traversari C., *Minerva Biotech.*, 11:243-253, 1999);

45 v) antígenos víricos (Traversari C., *Minerva Biotech.*, 11: 243-253, 1999).

Además de AAT, entre los elementos celulares que son cruciales para su inmunogenicidad eficaz y un reconocimiento eficiente por los linfocitos T del hospedador se incluyen antígenos HLA de clase I y HLA de clase II, y moléculas coestimuladoras/accesorias (por ejemplo, CD40, CD54, CD58, CD80, CD81) (Fleuren G.J. y col.,
50 *Immunol. Rev.*, 145: 91-122, 1995).

Entre las clases conocidas de AAT, los ACT son dianas terapéuticas especialmente adecuadas para inmunoterapia específica activa de pacientes de cáncer, debido a su expresión limitada en tejidos normales y su inmunogenicidad *in vivo* conocida en sujetos vivos, en particular mamíferos, incluidos los seres humanos (Jager E. y col., *J. Exp. Med.*, 187: 265-270, 1998; Rejnolds S.R. y col., *Int. J. Cancer*, 72: 972-976, 1997). Sin embargo, la expresión heterogénea de ACT específicos entre lesiones neoplásicas de diferentes pacientes limita su elegibilidad biológica para vacunación terapéutica dirigida por ACT. De hecho, las lesiones malignas de distintos pacientes de cáncer pueden expresar frecuentemente sólo ACT seleccionados (Sahin U. y col., *Clin. Cancer Res.*, 6: 3916-3922, 2000),
55 adicionalmente reprimidos (Lethz B. y col., *Melanoma Res.*, 7: S83-S88, 1997) y/o se ha referido también expresión heterogénea (dos Santos N.R. y col., *Cancer Res.*, 60: 1654-1662, 2000) de ACT específicos dentro de lesiones neoplásicas individuales (Jungbluth A.A. y col., *Br. J. Cancer*, 83: 493-497, 2000). Estos hechos, que pueden

producirse *in vivo* por separado o simultáneamente, también pueden contribuir a la inmunogenicidad constitutivamente baja de células malignas favoreciendo la progresión de la enfermedad (Speiser D.E. y col., *J. Exp. Med.*, 186: 645-653, 1997), y pueden conducir asimismo a inmunoselección *in vivo* de células neoplásicas con la aparición de clones negativos para ACT, en el curso de tratamiento inmunológico contra ACT específicos. Así, los enfoques inmunoterapéuticos que se centran en el objetivo inmunológico de distintos epítomos inmunógenos de ACT únicos no puede aplicarse a grandes cantidades de pacientes con cáncer, debido a la ausencia o la expresión posiblemente reprimida de ACT diana en sus lesiones neoplásicas; además, el objetivo inmunológico de ACT únicos *in vivo* puede generar variantes de tumor con pérdida de ACT que escapan eficientemente a la respuesta inmunitaria específica de ACT inducida/amplificada por el tratamiento. Un límite adicional a los enfoques terapéuticos que se dirigen a ACT únicos procede de su expresión intralesional heterogénea (Schultz-Thater E. y col., *Br. J. Cancer*, 83: 204-208, 2000), por otra parte, la presentación de distintos epítomos inmunógenos de ACT únicos por aloespecificidades HLA de clase I o HLA de clase II específicas permite el tratamiento sólo de pacientes con ciertos fenotipos definidos de HLA.

Para obviar en parte estas limitaciones, estrategias terapéuticas recientes están usando más de un epítomo inmunógeno de ACT único o múltiple, o la proteína ACT completa como agente de vacunación (*Conference on Cancer Vaccines*, ed. Ferrantini M. y Belardelli F., Roma-Italia, 15-16 de noviembre de 1999; <http://www.cancerresearch.org>).

En consecuencia, se siente una fuerte necesidad de una vacuna contra el cáncer que pueda superar los inconvenientes del estado de la técnica, en particular baja inmunogenicidad, inmunoselección *in vivo*, la posibilidad de aplicar una vacuna contra el cáncer en una población extensa de pacientes con cáncer, no limitada al ACT, o ATT, diana único específico, y en la que la vacuna contra el cáncer no esté "restringida" a antígenos HLA de clase I y/o HLA de clase II seleccionados.

Las recientes evidencias *in vitro* han demostrado que la expresión de todos los genes de ACT que se han investigado, entre los conocidos hasta ahora, se induce o se regula por incremento en células neoplásicas de diferente histología según su exposición a agentes de hipometilación de ADN (dos Santos N.R. y col., *Cancer Res.*, 60: 1654-1662, 2000; Weber J. y col., *Cancer Res.*, 54: 1766-1771, 1994). Se encontró que la inducción por ACT era persistente siendo detectable todavía varias semanas después del fin del tratamiento. Estos hallazgos sustentan la noción de que el ACT pertenece a una clase de AAT que está regulada extensamente por metilación de ADN. Además, el tratamiento de células neoplásicas con agentes de hipometilación de ADN indujo una regulación por incremento simultánea y persistente de su expresión de antígenos HLA de clase I y de aloespecificidades HLA de clase I investigadas, y también experimentó modulación por incremento de la expresión de las moléculas coestimuladoras/accesorias CD54 y CD58 (Coral S. y col., *J. Immunother.*, 22: 16-24, 1999).

No obstante su prometedor perfil terapéutico, los ACT muestran, sin embargo, una serie de inconvenientes, de manera que los ACT específicos investigados hasta ahora muestran una expresión heterogénea dentro de distintas lesiones neoplásicas, con la coexistencia de células malignas positivas y negativas a ACT; sólo ACT seleccionados entre los identificados hasta ahora pueden expresarse en distintas lesiones neoplásicas, independientemente de su origen histológico; los niveles de expresión umbral de ACT específico en células neoplásicas se requieren para su reconocimiento por LTC específicos de ACT y la vacunación contra un ACT específico requiere un HLA de clase I apropiado y, para ACT seleccionados, también un fenotipo de pacientes HLA de clase II.

Debido a sus especiales características biológicas, los ACT seleccionados se están usando en diferentes ensayos clínicos que pretenden inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica de ACT en pacientes afectados por enfermedades malignas de diferente histología. En la actualidad se usan diversas estrategias para la administración *in vivo* de ACT terapéuticos en la clínica o para la generación de herramientas de vacunación más potentes en nivel preclínico (dos Santos N.R. y col., *Cancer Res.*, 60: 1654-1662, 2000; Weber J. y col., *Cancer Res.*, 54: 1766-1771, 1994) tal y como conocen los expertos en la materia. Merece la pena destacar, principalmente debido a una serie de limitaciones técnicas y prácticas, que en la actualidad para los fines terapéuticos en la clínica se usa sólo un número limitado de epítomos inmunógenos de ACT específicos, o proteína de ACT completa única. A continuación se ofrece una lista de las principales estrategias ya usadas, o planteadas como hipótesis hasta ahora, para administrar ACT a pacientes con cáncer; también debe subrayarse que se usan estrategias idénticas para administrar a pacientes AAT que pertenecen a las otras clases de AAT conocidos hasta ahora, y que a veces se usan diferentes adyuvantes y/o vehículos para potenciar la inmunogenicidad de agentes terapéuticos.

- Péptidos sintéticos que representan epítomo(s) inmunógeno(s) de ACT únicos o múltiples reconocidos por linfocitos T CD8+ (*Conference on Cancer Vaccines*, ed. Ferrantini M. y Belardelli F., Roma-Italia, 15-16 de noviembre de 1999).

- Péptidos sintéticos encapsulados en liposomas que representan epítomo(s) inmunógeno(s) de ACT únicos o

múltiples (Steller M.A. y col., *Clin. Cancer Res.*, 4: 2103-2109, 1998).

- Proteína sintética completa de un ACT único (*Conference on Cancer Vaccines*, ed. Ferrantini M. y Belardelli F., Roma-Italia, 15-16 de noviembre de 1999; <http://www.cancerresearch.org>).

- Vectores víricos recombinantes que expresan epítomos de ACT únicos o múltiples reconocidos por linfocitos T CD8+ (Jenne L. y col., *Trends Immunol.*, 22:102-107, 2001).

- Disparo de ADN desnudo (Park J.H. y col., *Mol. Cells*, 9: 384-391, 1999).

- CMSP/macrófagos autólogos cargados *ex vivo* con péptidos sintéticos que representan epítomos de ACT únicos o múltiples reconocidos por linfocitos T CD8+ (*Conference on Cancer Vaccines*, ed. Ferrantini M. y Belardelli F., Roma-Italia, 15-16 de noviembre de 1999; <http://www.cancerresearch.org>).

- Células dendríticas autólogas cargadas *ex vivo* con péptidos sintéticos que representan epítomos de ACT únicos o múltiples reconocidos por linfocitos T CD8+ o cargadas con proteína sintética completa de un ACT único, o cargadas con preparaciones de células tumorales completas (*Conference on Cancer Vaccines*, ed. Ferrantini M. y Belardelli F., Roma-Italia, 15-16 de noviembre de 1999; <http://www.cancerresearch.org>; Jenne L. y col., *Trends Immunol.*, 22:102-107, 2001).

- Células dendríticas autólogas transfectadas o infectadas *ex vivo* con ADN/ARN para expresar ACT de longitud completa o fusionadas con células tumorales completas (Jenne L. y col., *Trends Immunol.*, 22:102-107, 2001);

- Linfocitos T autólogos transfectados o transducidos *ex vivo* con ADN/ARN para expresar ACT de longitud completa.

En cuanto a las vacunas autólogas contra el cáncer, a las que se refiere la presente invención como objeto principal, puede citarse una serie de referencias de patentes. El documento WO-99/42.128 desvela métodos para determinar el perfil de transcripción o expresión de HLA de un tumor sólido, para selección de tratamientos apropiados y/o para seguimiento del avance del tumor. El objetivo de esta referencia es inhibir algunas isoformas de HLA-G con el fin de incrementar la respuesta antitumoral nativa. El método comprende la extracción de células de una muestra tumoral, lisándolas y haciendo reaccionar el lisado con anticuerpos dirigidos contra antígenos HLA de clase I.

El documento DE 29913522 proporciona un aparato para preparar una vacuna contra el cáncer enviando células tumorales extraídas de un paciente a presiones de 200 a 9.000 bares, con el fin de destruir o dañar las células mientras se deja su superficie intacta reinyectando a continuación las células en el paciente.

El documento WO 00/02581 divulga una proteína o péptido de telomerasa, capaz de inducir una respuesta de linfocitos T contra un oncogén o una proteína o péptido supresor de tumor mutante. Dichos péptidos se usan para una vacuna contra el cáncer.

El documento WO 00/18933 divulga construcciones de ADN que provocan expresión de antígenos alterados funcionalmente inactivos que no están alterados con respecto a la eficiencia de transcripción y traducción de ADN, ARN o la generación de péptidos antigénicos. El paciente afectado por cáncer es tratado mediante la administración del ARN o el ADN de plásmido que codifica un antígeno asociado con cáncer humano alterado, en particular antígeno PSMA. En una forma de realización diferente, se usan como vacuna células dendríticas autólogas que se han expuesto *in vitro* al ARN o al ADN de plásmido.

El documento WO 00/20581 divulga una vacuna contra el cáncer que comprende un nuevo péptido de unión a antígeno leucocítico humano (HLA) de clase II MAGE-A3. El péptido puede usarse también para enriquecer selectivamente una población de linfocitos T con linfocitos T CD4+ específicos de dicho péptido. Dichos linfocitos enriquecidos se usan también como vacuna contra el cáncer.

El documento WO 00/25813 divulga un Antígeno Asociado a Tumor (AAT) universal que se une a una molécula de complejo de histocompatibilidad mayor. El método de tratamiento comprende la administración de una molécula de ácido nucleico que codifica el AAT, que es procesado por una célula presentadora de antígeno que activa linfocitos citotóxicos y destruye células que expresan AAT. Además del péptido específico hTERT, la identificación de diferentes AAT se hace posible mediante un método de síntesis complejo asistido por ordenador del péptido diseñado por ordenador y ensayos biológicos para confirmación de la utilidad del péptido.

El documento WO 00/26249 divulga fragmentos de proteína WT-1 humana o proteína gata-1 humana. Estos fragmentos de péptido se usan para vacuna contra el cáncer a través de la activación de linfocitos T citotóxicos

(LTC).

El documento US 6077519 proporciona una vacuna contra el cáncer que comprende una composición de epítopos de linfocitos T recuperados a través de elución ácida de epítopos a partir de tejido tumoral.

El documento WO 00/46352 proporciona una vacuna contra el cáncer que comprende linfocitos T humanos que expresan una molécula CD86 funcional. Los linfocitos T se obtienen sometiendo los linfocitos T a al menos dos estímulos secuenciales, que implican cada uno al menos un activador (un anticuerpo anti-CD2, 3 ó 28) y una citocina (interleucina) que estimula la proliferación de linfocitos T.

Coral S. y col. *Journal of Immunotherapy* 22(1):16-24, 1999, enseña que el potencial inmunógeno de células de melanoma y su reconocimiento por las células citotóxicas del hospedador depende de la presencia y del nivel de expresión de antígenos de Antígeno Leucocítico Humano (HLA) de clase I, moléculas coestimuladoras y antígenos asociados a melanoma (AAM) en células neoplásicas. Puede darse la sugerencia de que 5-AZA-CdR para su uso en inmunoterapia específica activa y/o pasiva para melanoma humano a través de su administración sistémica puede potenciar el reconocimiento de células de melanoma por células citotóxicas.

Momparler, *Anticancer Drugs Apr*; 8(4):358-68, 1997, menciona 5-AZA-CdR como agente quimioterapéutico.

Shichijo S. y col. *Jpn. J. Cancer Res.* 87, 751-756, julio de 1996, investigaron si el agente desmetilinizante 5-AZA-CDR induce MAGE 1, 2, 3 y 6 en células linfoides normales y malignas con el fin de comprender mejor los mecanismos de su expresión en las células. Los autores demostraron la inducción de ACT investigado en muestras seleccionadas sometidas a ensayo y expusieron que la desmetilación no es un estímulo suficiente para inducir genes MAGE en todos los casos y que sus resultados deben conducir a una mejor comprensión de mecanismos de expresión de genes MAGE en células. No se sugirieron perspectivas de implicaciones terapéuticas.

Resumen de la invención

Se ha encontrado ahora, y es un objeto de la presente invención, un método para la generación de células presentadoras de Antígeno de Cáncer de Testículo (ACT) que comprende:

- a) activación de células CMSP aisladas a partir de un sujeto humano;
- b) cultivo de dichas células activadas;

caracterizado porque:

c) dichas células de cultivo se tratan con 1 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina cuatro veces cada 12 horas; a continuación se sustituye la mitad del medio de cultivo por medio nuevo y se permite que continúe 48 horas más de manera que dichas células expresen simultáneamente múltiples Antígenos de Cáncer de Testículo (ACT).

Las células obtenidas directamente según el método de la presente invención, así como los componentes celulares de las mismas ya sea en solitario o en combinación con dichas células, son útiles para la prevención y tratamiento, en particular en un mamífero, incluidos los seres humanos, de malignidades de diferente histotipo que expresan constitutivamente uno o más de los múltiples antígenos asociados a tumores que son expresados en dichas células.

En lo sucesivo en la presente invención, dichas células se denominan sucintamente células ADHAPI.

Más convenientemente, las células que pueden obtenerse a partir del método anterior mencionado se usan en forma de una vacuna contra el cáncer.

En lo sucesivo, la presente invención se desvelará en detalle también por medio de ejemplos y figuras, en los que:

la Figura 1 muestra la proliferación de CMSP (RLMa) (R) autólogas estimuladas con células ADHAPI/B-VEB o células B-VEB de control (S);

la Figura 2 muestra la proliferación de CMSP (RLMa) (R) autólogas estimuladas con células ADHAPI/PWM-B o células PWM-B de control (S);

la Figura 3 muestra la proliferación de CMSP (RLMa) (R) autólogas estimuladas con células ADHAPI/CD40L-B o células de CD40L-B de control (S);

la Figura 4 muestra la proliferación de CMSP (RLMa) (R) autólogas estimuladas con células ADHAPI/PWM-CMSP o células de PWM-CMSP de control (S);

la Figura 5 muestra la proliferación de CMSP (RLMa) (R) autólogas estimuladas con células ADHAPI/PHA-CMSP y PHA-CMSP de control;

la Figura 6 muestra la proliferación de CMSP (RLMa) (R) autólogas estimuladas con células ADHAPI/PHA-+PWM-CMSP o PHA-+PWM-CMSP de control (S);

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, las células CMSP se aíslan a partir de un sujeto humano. En una posible forma de realización de la presente invención, dicho ser humano es un paciente con cáncer.

En ciertas formas de realización específicas de la presente invención, las células adecuadas para el método divulgado en la presente memoria descriptiva son:

- Líneas celulares linfoblastoides B tratadas con agente de hipometilación de ADN e inmortalizadas con virus de Epstein-Barr, generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con cáncer en estado avanzado de enfermedad o de sujetos sanos (células ADHAPI/B-VEB).

- Linfocitos B tratados con agente de hipometilación de ADN y activados por mitógeno de hierba carmín (PWM), generados a partir de linfocitos B purificados a partir de CMSP de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos (células ADHAPI/PWM-B).

- Linfocitos B tratados con agente de hipometilación de ADN y activados por CD40, generados a partir de linfocitos B purificados a partir de CMSP de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos (células ADHAPI/CD40-B).

- CMSP tratadas con agente de hipometilación de ADN y activadas por mitógeno de hierba carmín (PWM), generadas a partir de CMSP purificadas de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos (células ADHAPI/PWM-CMSP)

- CMSP tratadas con agente de hipometilación de ADN y activadas por fitohemaglutinina (PHA) + interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2), generadas a partir de CMSP purificadas de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos (células ADHAPI/PHA-rhIL2-CMSP)

- CMSP tratadas con agente de hipometilación de ADN y activadas por fitohemaglutinina (PHA) + interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2) + mitógeno de hierba carmín (PWM), generadas a partir de CMSP purificada de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos (células ADHAPI/PHA-rhIL2-PWM-CMSP)

Las células obtenidas por el método según la presente invención son adecuadas para su uso como agentes para la prevención y tratamiento de malignidades de diferente histotipo que expresan constitutivamente uno o más antígenos de cáncer, ya sean inmunodominantes o no inmunodominantes.

Otra forma de realización posible de la presente invención es aplicable a aquellos casos en los que no se desea o no es necesario usar la capacidad de presentación del antígeno directo de las células de vacunación. En este caso, las células de vacunación obtenidas directamente por el método anterior o sus componentes celulares pueden usarse como "reservorio" de antígenos de cáncer en reserva para vacunar a pacientes.

Esta forma de realización de la presente invención ofrece al experto en la materia las siguientes ventajas:

Los ACT son inmunógenos ya que incluyen epítomos reconocidos por LTC CD8+ específicos de ATC restringidos por HLA de clase I.

Los ACT son inmunógenos ya que incluyen epítomos reconocidos por linfocitos T CD4+ específicos de ATC restringidos por HLA de clase II.

Los ACT seleccionados incluyen simultáneamente epítomos presentados por antígenos HLA de clase I y HLA de clase II; así, los ACT seleccionados pueden inducir simultáneamente reacciones de LTC CD8+ y linfocitos T CD4+.

Los ACT no se expresan en tejidos benignos con la excepción del testículo y la placenta.

ACT diferentes pueden expresarse simultáneamente en células neoplásicas de malignidades sólidas y hemopoyéticas, proporcionando múltiples dianas terapéuticas que se coexpresan en células transformadas.

5 Los distintos ACT se expresan homogéneamente entre lesiones metastásicas simultáneas y secuenciales de pacientes dados.

10 Distintos ACT pueden expresarse en tejidos malignos de diferente origen histológico proporcionando dianas terapéuticas comunes compartidas por neoplasias humanas con independencia de su histotipo específico.

Distintos ACT pueden codificar para múltiples péptidos inmunógenos presentados en el contexto de diferentes aloespecificidades HLA de clase I y HLA de clase II.

15 Los inhibidores de histona desacetilasa pueden mostrar sinergia con agentes de hipometilación de ADN en inducción/regulación por incremento de la expresión de ACT, de antígenos HLA y de moléculas coestimuladoras/accesorias en células neoplásicas de diferente histología. De hecho, la metilación de ADN y la desacetilación de histona actúan como capas sinérgicas para la silenciación de genes epigénicos en cáncer (Fuks F. y col., *Nat. Genet.*, 24: 88-91, 2000), y se ha observado una fuerte reactivación de genes hipermetilados seleccionados, con función de supresor de tumores, en células de carcinoma colorrectal después de tratamiento con inhibidores de histona desacetilasa, después de una desmetilación de ADN mínima inicial (Cameron E.E. y col., *Nat. Genet.*, 21: 103-107, 1999).

25 La etapa de activación en el método según la presente invención se efectúa siguiendo el conocimiento común general, en cualquier caso puede hacerse referencia a *Current Protocols in Immunology*, Coligan J.E. y col. ed, Wiley.

30 El tratamiento de desmetilación en el método según la presente invención es generalmente bien conocido y la literatura especializada refiere generalmente el método, para más información véase también Santini V. y col., *Ann. Intern. Med.*, 134: 573-586, 2001.

35 Los agentes de hipometilación, también conocidos en la técnica como agentes de desmetilación, útiles para los fines de la presente invención son bien conocidos en la técnica. Los agentes de desmetilación de ADN son ampliamente desvelados en la literatura especializada, véanse por ejemplo los documentos WO-01/29.235, US-5.851.773. Un agente de desmetilación de ADN preferido es 5-aza-citidina o, más preferido, 5-aza-2'-desoxicitidina (5-AZA-CdR).

40 Las células presentadoras de antígeno obtenidas por el método de la presente invención son adecuadas para la preparación de vacunas contra el cáncer. Preferentemente, dichas vacunas son vacunas autólogas. Alternativamente, dichas vacunas son vacunas alogénicas. En esta forma de realización, las células obtenidas según el método anterior desvelado pueden usarse como células presentadoras de antígeno y en la forma de "reservorio" de antígenos de cáncer en reserva, ya sea como células o como componentes celulares de las mismas.

45 Las células anteriores y/o sus componentes celulares pueden usarse en un método para generar células inmunitarias efectoras, usándose dichas células inmunitarias efectoras para la preparación de un producto útil en la inmunoterapia adoptiva bien conocida. La vacuna divulgada en la presente memoria descriptiva puede usarse en combinación con un pretratamiento sistémico del paciente con cáncer con un agente de hipometilación, por ejemplo decitabina. Esta forma de realización puede realizarse con un artículo de fabricación, por ejemplo un kit, que comprende una vacuna según la presente invención y una composición farmacéutica adecuada para administración sistémica de un agente de hipometilación, por ejemplo decitabina.

50 Pueden prepararse vacunas según técnicas bien conocidas para el experto en la materia, recurriendo simplemente al conocimiento común general. Por ejemplo, las referencias de patentes mencionadas en la presente descripción son una descripción suficiente para la preparación de vacunas contra el cáncer, véanse por ejemplo los documentos WO 00/25813 o WO 00/46352.

55 El experto en la materia no tendrá dificultades para establecer la forma adecuada para usar las vacunas según la presente invención, en particular en cuanto al protocolo de administración.

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la presente invención.

EJEMPLO 1**Células ADHAPI/B-VEB**5 Purificación de CMSP

Se purificaron CMSP por centrifugado de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque estándar a partir de sangre periférica heparinizada de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos.

10 Generación de líneas celulares linfoblastoides B autólogas por la inmortalización de CMSP con virus de Epstein-Barr (VEB)

Se generaron líneas celulares linfoblastoides B-VEB+ incubando CMSP con sobrenadante a partir de línea celular de titíes B95.8 a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, en medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10% (o suero AB humano) y 2 mM de L-glutamina.

15 Generación de células ADHAPI/B-VEB y células B-VEB de control

Se cultivaron líneas celulares linfoblastoides B-VEB+ ($7,5 \times 10^5$ células/ml) en medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10% (o suero AB humano inactivado por calor al 10%) y 2 mM de L-glutamina a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, y pulsados cuatro veces con 1 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (5-AZA-CdR) cada 12 h; a continuación, se sustituyó la mitad del medio de cultivo por medio nuevo y se dejó que los cultivos prosiguieran durante 48 h más. A continuación se usaron células para procedimientos experimentales y/o se congelaron en condiciones viables. Se cultivaron células de control (células B-VEB) en condiciones experimentales similares pero sin pulsos de 5-AZA-CdR.

25 Recuperación final de células ADHAPI/B-VEB y células B-VEB de control

Véanse los resultados en la Tabla 1.

30 Reacción linfocitaria mixta autóloga (RLMa) y RLM

Se reunieron células ADHAPI/B-VEB y células B-VEB de control (estimuladores = S), se lavaron dos veces con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y se trataron mediante rayos X (75 Gy). Para RLMa y RLM se añadieron concentraciones escalares (de 1×10^6 células/ml a 6×10^4 células/ml) de células ADHAPI/B-VEB o células B-VEB de control a CMSP autólogas o alogénicas (1×10^6 células/ml) (respondedor = R) en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina, y se sembró en placas con fondo en U de 96 pocillos hasta un volumen final de 200 μ l/pocillo. Después de una incubación de 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%, se recogieron 100 μ l de sobrenadante de cultivo y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta su uso para ensayo de citocinas. A continuación, se añadieron 100 μ l de medio nuevo a cada pocillo y se dejó que los cultivos continuaran durante cinco días más, cuando se pulsaron los cultivos O/N con ³H-TdR (1 μ Ci/pocillo); a continuación se recogieron las placas y se midió la incorporación de ³H-TdR por células R mediante un contador β .

45 Proliferación de CMSP autóloga (R) estimulada con células ADHAPI/B-VEB o células B-VEB de control (S) en RLMa

Véase la Figura 1.

50 Perfil fenotípico de células ADHAPI/B-VEB y células B-VEB de control

Véanse los resultados en la Tabla II.

Análisis RT-PCR de ACT expresado por células ADHAPI/B-VEB y células B-VEB de control

Las condiciones experimentales y los cebadores usados para evaluar la expresión de ACT en células investigadas fueron los siguientes:

para MAGE-1, -2, -3, -4 Brasseur, F., y col. *Int. J. Cancer* 63: 375-380, 1995; para GAGE 1-6 Van den Eynde, B., y col. *J. Exp. Med.* 182: 689-698, 1995; para NY-ESO-1 Stockert, E. y col. *J. Exp. Med.* 187: 265-270, 1998; para SSX-2; Sahin, U., y col. *Clin. Cancer Res.* 6: 3916-3922, 2000.

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	NP	NP
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	NP	NP
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	2/4	4/4

^a positivo/probado; NP, no probado;

Evaluación ELISA de IFN- γ liberado por CMSP (R) estimuladas en RLMa por células ADHAPI/B-VEB o células B-VEB de control (S)

Véanse resultados en la Tabla III.

EJEMPLO 2

Células ADHAPI/PWM-B

Purificación de linfocitos B

Se purificaron CMSP por centrifugado de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque estándar a partir de sangre periférica heparinizada de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos, y se obtuvieron linfocitos B purificados por técnica de E rosetting convencional usando glóbulos rojos de ovejas tratados con neuraminidasa.

Generación de linfocitos B activados por PWM

Se añadieron linfocitos B purificados ($1,5 \times 10^6$ células/ml) con PWM (3 μ g/ml) y se cultivaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina.

Generación de células ADHAPI/PWM-B y células PWM-B de control

Se pulsaron linfocitos B activados por PWM cuatro veces con 1 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (5-AZA-CdR) cada 12 h; a continuación, se sustituyó la mitad del medio de cultivo por medio nuevo y se dejó que los cultivos continuaran durante 48 h más. A continuación se usaron células para procedimientos experimentales y/o se congelaron en condiciones viables. Se cultivaron células de control (PWM-B) en condiciones experimentales similares pero sin pulsos de 5-AZA-CdR.

Recuperación final de células ADHAPI/PWM-B y células PWM-B de control

Véanse los resultados en la Tabla I.

Reacción linfocitaria mixta autóloga (RLMa) y RLM

Se recogieron células ADHAPI/PWM-B y células PWM-B de control (estimuladores = S), se lavaron tres veces con solución salina equilibrada de Hanks suplementada con α -metilmannopiranosido al 0,5%, y se trataron mediante rayos X (30 Gy). Para RLMa y RLM se añadieron concentraciones escalares (de 1×10^6 células/ml a 6×10^4 células/ml) de células ADHAPI/PWM-B o células PWM-B de control a CMSP autólogas o alogénicas (1×10^6 células/ml) (respondedor = R) en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina, y se sembró en placas con fondo en U de 96 pocillos hasta un volumen final de 200 μ l/pocillo. Después de una incubación de 6 días a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, se recogieron 100 μ l de cultivo sobrenadante de cada pocillo y se almacenó inmediatamente a -80°C hasta su uso para ensayo de citocinas. A continuación, se añadieron 100 μ l de medio nuevo a cada pocillo y se pulsaron los cultivos O/N con ³H-TdR (1 μ Ci/pocillo); a continuación, se recogieron las placas y se midió la incorporación de ³H-TdR por células R mediante un contador β .

Perfil fenotípico de células ADHAPI/PWM-B y células PWM-B de control

Véanse los resultados en la Tabla II.

5 Análisis RT-PCR de ACT expresado por células ADHAPI/PWM-B y células PWM-B de control

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	0/4	4/4
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	0/4	4/4
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	1/4	4/4

^a positivo/probado; NP, no probado.

10 Proliferación de CMSP autólogas (R) estimuladas con células ADHAPI/PWM-B o células PWM-B de control (S) en RLMa

Véanse los resultados en la Figura 2.

15 Evaluación ELISA de IFN- γ liberado por CSMP alogénicas (RLM) y autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/PWM-B o células PWM-B de control (S)

Véanse los resultados en la Tabla III.

20 **EJEMPLO 3****Células ADHAPI/CD40LB**Purificación de CMSP

25 Se purificaron CMSP por centrifugado de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque estándar a partir de sangre periférica anticoagulada con ácido citrato dextrosa (ACD) o heparinizada de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos.

30 Generación de CSMP activadas con NIH3T3-CD40L

35 Se cocultivó CMSP (2×10^6 células/ml) con NIH3T3-CD40L semiconfluentes, tratadas radiológicamente (75 Gy) a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%, 2 mM de L-glutamina, 2 ng/ml de interleucina 4 recombinante humana (rh) (rhIL-4), 50 μ g/ml de transferrina humana, 5 μ g/ml de insulina rh, $5,5 \times 10^{-7}$ M de ciclosporina A (CsA), 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina (medio completo). Después de seis días de incubación, se recogieron las CMSP, se lavaron dos veces con HBSS, se resuspendieron a 1×10^6 células/ml en medio completo y se cocultivaron durante 3 días más a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% con NIH3T3-CD40L preparado de nuevo según se describe anteriormente. Este procedimiento se repitió cada 2-3 días hasta un tiempo de cultivo máximo de 16 a 18 días.

40 Generación de células ADHAPI/CD40L-B y células de CD40L-B de control

45 Después de 16 a 18 días de cultivo, se recogieron CMSP activadas y se reestimularon con NIH3T3-CD40L según se describe anteriormente; después de una incubación O/N a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, se sometieron los cultivos a pulsos cuatro veces con 1 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (5-AZA-CdR) cada 12 h; a continuación, se recogieron células y se reestimularon con NIH3T3-CD40L según se describe anteriormente y se dejó que los cultivos continuaran durante 48 h más. A continuación se usaron células para procedimientos experimentales y/o se congelaron en condiciones viables. Se cultivaron células de control (células CD40L-B) en condiciones experimentales similares pero sin pulsos de 5-AZA-CdR.

50

Recuperación final de células ADHAPI/CD40L-B y células de CD40L-B de control

Véanse los resultados en la Tabla I.

5 Reacción linfocitaria mixta autóloga (RLMa) y RLM

Se recogieron células ADHAPI/CD40L-B y células de CD40L-B de control (estimuladores = S), se lavaron tres veces con solución salina equilibrada de Hanks y se trataron mediante rayos X (50 Gy). Para RLMa y RLM se añadieron concentraciones escalares (de 1×10^6 células/ml a 6×10^4 células/ml) de células ADHAPI/CD40L-B o células de CD40L-B de control a CMSP autólogas o alogénicas (1×10^6 células/ml) (respondedor = R) en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina, y se sembró en placas con fondo en U de 96 pocillos hasta un volumen final de 200 µl/pocillo. Después de una incubación de 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂, se recogieron 100 µl de cultivo sobrenadante y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta su uso para ensayo de citocinas. A continuación, se añadieron 100 µl de medio nuevo a cada pocillo y se dejó que los cultivos continuaran durante 5 días más cuando los cultivos se pulsaron O/N con ³H-TdR (1 µCi/pocillo); a continuación se recogieron las placas y se midió la incorporación de ³H-TdR por células R mediante un contador β.

Perfil fenotípico de células ADHAPI/CD40L-B y células de CD40L-B de control

20 Véanse los resultados en la Tabla II.

Análisis RT-PCR de ACT expresados por células ADHAPI/CD40L-B y células de CD40L-B de control

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/10 ^a	10/10
MAGE-2	0/10	9/10
MAGE-3	0/11	10/11
MAGE-4	0/11	11/11
NY-ESO-1	0/14	14/14
GAGE-1-6	0/14	14/14
SSX-2	0/14	13/14

25 ^a positivo/probado.

Proliferación de CSMP autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/CD40L-B o células de CD40L-B de control (S) en RLMa

30 Véanse los resultados en la Figura 3.

Evaluación ELISA de IFN-γ liberado por CMSP (R) estimuladas en RLMa por células ADHAPI/CD40L-B o células de CD40L-B de control (S)

35 Véanse los resultados en la Tabla III.

EJEMPLO 4**Células ADHAPI/PWM-CMSP**40 Purificación de CMSP

Se purificaron CMSP por centrifugado de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque estándar a partir de sangre periférica heparinizada de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos.

45 Generación de CMSP activadas por PWM

Se añadieron CMSP ($1,5 \times 10^6$ células/ml) con PWM (3 µg/ml) y se cultivaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina.

50

Generación de células ADHAPI/PWM-CMSP y células de PWM-CMSP de control

Se pulsaron las CMSP activadas por PWM cuatro veces con 1 μ M de 5-aza-2'-desoxicitidina (5-AZA-CdR) cada 12 h; a continuación, se sustituyó la mitad del medio de cultivo por medio nuevo y se dejó que los cultivos continuaran durante 48 h más. A continuación se usaron células para procedimientos experimentales y/o se congelaron en condiciones viables. Se cultivaron células de control (PWM-CMSP) en condiciones experimentales similares pero sin pulsos de 5-AZA-CdR.

Recuperación final de células ADHAPI/PWM-CMSP y células de PWM-CMSP de control

Véanse los resultados en la Tabla I.

Reacción linfocitaria mixta autóloga (RLMa) y RLM

Se recogieron células ADHAPI/PWM-CMSP y células de PWM-CMSP de control (estimuladores = S), se lavaron tres veces con solución salina equilibrada de Hanks suplementada con α -metilmanopiranosido al 0,5%, y se trataron mediante rayos X (30 Gy). Para RLMa y RLM se añadieron concentraciones escalares (de 1 x 10⁶ células/ml a 6 x 10⁴ células/ml) de células ADHAPI/PWM-CMSP o células de PWM-CMSP de control a CMSP autólogas o alogénicas (1 x 10⁶ células/ml) (respondedor = R) en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina, y se sembró en placas con fondo en U de 96 pocillos hasta un volumen final de 200 μ l/pocillo. Después de una incubación de 6 días a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, se recogieron 100 μ l de cultivo sobrenadante de cada pocillo y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta su uso para citocina, se añadieron 100 μ l de medio nuevo a cada pocillo y se pulsaron O/N con ³H-TdR (1 μ Ci/pocillo); a continuación se recogieron y se midió la incorporación de ³H-TdR por células R mediante un contador β .

Perfil fenotípico de células ADHAPI/PWM-CMSP y células de PWM-CMSP de control

Véanse los resultados en la Tabla II.

Análisis RT-PCR de ACT expresados por células ADHAPI/PWM-CMSP y células de PWM-CMSP de control

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	0/4	3/4
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	1/4	3/4
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	3/4
SSX-2	0/4	3/4

^a positivo/probado; NP, no probado.

Proliferación de CMSP autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/PWM-CMSP o células de PWM-CMSP de control (S) en RLMa

Véanse los resultados en la Figura 4.

Evaluación ELISA de IFN- γ liberado por CMSP autólogas (R) estimuladas en RLMa por células ADHAPI/PWM-CMSP o células de PWM-CMSP de control (S)

Véanse los resultados en la Tabla III.

EJEMPLO 5**Células ADHAPI/PHA-CMSP**Purificación de CMSP

Se purificaron CMSP por centrifugado de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque estándar a partir de sangre periférica heparinizada de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos.

Generación de CMSP activadas por PHA

5 Se añadieron CMSP ($1,5 \times 10^6$ células/ml) con PHA-M ($10 \mu\text{g/ml}$) y 100 UI/ml rhlL-2, y se cultivaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% en medio RPMI 1640 suplementado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10% (o en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, $100 \mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina (medio completo).

Generación de células ADHAPI/PHA-CMSP y PHA-CMSP de control

10 Se pulsaron CMSP activadas por PHA cuatro veces con $1 \mu\text{M}$ de 5-aza-2'-desoxicitidina (5-AZA-CdR) cada 12 h; a continuación, se sustituyó la mitad del medio de cultivo por medio completo nuevo sin PHA-M y se dejó que los cultivos continuaran durante 48 h más. A continuación se usaron células para procedimientos experimentales y/o se congelaron en condiciones viables. Se cultivaron células de control (PHA-CMSP) en condiciones experimentales
15 similares pero sin pulsos de 5-AZA-CdR.

Recuperación final de células ADHAPI/PHA-CMSP y PHA-CMSP de control

20 Véanse los resultados en la Tabla I.

Reacción linfocitaria mixta autóloga (RLMa) y RLM

25 Se recogieron células ADHAPI/PHA-CMSP y PHA-CMSP de control (estimuladores = S), se lavaron tres veces con solución salina equilibrada de Hanks suplementada con α -metilmannopiranosido al 0,5%, y se trataron mediante rayos X (50 Gy). Para RLMa y RLM se añadieron concentraciones escalares (de 1×10^6 células/ml a 6×10^4 células/ml) de células ADHAPI/PHA-CMSP o PHA-CMSP de control a CMSP autólogas o alogénicas (1×10^6 células/ml) (respondedor = R) en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, $100 \mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina y se sembró en placas
30 con fondo en U de 96 pocillos hasta un volumen final de $200 \mu\text{l/pocillo}$. Después de una incubación de 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5%, se recogieron $100 \mu\text{l}$ de cultivo sobrenadante de cada pocillo y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta su uso para ensayo de citocinas. A continuación, se añadió $100 \mu\text{l}$ de medio nuevo a cada pocillo y se dejó que los cultivos continuaran durante 5 días más cuando se pulsaron cultivos O/N con $^3\text{H-TdR}$ ($1 \mu\text{Ci/pocillo}$); a continuación, se recogieron las placas y se midió la incorporación de $^3\text{H-TdR}$ por
35 células R mediante un contador β .

Perfil fenotípico de células ADHAPI/PHA-CMSP y PHA-CMSP de control

Véanse los resultados en la Tabla II.

Análisis RT-PCR de ACT expresados por células ADHAPI/PHA-CMSP y PHA-CMSP de control

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/12 ^a	12/12
MAGE-2	0/3	3/3
MAGE-3	0/12	12/12
MAGE-4	0/4	4/4
NY-ESO-1	0/6	6/6
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	0/6	6/6

^a positivo/probado; NP, no probado.

Proliferación de CMSP autólogas (R) estimuladas con células ADHAPI/PHA-CMSP y PHA-CMSP de control en RLMa

45 Véanse los resultados en la Figura 5.

Evaluación ELISA de IFN- γ (liberado por CMSP alogénicas (RLM) y autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/PHA-CMSP o PHA-CMSP(S) de control

50 Véanse los resultados en la Tabla III.

EJEMPLO 6**Células ADHAPI/PHA+PWM-CMSP**Purificación de CMSP

Se purificaron CMSP por centrifugado de gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque estándar a partir de sangre periférica heparinizada o anticoagulada con ACD de pacientes con cáncer en fase avanzada de enfermedad o sujetos sanos.

Generación de PHA+CMSP activadas por PWM

Se añadieron CMSP ($1,5 \times 10^6$ células/ml) con PHA-M ($10 \mu\text{g/ml}$), PWM ($3 \mu\text{g/ml}$), 100 UI/ml de rhIL-2 y se cultivaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5% en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10% (o con suero autólogo inactivado por calor al 10%), 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina (medio completo).

Generación de células ADHAPI/PHA+PWM-CMSP y PHA+PWM-CMSP de control

Se pulsaron PHA+CMSP activadas por PWM cuatro veces con $1 \mu\text{M}$ de 5-aza-2'-desoxicitidina (5-AZA-CdR) cada 12 h; a continuación, se sustituyó la mitad del medio de cultivo por medio completo nuevo sin PHA o PWM y se dejó que los cultivos continuaran durante 48 h más. A continuación se usaron células para procedimientos experimentales y/o se congelaron en condiciones viables. Se cultivaron células de control (PHA+PWM-CMSP) en condiciones experimentales similares pero sin pulsos de 5-AZA-CdR.

Recuperación final de células ADHAPI/PHA+PWM-CMSP y PHA+PWM-CMSP de control

Véanse los resultados en la Tabla I.

Reacción linfocitaria mixta autóloga (RLMa) y RLM

Se recogieron células ADHAPI/PHA+PWM-CMSP y PHA+PWM-CMSP de control (estimuladores = S), se lavaron tres veces con solución salina equilibrada de Hanks suplementada con α -metilmannopiranosido al 0,5%, y se trataron mediante rayos X (50 Gy). Para RLMa y RLM se añadieron concentraciones escalares (de 1×10^6 células/ml a 6×10^4 células/ml) de células ADHAPI/PHA-rhIL2+PWM-CMSP o PHA+PWM-CMSP de control a CMSP autólogas o alogénicas (1×10^6 células/ml) (respondedor = R) en medio Iscove basal suplementado con suero AB humano inactivado por calor al 10%, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina, y se sembró en placas con fondo en U de 96 pocillos hasta un volumen final de 200 μl /pocillo. Después de una incubación de 6 días a 37°C en una atmósfera humidificada de CO_2 al 5%, se recogieron 100 μl de cultivo sobrenadante de cada pocillo y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta su uso para ensayo de citocinas. A continuación, se añadieron 100 μl de medio nuevo a cada pocillo y se pulsaron cultivos O/N con ^3H -TdR (1 μCi /pocillo); a continuación, se recogieron las placas y se midió la incorporación de ^3H -TdR por células R mediante un contador β .

Perfil fenotípico de células ADHAPI/PHA+PWM-CMSP y PHA+PWM-CMSP de control

Véanse los resultados en la Tabla II.

Análisis RT-PCR de ACT expresados por células ADHAPI/PHA+PWM-CMSP y PHA+PWM-CMSP de control

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/7 ^a	7/7
MAGE-2	0/7	7/7
MAGE-3	0/7	7/7
MAGE-4	0/7	7/7
NY-ESO-1	0/7	7/7
GAGE-1-6	0/7	7/7
SSX-2	0/7	7/7

^a positivo/probado.

Proliferación de CMSP autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/PHA+PWM-CMSP o PHA+PWM-CMSP de control en RLMa

5 Véanse los resultados en la Figura 6.

Evaluación ELISA de IFN- γ liberados por CMSP alogénicas (RLM) y autólogas (RLMa) (R) con células ADHAPI/PHA+PWM-CMSP o PHA+PWM-CMSP de control (S).

10 Véanse los resultados en la Tabla III.

Tumorigenicidad *in vivo* de células ADHAPI

15 Xenoinjertos subcutáneos únicos de células ADHAPI viables/PHA-rhIL2-PWM-CMSP (12×10^6) y sus células de control (14×10^6), células ADHAPI/CD40L-B (8×10^6) y sus células de control (8×10^6) o células ADHAPI/PHA-rhIL2 PWM-CMSP (12×10^6) tratadas mediante rayos X (30 Gy) y sus células de control (14×10^6), células ADHAPI/CD40L-B (15×10^6) tratadas mediante rayos X (50 Gy) y sus células de control (18×10^6), no indujeron formación de tumor en los sitios de inyección o distantes (clínicamente explorables), ni afectaron a la salud general y el peso de ratones BALB/c nu/nu 180 días después de la administración de células ADHAPI. Xenoinjertos subcutáneos repetidos de células ADHAPI/B-VEB viables ($5 \times 10^6/1^a$ inyección; $1 \times 10^7/2^a$ inyección y posteriores) y células B-VEB de control ($5 \times 10^6/1^a$ inyección; $1 \times 10^7/2^a$ inyección y posteriores) o células ADHAPI/B-VEB tratadas mediante rayos X (75 Gy) ($5 \times 10^6/1^a$ inyección; $1 \times 10^7/2^a$ inyección y posteriores) y células B-VEB de control tratadas mediante rayos X (75 Gy) ($5 \times 10^6/1^a$ inyección; $1 \times 10^7/2^a$ inyección y posteriores), en los días 0, 33, 63 y 96, no indujeron formación de tumor en los sitios de inyección o distantes (clínicamente explorables), ni afectaron a la salud general y al peso de ratones BALB/c nu/nu 180 días después de la primera administración. La salud general y el peso de animales tratados con células ADHAPI fueron comparables a los animales de control, no tratados o injertados con células B-VEB.

Ventajas de células ADHAPI como vacunas de ACT celulares polivalentes

30 En comparación con las estrategias principales ya usadas o conjeturadas hasta ahora, para la mayoría de la administración eficaz de ACT conocidos a pacientes con cáncer, las células ADHAPI representan un enfoque totalmente nuevo e innovador, y comprenden una serie de ventajas notorias/destacables. Entre ellas están:

35 Células ADHAPI frente a vacunas de ACT celulares no modificadas genéticamente

Las células ADHAPI son vacunas de CPA nuevas y singulares ya que expresan simultáneamente múltiples/todos los ACT regulados por metilación; al sintetizarse endógenamente, los ACT pueden acceder de forma directa y simultánea a rutas de procesamiento de antígenos HLA de clase I y HLA de clase II dentro de células ADHAPI (Jenne L. y col., *Trends Immunol.*, 22:102-107, 2001).

45 Así, debido a la expresión de membrana celular constitutiva de los antígenos HLA de clase I y HLA de clase II, las células ADHAPI pueden presentar simultáneamente epítomos inmunógenos de ACT sintetizados endógenamente para linfocitos autólogos T CD8+ y CD4+; por tanto, las células ADHAPI pueden inducir/amplificar simultáneamente un LTC dirigido por ACT y respuestas inmunitarias humorales. Además, las células ADHAPI pueden expresar y presentarse ante ACT reguladas por metilación de linfocitos T del hospedador que no se han identificado y caracterizado todavía (además de epítomos no inmunodominantes de ACT conocidos y aún por conocer).

50 En oposición a las células ADHAPI, las vacunas CPA autólogas pulsadas con péptido(s) ACT sintéticos, pulsadas con proteínas completas o pulsadas con preparaciones de células tumorales (por ejemplo, células dendríticas, CMSP), así como híbridos de células dendríticas de células tumorales generadas por electrofusión (Kugler A. y col., *Nat. Med.*, 6: 332-336, 2000. Tureci O. y col., *Cancer Res.*, 56: 4766-4772, 1996, ed.), comparten limitaciones importantes, entre ellas: i) el destino desconocido *in vivo* del o los péptidos de ACT sintéticos cargados *ex vivo*, de proteína de ACT sintética completa o de ACT derivados de tumor, lo que puede afectar significativamente a la longevidad de la presentación de los antígenos ante el sistema inmunitario del hospedador; ii) cantidades limitadas de péptido(s) de ACT sintético(s), de proteína de ACT sintética completa o de ACT derivados de tumor que pueden cargarse *ex vivo* en antígenos HLA de clase I y/o HLA de clase II de vacunas celulares, que pueden obstaculizar significativamente la inmunogenicidad de ACT administrados; iii) la restricción por el fenotipo del HLA del paciente, y el número todavía relativamente limitado de antígenos HLA de clase I conocidos e incluso más epítomos de inmunógenos restringidos por antígenos HLA de clase II de ACT identificados hasta ahora; iv) disponibilidad de cantidades adecuadas de tejido de tumor nuevo, que debe ser también suficientemente representativo de los

diversos ACT expresados en lesiones neoplásicas (Jenne L. y col., *Trends Immunol.*, 22:102-107, 2001).

La expresión de ACT sintetizados endógenamente por células ADHAPI es duradera; así, a diferencia de las vacunas de CPA autólogas pulsadas con péptido(s) de ACT sintéticos o pulsadas con proteína completa de ACT sintéticos o pulsadas con preparaciones de células tumorales completas *ex vivo*, las células ADHAPI pueden proporcionar una estimulación prolongada *in vivo* de respuesta inmunitaria en los hospedadores y un número menor de administraciones a pacientes. Esta hipótesis se ve reforzada por la posibilidad prevista de administrar células ADHAPI como vacunas celulares viables no tratadas mediante rayos X debido a su ausencia de tumorigenicidad *in vivo* a largo plazo. Además, una vez que las células ADHAPI han experimentado muerte fisiológica *in vivo*, aún podrían actuar como un "reservorio" de péptidos y proteínas de ACT sintetizados endógenamente, que podrían impulsar de forma adicional y eficaz la presentación de epítomos de ACT restringidos por HLA de clase I a linfocitos T CD8+ por células dendríticas del paciente, a través del mecanismo inmunológico de cebado cruzado, así como la presentación de epítomos de ACT restringidos por HLA de clase II a linfocitos T CD4+, a través de la ruta exógena bien conocida de procesamiento de antígenos.

Las células ADHAPI conservan su función de CPA; de hecho, estimulan eficientemente la proliferación y la liberación de IFN- α de CMSP autólogas y alogénicas; además, las células ADHAPI son, en la mayoría de los casos, estimuladores más potentes en comparación con sus respectivas células de control. A este respecto, es pertinente que además de ACT, las células ADHAPI puedan expresar simultáneamente niveles superiores de antígenos HLA de clase I y/o de diferentes moléculas accesorias coestimuladoras en comparación con sus células de control respectivas. Estas evidencias representan claramente una gran ventaja de las células ADHAPI como vacunas celulares autólogas, en comparación con células tumorales autólogas que son inmunógenos peores, y no expresan constitutivamente varias moléculas coestimuladoras/accesorias. Además, en comparación con células dendríticas autólogas expandidas y generadas *ex vivo*, las vacunas de células ADHAPI son generadas por CPA inmunocompetentes y totalmente maduras; este aspecto supera la limitación potencial representada por la fase de maduración de células dendríticas usadas para la generación de vacunas celulares, que puede influir en su potencial tolerógeno más que inmunógeno.

En comparación con otras vacunas celulares, la generación *ex vivo* de vacunas de células ADHAPI, que expresan simultáneamente múltiples/todos los ACT regulados por metilación, es simple, en la mayoría de los casos rápida, no requiere voluminosas manipulaciones celulares *in vitro*, no implica manipulaciones genéticas, no requiere tejido tumoral autólogo y es altamente reproducible a partir de CMSP de individuos sanos y de pacientes con cáncer.

Además, cerca del 100% de las preparaciones de células ADHAPI expresan todos los ACT investigados que son inducibles por desmetilación en CPA. Debido a estas características, la generación de vacunas de células ADHAPI es más fácil de estandarizar y de controlar en cuanto a calidad (por ejemplo por citometría de flujo para moléculas de superficies celulares seleccionadas y RT-PCR para ACT seleccionados) y potencia (por ejemplo por RT-PCR cuantitativa para ACT seleccionados). Además, en comparación con otras vacunas celulares que hasta la fecha deben prepararse de nuevo cada vez que es preciso administrarlas a pacientes, generando así una evidente variabilidad entre preparaciones (por ejemplo, viabilidad celular, perfil fenotípico de células de vacunación, cantidad de péptido(s) de ACT sintético(s) cargado(s) o proteína completa de ACT sintéticos o de preparaciones de células tumorales completas, eficacia de la generación de híbridos de células tumorales-células dendríticas por electrofusión), las vacunas de células ADHAPI, una vez preparadas y verificada su viabilidad, calidad y potencia, pueden distribuirse en partes alícuotas, congelarse apropiadamente y almacenarse en condiciones viables hasta su uso para fines terapéuticos. Además, como no requieren la disponibilidad de tejido tumoral autólogo para pulsar vacunas celulares autólogas o para generar híbridos de células tumorales-células dendríticas *ex vivo*, y como pueden prepararse rápidamente en gran número a partir de leucaféresis repetidas, las vacunas de células ADHAPI representan una fuente prácticamente ilimitada de agente terapéutico para cada paciente.

A la luz de su expresión simultánea de múltiples/todos los ACT regulados por metilación que se sintetizan endógenamente, y que pueden acceder directa y simultáneamente a la ruta de procesamiento de antígenos HLA de clase I y HLA de clase II, debido a su posibilidad de expresar y presentar ACT regulados por metilación por linfocitos T del hospedador que no han sido todavía identificados y caracterizados (así como epítomos no inmunodominantes de ACT conocidos y todavía desconocidos), y debido al número todavía limitado de epítomos inmunógenos restringidos por antígenos HLA de clase I y antígenos HLA de clase II conocidos de ACT identificados hasta ahora que pueden usarse así para aplicaciones terapéuticas según el fenotipo HLA del paciente, una ventaja adicional de las células ADHAPI es que son aptas muy probablemente para presentar simultáneamente epítomos inmunógenos conocidos y todavía desconocidos de diferentes ACT en el contexto de cualquiera y de múltiples aloespecificidades HLA de clase I y HLA de clase II. Así, en comparación con vacunas celulares pulsadas con péptido(s) de ACT sintéticos o pulsadas con proteína completa de ACT sintéticos, el tratamiento con vacunas de células ADHAPI no se limita a pacientes con fenotipos HLA definidos; por ello, todos los pacientes con cáncer cuyas lesiones neoplásicas

expresan uno o más ACT pueden ser candidatos al tratamiento con vacunas de células ADHAPI, con independencia de su fenotipo HLA. A este respecto, entre los ACT conocidos hasta ahora, uno o más de ellos se expresan generalmente en la mayoría de las malignidades investigadas de diferente histotipo; por tanto, la vacunación con células ADHAPI es adecuada en la gran mayoría de pacientes con cáncer. Una información significativa es que

MAGE, GAGE o NY-ESO-1 se expresan en el 96% de los tumores humanos (*Cancer Immunol. Immunother.* 50:3-15, 2001).

En comparación con vacunas celulares pulsadas con péptido(s) de ACT sintéticos y pulsadas con proteína completa de ACT sintéticos, en las que pueden cargarse cantidades limitadas de proteína(s) *ex vivo* en antígenos HLA de clase I y/o HLA de clase II de vacunas celulares, que obstaculizan significativamente la inmunogenicidad de ACT administrados, y debido a su expresión simultánea de múltiples/todos los ACT regulados por metilación, las vacunas de células ADHAPI pueden superar la inmunoselección de variantes tumorales negativas para ACT que tienen lugar en el curso del tratamiento contra un único o algunos ACT, y superan la expresión constitutivamente heterogénea y a veces regulada por disminución de distintos ACT que aparecen en lesiones neoplásicas específicas.

Las vacunas de células ADHAPI están constituidas por CPA funcionales autólogos que expresan simultáneamente múltiples/todos los ACT regulados por metilación conocidos, y que muy probablemente expresan ACT todavía no identificados cuya expresión está regulada por metilación de ADN; además, las vacunas de células ADHAPI pueden usarse en pacientes afectados por tumores positivos para ACT de diferente histotipo. Estas características funcionales y fenotípicas representan una clara ventaja con respecto a las vacunas de células tumorales alogénicas usadas en la actualidad (por ejemplo, lisados de líneas celulares neoplásicas de reserva completas o sus extractos no purificados, antígenos circulantes de líneas celulares neoplásicas de reserva). De hecho, estas vacunas de células tumorales pueden no contener o pueden contener cantidades insuficientes de ACT relevantes inmunológicamente conocidos y todavía desconocidos, contener componentes celulares irrelevantes que pueden competir con ACT por las respuestas inmunológicas, pueden tener una toxicidad aumentada que es alogénica, requerir procesamiento eficaz por el sistema inmunitario de los pacientes, y pueden usarse exclusivamente en pacientes afectados por malignidades del mismo tipo histológico.

Vacunas de células ADHAPI frente a vacunas de ACT celulares modificadas genéticamente

La generación de células ADHAPI no implica las manipulaciones genéticas *ex vivo* de células dendríticas autólogas o de otras CPA autólogas, que se requieren para producir vacunas celulares modificadas genéticamente que expresan ACT seleccionados después de transfección o transducción. Además, en comparación con células ADHAPI, una serie de limitaciones afecta a las vacunas celulares modificadas genéticamente; entre estas están: i) la baja eficacia relativa de metodologías de transfección disponibles; ii) la inducción de respuestas inmunitarias celulares contra antígenos de los vectores víricos usados para transducción celular, que conduce a la destrucción de células de vacunación modificadas genéticamente; iii) la presencia de anticuerpos de neutralización inducidos por vacunación o preexistentes que interfieren con la administración o administraciones de vacunas; iv) efectos directos de vectores víricos en la viabilidad, maduración y capacidad de presentación de antígenos de células transducidas (Jenne L. y col., *Trends Immunol.*, 22:102-107, 2001).

Tabla I
Recuperación de células ADHAPI y células de control

Tipo de célula	Células ADHAPI	Células de control
B-VEB ^a	114 ± 25	175 ± 51
PWM-B ^b	16 ± 5	38 ± 17
CD40L-B ^c	75 ± 27	96 ± 5
PWM-CMSP ^d	26 ± 11	45 ± 16
PHA-CMSP ^e	23 ± 10	63 ± 25
PHA+PWM-CMSP ^f	35 ± 28	63 ± 36

^a Los datos representan la media en % ± DE de células recuperadas en comparación con el número de células (100%) usadas para su generación en 3 (a), 4 (b), 4 (c), 4 (d), 7 (e) y 5 (f) experimentos independientes.

Tabla II
Perfil fenotípico de células ADHAPI comparado con células de control autólogas*

Antígeno	Células ADHAPI					
	CD40L-B ^{a†}	B-VEB ^b	Pwm-CMSP ^c	PWM-B ^d	PHA-CMSP ^e	PHA+ PWM-CMSP ^f
HLA Clase I	ns ^f	ns	ns	ns	ns	0,02 ^g
HLA-A Locus	ns	ns	nt ^h	np	0,004	np
HLA-B Locus	ns	ns	np	np	0,05	np
HLA-A Alelos	0,01	ns	ns	ns	0,008	0,006
HLA-B Alelos	ns	ns	np	np	ns	np
CD40	ns	0,01	ns	0,005	ns	ns
CD54	0,03	0,01	ns	ns	0,003	ns
HLA Clase II	ns	ns	ns	0,03	ns	0,05
CD56	np	np	np	ns	np	np
CD58	ns	ns	np	np	ns	ns
CD59	np	np	ns	ns	np	0,04
CD80	0,05	ns	ns	ns	ns	ns
CD81	np	0,002	np	np	ns	np
CD86	0,008	np	ns	ns	np	ns

*Los datos se obtuvieron comparando mediante prueba t de Student emparejada los valores medios de intensidad de fluorescencia media obtenida por citometría de flujo en 6 (a), 6 (b), 4 (c), 4 (d), 6 (e) y 2 (f) experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas fueron representativas invariablemente de una expresión regulada por incremento del antígeno investigado en células ADHAPI comparado con células de control autólogas.

^f no significativo;

^g valor p;

^h no probado;

†Células ADHAPI/CD40L-B = 82–100% CD20+; células de CD40L-B de control = 87–99% CD20+.

Tabla III

Evaluación mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de IFN- γ liberado por CMSP autólogas (R) (RLMa) y alogénicas (RLM) (R) estimuladas por células ADHAPI (S) o por células de control (S).*

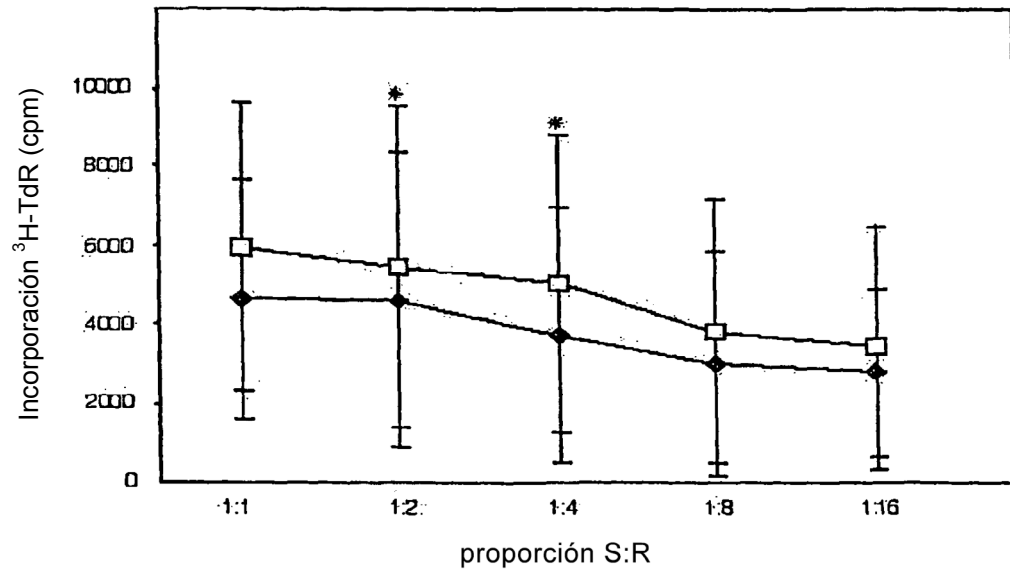
Tipo de célula	RLMa		RLM	
	Células de control	Células ADHAPI	Células de control	Células ADHAPI
B-VEB ^a	1770 \pm 919	2360 \pm 85 0,5 ^g	nt ^h	np
PWM-B ^b	4330 \pm 629	5530 \pm 804 0,06	4040 \pm 721	4950 \pm 476 0,08
CD40L-B ^c	330 \pm 197	429 \pm 153 0,1	np	np
PWM-CMSP ^d	1500 \pm 135	1520 \pm 175 0,6	np	np
PHA-CMSP ^e	140 \pm 70	956 \pm 436 0,1	267 \pm 119	1040 \pm 545 0,07
PHA+PWM+CMSP ^f	790 \pm 236	831 \pm 244 0,09	819 \pm 184	830 \pm 169 0,7

*Los datos representan los valores medios \pm DE de IFN- γ (pg/ml) liberado en dos (a), cuatro (b), cuatro (c), cuatro (d), tres (e) y cuatro (f) experimentos independientes. Las proporciones S/R fueron: 3:1 (a), 1:1 (b), 1:2 (e), 1:1 (d), 1:1 (e), 1:2 (f). La liberación de IFN- γ se sometió a ensayo 24 h (a), seis días (b), 24 h (c), seis días (d), 24 h (e) y 6 días (f) después del inicio del cultivo; ^g valor p frente a células de control obtenidas por prueba t de Student emparejada; ^h no probado.

REIVINDICACIONES

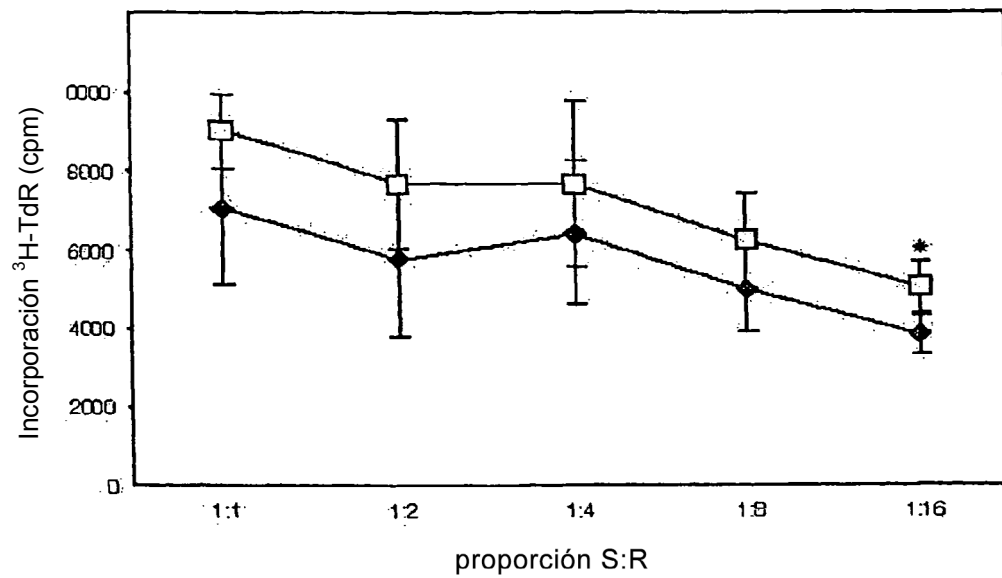
1. Un método para la generación de células presentadoras de Antígeno de Cáncer de Testículo (ACT) que comprende:
5 a) activación de células CMSP aisladas a partir de un sujeto humano;
b) cultivo de dichas células activadas;
caracterizado porque
c) dichas células cultivadas son tratadas con 5-aza-2'-desoxicitidina 1 μ M cuatro veces cada 12 horas; sustituyendo a continuación la mitad del medio de cultivo por medio nuevo y permitiendo que continúe durante 48 horas más de
10 manera que dichas células expresen simultáneamente múltiples Antígenos de Cáncer de Testículo (ACT).
2. Un método según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un paciente con cáncer.
3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dichas células son líneas
15 celulares linfoblastoides B inmortalizadas con virus de Epstein-Barr.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dichas células son linfocitos B activados por mitógenos de hierba carmín (PWM).
- 20 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dichas células son linfocitos B activados por CD40.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dichas células son CMSP
25 activadas por fitohemaglutinina (PHA) + interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2).
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dichas células son CMSP activadas por fitohemaglutinina (PHA) + interleucina-2 recombinante humana (rhIL-2) + mitógeno de hierba carmín (PWM).

Figura 1. Proliferación de CMSP autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/B-VEB (□) o células B-VEB de control (♦) (S)^a



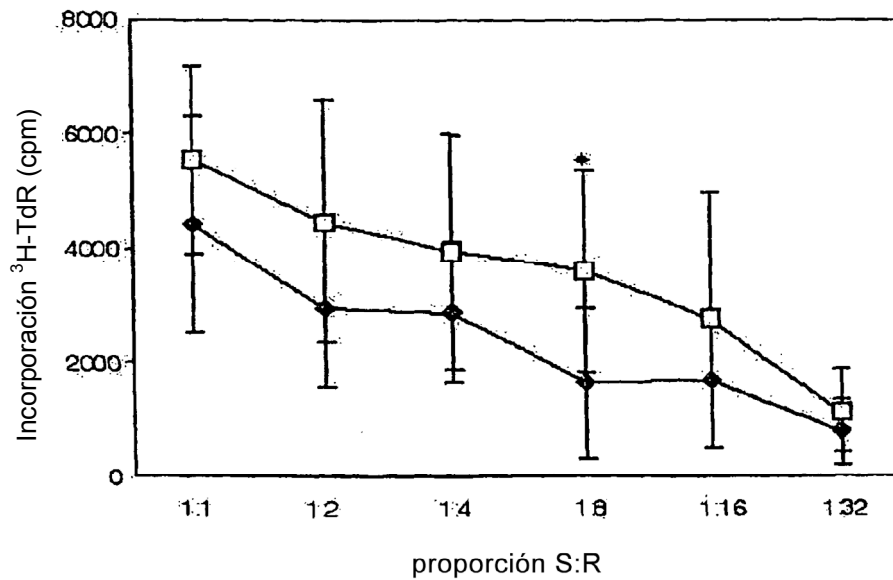
^aLos datos representan los valores medios (cpm) \pm DE de incorporación de [3H]-TdR obtenidos en cuatro experimentos independientes.

Figura 2. Proliferación de CMSP autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/PWM-B (\square) o células PWM-B de control (\blacklozenge) (S)^a



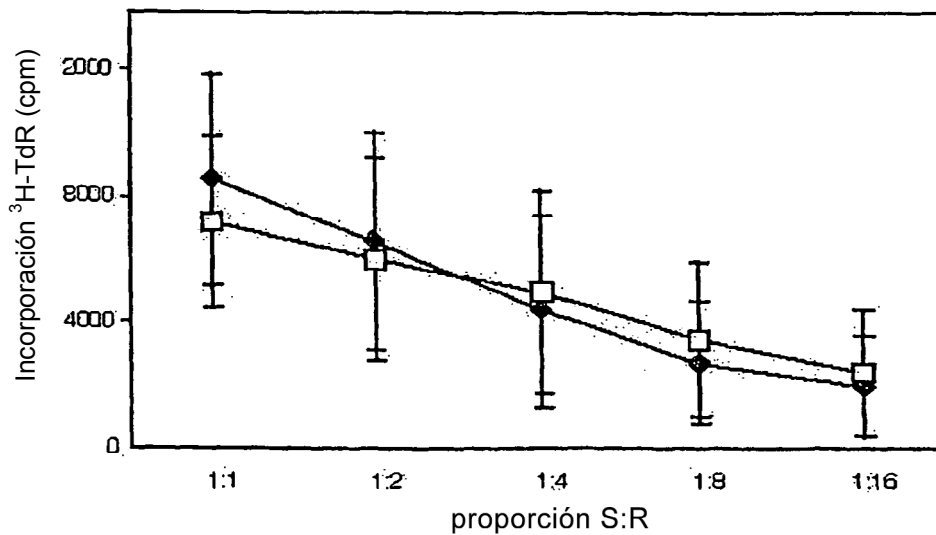
^aLos datos representan los valores medios (cpm) \pm DE de incorporación de [3H]-TdR obtenidos en cuatro experimentos independientes.

Figura 3. Proliferación de CMSP autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/CD40L-B (□) o células CD40L-B de control (♦) (S)^a



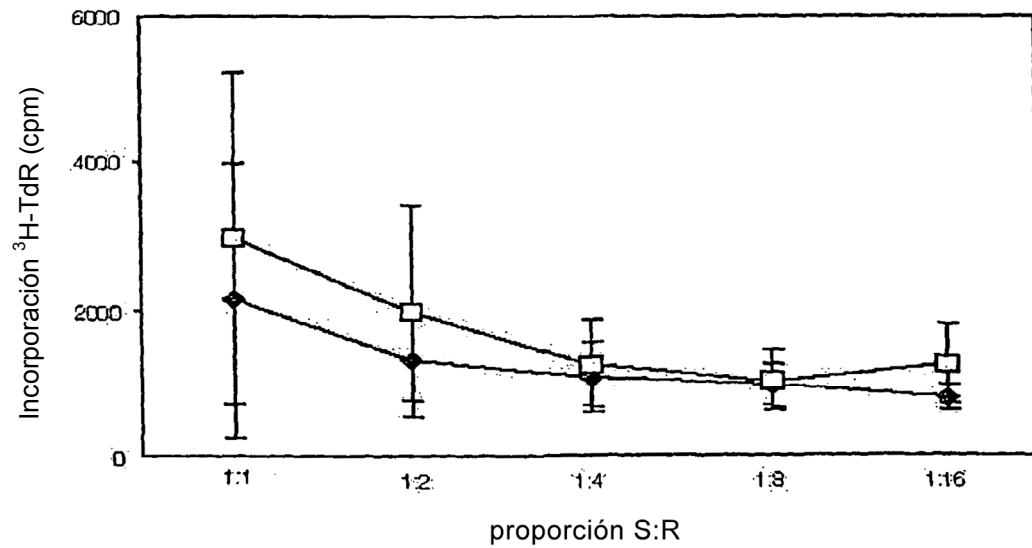
^aLos datos representan los valores medios (cpm) \pm DE de incorporación de [3H]-TdR obtenidos en ocho experimentos independientes.

Figura 4. Proliferación de CMSP alogénicas (RLM) y autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/B-PWM-CMSP (\square) o células PWM-CMSP de control (\blacklozenge) (S)^a



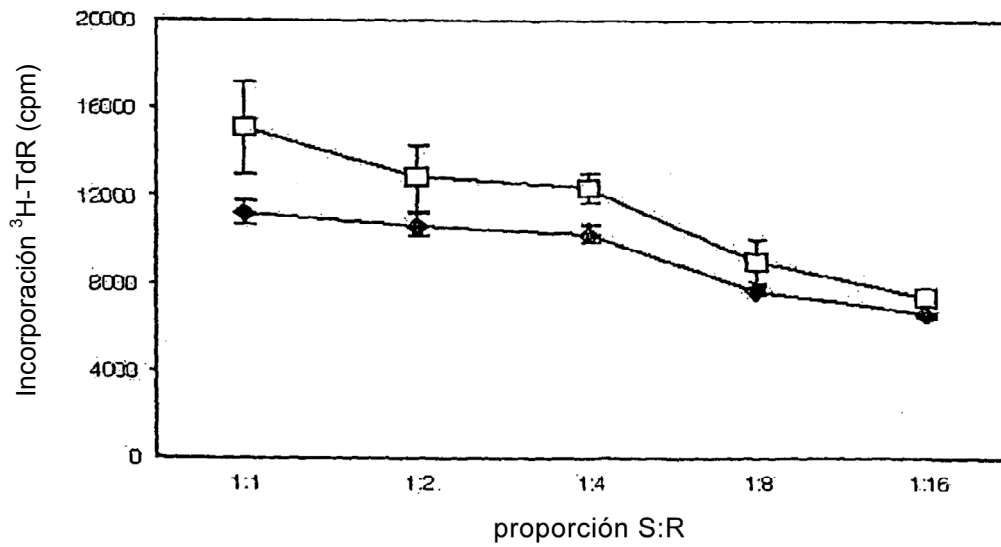
^aLos datos representan los valores medios (cpm) \pm DE de incorporación de [3H]-TdR obtenidos en cuatro experimentos independientes.

Figura 5. Proliferación de CMSP autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/PHA-CMSP (□) o PHA-CMSP de control (♦)



^aLos datos representan los valores medios (cpm) \pm DE de incorporación de $[^3\text{H}]$ -TdR obtenidos en cinco experimentos independientes.

Figura 6. Proliferación de CMSP autólogas (RLMa) (R) estimuladas con células ADHAPI/PHA+PWM-CMSP (\square) o PHA+PWM-CMSP de control (\blacklozenge) (S)^a



^aLos datos representan los valores medios (cpm) \pm DE de incorporación de $[^3\text{H}]$ -TdR obtenidos en cinco experimentos independientes.