



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 006**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01917257 .6**

96 Fecha de presentación : **30.03.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1272617**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: **Estirpes celulares de próstata y su uso.**

30 Prioridad: **01.04.2000 GB 0008032**  
**03.10.2000 GB 0024237**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.10.2011**

73 Titular/es: **ONYVAX LIMITED**  
**Businesscare Solutions Ltd. Tong Hall Tong**  
**West Yorkshire, BD4 0RR, GB**

72 Inventor/es: **Thraves, Peter y**  
**Sutton, Andrew**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 006 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

Estirpes celulares de próstata y su uso

**Sumario**

5 Una población cada vez más envejecida y un mejor diagnóstico han conducido a un aumento aparente en el número de casos del cáncer de próstata en hombres. Hay necesidad crítica de comprender mejor la evolución de esta enfermedad desde su localización confinada de inicio hasta la enfermedad metastásica generalizada en la etapa final con morbilidad y mortalidad presentes. Históricamente ha sido difícil obtener y mantener estirpes celulares de próstata inmortalizadas en cultivo. Durante unos 15 a 20 años el campo de la experimentación *in vitro* en el cáncer de próstata se ha basado en tres estirpes celulares procedentes de zonas metastásicas. Más recientemente se han derivado nuevas estirpes celulares del tejido primario mediante la inmortalización con montajes víricos de oncogen. Los inventores han derivado una serie de clones de estirpe celular inmortalizada. Las estirpes celulares se caracterizan por ser de origen epitelial de la próstata y tener excelentes características de crecimiento en combinación con la expresión poco común de marcadores que hacen estas estirpes celulares valiosas para el descubrimiento de antígenos y el uso como potenciales vacunas en el tratamiento del cáncer de próstata así como para la identificación de fármacos, análisis genético de la base del cáncer de próstata y otros estudios relacionados.

**Campo de la invención**

20 El carcinoma de próstata (CAP) es la segunda causa más frecuente de cáncer relacionada con la muerte en hombres en los Estados Unidos (Boring, 1993). El aumento de la frecuencia del cáncer de próstata durante la última década ha confirmado al cáncer de próstata como el más frecuente de todos los cánceres (Carter y Coffey, 1990). Aunque el cáncer de próstata es el cáncer más corriente en los hombres en Estados Unidos (aproximadamente 200.000 casos recién diagnosticados/año), los cambios moleculares subyacentes a su génesis y evolución continúan siendo poco entendidos (Boring et al., 1993).

25 Un reto poco frecuente presentado por el cáncer de próstata consiste en que la mayoría de los tumores de próstata no representan condiciones que suponen una amenaza para la vida. Pruebas procedentes de autopsias indican que 11 millones de norteamericanos padecen cáncer de próstata (Ddorn, 1983). Estas cifras son coherentes con el carcinoma de próstata que tiene un historial natural prolongado en el que relativamente pocos tumores evolucionan a una importancia clínica durante la vida del paciente. Si el cáncer está muy diferenciado, confinado en el órgano y focal cuando se detecta, el tratamiento no prolonga la esperanza de vida de los pacientes de más edad.

30 Desgraciadamente, los relativamente pocos carcinomas de próstata que son de naturaleza evolutiva son probablemente los que ya se han metastatizado en el momento de la detección clínica. Los índices de supervivencia en personas con cáncer de próstata metastásico son muy bajos. Entre estos dos extremos hay pacientes con tumores de próstata que se metastatizarán pero que todavía no lo ha hecho. Para estos pacientes, es cutativa la extirpación quirúrgica de sus próstatas y prolonga su esperanza de vida.

35 Históricamente ha habido pocas estirpes de próstata inmortales que puedan cultivarse *in vivo* para su uso en la identificación del fármaco, el descubrimiento del antígeno u otras técnicas experimentales buscando nuevas entidades terapéuticas para esta enfermedad. Tres estirpes celulares han estado en uso experimental generalizado durante unos 15 a 20 años concretamente; DU145 (Mickey, *et al.*, *Cancer Res.* 37: 4049-4058, 1977; K. R. Stone, *et al.*, *Int. J. Cancer* 21: 274-281, 1978); PC-3 (M.E. Kighn *et al.*, *Invest. Urol.* 17: 16-23, 1979; *Cancer Res.*40: 524-534, 1980) y LnCap (Horoszewicz J.S. *et al.*, *Models for Prostate Cancer*, 1980, Alan R., Liss Inc., 150 Fifth Avenue, Nueva York NY. NY 10011).

45 Últimamente un número creciente de grupos han desarrollado nuevas estirpes celulares que usan oncogenes derivados de virus para conseguir el estado inmortal en el cultivo. Estas estirpes celulares incluyen: TSU-Pr1 (Iizumi T. *et al.* *J. Urol.* junio de 1987; 137(6): 1304-6, Establishment of a new prostatic carcinoma cell line TSU-Pr1); LuCap23 (Ellis WJ. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* Junio de 1996; 2(6):1039-48, Characterization of a novel androgen-sensitive, prostate-specific antigen-producing prostatic carcinoma xenograft: LuCaP 23); P69SV40-T P69-M2182 (Plymate SR. *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* oct. De 1996; 81(10): 3709-16, The effect on the insulin-like growth factor system human prostate epithelial cells of immortalization and transformation by simian-virus-40 T antigen); MDA Pca 2a y MDA Pca 2b (Navone NM. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* dic de 1997; 3(12 Pt1):2493-500 Establishment of two human prostate cancer cell lines derived from a single bone metastasis); 1519-CPTX, 1535-CPTX, 1532-CPTX y 1542-CP<sub>3</sub>TX, (Bright RK. *et al.*, *Cancer Res.* 1 marzo de 1997; 57(5): 995-1002 Generation and genetic characterization of immortal human prostate epithelial cell lines derived from primary cancer specimens) y la estirpe celular ARCAP (Zhou H.Y. *et al.* Androgen-repressed phenotype in human prostate cancer *procedimiento.* *Natl. Acad. Sci. USA* 24 de dic. 1996; 93(26): 15152.7).

55 Se ha demostrado que el cáncer de próstata *in situ* y también las estirpes celulares de zonas primarias y metastásicas en común con muchos tipos de tumores disminuyen su expresión de MHC-I por varios mecanismos (Blades RA *et al.* *Urology* nov. de 1995; 46(5): 681-6; discussion 686-7 Loss of HLA class I expression in prostate cancer: Implications fórmula immunotherapy). Esto tiene implicaciones en estrategias inmunoterapéuticas *in vivo* y también en el descubrimiento de antígenos *in vitro* de los cuales ambos se benefician de manera significativa de la

expresión de MHC-1. *In vivo*, la falta de expresión de MHC-1 inhibirá la presentación directa por las células tumorales de epítomos de linfocitos T al receptor del linfocito T tanto en células CD4 como CD8 y por consiguiente se volverá efectivamente invisible a la destrucción mediada por linfocitos T. Células inmortalizadas *in vitro* que carecen de expresión de son significativamente menos eficaces en numerosos usos experimentales incluyendo los ensayos de lisis mediada por linfocitos T y los estudios de elución de péptidos. Los usos terapéuticos de estirpes celulares en forma de vacunas con células completas también se benefician de la expresión de MHC-1, particularmente en estrategias de autovacunación. En modelos experimentales de vacunación frente a la expresión "alo" MHC-1 de la prueba de provocación tumoral en la estirpe celular de vacunación produce el efecto protector más marcado particularmente cuando el "alo" MHC-1 reside en el tumor relacionado asociado que lleva células tumorales o en antígenos específicos (Xu W. *et al. Cancer Immunol Immunother.* Enero de 1998; 45(5): 217-24).

La solicitud WO 97/28255 describe la generación de estirpes celulares inmortalizadas a partir de células epiteliales de próstata. El documento WO 97/28255 confirma también la expresión por MHC-1 de las estirpes celulares, lo que les hace particularmente útiles para el tratamiento del cáncer de próstata.

### **Campo específico de la invención**

El cáncer de próstata en la mayoría de los casos continúa estando localizado en la propia próstata y no se escapa de los límites locales de la próstata. Por lo tanto, a menos que en los pacientes se controle clínicamente la concentración de PSA en sangre, examen rectal digital, ultrasonidos o biopsia acicular, la lesión no se diagnostica. Cuando el tumor se sale de la glándula prostática la difusión y las zonas metastásicas favorecidas son muy reproducibles. Las principales zonas de deposición son los ganglios linfáticos locales y más extensamente los huesos, de hecho muy a menudo el primer diagnóstico de la enfermedad prostática es el dolor de huesos o las fracturas inespecíficas de huesos procedentes de los depósitos metastásicos en los huesos. Las razones para la preponderancia de metástasis en la linfa y en huesos puede ser la proximidad local de ganglios linfáticos y el medio rico en factor de crecimiento en los huesos. Ha habido relativamente pocos informes de estirpes celulares generadas a partir de otras zonas metastásicas, siendo las más destacables la derivación derivación de DU145 procedente de una metástasis de cerebro y la estirpe celular ARCAP procedente también del fluido ascítico de un paciente con cáncer de próstata ampliamente diseminado.

La primera forma de realización de la presente invención consiste en dos células ONYCAP1 y ONYCAP23. Las estirpes celulares se han caracterizado extensamente por ser epiteliales de próstata en origen en virtud de la tinción de queratina. Las estirpes celulares se demuestra además que poseen concentraciones significativas de la expresión de MHC-1 en superficie además de varias otras proteínas inmunitarias funcionales no atribuidas normalmente a estirpes de células tumorales, a saber ligando MHC-2, ICAM y CD40. Los dos clones presentan morfología diferenciada y también un modelo diferenciado de expresión génica presentando Onycap23 un fenotipo osteomimético distinto en comparación con Oncap 1.

En la solicitud número GB 0008032.5 (01.04.00) de los inventores éstos creían que estas células procedían del fluido ascítico pero ahora se sabe que proceden de las células PNT-2 (véase los Ejemplos).

Una segunda forma de realización de la presente invención consiste en el uso de cualquiera de las estirpes celulares en la formulación de una vacuna para el tratamiento del cáncer de próstata con o sin un adyuvante de la vacuna que puede incluir IL-2, IL-12, interferón gamma, BCG, anatoxina antitetánica o *Mycobacterium Vaccae*. La vacuna puede usarse como terapia adyuvante en combinación con otras modalidades de tratamiento tales como radioterapia, intervención quirúrgica o quimioterapia en las que la vacuna se usa para tratar o resolver la enfermedad residual mínima.

Un aspecto más de la invención consiste en el uso de una combinación de estirpes celulares en la formulación de una vacuna para el tratamiento del cáncer de próstata con o sin un adyuvante de la vacuna que puede incluir IL-2, IL-12, interferón gamma, BCG, anatoxina antitetánica o *Mycobacterium Vaccae*. La vacuna puede usarse como terapia adyuvante en combinación con otras modalidades de tratamiento tales como radioterapia, intervención quirúrgica o quimioterapia en las que la vacuna se usa para tratar o resolver la enfermedad residual mínima.

Las células de la invención pueden usarse en combinación con otras estirpes celulares de próstata disponibles en ATCC, ECACC u otros laboratorios y bancos de células en la formulación de una vacuna para el tratamiento del cáncer de próstata con o sin un adyuvante de la vacuna que puede incluir IL-2, IL-12, interferón gamma, BCG, anatoxina antitetánica, *Mycobacterium Vaccae* u otro adyuvante o inmunomodulador adecuado conocido en la técnica. La vacuna puede usarse como terapia adyuvante en combinación con otras modalidades de tratamiento tales como radioterapia, intervención quirúrgica o quimioterapia en las que la vacuna se usa para tratar o resolver la enfermedad residual mínima o para el tratamiento de la enfermedad en cualquier fase con o sin tratamiento conjunto de varios tipos.

Un descubrimiento inesperado que surge del análisis de estas estirpes celulares es el descubrimiento de que poseen concentraciones significativas en superficie de MHC-1 que ofrece el potencial para usar las estirpes celulares en estudios de elución de péptidos para aislar e identificar péptidos de MHC-1 restringidos de estas estirpes celulares. Estas estirpes celulares son también exclusivas tanto en la naturaleza espontánea de su

inmortalización como en la manera muy agresiva en la que se han desarrollado *in vivo*. Por consiguiente representan una fuente excelente de antígenos potenciales esencial para la enfermedad metastásica de la próstata. Las células de la presente invención pueden usarse para identificar péptidos de MHC-1 restringidos y antígenos tumorales , péptidos y proteínas que surgen de estas estirpes celulares. Pueden prepararse vacunas usando antígenos, péptidos o vacunas de ADN procedentes de estas estirpes celulares.

Las bibliotecas de expresión procedentes de las estirpes celulares que pueden usarse en experimentos de identificación para descubrir antígenos asociados al tumor o específicos para su uso como vacuna o inmunoterapias y diagnósticos. La clonación de la expresión actualmente es técnicamente sencilla usando kits comercialmente disponibles tales como los kits de expresión bacteriana activados por epítomos de Invitrogen™ y Roche™ o kits de expresión de mamífero de Stratagene™. Una vez el ARN se ha transcrito a la inversa a ADNc y se ha insertado en un sistema de expresión oportuno pueden producirse varios clones con antisuero de pacientes vacunados o sin vacunar usando la estrategia tipo SEREX. Alternativamente pueden usarse clones de expresión de células de mamífero como dianas para su uso con linfocitos T citotóxicos (LTC) procedentes de animales vacunados o sin vacunar o de pacientes para identificar potenciales antígenos de linfocitos T.

Las estirpes celulares pueden usarse en experimentos específicos de proliferación usando sangre completa para determinar la frecuencia original de los linfocitos T que reconocen antígenos procedentes de estirpes celulares tanto en pacientes vacunados como sin vacunar. Los inventores han descubierto sorprendentemente que los lisados de estas estirpes celulares son buenos para estimular la proliferación de linfocitos T en un alto porcentaje de pacientes sin vacunar lo que indica que puede haber muchos antígenos compartidos entre estas nuevas estirpes celulares y tumores *in situ* en fase precoz. Pueden usarse también lisados de las células para pulsar células presentadoras de antígenos u otras células que expresan MHC-1 para permitir que estas células se utilicen como dianas potenciales en ensayos con LTC.

Otros usos de la presente invención se refieren al uso del crecimiento de estirpes celulares en ratones lampiños para identificación de fármacos, al uso de estirpes celulares en identificaciones genómicas para la identificación del fármaco diana y a la identificación de antígenos que pueden identificarse en ensayos de diagnóstico para identificar durante la detección en fase inicial del cáncer de próstata.

### **Descripción de las Figuras**

Figura 1: Morfología de Onycap 1 (x200 Figura 1A) y Onycap 23 (x200 Figura 1B)

Figura 2: Análisis FACS de expresión de citoqueratina por Onycap y Onycap23

Figura 3: Análisis FACS de marcadores de superficie inmunológicos conocidos Onycap1 (Figura 3A) y Onycap23 (Figura 23)

Figura 4: Respuesta de proliferación de pacientes de cáncer de próstata en fase final a lisados de Onycap1 y Onycap23

### **Ejemplos**

#### **Aislamiento de estirpes celulares**

Se extrajo una muestra de fluido ascítico (3 l) de un paciente con enfermedad de próstata metastásica conocida. El fluido ascítico se centrifugó a 1000 x g durante 15 minutos y a continuación se volvió a poner en suspensión en medio KSFM enriquecido con 25 g/ml de extracto de pituitaria bovina, 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, L-glutamina 2 mM, tampón HEPES 10 mM y suero de ternero fetal al 10% (FCS) (denominado en lo sucesivo "KSFM modificado"). Se controló la excrecencia natural y se centrifugó el medio decantado para conservar cualquiera de las células no adherentes. Durante tres a cuatro semanas se observaron que se desarrollaban esferoides acoplados y poblaciones de células uniformes en los matraces T75. Se cree que en alguna fase durante la contaminación de la excrecencia ocurrió en las células PNT-2 [número de referencia 95012613 de ECACC] que son células epiteliales de próstata inmortalizadas con antígeno T grande SV40.

#### **Clonación de estirpes celulares**

Un matraz T175 de la excrecencia ascítica se trató con tripsina y se colocó en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a diluciones variables calculadas para dar 1, 10 y 100 células por pocillo. Después de un periodo de 14 a 21 días se eligieron clones en crecimiento de la placa de 1 célula/pocillo en la que había menos de 20 colonias por placa visibles. Los clones identificados se trataron con tripsina y se colocaron en matraces T25 para su expansión, después de unos 14 a 21 días de crecimiento se expandieron más los clones a T75 y después a matraces T175. Los clones expandidos se trataron con tripsina y se reformularon en la mezcla en congelación que comprende KSFM que contiene FCS al 10% v/v y DMSO al 20% v/v y a continuación se guardó en alícuotas de  $1 \times 10^6$  células en nitrógeno líquido.

#### **Caracterización de la morfología de los clones**

Los diversos clones se caracterizaron basándose en la morfología inicial, y las fotografías del ejemplo se representan en la **Figura 1**. En la Figura 1A se muestra una pequeña morfología epitelial y es representativa del clon Onycap1. Una segunda morfología única presentada por el clon Onycap23 se muestra en la figura 1B por medio del cual las células muestran procesos pseudo-dendríticos que emanan de un cuerpo celular central similar al denominado fenotipo neuroendocrino (Chung TDK y Splotto método 2000 The Prostate 42 págs. 186-195) que se pueden producir por crecimiento en medio que contiene IL6.

Caracterización de los clones que son de origen epitelial de la próstata

Onycap1 y Onycap23 se han analizado por citometría de flujo usando anti-citoqueratina 8, anti-citoqueratina 18 y anticuerpos desmina. Citoqueratina 8 y 18 son característicos y se consideran marcadores auténticos de epitelios de próstata. La **Figura 2** presenta ejemplos de análisis de citometría de flujo de los clones con CY8, CY18 y anticuerpos desmina comparados con el isótopo de referencia. En todos los casos se tiñeron los clones para para estos marcadores epiteliales de la próstata característicos demostrando su origen prostático coherente con la enfermedad del paciente.

Análisis del marcador de superficie de los clones

Se escogieron clones seleccionados para el análisis del marcador de superficie usando anticuerpos disponibles en el mercado. El análisis se llevó a cabo para detectar las siguientes proteínas: MHC-I, MHC-II, CD40, CD154, CD69, CD80 y CD86. La **Figura 3** presenta datos representativos de citometría de flujo de Onycap1 y Onycap23. Pocas veces para las estirpes celulares metastásicas de próstata estos clones presentan niveles significativos de MHC-I junto con varios otros importantes marcadores que son importantes en inmunoterapéuticos tumorales basados en células, tales como CD86 y CD40.

La presencia de concentraciones significativas de MHC-I es importante ya que su presencia en la superficie de la célula será importante en la producción de una respuesta alógena cuando estas células se usan como una autovacuna de células completas. Existe también la posibilidad de que con la expresión de MHC-I en superficie estas células puedan presentarse también directamente a los linfocitos T, pequeños antígenos peptídicos restringidos por los MHC-I de los clones de MPA. Además una vez el receptor del linfocito T está ocupado la presencia de moléculas co-estimulantes en los clones de MPA puede producir también una respuesta proliferante significativa ya que tanto el receptor T como las señales coestimulantes están presentes en las células MPA.

Producción de ADNc y análisis PCR de los clones

La caracterización del perfil de expresión de los clones Onycap1 y Onycap23 se lleva a cabo por análisis RCPrt con un pequeño número de cebadores de RCP. Se emprendió el perfil de expresión de varias proteínas y antígenos de la próstata bien conocidos además de conocidos marcadores de invasión y metástasis para hacer una evaluación preliminar de estos clones para compararlos a otras células de la próstata conocidas. Se cultivaron los clones en matraces T75 en medio KSFM enriquecido con 25 g/ml de extracto de pituitaria bovina, 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, L-glutamina 2 mM, tampón HEPES 10 mM y suero de ternera fetal al 5 % (FCS).

Cultivo celular

Clones de estirpes celulares ONYCAP-1 y ONYCAP-23 se cultivaron en matraces T75 en KSMF modificado. Se recogieron las células por tripsinización de la superficie del plástico y se lavaron en solución salina equilibrada de Hanks antes de la extracción del ARN.

Extracción del ARN

Se realizó una doble extracción usando TRI REAGENT (Sigma nº T9424). El reactivo se añadió directamente a los sedimentos celulares lavados y las muestras se dejaron reposar durante 5 minutos antes de la adición de cloroformo. Se agitaron las muestras y se dejaron en reposo durante 10 minutos más a temperatura ambiente y a continuación se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos.

La fase acuosa superior se transfirió a un tubo fresco, se añadió otra alícuota de TRI REAGENT y las etapas anteriores se repitieron durante la segunda fase de extracción. La fase acuosa se transfirió de nuevo a un tubo reciente y el ARN se precipitó con isopropanol. Los sedimentos de ARN se lavaron con etanol al 75 %, se secaron y se volvieron a poner en suspensión en tampón TE.

Tratamiento con DNasa

Una alícuota de cada muestra de ARN se trató con Desoxirribonucleasa I (Life Technologies nº 18068-015) para asegurar que no había contaminación con ADN genómico. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación la DNasa se inactivó mediante la adición de EDTA 25 mM y calentamiento a 65 °C durante 10 minutos.

Transcripción inversa

La transcripción inversa se realizó usando el kit para la síntesis de la 1ª cadena del ADNc para RT-RCP (AMV) de Boehringer Mannheim (nº 1.483.188). Las reacciones se incubaron a 25 °C durante 10 minutos y a continuación a 42 °C durante 1 hora. La enzima AMV se desnaturalizó por calentamiento a 99 °C durante 5 minutos y a continuación se enfrió la reacción a 4 °C.

5 Resultados

Los cebadores de RCP listados se seleccionaron de la bibliografía para cubrir conocidas proteínas de la próstata, antígenos y marcadores de invasión y metástasis. El ADNc extraído de los clones se sondó con los cebadores y los productos del final de la reacción en geles de agarosa de alta resolución para comprobar los productos de los tamaños esperados. Los resultados se tabulan en la Tabla 1 para los clones Onycap1 y Onycap23.

10 Producción de ADNc y análisis en matriz del ADN de los clones

Metodología

Cultivo celular

15 Se sembraron Onycap1 y Onycap23 de la estirpe celular a razón de  $1 \times 10^6$  células en matraces de cultivo T175. Se mantuvieron los cultivos durante 4 a 5 días en KSMF modificado. Se recogieron las células por tripsinización de la superficie del plástico y se lavaron en solución salina equilibrada de Hanks antes de la extracción del ARN.

Extracción del ARN

20 Se realizó una doble extracción usando TRI REAGENT (Sigma nº T9424). El reactivo se añadió directamente a los sedimentos celulares lavados y las muestras se dejaron reposar durante 5 minutos antes de la adición de cloroformo. Se agitaron las muestras y se dejaron reposar durante 10 minutos más a temperatura ambiente y a continuación se centrifugaron a 12.000 x g durante 15 minutos.

La fase acuosa superior se transfirió a un tubo fresco, se añadió otra alícuota de TRI REAGENT y las etapas anteriores se repitieron durante la segunda fase de extracción. La fase acuosa se transfirió de nuevo a un tubo reciente y el ARN se precipitó con isopropanol. Los sedimentos de ARN se lavaron con etanol al 75 %, se secaron y se volvieron a poner en suspensión en tampón TE.

25 Tratamiento con DNasa

Una alícuota de cada muestra de ARN se trató con Desoxirribonucleasa I (Life Technologies nº 18068-015) para asegurar que no había contaminación con ADN genómico. Las reacciones se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y a continuación la DNasa se inactivó mediante la adición de EDTA 25 mM y calentamiento a 65 °C durante 10 minutos.

30 Sondado de la matriz del ADN

Se usó ADN marcado para sondar la matriz Atlas<sup>TM</sup> de Clontech (matriz II de cáncer humano) siguiendo el protocolo de los fabricantes para hibridación y lavado. Se registraron las imágenes usando un PhosphorImager y se registraron los archivos analizados con el programa informático Atlas Image <sup>TM</sup> de Clontech.

Resultados

35 Los genes expresados se tabulan en la Tabla 2 y se muestran los clones Onycap1 y Onycap23 para compartir muchos genes comunes expresados pero además que poseen productos únicos expresados como se predijo por su muy diferente morfología.

Respuesta proliferante de linfocitos T humanos a lisados de Onycap1 y Onycap23

Metodología

40 Preparación de lisados del clon MPA para estudios de proliferación de linfocitos T

Se cultivaron clones en matraces T75 en KSMF modificado. Una vez las células han alcanzado la confluencia se recogieron por tripsinización y se lavaron en solución salina equilibrada de Hanks y a continuación se sedimentaron por centrifugación.

45 La masa de células sedimentadas se llevó a través de cuatro ciclos de congelación-descongelación en un volumen mínimo de solución salina equilibrada de Hanks a una concentración celular de  $2 \times 10^6$  células/ml. El sobrenadante de células resultante se dividió en alícuotas de 25 µl y se guardó a -70 °C hasta que se necesitó.

Los inventores llevaron a cabo un ensayo de proliferación en linfocitos T en pacientes de cáncer de próstata en fase inicial después de la estimulación con lisados de las estirpes celulares de la próstata, para determinar si en una etapa inicial de las poblaciones de linfocitos T de la enfermedad albergaban una reactividad a antígenos procedente

de los clones de las células Onycap1 y Onycap23. La sangre completa se extrajo en cada visita a la clínica y se usó en un ensayo de proliferación a base de BrdU (bromodesoxiuridina) tal como se describe a continuación:

*Procedimiento de proliferación de BrdU del paciente*

	Reactivos	nº en catálogo	Suministrador
5	Medio RPMI		Life Technologies
	BrdU		Sigma Chemical Co., Poole, Dorset
	PharMlyse	35221E	Pharmingen, Oxford UK
	Cytofix/Cytoperm	2090KZ	"
	Perm/Tampón de lavado (x10)	2091KZ	"
10	FITC Anti-BrdU/DNasa	340649	Becton Dickinson
	PerCP Anti-CD3	347344	"
	Pe Anti-CD4	30155X	Pharmingen
	Pe Anti-CD8	30325X	"
	FITC mu-IgG1	349041	Becton Dickinson
15	PerCP IgG1	349044	"
	PE IgG1	340013	"

*Procedimiento*

- 1) Se diluye 1 ml de sangre con 9 ml de RPMI + L-glutamina 2 mM + antibióticos penicilina/estreptomicina + 2-mercaptoetanol 50 µM. No se añade suero. Se deja toda la noche a 37 °C
- 2) A la mañana siguiente, se dividen en alícuotas 450 µl de sangre diluida en los pocillos de una placa de 48 pocillos y se añaden 50 µl de lisado estimulante. El lisado se prepara por congelación-descongelación de células tumorales (2x10<sup>6</sup> equivalentes de celulares/ml)x3 en nitrógeno líquido y almacenando a continuación las alícuotas congeladas hasta que se requiera.
- 3) Se cultivan células a 37 °C durante 5 días
- 4) En la tarde del día 5 se añaden 50 µl de BrdU @ 30 µg/ml
- 5) Se dividen en alícuotas 100 µl de cada muestra en una placa de 96 pocillos de fondo redondo
- 6) Se centrifuga la placa y se descarta el sobrenadante
- 7) Se lisan los glóbulos rojos usando 100 µl de Pharmlyse™ durante 5 minutos a temperatura ambiente
- 8) Se lavan 2 veces con 50 µl de Cytofix™
- 9) Se centrifuga y se elimina el sobrenadante dando golpecitos
- 10) Se permeabiliza con 100 µl de Perm/Wash™ durante 10 min a temperatura ambiente.
- 11) Se añaden 30 µl de mezcla de anticuerpos que contiene anticuerpos a la dilución correcta preparada hasta volumen con Perm/Wash™
- 12) Se incuban durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente
- 13) Se lavan 1 vez y se vuelven a poner en suspensión en 100 µl de paraformaldehído al 2 %
- 14) Se añade esto a 400 µl de FACScan™ en un grupo de tubos listos para análisis
- 15) Se analiza en FACScan™, almacenando 3000 casos de CD3 cerrados.

*Placa de 6 pocillos para estimulación*

	NII	Con	15	Ln	D	Pn
PBL1						
PBL2						
PBL3						
PBL4						
PBL5						
PBL6						

40

Placa de 96 pocillos para tinción de anticuerpos

PBL1		PBL2		PBL3		PBL4		PBL5		PBL6	
NII A	15 D										
NII D	15 E										
NII E	Ln D										
Con D	Ln E										
Con E	Du D										
	Du E										
	Pn D										
	Pn E										

**Leyenda:**  
A: FITC mu-IgG1 (5 µl) + PE IgG1 (5 µl) + PerCP IgG1 (5 µl) + 15 µl Perm/Wash™  
D: FITC Anti-BrdU/DNasa (5 µl) + PE Anti-CD4 (5 µl) + PerCP anti-CD3 (5 µl) + 15 µl Perm/Wash™  
E: FITC Anti-BrdU/DNasa (5 µl) + PE Anti-CD8 (5 µl) + PerCP anti-CD3 (5 µl) + 15 µl Perm/Wash™  
15: NIH1542-CP3TX (línea inmortalizada procedente de cánceres de próstata primarios por Dr. Suzanne Topallan en el NIH)  
Ln: LnCap (Número de ATCC: CRL-1740)  
D: Du145 (Número de ATCC: HTB-81)  
Pn: Pnt2 (Nº de Ref. ECACC: 95012613)  
Con: ConA lectina (referencia positiva)  
NII: Sin estimulación

Resultados

5 Los resultados de una serie de ensayos de proliferación se presentan en la **Figura 4** en la que un índice de proliferación para linfocitos T positivos a CD4 o CD8 están representados frente a lisados celulares Onycap1 y Onycap23, deduciéndose el índice de proliferación al dividir el porcentaje de linfocitos T que proliferan por la referencia sin lisar. Un índice de proliferación superior a 1 indica proliferación de linfocitos T significativa en respuesta al lisado celular usado para estimular.

10 Los resultados se muestran para seis sueros 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de pacientes de cáncer de próstata en fase inicial cada uno de los cuales se estimuló con lisado de células Onycap1 u Onycap23. Los resultados demuestran que las estirpes de células Onycap poseen antígenos que estimulan linfocitos T de manera diferenciada en una variedad de pacientes. Es poco probable que una respuesta se deba a una reacción de linfocitos mezclados ya que ambas estirpes celulares poseen el mismo haplotipo y todavía para cada uno de los sueros de los pacientes existen ejemplos de una estirpe celular que estimula una respuesta donde la otra estirpe celular no lo hace.

Tabla 1 Análisis de la expresión por RCP en Onycap1 y Onycap23

Antígeno de la próstata	Onycap1	Onycap23
PSA	-	-
PAP	-	-
PSM	-	-
Receptor de andrógeno	-	-
Receptor de EGF	-	-

IGF-II	-	-
Receptor de HGF	+	+
uPA	+	+
PCTA.1	+	+
PSCA	+	+
Receptor de GRP	-	+
Receptor de uPA	+	+
Receptor de ácido hialurónico	-	-
MMP-9	-	-
Vimentina	+	+
PAGE-1	-	-
E-cadherina	-	-
TGF $\alpha$	+	+
KAI1	-	+
Heparanasa	+	+

Tabla 2 Análisis de la expresión génica para Onycap1 y Onycap23

Intensidad de la mancha

	Onycap1	Onycap23	Producto génico
5	2748	10332	antígeno CD81; proteína TAPA-1 de la superficie celular de 26 kDa
	2260	9368	receptor 1 del virus de leucemia (GLVR1)
	0	7652	precursor 2 de glucoproteína de la membrana asociado a lisosomas (LAMP2); antígeno CD107B
10	0	5184	proteína II de la membrana de lisosoma (LIMP II);
	0	12796	anexina V; lipocortina V; endonexina II;
	0	5688	LGALS3, MAC2 (Galectina-3, antígeno MAC-2)
	0	6528	precursor 3 del antígeno asociado a la función de linfocitos (LFA3); antígeno CD58
15	0	28900	nepriylsina: endopeptidasa neutra (NEP); encefalinasa (EPN);
	0	7264	proteína de dedos de cinc
	248	2676	FACTOR INTERACTUANTE 5'-TG-3' (PROTEÍNA HOMEOSECUENCIA TGIF)
20	0	5032	PROTEÍNA HOMEOSECUENCIA SIX1
	2504	4888	PROTEÍNA SOX-9
	1440	3128	FRAGMENTO DE PROTEÍNA DE DEDOS DE CINCO
	0	6052	SUPUESTO REGULADOR DE TRANSCRIPCIÓN ENX-1
	804	7100	PROTEÍNA LASP-1 DE DOMINIOS LIM Y SH3 (MLN 50)
25	388	4708	ANILLO MEL-18-PROTEÍNA DE DEDOS
	8716	17132	REPRESOR DE TRADUCCIÓN NAT1
	0	6312	SAP18 (polipéptido P18 asociado a Sin3)
	0	6984	factor de elongación ELL2 de ARN polimerasa II de 640 AA proteína preliminar
	1932	6228	transcrito 2 asociado a HLA-B; proteína BAT-2 rica en prolina

ES 2 367 006 T3

	11008	2132	complemento 3 (C3)
	2076	8868	PROTEÍNA CEREBELOSA ÁCIDA NUCLEAR RICA EN LEUCINA LANP
	184	3164	precursor de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PTLP); proteína II de transferencia de lípidos
5	3016	12244	proteína dek
	0	5452	PROTEÍNA 2 RICA EN CISTEÍNA (CRP2) (PROTEÍNA ESP1)
	3748	8480	proteína EWS de unión al ARN
	6200	15836	proteína fus/tls de unión al ARN
	12996	35836	fósoproteína nucleolar B23; nucleofosmina (NPM); numatrina
10	4532	12992	supresor tumoral de tipo beta receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)
	1680	5664	receptor alfa del ácido retinoico
	1744	15192	proteína relacionada con ras R-ras2; proteína TC21 similar a ras; oncogén de teratocarcinoma
15	0	5676	leucemia mielóide linfóide de la proteína del montaje clatrina (CALM)
	27752	40916	MT1H (Metaltioneína-O, MT-0) + isoforma 1L de meteltioneína (MT-1L)
	9124	26864	proteína 1 del canal selectivo a aniones dependiente del voltaje
	244	6964	proteína RAB-5C relacionada con ras
	0	5584	proteína de fusión SNAP23A de vesícula-membrana
20	3976	16024	anexina IV (ANX4); lipocortina I; calpactina II; cromobindina 9; proteína inhibidora de fosfolipasa A2
	13640	34420	anexina I (ANX1)
	11428	27236	anexina II (ANX2); lipocortina II; subunidad pesada de calpactina I; cromobindina 8; proteína I;
25	0	7944	receptor 2 que retiene la proteína del lumen ER; receptro 2 de KDEL; ERD 22
	0	5136	isoforma A homóloga de la proteína SEC23 (SEC23A)
	2896	11292	subunidad de coatómero beta; proteína de la capa beta; beta <sup>1</sup> -COP; p102
	0	5472	subunidad de coatómero delta; proteína de la capa delta; delta-COP; arcaína (ARCN1)
30	0	6448	precursor del receptor de manosa-6-fosfato dependiente del catión
	0	7516	sintaxina 7 (STX7)
	3464	8162	proteína RAB-11B relacionada con ras; YPT3
	5740	9960	proteína RAB-7 relacionada con ras
	3852	14512	proteína RAB-1A relacionada con ras; proteína relacionada con YPT1
35	640	4004	proteína p22 de unión al calcio; proteína CHP de unión al calcio
	0	9184	proteína AP17 del montaje de la capa de clatrina; proteína AP-2 de 17 kDa del adaptador de la membrana plasmática
	8496	19328	proteína AP50 del montaje de la capa de clatrina; proteína AP-2 de 50 kDa del adaptador de la membrana plasmática
40	0	5908	acetoacetil-coenzima A tiolasa citosólica
	312	7616	precursor de beta-D-galactosidasa; lactasa; ácido beta-galactosidasa; GLB1
	1212	7572	6-FOSFOFRUCTOCINASA
	3492	7320	isozima piruvato cinasa M2 (PKM2)
	708	6620	succinil-CoA:3-cetoácido-coenzima A transferasa
45	240	5856	polipéptido alcohol deshidrogenasa 5 ji
	0	5188	NADH-citocromo B5 reductasa
	0	7152	subunidad 1 corta de enoil-CoA hidratasa mitocondrial
	0	5356	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa; HMGCR)
	0	5212	lipasa ácida liposómica/precursor de éster colesterílico hidrolasa (LAL)
50	0	8096	proteína de unión a fosfatidiletanolamina (PBP); neuropolipéptido H3
	0	6420	anexina III (ANX3); lipocortina III; proteína III anticoagulante de la placenta (PAP-III)
	432	5024	farnesil pirofosfato sintetasa
	448	5276	proteína H105E3
55	0	5084	dihidrofolato reductasa (DHFR)
	1976	8296	timidilato sintasa (TYMS; TS)
	324	7856	precursor de glutamato deshidrogenasa 1 (GDH; GLUD1)
	2580	5504	precursor de acil-CoA deshidrogenasa específico de cadena muy larga (VLCAD)
	24144	34792	cadena pesada de ferritina (FTH1); FTHL6
60	44632	5996	precursor de fosfatasa alcalina de tipo 1 de la placenta (PLAP-1)
	3732	8760	homólogo de D2-isopentenilpirofosfato isomerasa (IPP isomerasa)
	364	6132	ornitina descarboxilasa (ODC1)
	14304	24032	proteína disulfuro isomerasa
	0	5416	proteína ciclofilina 3 (CYP3)
65	14884	31528	proteína L22 ribosómica 60S (RPL22);
	0	8068	proteína relacionada con TIA-1; nucleolisina TIAR

## ES 2 367 006 T3

	0	10204	fosfoproteína astrocítica PEA-15
	0	7020	precursor de proteína cyr61; proteína GIG1; proteína 10 de unión al factor de crecimiento insulinoide (IGFBP10)
	0	5668	precursor de granulinas (GRN); acrogranina
5	7228	16696	precursor B del péptido natriurético
	932	3548	SEMAFORINA V
	660	8248	molécula adaptadora del transductor de señal (STAM)
	2096	4344	beta-adaptina 1 adaptador HA2 de la membrana plasmática/subunidad beta de adaptina AP2;
10	128	5132	PROTEÍNA S6 CINASA RIBOSÓMICA (EC 2.7.1.-)(S6K) (P70-S6K).
	2796	13364	isoforma alfa de caseína cinasa I (CKI-alfa); CK1; CSNK1A
	11716	21668	isoforma delta de caseína cinasa I (CKI-delta); CK1; CSNK1D
	812	6076	subunidad beta de caseína cinasa II (CK II; CSNK2B; CK2N); fosvitina
	2204	7884	proteína cinasa 2 activada por MAP cinasa (MAPKAP cinasa 2; MAPKAPK-2)
15	0	5592	isoforma alfa de la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa PP2A de 65 kDa;
	0	5292	isoforma neuronal de la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa PP2A de 55 kDa;
20	420	5744	proteína fosfatasa 5 con doble especificidad; proteína fosfatasa HVH3 con doble especificidad
	4328	10112	proteína fosfatasa 7 con doble especificidad; proteína fosfatasa PYST2 con doble especificidad
	1484	5124	isoforma alfa de la subunidad catalítica serina/treonina de la proteína fosfatasa 2B
25	972	7260	serina/treonina de la proteína fosfatasa 5 (PP5); proteína fosfatasa T (PPT)
	0	6016	proteína-tirosina fosfatasa 1B (PTP-1B)
	1584	6508	proteína-tirosina fosfatasa G1 (PTP-G1)
	6480	14912	subunidad catalítica serina/treonina de la proteína fosfatasa PP1-alfa 1 (PP-1A)
	952	6852	subunidad alfa 3proteína de unión a nucleótido de guanina G(K) (GNA3)
30	4104	12748	NUCLEÓTIDO DE GUANINA-PROTEÍNA DE UNIÓN G(I),
	0	8304	proteína RAP-1B relacionada con ras; proteína SMG p21B de unión a GTP
	0	6180	cadena ligera de calpactina I
	8284	15263	proteína IQGAP1 pseudo-activante de ras GTPasa; p19; KIAA0051
	856	6416	calmodulina
35	1556	9264	calmodulina
	440	4164	ANEXINA XI (ANEXINA 50 ASOCIADA A CALCYCLINA) (CAP-50) (AUTOANTÍGENO DE 56 KD).
	2756	8752	calgizzarina; proteína S!==C; MLN70
	3768	11592	proteína sorcina (SRI) de 22 kDa; CP-22
40	472	6296	ligando de ciclofilina moduladora de la señal de calcio (CAML)
	5352	16056	14-3-3 proteína beta/alfa; proteína-1 inhibidora de la proteína cinasa C (KCIP-1); proteína 1054
	9088	20192	14-3-3 PROTEÍNA ÉPSILON (SUBUNIDAD FACTOR L DE ESTIMULACIÓN IMPORTADA MITOCONDRIAL)
45	4576	11468	14-3-3 PROTEÍNA ZETA/DELTA (PROTEÍNA-1 INHIBIDORA DE LA PROTEÍNA CINASA C) (KCIP-1);
	1688	8056	isoforma alfa de la proteína de transferencia fosfatidilinositol (PI-TP-alfa);
	12604	26120	proteína 12 similar a la subunidad beta de la proteína de unión a la guanina nucleótido;
50	532	3800	precursor de proteína liposómica protectora; catepsina A; carboxipeptidasa C; PPGB
	9808	23748	pequeña subunidad (reguladora) de proteasa dependiente del calcio; calpaína;
	1036	8220	PROTEÍNA HUNTINGTINA INTERACTUANTE (HIP2)
	0	5844	inhibidor de coagulación asociado a la lipoproteína
55	504	4120	precursor kappa de la proteína tirosina fosfatasa (R-PTP-kappa; PTPRK; PTPK)
	4740	14824	SUPUESTA PROTEÍNA RECEPTORA (PM1)
	40	3116	receptor huérfano TR4
	168	2980	isoforma de dinactina de 150 kDa; polipéptido asociado a dineína de 150 kDa (DAP.150);
60	13744	33716	COFILINA
	4044	12584	isoforma citoesquelética de alfa-actinina 1; proteína de enlace cruzada F-actina
	852	5288	drebrina E
	1684	11556	precursor principal de la proteína prión (PRP); PRP27-30; PRP33-35C; ASCR
	820	4628	proteína DXS6673E; gen experimental de retraso mental unido a X
65			

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Estirpe celular seleccionada de entre el grupo constituido por los clones ONYCAP-1 y ONYCAP-23 que están depositados como depósito con fines de patente según el Tratado de Budapest en ECACC el 28 de marzo de 2000 con los números de entrada 00032802 y 00032801 respectivamente, y que las estirpes celulares se caracterizan por ser de origen epitelial de la próstata en virtud de la tinción con citoqueratina.
2. Uso de una cualquiera de las estirpes celulares de la reivindicación 1 en la formulación de una vacuna para el tratamiento del cáncer de próstata con o sin adyuvante de vacuna que puede incluir IL-2, IL-12, interferón gamma, BCG, anatoxina antitetánica o *Mycobacterium Vaccae*.
- 10 3. Uso de una combinación de las estirpes celulares de la reivindicación 1 en la formulación de una vacuna para el tratamiento del cáncer de próstata con o sin adyuvante de vacuna que puede incluir IL-2, IL-21, interferón gamma, BCG, anatoxina antitetánica o *Mycobacterium Vaccae*.
4. Vacuna que comprende o que se compone de células de una o ambas estirpes celulares de la reivindicación 1, opcionalmente junto con un adyuvante.

Figura 1

Figura 1A

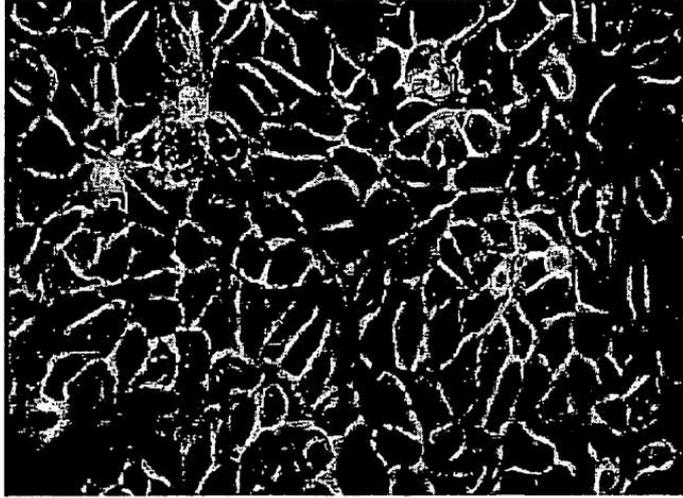


Figura 1B

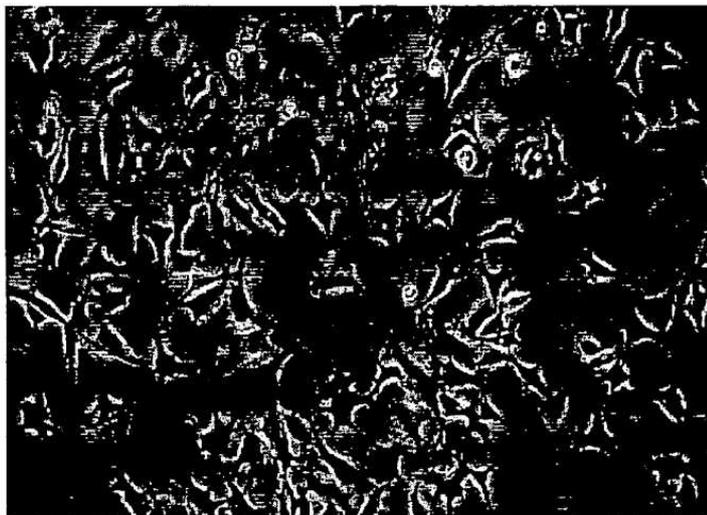
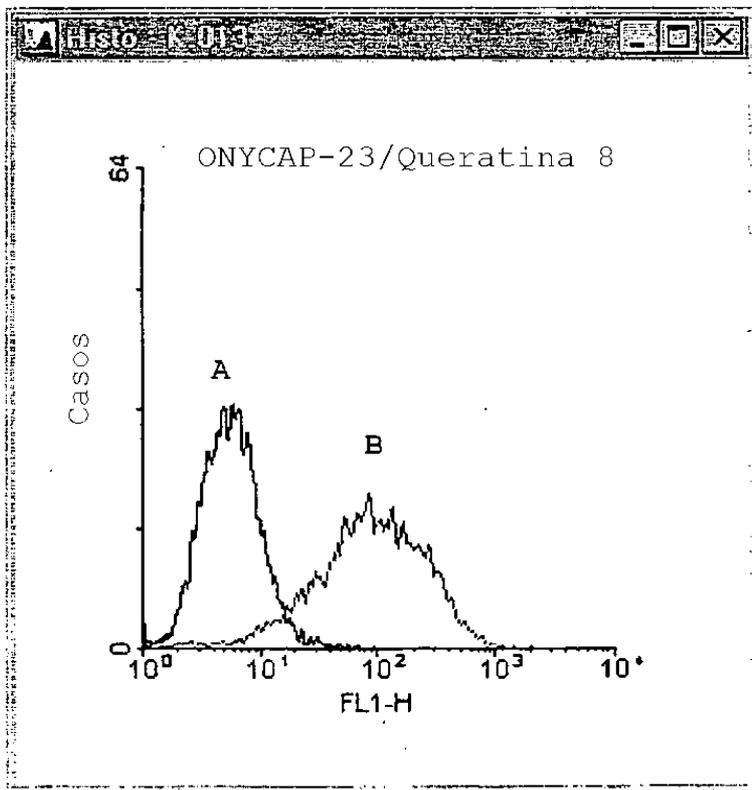
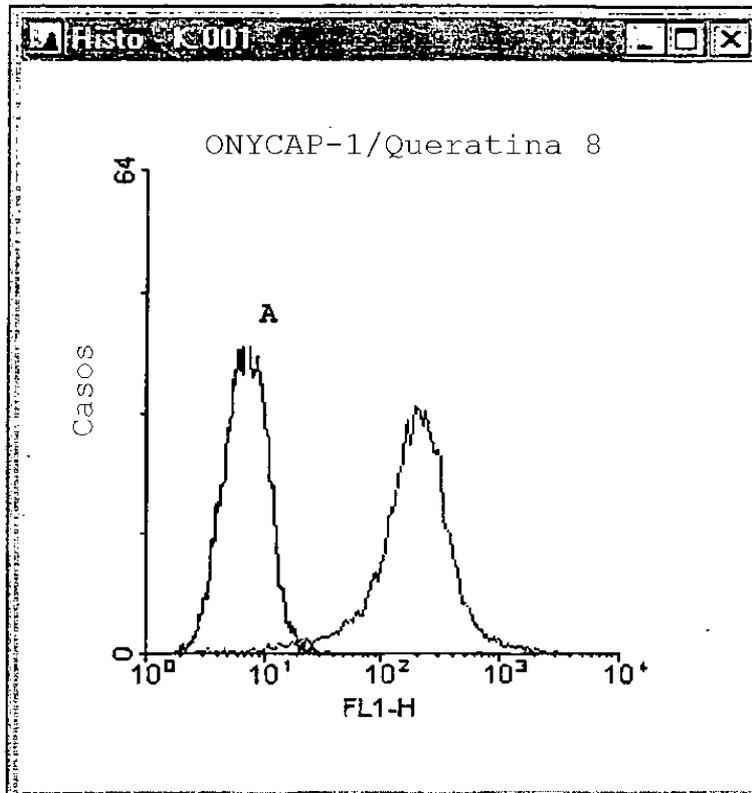
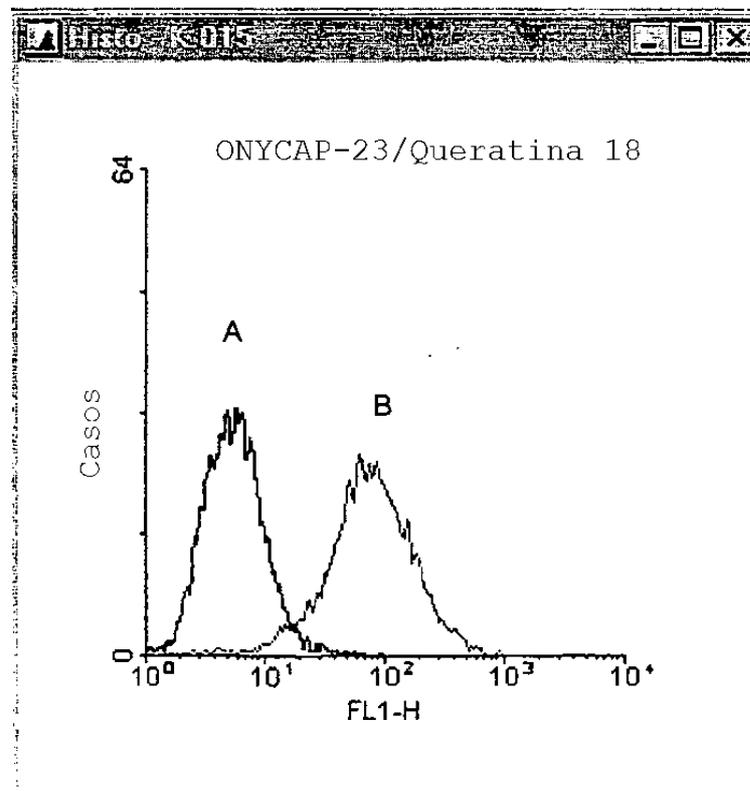
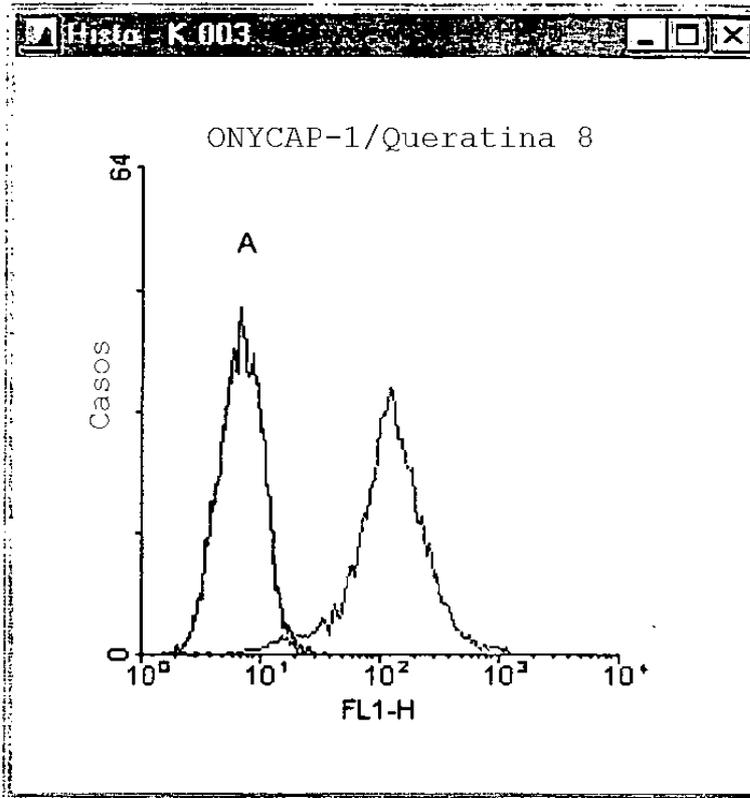


Figura 2A



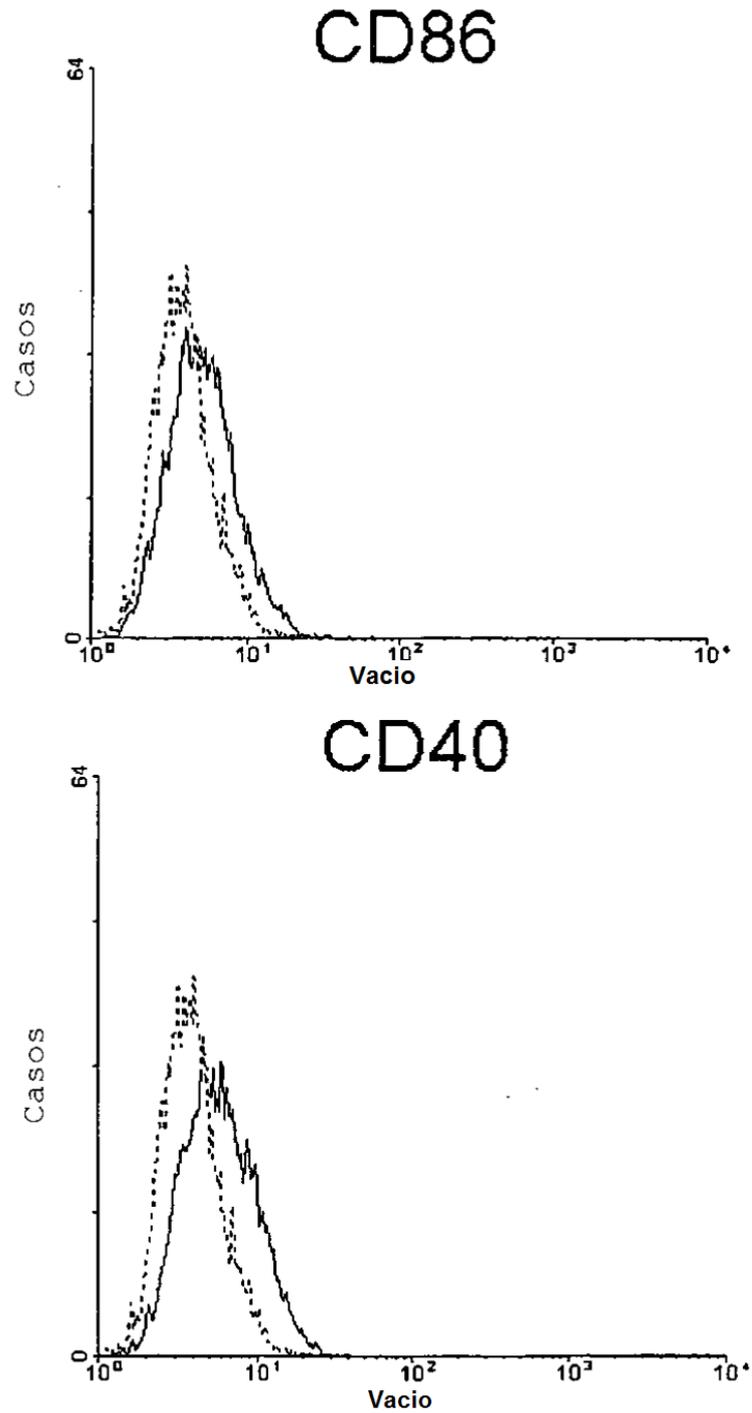
A = Gráfico del control de isotipo  
B = Tinción específica de anticuerpos

Figura 2B



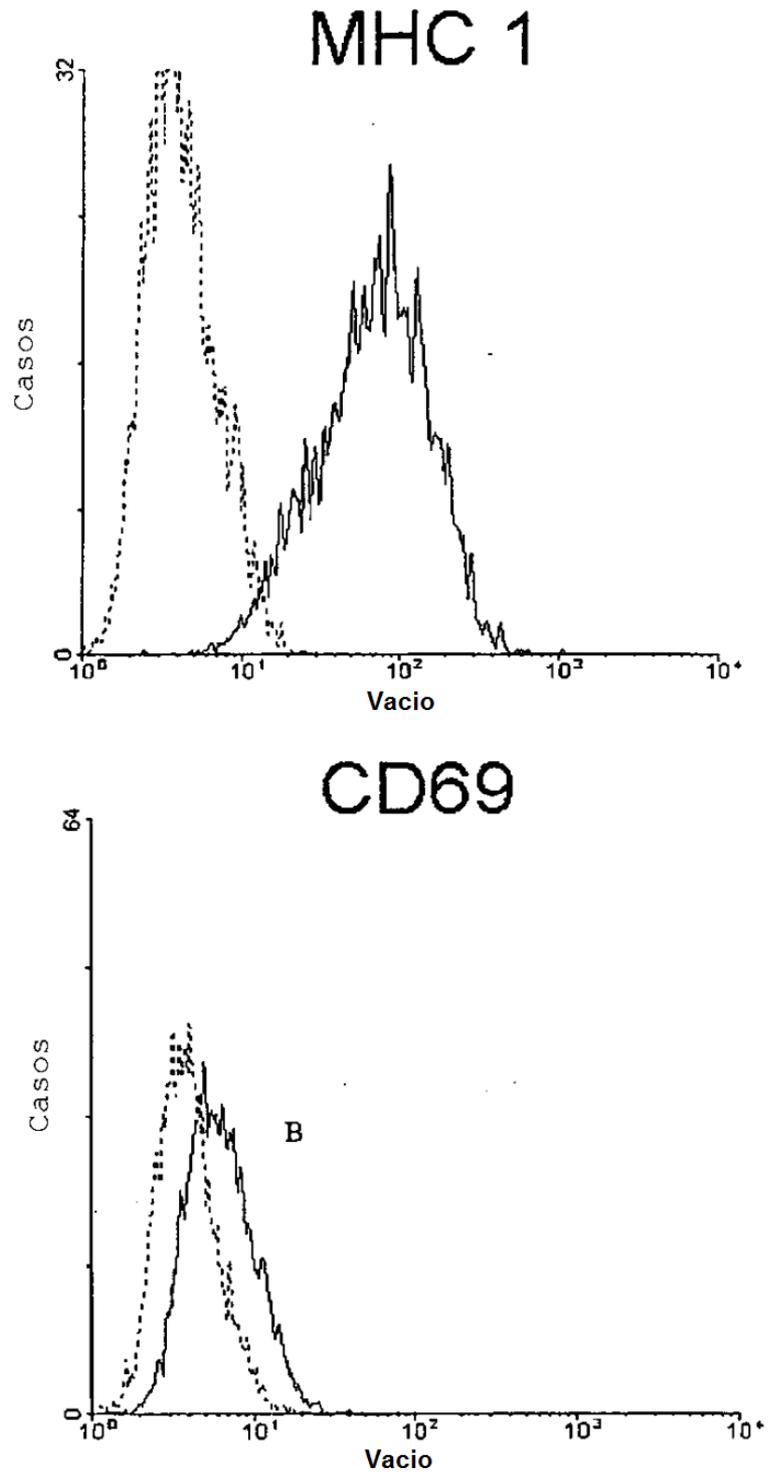
A = Gráfico del control de isotipo  
B = Tinción específica de anticuerpos

Figura 3Ai: Onycapl



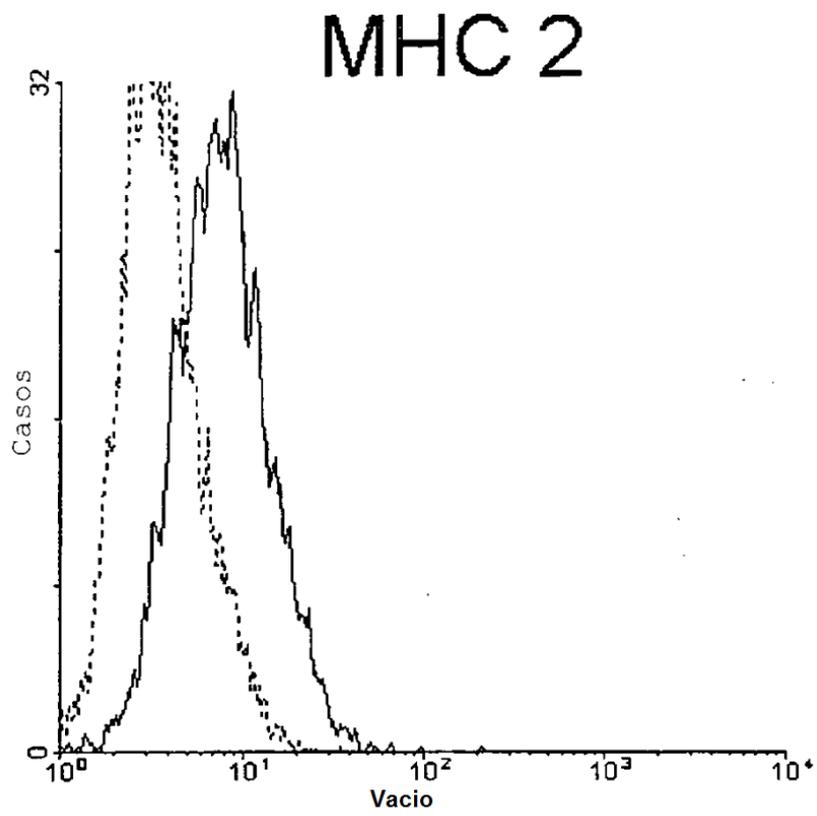
A = Gráfico del control de isotipo  
B = Tinción específica de anticuerpos

Figura 3Aii:



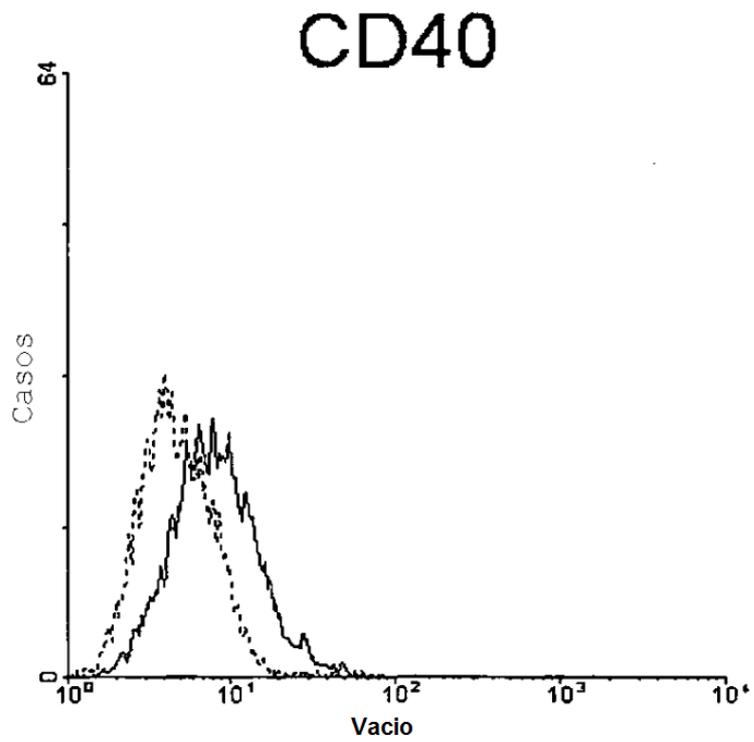
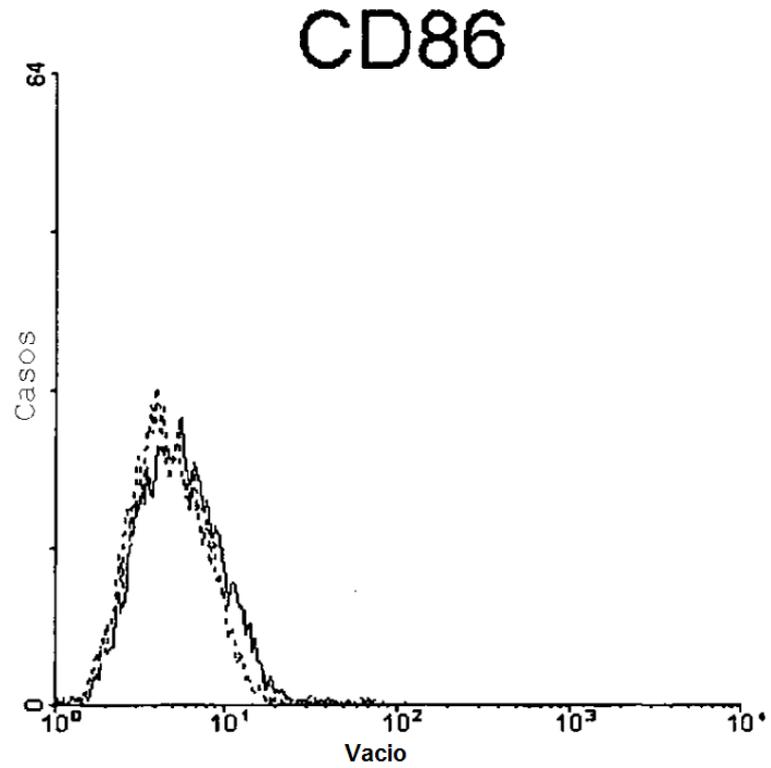
A = Gráfico del control de isotipo  
B = Tinción específica de anticuerpos

Figura 3Aiii:



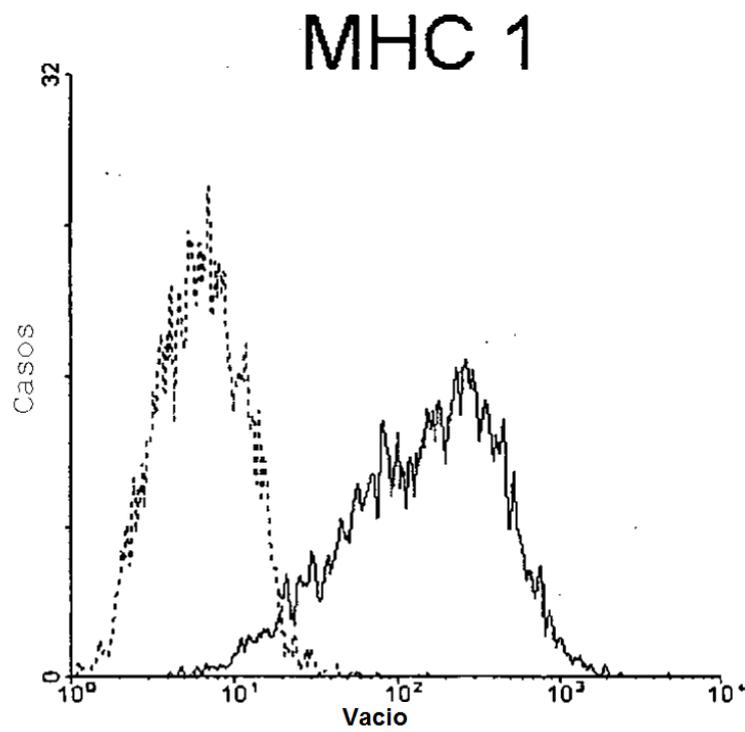
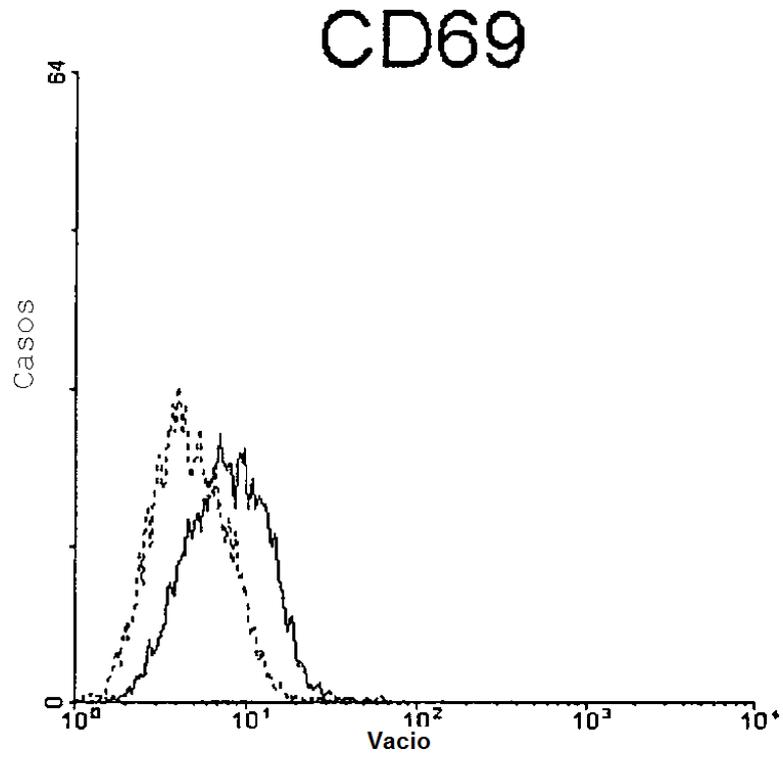
A = Gráfico del control de isotipo  
B = Tinción específica de anticuerpos

Figura 3Bi: Onicap 23



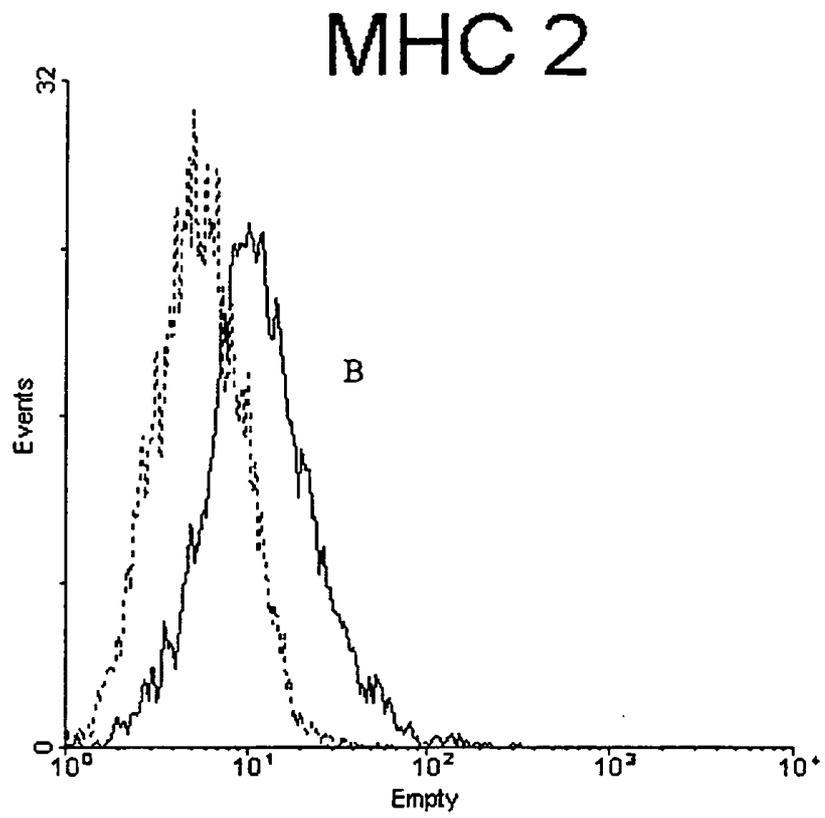
A = Gráfico del control de isotipo  
B = Tinción específica de anticuerpos

Figura 3Bii



A = Gráfico del control de isotipo  
B = Tinción específica de anticuerpos

Figure 3Biii



- A = Isotype control plot
- B = Specific antibody staining

Figura 4

