



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 355**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/08** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02022787 .2**  
86 Fecha de presentación : **11.10.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1408106**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2004**

54 Título: **Inmunoterapia de cáncer.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2007**

73 Titular/es: **Sentoclone AB.**  
**Sophiahemmet**  
**114 86 Stockholm, SE**

72 Inventor/es: **Winqvist, Ola y**  
**Thörn, Magnus**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 282 355 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Inmunoterapia de cáncer.

5 La presente invención se relaciona con un método novedoso y mejorado de inmunoterapia de cáncer. Específicamente, la presente invención se relaciona con un método para suministrar linfocitos obtenidos de ganglios linfáticos centinela de un paciente de cáncer y expandiéndolas *in vitro*.

10 El cáncer, un término frecuentemente utilizado para indicar cualquiera de varios tipos de neoplasmas malignos, es una de las causas principales de muerte en humanos. Actualmente, el cáncer cuenta con aproximadamente el 23% de todas las muertes en el mundo, con sólo las enfermedades cardiovasculares reclamando más vidas. Durante el tiempo de vida de un cáncer individual puede desarrollarse en cualquier tejido de cualquier órgano y a cualquier edad con las células transformadas que invaden los tejidos circundantes o metastasizándose a varios sitios en el cuerpo. Actualmente existe evidencia creciente que además de los factores endógenos también ciertas actividades y condiciones ambientales, tales como el fumar, la exposición a compuestos específicos contenidos en los alimentos o liberados por los procesos industriales cuentan en el desarrollo y la mejora del riesgo de ciertos tipos de cánceres y tumores.

15 Una vez que se ha diagnosticado el cáncer, las decisiones de tratamiento se vuelven preponderantes. En el pasado, tanto las terapias locales como regionales habían sido aplicadas, específicamente cirugía y/o radiación, que son usualmente combinadas con la terapia sistémica, es decir, la administración de drogas anti-neoplásicas.

20 La Cirugía es la forma más vieja de terapia de cáncer, pero sufre de varios inconvenientes. Sólo será exitosa, si el tumor es detectado en una etapa de desarrollo temprano, en la cual las células del tumor primario no han comenzado a diseminarse todavía, y el éxito del tratamiento varía grandemente entre los sitios con cáncer. La radiación se utiliza además de la cirugía o sólo en casos, donde el tumor primario es difícil de acceder por medios quirúrgicos, tal como en linfomas de no Hodgkin nodulares y difusos, carcinoma de célula escamoso de la cabeza y cuello, tumores de célula germinal mediastinal, cáncer de próstata, o cáncer de mama en etapa temprana.

25 Junto con cualquiera de estas anteriores dos drogas anti-neoplásicas para régimen de tratamiento se administran a un paciente con cáncer, las cuales evitan la división celular o el esparcimiento de las células neoplásicas (tratamiento quimioterapéutico). Aunque estos agentes son tóxicos para esencialmente todas las células proliferantes rápidas, en la configuración adyuvante, la quimioterapia puede llevar aproximadamente una mortalidad reductora mejorada limitada, por ejemplo, en un cáncer de colon del 51% al 40% después de más de cinco años de seguimiento.

30 Recientemente, dos regímenes de tratamiento adicionales se han desarrollado, la terapia fotodinámica y la inmunoterapia tumoral.

35 En la terapia fotodinámica, los compuestos fotosensibilizantes y los láseres se utilizan para producir necrosis tumoral. Los compuestos fotosensibilizantes localizadores del tumor son sistémicamente administrados a un paciente y subsecuentemente activados por un láser. Luego de absorber la luz de longitud de onda apropiada el sensibilizador se convierte a un estado excitado, siendo la citotoxicidad mediada por la interacción entre el sensibilizador y el oxígeno molecular dentro del tejido tratado para generar oxígeno citotóxico simple.

40 La inmunoterapia tumoral de otra parte trata de tomar beneficio de la tarea inherente que cumple el sistema inmune en el individuo como un instrumento para preservar la integridad física del cuerpo.

45 En principio, el sistema inmune del mamífero tiene dos mecanismos generales para proteger el cuerpo, la respuesta inmune no específica o innata y la respuesta específica o inmune adquirida. En contraste a la respuesta innata, que combate no específicamente cualquier material invasor extraño, la respuesta específica se adecua a una sustancia particular (antígeno), que es efectuada mediante selección de clonación. La inmunidad adquirida es mediada por células especializadas, las células B, que producen anticuerpos como moléculas efectadoras (que implementan la respuesta inmune humoral), y las células T que median su efectividad a través de células como tales (inmunidad mediada por células).

50 Las células del sistema inmune específico generalmente combaten y destruyen cada entidad que ha sido reconocida por no pertenecer al cuerpo, es decir, como extrañas o de "no sí mismo", mientras que al mismo tiempo desisten de cualquier ataque a sustancias/antígenos que son conocidas por determinar "a sí mismo". Así, cualquier entidad biológica exógena y no biológica que entre/invaide el cuerpo del individuo, es atacada, pero también cualquier materia endógena, que el sistema inmune nunca ha aprendido que representa "a sí mismo" y la reconoce como extraña.

55 En un individuo el sistema inmune usualmente suministra una vigilancia inmunológica y evita el desarrollo de cáncer. La inmunidad al cáncer es mediada principalmente por las células T y las células NK, en donde las células tumorales transformadas se destruyen después de ser reconocidas como material extraño (asociado a tumor), es decir, antígenos que no son conocidos pertenecen "a sí mismos" (células T) o a las que les falta la expresión del MHC clase I (células NK).

60 La medicina ensayó explotar estos mecanismos en el tratamiento de cáncer y hasta ahora, se ha aplicado dos métodos generales en la inmunoterapia de tumor. De acuerdo a un primer método la respuesta inmune innata se

estimula al administrar sustancias a pacientes con tumor, tales como la interleucina-2, el factor de necrosis tumoral o el interferón. Sin embargo, esta aproximación no prueba ser muy exitosa, aunque muestra efectos colaterales fuertes debido a la alta toxicidad que las sustancias administradas muestran a concentraciones efectivas.

5 Otro enfoque ha sido sobre el sistema inmune específico, tomando ventaja de la capacidad endógena del sistema inmune a distinguir entre “si mismo” y “no si mismo”. Generalmente el sistema inmune ataca las células transformadas, en razón a que ellas exhiben antígenos reconocidos por ser extraños o de “no si mismos”. Sin embargo, en algunos casos las células tumorales pueden escapar al sistema inmune *in vivo*, parcialmente porque el antígeno asociado a tumor no es capaz de elicitar una respuesta inmune, o no es capaz de efectuar una estimulación suficiente de las células T, o por la razón de que las células tumorales produzcan factores que sub-regulen la respuesta inmune *in vivo*.

15 Con el fin de ayudar al sistema inmune a desarrollar sus células mononucleares de tarea endógena de un paciente con cáncer han sido aisladas de la sangre periférica y transferidas a un cultivo, donde ellas han sido estimuladas y expandidas. Después de la expresión ellas fueron retro-infundidas al paciente, sin embargo, dando tasas de respuesta exitosas de solamente hasta el 35%. Uno de los inconvenientes reside en que la sangre periférica contiene sólo pequeños números de linfocitos con actividad funcional contra antígenos tumorales.

20 Con el fin de solucionar esta deficiencia una variación de tal procedimiento se ha propuesto, que incluye aislar y expandir las población de linfocitos que han infiltrado los tumores *in vivo*, los así llamados linfocitos infiltrantes de tumor. Aún, este proceso sufre la desventaja de requerir un tipo específico de linfocitos, que están presentes solamente en una etapa tardía del desarrollo del tumor y en números bajos. Adicionalmente, los linfocitos que infiltran el tumor son sometidos a sustancias inmunosupresoras provenientes del tumor y finalmente el aislamiento de tales linfocitos no es siempre una tarea fácil de lograr.

25 Lind, D.S. *et al.* Describe en Surgical Oncology 3 (1993), p. 273-282 experimentos que se relacionan con la expansión y la secreción de citoquina de linfocitos activados con briostatina de los ganglios linfáticos axilares criopreservados de pacientes con cáncer. Un cocktail de briostatina junto con ionomicina se utiliza y exhibe propiedades anti-neoplásicas y mostró ser capaz de sustituirse por el antígeno tumoral. Los linfocitos tratados de tal manera no son citotóxicos *in vitro*.

30 C.S. Chin y H.D. Bear describen un método para identificar ganglios linfáticos que drenan vacuna (Annals of Surgical Oncology 9 (2002), p. 94-103). Las células tumorales se inyectaron en ratones en dos sitios, la almohadilla y el flanco, y se recolectaron ganglios linfáticos axilares, inguinales o popliteales.

35 Por lo tanto, un problema de la presente invención reside en solucionar las anteriores desventajas de la técnica anterior y suministrar un método novedoso y mejorado para inmunoterapia.

40 Este problema se ha resuelto mediante un método para tratar y/o prevenir la recurrencia de cáncer que comprende las etapas de suministrar los linfocitos obtenidos de los ganglios linfáticos centinela y activar y expandir los linfocitos así obtenidos *in vitro*.

En las figuras,

45 La Fig. 1 muestra los resultados de una identificación preoperatoria de él o los ganglios centinela.

La Fig. 2 muestra los resultados obtenidos de una caracterización de los linfocitos.

50 La Fig. 3 muestra los resultados de una activación no específica y de los análisis FACS intracelulares para la metástasis; y

La Fig. 4 muestra un esquema hipotético de cómo el material antigénico del tumor es transportado por los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos drenantes, identificados por un tinte trazador, donde ocurre la representación de los péptidos antigénicos y la activación de las células T.

55 Se tiñeron con anticuerpos contra CD4 y el marcador de activación CD69 y analizado utilizando citometría de flujo (paneles medios), el porcentaje de las células cooperadoras CD4 T activadas positivas dobles se indican en la esquina derecha superior. Las células del tumor, (CC), los ganglios centinela (SN), y los ganglios linfáticos (LN) se incubaron con una dilución de 10 o 100 veces el extracto de cáncer de colon autólogo en un estudio en curso de 5-7 veces al día. Las células se pulsaron 16h antes de cosecharlas con 1  $\mu$ Ci 3H-Timidina. Proliferación pico ocurrida en el día 5 (paneles derechos).

60 La Fig. 3 muestra los resultados de una activación no específica y de un análisis FACS intracelular para la metástasis y la respuesta proliferativa contra la estimulación de Concanavalina A (A) y los análisis FACS intracelulares utilizando el anticuerpo citoqueratina-20 (B). Las células de la sangre periférica (PBL), el tumor (CC), los ganglios centinela (SN) y los ganglios linfáticos (LN) se investigaron en un ensayo de proliferación en cueros de tiempo estimulando con 10  $\mu$ g/mL de Concanavalina A (A). Las células del tumor (CC), los ganglios centinela (SN) y los ganglios linfáticos (LN) se permeabilizaron con saponina seguida por la incubación con un anticuerpo anti citoqueratina-20 y la detección con un anticuerpo conjugado IgG FITC anti ratón (B). La línea punteada representa muestras de control incubadas

## ES 2 282 355 T3

con anticuerpo secundario solamente y en la gráfica sobrepuesta tanto los anticuerpos primarios como secundarios se incluyeron en las incubaciones. Los números indican el porcentaje de células tumorales positivas a citoqueratina-20.

La Fig. 4 muestra un esquema hipotético de cómo el material antigénico proveniente del tumor es transportado por los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos drenantes, identificados por un tinte trazador, donde ocurre la presentación de los péptidos antigénicos y la activación de las células T. El esquema hipotético Dukes B (A). En el tumor hay un cambio rápido de células, la falta de oxígeno y nutrientes que originan un ambiente hostil atrae los macrófagos y las células dendríticas. Los desechos de las células tumorales son fagocitados por estas células que presentan antígeno profesional (APC) y transportadas por los vasos linfáticos a los ganglios centinela drenantes, que se pueden detectar peroperativamente por inyección peritumoral del azul Patent. En el ganglio centinela los péptidos de carga APC, procesados en la senda endosomal/lisosomal y derivados de los antígenos tumorales, principalmente en el bolsillo HLA clase II. El complejo de péptido tumoral clase II es transportado a la superficie al APC y es reconocido por las células cooperadoras CD4 + T que suministran una primer señal de activación. La segunda señal de activación se suministra por las moléculas coestimuladoras tales como la B7.1, B7.2 e ICAM-1 que son expresadas a niveles altos sobre el APC. Así la célula cooperadora CD4 + T se vuelve una célula efectuada activada y deja el ganglio linfático para regresar al torrente sanguíneo por vía del conducto torácico. La célula cooperadora CD4 + T activada deja el torrente sanguíneo en áreas de inflamación y de nueva formación de vasos tales como en un tumor o metástasis. La célula se vuelve ahora un linfocito infiltrante de tumor (TIL). Sin embargo, debido al ambiente hostil local en el tumor y posiblemente por las citoquinas inmunosupresoras liberadas del tumor las células TIL frecuentemente se vuelven inmunosuprimidas y sin respuesta (anérgicas).

Dukes C (B): En la presencia de células metastásicas en un ganglio Centinela encontramos que los linfocitos son incapaces de proliferar contra el extracto tumoral ni contra un activador no específico tal como la Concanavalina A. Los APC con desechos tumorales fagocitados están probablemente presentes y las células parecen ser activadas. Una explicación es que las células metastásicas producen factores inmunosupresores. Otra explicación es que Dukes C (presencia de metástasis del ganglio linfático) sólo ocurre en pacientes con una falla inmune para reconocer el tumor como extraño. Así una situación similar como se ve en las diferentes cepas de ratones expuestos a Leishmaniasis donde algunas cepas limpian la infección mientras otras sucumben debido a diferencias de antecedentes genéticos.

Durante los estudios extensivos que conducen a la presente invención los inventores analizaron el perfil inmune de los pacientes que sufren de cáncer colorectal y sorprendentemente encontraron que aunque los linfocitos aislados de la sangre periférica o genéricamente el sistema linfático de los pacientes no respondieron al tumor, los ganglios linfáticos centinela de dichos pacientes poseen linfocitos que muestran actividad contra células tumorales. Con base en este hallazgo la invención se cumplió, y se suministra una herramienta útil en la inmunoterapia celular.

Cuando se lleva a cabo el método como se describe aquí, primero los ganglios centinela han sido localizados. Los ganglios linfáticos centinela son genéricamente definidos como los primeros, ganglios linfáticos en el sistema linfático que reciben el drenaje linfático proveniente del área de tumor primario. Esto se puede convenientemente lograr durante la cirugía de él o los tumores primarios, por ejemplo, al introducir una sustancia trazadora alrededor o en la circunferencia del sitio del tumor, preferiblemente antes de la remoción quirúrgica del tumor primario. El trazador es transportado en los capilares linfáticos y se acumula por vía de fagocitosis por los macrófagos en los ganglios linfáticos localizados corriente abajo. Usualmente, los ganglios linfáticos centinela se pueden determinar visualmente algunos minutos después de aplicar la sustancia trazadora al revisar los ganglios linfáticos coloreados primero, o más intensos.

Como una sustancia trazadora por ejemplo, el tinte azul patent, el azul linfazurina o la albúmina marcada 99 Tc se pueden utilizar.

Una vez que los ganglios linfáticos centinela han sido identificados, ellos son aislados por medios quirúrgicos y se puede evaluar el estado histológico de éstos en cortes representativos de los ganglios.

En la siguiente etapa los linfocitos presentes en el resto de material de los ganglios centinela se recolectan y se transfieren a un cultivo *in vitro*. Éste puede, por ejemplo, ser logrado al presionar los ganglios linfáticos de tal forma que ellos liberen su contenido con o sin la presencia de colagenasa.

Las células así obtenidas son subsecuentemente sometidas a un cultivo *in vitro*.

En caso de remover las células no deseadas del cultivo y/o seleccionar para una sub-población específica de células T, por ejemplo, CD4, CD8, CD69, CD62L se pueden aplicar técnicas de selección positiva o negativa, tales como anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie únicos para las células seleccionadas. Un ejemplo para tales técnicas es la inmuno-adherencia magnética en donde los anticuerpos monoclonales dirigidos a los marcadores de superficie celular presentes sobre las células a ser seleccionadas se unen a un vehículo. La selección de las células también se puede lograr mediante célula ayudada por citometría de flujo seleccionada bajo condiciones estériles.

Las células pueden ser cultivadas bajo condiciones convencionales en cualquier medio adecuado para hacer crecer las células de linfocitos que incluyen un Medio Esencial Mínimo o Medio RPMI 1640. Con el fin de promover el crecimiento de las células, los factores necesarios para la proliferación y la viabilidad de éstos se pueden agre-

## ES 2 282 355 T3

gar, incluyendo suero, por ejemplo, suero de becerro fetal o suero humano y antibióticos, por ejemplo, penicilina estreptomicina. Los linfocitos se mantienen bajo condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada de alrededor de 37°C y una atmósfera, por ejemplo, aire mas 5% de CO<sub>2</sub> presentada a la célula T por medio de una célula que presenta antígeno, tal como una célula B, macrófago, monocito, célula dendrítica, célula de Langerhans en conjunto con una molécula MHC. Para este fin, las células tumorales, un extracto de tumor autólogo y/o un antígeno tumoral recombinante se agrega al cultivo de linfocitos y se incuban durante un tiempo suficiente para cebamiento adicional. Similarmente, una célula infectada con un patógeno, pro ejemplo, un virus, que presenta antígenos del patógeno se puede incubar con los linfocitos. Luego de la activación específica del antígeno de la población de células T, las células se pueden expandir adicionalmente de acuerdo con los métodos descritos aquí.

10 En vista de la seguridad del paciente se prefiere el uso de un extracto de tumor autólogo, en razón a que la etapa de remoción de las células tumorales y/o las células recombinantes se puede omitir.

Se ha encontrado adicionalmente que cuando las células tumorales están presentes en los ganglios linfáticos centinela los linfocito obtenidos de éstos exhiben una actividad y/o especificidad más baja contra las células tumorales comparadas con los linfocitos obtenidos de los ganglios linfáticos centinela libres de célula de tumor. Sin querer estar ligado por ninguna teoría se cree actualmente que este hallazgo es probablemente debido a la capacidad del tumor de inmuno-supresión, es decir, un estado funcional de anergia debido a la presencia de células tumorales.

Cuando el cultivo de linfocito se ha expandido y estimulado a una proporción deseada, los linfocitos son recolectados, opcionalmente purgados de cualquier material, de detrimento para la salud del paciente y transferidos de regreso al paciente. Esto se puede lograr mediante infusión intravenosa, durante un período de desde aproximadamente 1 a 5 horas, con el número de células mononucleares administrado siendo dependiente solamente del número de células generado durante la etapa de proliferación.

El método de la presente invención suministra claras ventajas sobre el de la técnica anterior. En razón a que los linfocitos se recolectan de ganglios linfáticos centinela, específicamente aquellos linfocitos que son expandidos ya que tienen una actividad y especificidad dirigidas contra los antígenos del tumor. Este anticuerpo anti IL-4 con el fin de activar las células cooperadoras CD4 + T hacia IFN- $\alpha$  producen células efectadoras Th1. La cantidad de citoquina que debe ser agregada al cultivo de célula T para obtener la expansión a una proporción suficiente puede ser fácilmente determinada por la persona experta. La citoquina se agrega desde el primer día del cultivo, y se agrega cada tercer día del cultivo en cantidades suficientes para mantener la proliferación de las células T. Por ejemplo, el IL-2 se puede agregar a los cultivos para obtener una concentración final de aproximadamente 100 U/ml y se agregan cada tercer día al cultivo, tal como cada segundo o tercer día, cuando se agrega un nuevo medio al cultivo de célula.

En razón a que de acuerdo con el método de la presente invención se utilizan los linfocitos, ellos ya han sido cebados *in vivo* y tienen una especificidad contra los antígenos de tumor, ninguna activación/cebamiento adicional se requiere en principio, en razón a que ya ha ocurrido la expansión clonal.

Sin embargo, en pacientes con tumores que producen sustancias inmuno-supresoras el cultivo de linfocito se puede estimular con antígeno tumoral en una forma adecuada para disparar una señal de activación adicional en las células T, es decir, el antígeno es presentado a la célula T de tal forma que la señal es disparada en la célula T a través del complejo TCR/CD3. Por ejemplo, el antígeno se puede presentar a la célula T mediante una célula que presenta antígeno, tal como una célula B, macrófago, monocito, célula dendrítica, célula Langerhans en conjunto con una molécula MHC. Para este fin, las células tumorales, un extracto de tumor autólogo y/o un antígeno de tumor recombinante se agregan al cultivo de linfocitos y se incuban durante un tiempo suficiente para cebamiento adicional. Similarmente, una célula infectada con un patógeno, por ejemplo, un virus, que presenta antígenos del patógeno se puede incubar con los linfocitos. Luego de la activación específica del antígeno de una población de células T, las células se pueden además expandir de acuerdo con los métodos descritos aquí. En vista de la seguridad del paciente se prefiere el uso de un extracto de tumor autólogo, en razón a que la etapa de remoción de las células tumorales y/o las células recombinantes se puede omitir.

Se ha encontrado adicionalmente que cuando las células tumorales están presentes en los ganglios linfáticos centinela los linfocitos obtenidos de éste exhiben una actividad y/o especificidad inferior contra las células tumorales comparados con los linfocitos obtenidos de la célula tumoral libre de ganglio linfático centinela. Sin querer estar ligado por ninguna teoría se cree actualmente que este hallazgo es probablemente debido a la capacidad del tumor de inmuno-supresión, es decir, un estado funcional de anergia debido a la presencia de células tumorales.

Cuando se ha expandido el cultivo de linfocito y estimulado a una proporción deseada, los linfocitos son recolectados, opcionalmente purgados de cualquier material, de detrimento para la salud del paciente y transferidos de regreso al paciente. Esto se puede lograr mediante infusión intravenosa, durante un período de desde aproximadamente 1 a 6 horas, con el número de células mononucleares administrado siendo dependiente solamente del número de células generadas durante la etapa de proliferación.

De acuerdo a otra modalidad la presente invención también suministra un kit para llevar a cabo el presente método. El kit comprende un tinte, preferiblemente un tinte azul patent y los agentes para estimular la proliferación y expansión de los linfocitos.

## ES 2 282 355 T3

El método de la presente invención suministra claras ventajas sobre la técnica anterior. En razón a que los linfocitos se recolectan de ganglios linfáticos centinela, específicamente aquellos linfocitos que son expandidos ya que tienen una actividad y especificidad dirigidas contra los antígenos del tumor. Esta especificidad puede ser mejorada *in vitro*, al cultivar los linfocitos en la presencia de un extracto de tumor autólogo para promover la selección de clonación y la expansión. Las células T con reactividad específica hacia el tumor primario se pueden identificar en los ganglios centinela y estas células se pueden expandir específicamente para uso posterior en inmunoterapia celular.

La invención será ahora explicada por medio del siguiente ejemplo que no debe ser considerado como limitante sino que es dado sólo con un propósito ilustrativo.

### Ejemplo 1

#### *Recolección y preparación de células*

Cinco pacientes con cáncer de colon, sin signos de metástasis distante o de involucramiento de ganglio linfático antes de la cirugía, se incluyeron en el estudio (Tabla 1). El estudio fue aprobado por el comité de ética local y se dio un consentimiento informado por los pacientes.

El sitio del tumor colónico fue movilizado a través de la división de las adhesiones peritoneales para facilitar la inspección. Un ml de tinte azul Patent (Guerbet, Paris) se inyectó superficialmente en la circunferencia del tumor. A los cinco minutos, uno a tres ganglios linfáticos mesentéricos coloreados con azul se identificaron microscópicamente como ganglios centinela y ellos fueron marcados con suturas.

Los ganglios centinela y no centinela fueron cortados en mitades. Las tajadas de menos de 1 mm fueron cortadas del centro y de la parte periférica de los ganglios para citometría de flujo y análisis de proliferación. El resto de los ganglios sufrieron examen histopatológico de rutina. Los tumores fueron clasificados histopatológicamente como etapas Dukes A-C (11) (Tabla 1).

Una pieza del tumor primario (que incluye parte del margen invasivo) se removió para análisis de citometría de flujo y como una fuente de antígeno.

La sangre venosa, los ganglios linfáticos centinela y no centinela y los tumores fueron de inmediato cuidados para minimizar el tiempo de manejo. Los leucocitos de sangre periférica (PBL) fueron purificados mediante Ficoll-Hypaque (Farmacia, Amersham). Fueron obtenidas suspensiones de célula simple de células de ganglio linfático mediante presión suave utilizando un homogenizador de vidrio de ajuste libre. Las células fueron resuspendidas y lavadas dos veces en DMEM el que contiene 2.5% de suero de becerro fetal (FCS) (Life Technologies). Finalmente, las células fueron resuspendidas en un medio de proliferación RPMI que contiene 10% de suero AB humano (Sigma), 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma) y 1% de glutamina (Sigma).

Las muestras tumorales fueron homogenizadas utilizando un homogenizador Dounce en 5 volúmenes (p/v) de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) seguido por 5 minutos de desnaturalización a 97°C. No fueron visibles células intactas bajo el microscopio. Los homogeneizados tumorales fueron diluidos 1:10 y 1:100 en un medio de proliferación completo. El PBL purificado y las células de ganglios linfáticos fueron utilizadas a  $3 \times 10^5$  células/pozos en un ensayo de proliferación contra el homogeneizado tumoral diluido, concanavalina A  $10 \mu\text{g/ml}$  o antígeno carcinoembrionario  $100 \mu\text{g/ml}$  (Sigma) en triplicado. La proliferación se midió en el día 5, 6 y 7 al agregar un  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina/pozo (Amersham) 16 horas antes de cosecharse. Las muestras fueron sometidas a conteo por centelleo. Las suspensiones de PBL, células de ganglio linfático y células tumorales a  $1 \times 10^6$  células/muestra fueron sometidas a investigación utilizando citometría de flujo (FACS). Las células fueron lavadas en PBS que contiene 2% de FCS y 0.02% de  $\text{NaN}_3$  (amortiguador FACS) y directamente marcada triple utilizando marcadores de superficie de célula fluorescente contra CD4 PE, CD8 PerCp y el marcador de activación muy temprano CD69 FITC (Pharmingen). Para células FACS intracelulares fueron permeabilizadas con 0.3% de saponina (Sigma) en un amortiguador FACS durante 15 minutos a temperatura ambiente seguido por una incubación de 30 minutos con anticuerpo de citoqueratina-20 (Dakopatts). Después de los lavados, las células fueron incubadas con un anticuerpo conjugado con IgG FITC anti ratón (Jackson) durante 30 minutos. Las células teñidas sin el anticuerpo primario fueron utilizadas como controles. Después del teñido, las células fueron investigadas utilizando un FACSscan (Becton Dickinson) y los datos fueron analizados utilizando el software de computadora cellquest (Becton Dickinson).

TABLA 1

*Características del paciente, sitios del tumor, etapa, ganglios linfáticos investigados y respuestas proliferativas*

Paciente	Sexo	Edad	Sitio del Tumor	Clasificación Dukes	Ganglios positivos/ Ganglios cosechados	Proliferación CPM media
1.	F	58	Ascendente	B	0/29	15125 <sup>a</sup>
2.	F	75	Ascendente	C	4/23	3848 <sup>a</sup>
3.	F	78	Ascendente	C	2/19	78
4.	M	81	Ascendente	B	0/22	7686
5.	M	80	Sigmoide	B	0/18	26289

a. El pico en el día 6 de las respuestas proliferativas medias donde se ve en dilución el extracto tumoral 1/100

## Ejemplo 2

*Identificación peroperativa del ganglio centinela y la clasificación patológica*

Uno a tres ganglios centinela fueron detectados intraoperativamente utilizando una inyección de azul Patent en la circunferencia del tumor (Fig. 1). Las características del paciente y la localización de los tumores están presentes en la tabla 1. Luego de la disección macroscópica de los especímenes removidos, entre 18 y 29 ganglios linfáticos (promedio 22) fueron identificados y embebidos para evaluación histopatológica (Fig. 2A, B paneles izquierdos). Los pacientes 2 y 3 (Tabla 1) tuvieron una esparción metastásica al ganglio centinela y fueron clasificados histopatológicamente como Dukes C (Fig. 2B panel izquierdo). Los otros 3 pacientes no mostraron ningunos signos de esparcimiento metastásico a él o los ganglios centinela ni otros ganglios linfáticos a pesar del crecimiento de los tumores a través de la pared muscular del intestino (Fig. 2A panel izquierdo). Ellos fueron clasificados como Dukes B.

Las suspensiones de célula simple de linfocitos recolectados separadamente de la sangre periférica (PBL) (no mostrado), el tumor, los ganglios linfáticos centinela drenantes y los ganglios linfáticos no drenantes fueron teñidos el triple con anticuerpos que reconocen el marcador de activación muy temprano CD69 y los marcadores de célula T CD4 (Fig. 2A, B panel medio) y CD8 (no mostrado) seguido por análisis de citometría de flujo (FACS). Los números similares de los linfocitos CD4 + activados fueron encontrados tanto en ganglios centinela como no centinela sin importar la presencia (Fig. 2A panel medio) o ausencia de metástasis (Fig. 2B panel medio). Todos los tumores investigados contenían linfocitos que infiltran tumor (TIL) en una proporción varia y la mayoría de estos TIL, donde ambas células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, presentaron y activaron el fenotipo CD69<sup>+</sup>. En la sangre periférica estuvieron ausentes los linfocitos CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> activados (no mostrados).

El estado funcional de los linfocitos se caracterizó además en los ensayos de proliferación de curso de tiempo utilizando extractos de célula tumoral homogenizados como fuente de antígeno (Fig. 2A, B paneles derechos). La estimulación con tinte de azul Patent no originó la proliferación en ningún caso (datos no mostrados). En todos los ganglios linfáticos centinela sin metástasis (casos Dukes B), los linfocito proliferaron de una manera dependiente de dosis contra el extracto de tumor autólogo (Fig. 2A, panel derecho). La proliferación del pico fue regularmente vista en el día 6 en la cantidad más alta de antígeno (Tabla 1). Ninguna proliferación dependiente de antígeno fue reconocida entre los linfocitos provenientes de ganglios no centinela o de los TIL. En los casos de los Dukes C (Tabla 1, Fig. 2B panel derecho), donde los ganglios centinela contenían células metastásicas, no se identificó ninguna o solo una muy débil respuesta proliferativa. Para investigación adicional el estado funcional de los linfocitos, las células T no fueron específicamente estimuladas con Concanavalina A la cual puentea la activación a través del receptor de célula T. Todos los linfocitos de ganglio PBL y no centinela respondieron con fuerte proliferación así como también los linfocitos de ganglio centinela provenientes de los pacientes Dukes B (Fig. 3A). Sin embargo, los linfocitos de ganglio centinela provenientes de los pacientes Dukes C no responden con proliferación contra Concanavalina A, ni lo hicieron los TIL provenientes de los casos Duke B o C. La estimulación de los linfocitos de ganglio centinela provenientes de los pacientes Dukes B con 100 µg/ml de antígeno carcinoembriónico no resultaron en ninguna actividad proliferativa (datos no mostrados).

Los linfocitos con actividad específica hacia el extracto tumoral autólogo fueron seleccionados y puestos en cultivos de largo plazo. Las células estimuladas consistieron de linfocitos T CD4<sup>+</sup> predominantemente y ellos fueron expandidos en la presencia de IL-2 y sobrevivieron *in vitro* durante varias semanas.

## ES 2 282 355 T3

Las células provenientes de los tumores, los ganglios centinela y no centinela fueron investigados mediante los FACS después de tñido intracelular con citoqueratina-20, un marcador de cánceres epiteliales. Encontramos que la permeabilización de las células con saponina permitió la detección de una proporción grande de las células positivas de citoqueratina-20 en los tumores (Fig. 3B). De manera interesante, fuimos capaces de detectar un número pequeño de células positivas de citoqueratina-20 en un ganglio centinela con micrometástasis (Fig. 3B, Fig. 2B panel izquierdo).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar y/o prevenir la recurrencia de cáncer, que comprende las etapas de

- a) suministrar linfocitos obtenidos de ganglios linfáticos centinela de un paciente;
- b) y expandir los linfocitos *in vitro*, en donde los linfocitos son para reintroducción en el paciente.

2. El método de acuerdo a la reivindicación 1, en donde la etapa (b) comprende estimular los linfocitos *in vitro* mediante la adición de citoquinas o anticuerpos.

3. El método de acuerdo a la reivindicación 2, en donde las citoquinas son anticuerpo IL-2, INF- $\alpha$ , IL-12 e IL4.

4. El método de acuerdo a la reivindicación 2 ó 3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD3, y/o un anti CD28.

5. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa (b) comprende exponer los linfocitos suministrados en la etapa a) a una señal de activación adicional.

6. El método de acuerdo a la reivindicación 5, en donde la señal de activación comprende exponer los linfocitos a un extracto de tumor autólogo o a un antígeno recombinante.

7. El método de acuerdo a la reivindicación 5 ó 6, en donde la activación se lleva a cabo en la presencia de células que presentan antígeno.

8. El método de acuerdo a la reivindicación 7, en donde la célula que presenta antígeno comprende célula B, macrófagos, monocitos, células dendríticas, células Langerhans.

9. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los linfocitos se derivan de un origen humano o animal.

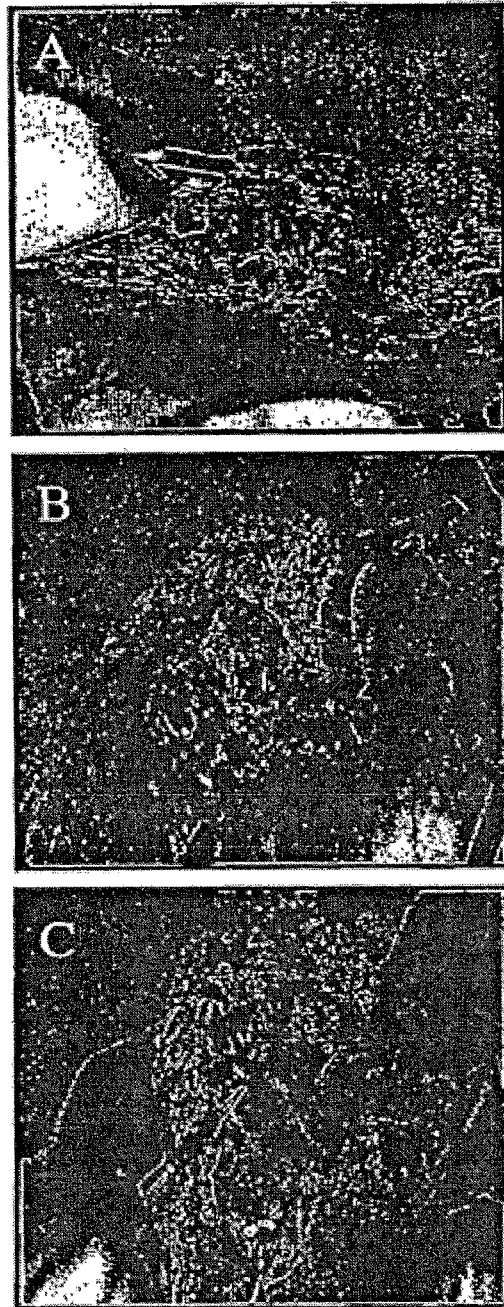


Fig. 1

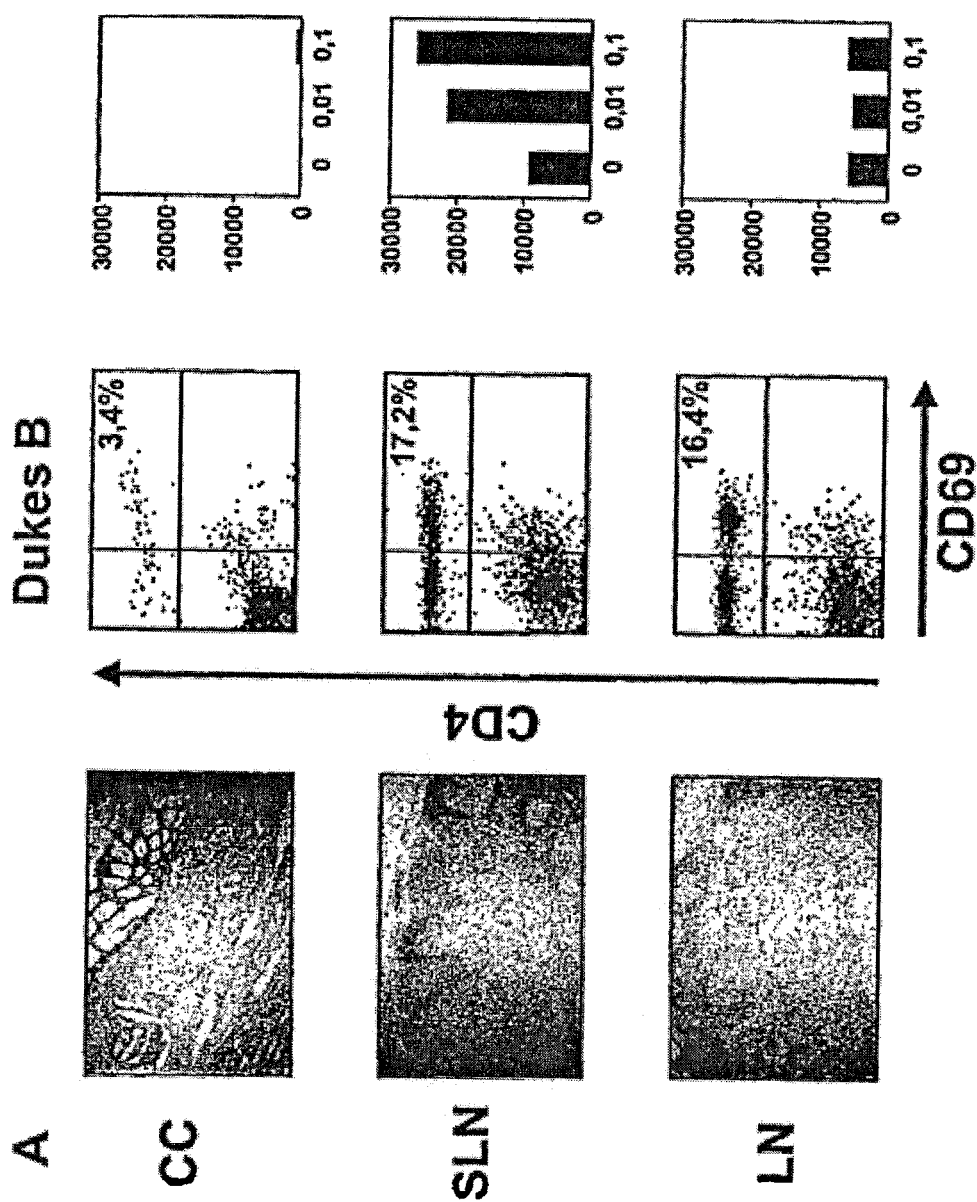


Fig. 2A

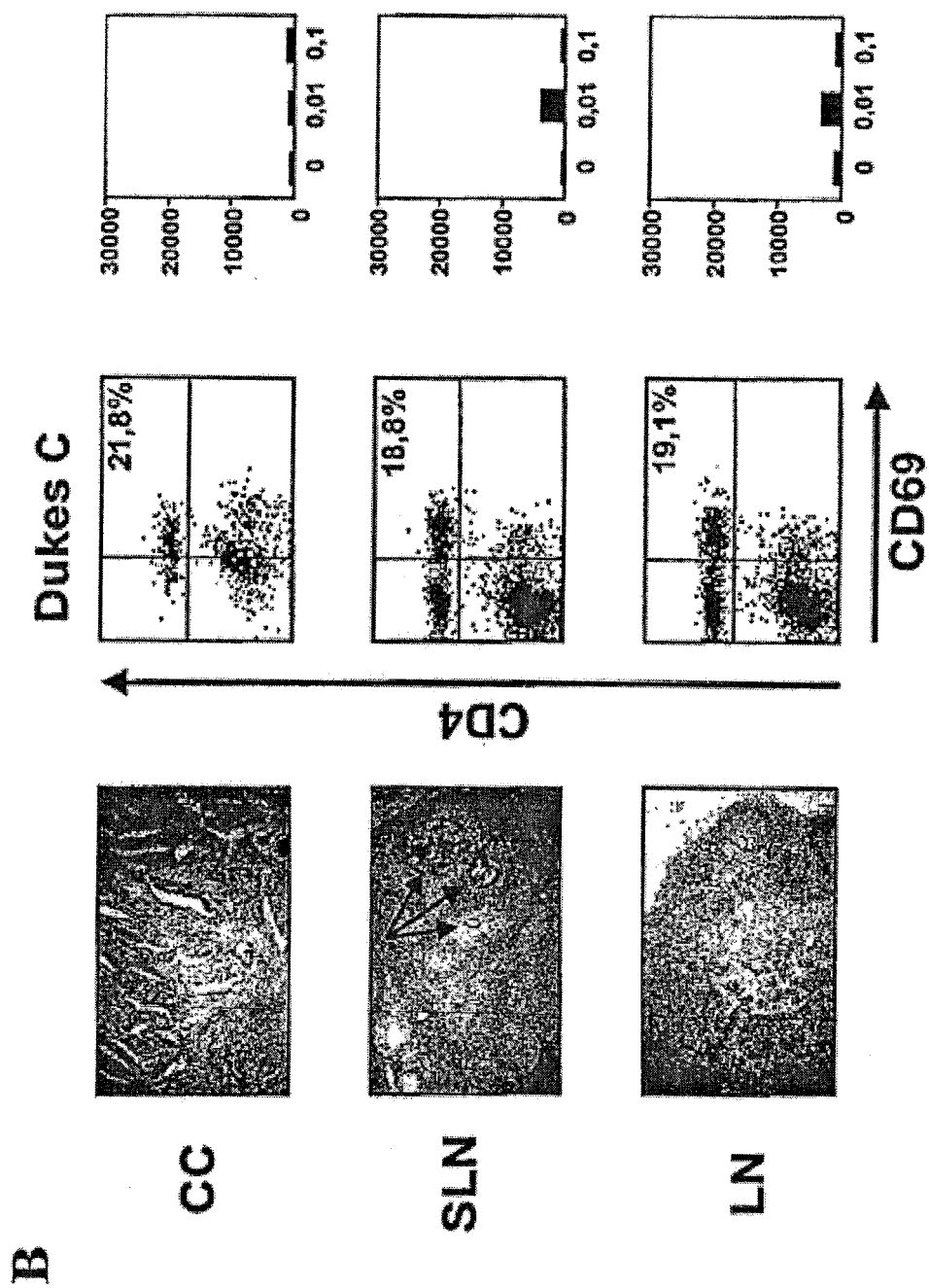


Fig. 2B

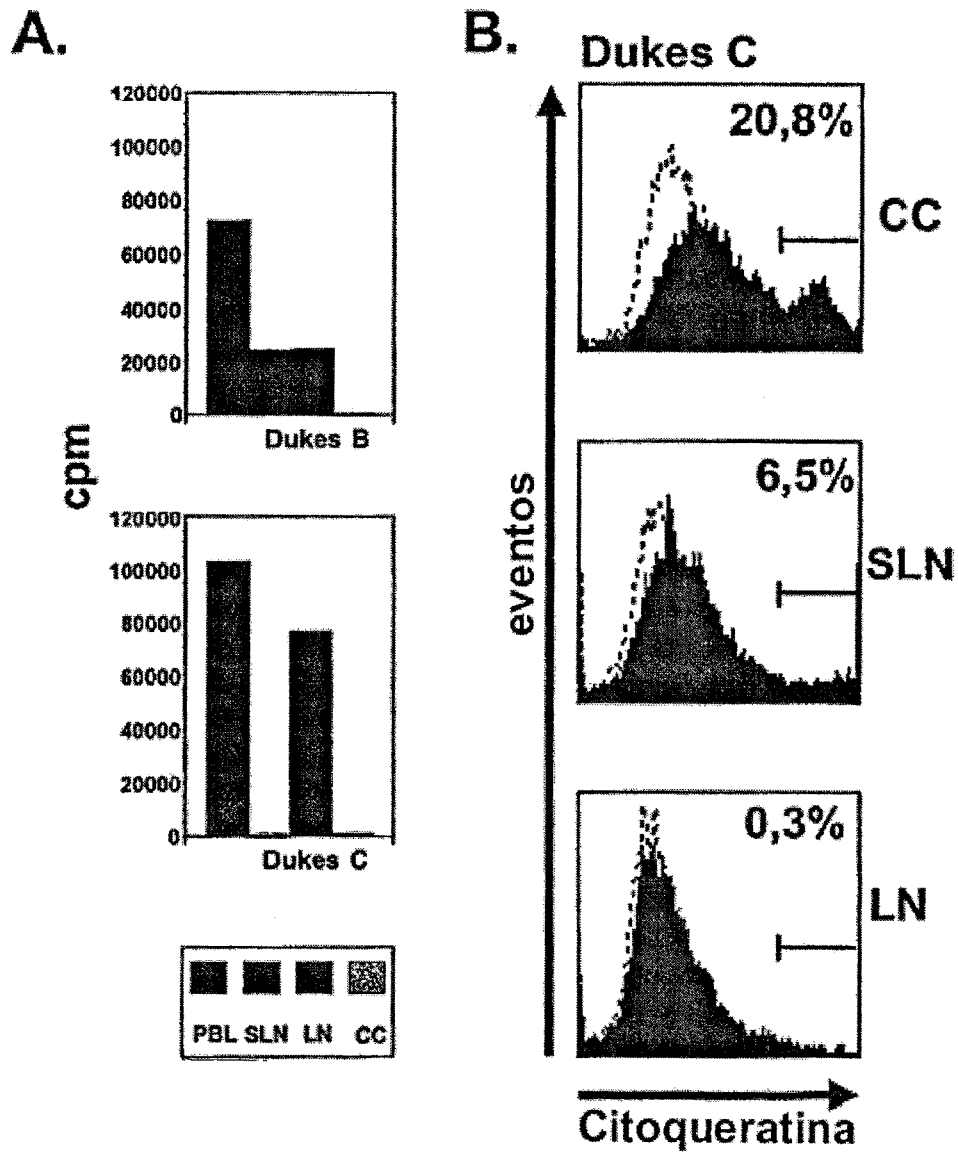


Fig. 3

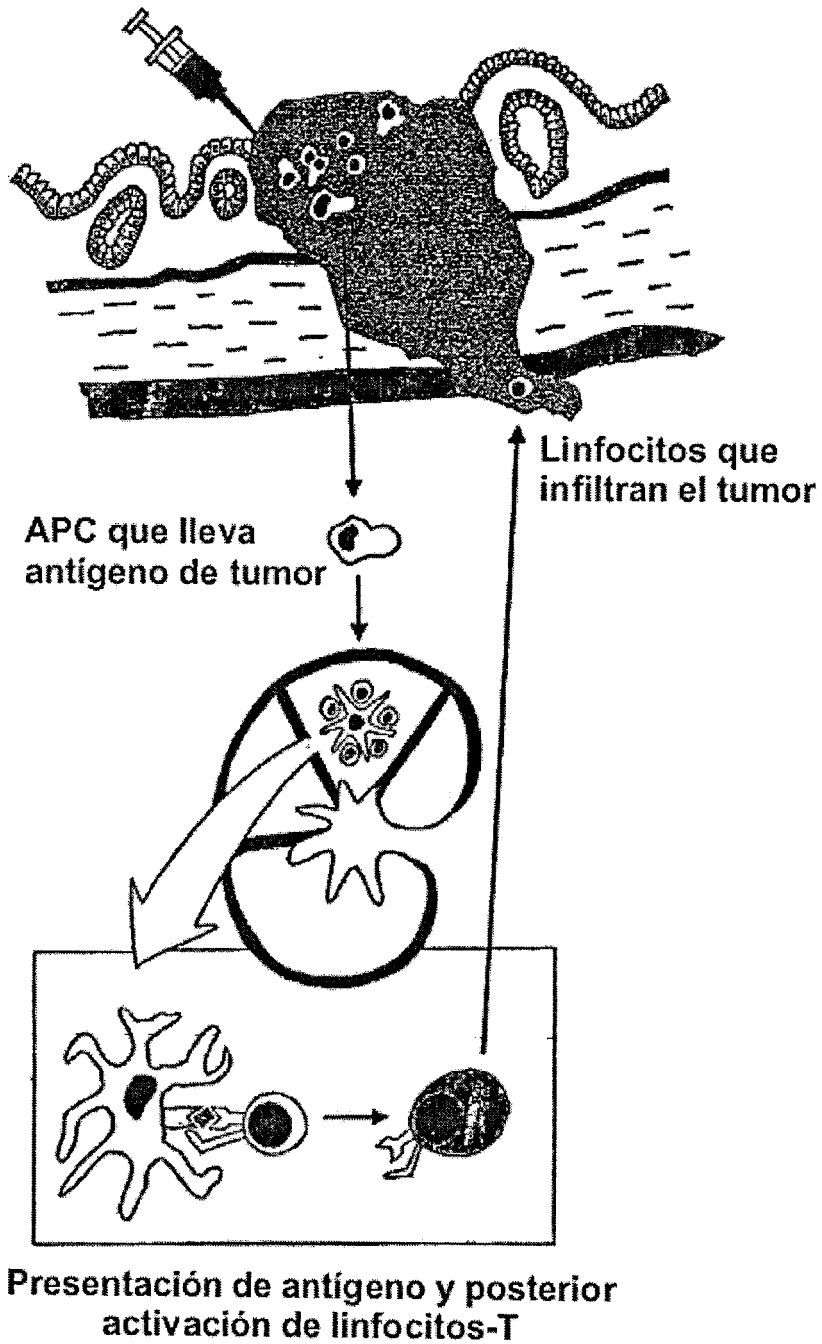


Fig. 4A

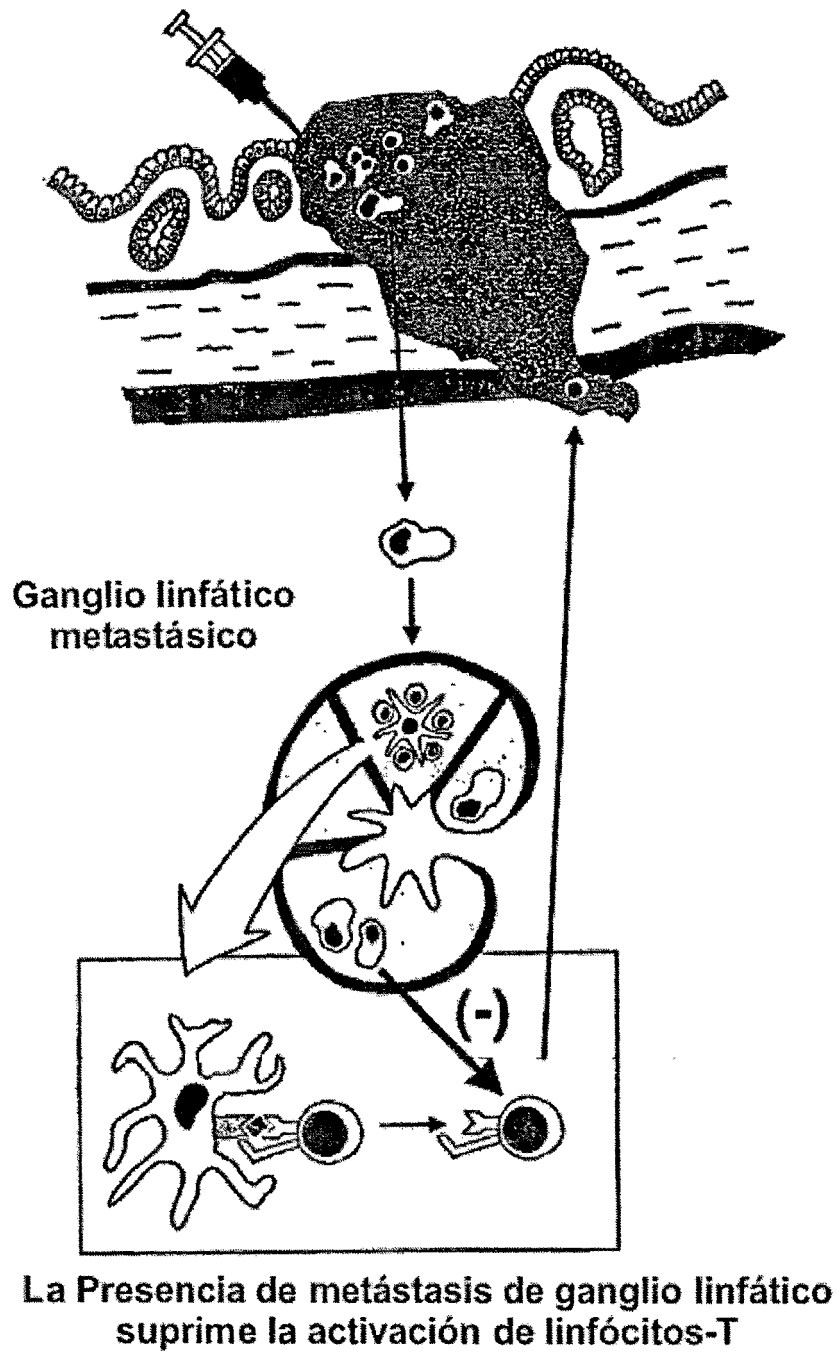


Fig. 4B