

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 713**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0784 (2010.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08701232 .4**
96 Fecha de presentación: **03.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2102331**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.2009**

54 Título: **VACUNA ANTITUMORAL DERIVADA DE CELULAS CD4+ NORMALES MODIFICADAS QUÍMICAMENTE.**

30 Prioridad:
03.01.2007 GB 0700058

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.01.2012

73 Titular/es:
CytoVac A/S
SCION-DTU Forskerparken Venlighedsvej 6
2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:
KIRKIN, Alexei y
DZHANDZHUGAZYAN, Karine

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 372 713 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna antitumoral derivada de células CD4+ normales modificadas químicamente

Campo de la invención

5 La invención se refiere principalmente a composiciones adecuadas para inducir respuestas inmunes contra tumores malignos; por lo tanto, las composiciones pueden usarse como vacuna o para generar células citotóxicas para una inmunoterapia adoptiva. Más particularmente, la invención se refiere a la preparación de una vacuna antitumoral celular basada en el uso de solamente células normales del sistema inmune.

Antecedentes de la invención

10 Los cánceres avanzados representan una de las causas principales de muerte en seres humanos, pero no se han sugerido hasta ahora procedimientos de tratamiento totalmente eficaces. Las inmunoterapias basadas en células representan el procedimiento no tóxico más prometedor de tratamiento del cáncer. La inmunoterapia del cáncer tiene como objetivo destruir las células tumorales por mecanismos inmunológicos. Puede usarse como un único tratamiento, o como un adyuvante para otros tipos de terapias tales como, por ejemplo, cirugía, irradiación y quimioterapia. La estrategia se basa en la manipulación *ex vivo* y la reintroducción de productos celulares para evitar
15 inmunocompetencias con el fin de inducir respuestas inmunes específicas de tumores. Por lo tanto, el objetivo final de dichas inmunoterapias basadas en células es la inducción de células efectoras específicas de tumores y los avances recientes se han centrado en linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) capaces de reconocer y destruir células tumorales. Es importante que estos CTL deberían ser capaces de sobrevivir durante un tiempo prolongado en el organismo en forma de células de memoria que puedan reactivarse y expandirse rápidamente tras la reaparición de células tumorales en el organismo.

20 La posibilidad de emplear el sistema inmune para atacar células cancerosas viene del hecho de que las células cancerosas contienen nuevas proteínas o sobreexpresan las proteínas existentes que pueden convertirse en dianas para el ataque inmunológico. Se han identificado un número significativo de antígenos asociados a tumores reconocidos por dichos CTL desde la descripción del primer antígeno tumoral humano MAGE-1 en 1991 por el grupo de T. Boon (Novellino y col., 2005). Actualmente hay tres grupos principales de antígenos tumorales bajo investigación intensiva como posibles dianas para una inmunoterapia activa: (i) antígenos de diferenciación tales como MART-1, gp100 y tirosinasa para melanomas, y PSA y PSMA para el cáncer de próstata; (ii) antígenos sobreexpresados tales como telomerasa y survivina y (iii) antígenos de cáncer/testículo (CTA) tales como MAGE, GAGE, NY-ESO-1 y BORIS.

30 Desde el punto del direccionamiento específico de respuestas inmunes a células tumorales, los de mayor perspectiva son los CTA, ya que no se expresan en células normales excepto en células germinales del testículo que no son reconocidas por el sistema inmune (las células germinales carecen de expresión de moléculas de histocompatibilidad) (véanse las revisiones sobre CTA: (Kirkin y col., 2002; Zendman y col., 2003)). Se demostró que la activación de CTA en células tumorales es debida a la desmetilación del promotor en regiones de CpG y es una consecuencia de un procedimiento de desmetilación de todo el genoma que se produce en muchos cánceres, y se correlaciona con progresión tumoral (De Smet y col., 1996). De hecho, se demostró que la expresión de CTA estaba asociada con progresión tumoral (Brasseur y col., 1995; Eura y col., 1995; Katano y col., 1997; Patard y col., 1995). Los potenciales terapéuticos de este grupo de antígenos tumorales se han confirmado por varios estudios. Por ejemplo, (a) un paciente con melanoma MZ-2 con metástasis que se sometió a múltiples vacunaciones con células tumorales autólogas destruidas conduciendo al desarrollo de respuestas de CTL contra varios CTA (MAGE-1, MAGE-3, GAGE y BAGE, véase la revisión (van Pel y col., 1995)) experimentó un periodo sin enfermedad de larga duración (P. Coulie, comunicación personal); (b) la vacunación de pacientes con melanoma con células dendríticas cargadas con péptido de MAGE-A3 indujo la regresión de metástasis positivas a antígeno (Thurner y col., 1999a); y (c) la eficacia terapéutica de una vacuna polivalente estaba correlacionada con la inducción de una respuesta inmune contra el antígeno MAGE-3 (Reynolds y col., 2003). No obstante, debido a la elevada heterogeneidad en la expresión de miembros de CTA separados, este grupo de antígenos no es popular como diana inmunológica en comparación con antígenos de diferenciación o sobreexpresados.

50 Para superar el problema con la expresión heterogénea de CTA, las vacunas que se dirigen a estos antígenos deberían ser tan polivalentes como fuera posible. La solicitud de patente WO 03/045427 describe una vacuna polivalente que se dirige a CTA de este tipo que está basada en una línea celular de melanoma humano preseleccionada que expresa altos niveles de CTA y que no expresa antígenos de diferenciación de melanocitos. Todas las demás vacunas basadas en células tumorales emplean tumores autólogos, o líneas celulares convencionales seleccionadas basándose en el principio de que "cuantos más antígenos tumorales diferentes mejor". El empleo de células tumorales autólogas en una vacuna como fuente de antígenos puede inducir en algunos casos la regresión del tumor, cuando se aplica en forma de vacunación basada en células dendríticas (O'Rourke y col., 2003; Marshall y col., 2006). La limitación principal de la estrategia de vacuna polivalente es la dificultad en la producción y normalización de la mezcla antigénica. El uso directo de material de biopsia original carece de normalización y además también con frecuencia dicho material no está disponible. El uso de líneas celulares convencionales no ha demostrado una alta eficacia clínica hasta ahora (Palucka y col., 2006; Salcedo y

col., 2005).

Una de las razones para la baja eficacia de uso de material de célula tumoral completa es la baja eficacia de presentación cruzada. Para estimular la generación de las células T citotóxicas, los antígenos proteicos tumorales exógenos tienen que captarse por células presentadoras de antígeno a través del proceso de endocitosis y después transferirse de las vesículas endocíticas al citosol (véase la revisión (Cresswell y col., 2005)). Esto es necesario para el procesamiento de antígenos proteicos y la formación de péptidos antigénicos. Más adelante, los péptidos se presentan en la superficie en asociación con moléculas de MHC clase I. Sólo una pequeña porción de los antígenos añadidos exógenamente entra en la célula y sólo una pequeña fracción de la proteína captada después de eso se somete a presentación cruzada. Para superar la baja eficacia de presentación cruzada, varios autores sugirieron el uso de ARN aislado de células tumorales para la transfección de células presentadoras de antígenos (Gilboa y Vieweg, 2004; Schaft y col., 2005; Kyte y col., 2006). El factor limitante principal de la transfección con ARN es la ausencia de formación de complejos de péptidos antigénicos y moléculas de MHC clase II que es necesaria para la inducción de una respuesta auxiliar T. Sin respuesta auxiliar T no está teniendo lugar ninguna formación de memoria inmunológica CD8+ (Bevan, 2004; Castellino y Germain, 2006), y sin formación de memoria, los CTL CD8+ mueren después de la expansión inicial. Además, en condiciones de crecimiento tumoral, la formación de una respuesta de memoria de CD8+ puede estar corrompida debido a la presencia de células reguladoras (Klebanoff y col., 2006).

Se ha sabido que la 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-CdR) induce la expresión de antígenos de cáncer/testículo principalmente en células tumorales (Weber y col., 1994). Además, se demostró previamente por un grupo (De Smet y col., 1996) pero no por otro (Weber y col., 1994) que la 5-Aza-CdR también podría inducir la expresión de al menos uno de CTA, MAGE-A1, en linfocitos de sangre periférica activados con PHA.

Esta técnica se usa en la solicitud de patente WO 03/012086 como parte de un procedimiento de generación de células presentadoras de antígeno que comprende recoger células de un sujeto, activar las células con agentes tales como mitógeno de hierba carmín (PWM) y fitohemaglutinina (PHA), cultivar las células activadas *ex vivo*, y tratar las células cultivadas con agentes de hipometilación del ADN de modo que las células expresen múltiples antígenos asociados a tumores (CTA). Los CTA producidos de este modo se proponen para su uso como vacunas contra el cáncer. Sin embargo, una cuestión principal en este procedimiento es el uso de agentes extraños tales como mitógeno de hierba carmín (PWM) y fitohemaglutinina (PHA) para la activación de las células.

Todavía existe un requisito sin cumplir para el desarrollo de una vacuna basada en células eficaz que sea capaz de superar estos problemas e inducir una respuesta inmune antitumoral mediada por CTL productiva y duradera.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar composiciones de presentación de antígenos mediante un tratamiento químico en el que se usan solamente células normales y no se usan agentes extraños para activar las células.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se incluya en las reivindicaciones se proporciona como información únicamente.

En su aspecto más amplio, la presente invención proporciona una composición para inducir una respuesta inmune en un mamífero, que comprende células linfoides en las que la expresión de antígenos tumorales se ha inducido químicamente después de la activación con células dendríticas maduras.

La presente invención usa solamente células normales, es decir, células linfoides y células dendríticas no adulteradas según se aíslan de fluidos corporales, excluyendo por lo tanto las células que se han tratado con cualquier agente extraño tal como activadores derivados de plantas, por ejemplo, PWM y PHA. Además, la presente invención no emplea preparaciones de antígenos tumorales, ya sean sintéticos o aislados de células tumorales. Como resultado, la preparación y la aprobación reglamentaria de una vacuna es mucho más fácil y segura. Preferentemente, se usan las células del propio paciente.

Los antígenos tumorales se inducen en células linfoides (normales) en proliferación, especialmente durante la fase logarítmica de proliferación. La proliferación de las células linfoides normales se estimula por células dendríticas maduras (normales).

Más convenientemente, las células linfoides son linfocitos, especialmente linfocitos de sangre periférica.

Preferentemente, los antígenos tumorales son antígenos de cáncer/testículo (CTA), que pueden inducirse químicamente por desmetilación del ADN, por ejemplo, por tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina. Un procedimiento alternativo es que los antígenos tumorales se inducen químicamente por acetilación de histonas, por ejemplo, por tratamiento con inhibidores de la histona desacetilasa tales como tricostatina (TSA).

Los antígenos de cáncer/testículo se expresan en una amplia variedad de tumores, de modo que la composición de la invención es capaz de generar una respuesta inmune que es eficaz contra una amplia variedad de tumores, a pesar del hecho de que se obtiene de células normales.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de la composición para estimular una respuesta inmune contra los antígenos tumorales, es decir, para la preparación de una vacuna antitumoral. La vacuna puede usarse profilácticamente o para el tratamiento directo de tumores existentes.

5 La invención proporciona el uso de la composición como células presentadoras de antígeno para la activación *in vitro* de linfocitos T citotóxicos, por ejemplo, en inmunoterapia adoptiva de células T.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de tumor que comprende la activación de linfocitos T usando la composición como células presentadoras de antígeno. La expansión de las células citotóxicas se induce preferentemente por células dendríticas activas (normales). El procedimiento puede llevarse a cabo *in vivo* como procedimiento terapéutico o *in vitro*, seguido del uso de las células T en inmunoterapia adoptiva de células T.

10

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** ilustra el fenotipo de células dendríticas maduras.

La **Figura 2** ilustra el fenotipo de un cultivo en proliferación de linfocitos obtenido después del cultivo con células dendríticas maduras autólogas.

15 La **Figura 3** ilustra la expresión de antígenos del grupo de MAGE-A en linfocitos intactos y tratados con 5-Aza-CdR, así como en células tumorales según se detectó por análisis de RT-PCR.

La **Figura 4** ilustra la expresión de antígenos NY-ESO-1, GAGE-3-7 y BORIS en linfocitos intactos y tratados con 5-Aza-CdR, así como en células tumorales según se detectó por análisis de RT-PCR.

20 La **Figura 5** ilustra la expresión de proteína del grupo de MAGE en linfocitos intactos y tratados con 5-Aza-CdR, así como en células tumorales según se detectó por análisis de ELISA basado en células.

La **Figura 6** ilustra el fenotipo de linfocitos después de la estimulación primaria con linfocitos autólogos tratados con 5-Aza-CdR.

La **Figura 7** ilustra el fenotipo de células CD8+ aisladas.

25 La **Figura 8** ilustra la producción de IFN-gamma después de la incubación de linfocitos CD8+ aislados de cultivos primarios con diferentes células diana tumorales.

La **Figura 9** ilustra microscópicamente la destrucción detectada de diferentes células diana por linfocitos CD8+ aislados de cultivo primario.

La **Figura 10** ilustra la producción de IFN-gamma después de la incubación de linfocitos inmunes cultivados a largo plazo con diferentes células diana.

30 **Descripción detallada de la invención**

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se incluya dentro de las reivindicaciones se proporciona únicamente como información. La presente invención tiene como objetivo proporcionar una respuesta inmune eficaz por procedimientos en los que las células presentadoras de antígeno son células normales en las que la expresión de antígenos asociados a tumores se ha inducido químicamente, y también que están enriquecidas en células CD4+, y por tanto son capaces de estimular directamente linfocitos T citotóxicos y proporcionar una ayuda mediada por CD4+ que es vital para la formación de la memoria inmunológica. Estas células presentadoras de antígeno pueden usarse como vacuna basada en células para la estimulación *in vivo* de una respuesta inmune o en la terapia adoptiva de células T, en la que se estimulan linfocitos T citotóxicos *in vitro*.

35

40 La invención se basa en el descubrimiento de que las células linfoides normales pueden inducirse para que proliferen por células dendríticas maduras, y que durante la proliferación pueden inducirse por tratamiento químico para que expresen antígenos tumorales, tales como antígenos de cáncer/testículo, dando como resultado una composición que contiene células CD4+, y por tanto que es capaz de presentar antígenos tumorales a células T para generar células CD8+ citotóxicas, algunas de las cuales incluyen marcadores de células de memoria CD62L.

45 Las células linfoides normales son más convenientemente linfocitos, especialmente linfocitos de sangre periférica, que pueden inducirse por tratamiento con agentes de desmetilación del ADN para que expresen antígenos de cáncer/testículo.

Por consiguiente, mediante el uso de aspectos preferidos de la invención es posible proponer diversas rutas de tratamiento del cáncer, tales como:

50 un procedimiento de tratamiento de cáncer por estimulación de una respuesta inmune contra tumores, que

comprende:

5 estimular la proliferación de células linfoides por células dendríticas maduras, tratar las células linfoides en proliferación para inducir la expresión de antígenos de cáncer/testículo, obteniendo de este modo una composición de presentación de antígenos que incluye linfocitos enriquecidos en células CD4+, y administrar la composición de presentación de antígeno a un paciente con cáncer para estimular una respuesta inmune contra los antígenos de cáncer/testículo; o como alternativa un procedimiento de tratamiento del cáncer por terapia adoptiva de células T, que comprende:

10 estimular la proliferación de células linfoides por células dendríticas maduras, tratar las células linfoides en proliferación para inducir la expresión de antígenos de cáncer/testículo, obteniendo de este modo una composición de presentación de antígeno que contiene linfocitos normales enriquecidos en células CD4+,
 15 usar la composición de presentación de antígeno para activar linfocitos de células T *ex vivo* que pueden expandirse para obtener una composición citotóxica que contiene linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de tumor con marcadores de células de memoria CD62L, y administrar la composición citotóxica a un paciente con cáncer.

La expansión de la composición citotóxica también se consigue convenientemente usando células dendríticas maduras normales para estimular la proliferación.

20 Más convenientemente, las células linfoides son linfocitos de sangre periférica extraídos de sangre autóloga o heteróloga.

En su aplicación práctica preferida, la presente invención comprende los procedimientos siguientes:

A aislamiento de linfocitos de sangre periférica;
 generación de células dendríticas maduras a partir de monocitos;

25 B estimulación de los linfocitos por las células dendríticas maduras conduciendo a la proliferación preferente de células CD4+;
 tratamiento de los linfocitos activados con agentes químicos conduciendo a la inducción de la expresión de antígenos de cáncer/testículo;
 y

30 C preparación de una vacuna a partir de linfocitos activados y tratados; uso de vacunas como tratamiento profiláctico o tratamiento directo de tumores;
 o

D generación de linfocitos citotóxicos por cocultivo de linfocitos con linfocitos activados y tratados;
 expansión de linfocitos citotóxicos en presencia de células dendríticas como células alimentadoras;
 uso de linfocitos citotóxicos para el tratamiento de tumores por inmunoterapia adoptiva.

35 Aunque la invención se ha descrito con referencia al tratamiento del cáncer en seres humanos, los procedimientos de la invención también son aplicables a la medicina veterinaria para generar materiales para el tratamiento de tumores en mamíferos no humanos.

La invención se entenderá más completamente considerando la metodología adoptada por los presentes inventores en el desarrollo de los descubrimientos anteriores, como sigue a continuación.

40 La diferencia principal entre la vacuna basada en células descrita en la presente invención y otras vacunas existentes diseñadas para inducir una inmunidad antitumoral es que los procedimientos de la presente invención no emplean ninguna preparación de antígenos tumorales, ya sean sintéticos o aislados de células tumorales. En esta nueva vacuna, los antígenos tumorales se inducen endógenamente en células presentadoras de antígeno en proliferación del sistema inmune por tratamiento químico. De este modo, la respuesta inmune con formación de CTL
 45 específicos de antígeno tumoral se inicia sin la necesidad de captación de antígeno y presentación cruzada. El problema con la inducción de la respuesta auxiliar T se resuelve mediante el empleo de células auxiliares T activadas (linfocitos CD4+) que funcionan tanto como células presentadoras de antígeno como para proporcionar ayuda a las células CD8+ específicas de antígeno. Usando esta estrategia es posible inducir la expresión de un amplio espectro de antígenos de cáncer/testículo asociados a tumores en células CD4+ en proliferación, y estas
 50 células son capaces de estimular la formación de linfocitos T citotóxicos que reconozcan un amplio espectro de células tumorales. Las células CTL inmunes inducidas de este modo tienen algunas características de células de memoria.

La primera tarea abordada por los presentes inventores era cómo generar un cultivo de linfocitos en proliferación enriquecidos en células T CD4+. Es bien sabido que el mejor modo de generar células auxiliares T específicas de antígeno es emplear células dendríticas maduras cargadas con el antígeno (Jonuleit y col., 2001; De Vries y col.,
 55

2003). Sin embargo, los presentes inventores mezclaron células dendríticas maduras no cargadas con antígeno con una fracción no adherente de linfocitos y descubrieron que, después de 7-8 días de incubación, había una proliferación intensiva de linfocitos. Los cultivos en proliferación eran principalmente linfocitos T enriquecidos en linfocitos CD4+.

5 Habiendo desarrollado un procedimiento de generación de cultivos de linfocitos en proliferación, los presentes inventores intentaron inducir la expresión de antígenos de cáncer/testículo en estos cultivos. Se ha sabido que la 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-CdR) induce la expresión de antígenos de cáncer/testículo principalmente en células tumorales (Weber y col., 1994). Además, se demostró previamente por un grupo (De Smet y col., 1996) pero no por otro (Weber y col., 1994) que la 5-Aza-CdR también podría inducir la expresión de al menos uno de CTA, MAGE-A1, 10 en linfocitos de sangre periférica activados con PHA. Se acepta en general que es mucho más difícil inducir la expresión de CTA en células normales en comparación con células cancerosas (De Smet y col., 1996; Weber y col., 1994), o que estos antígenos no son inducibles por 5-Aza-CdR en células normales (Karpf y col., 2004). No obstante, después de optimizar las condiciones para el cultivo de linfocitos y su tratamiento, los presentes inventores eran capaces de inducir todos los antígenos de cáncer/testículo que habían seleccionado como los expresados más comúnmente en tumores, en concreto los CTA: MAGE- A1, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE- 15 A12, GAGE-3-7, NY-ESO-1 y BORIS.

Habiendo obtenido la expresión de un amplio espectro de CTA, que se parecía a su expresión en células de cáncer en progresión, se realizaron experimentos sobre la inducción de una respuesta de CTL. Todos los experimentos se realizaron usando linfocitos de donantes sanos HLA-A2+, ya que en este caso es posible usar células tumorales 20 positivas para HLA-A2 para la detección de una respuesta antitumoral de CTL. Se usaron linfocitos tratados con 5-Aza-CdR como estimuladores sin tratamiento con irradiación o mitomicina C, ya que su propia capacidad proliferativa estaba prácticamente ausente al final del periodo de tratamiento con 5-Aza-CdR. La fracción de linfocitos no adherentes, que se mantuvo congelada después del aislamiento de monocitos, se mezcló con linfocitos tratados con 5-Aza-CdR y se incubó durante 9 días. Se añadió IL-2 el día 2. Al final de este periodo de cultivo había 25 una proliferación intensiva de linfocitos. El análisis de FACS de cultivos en proliferación indicó que la proporción de linfocitos CD8+ superaba la proporción de células CD4+ en de 2 a 5 veces, y que la mitad de las células CD8+ estaban expresando el marcador CD62L de células de memoria centrales.

También había un número significativo de células asesinas naturales (NK) que no son poco comunes para cultivos celulares después de la estimulación primaria. Por lo tanto, para detectar la actividad lítica de sólo los CTL CD8+ 30 generados, se aislaron las células CD8+. Se realizaron mediciones de la actividad citotóxica usando un panel de líneas celulares tumorales tanto positivas como negativas para antígenos HLA-A2. La actividad citotóxica de células al final del ciclo de estimulación era reducida, pero aumentaba significativamente después de la incubación de las células en presencia de IL-2 durante 24 horas. La lisis mostraba restricción a HLA-A2, indicando una lisis mediada por CTL, y no lisis mediada por NK.

35 Por lo tanto, puede concluirse que los presentes inventores han desarrollado una nueva composición de células presentadoras de antígeno para la inducción de una respuesta de linfocitos T citotóxicos con una amplia especificidad antitumoral y características de respuesta de memoria. Esta composición puede emplearse para la vacunación directa de pacientes con cáncer, o para la generación y expansión *in vitro* de linfocitos T citotóxicos para inmunoterapia adoptiva.

40 Para el tratamiento químico de las células linfoides normales, se prefiere la desmetilación del ADN con 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-CdR). Otros reactivos que pueden usarse para la desmetilación del ADN son 5-azacitidina, 5-fluoro-2'-desoxicitidina y zebularina, que también es un análogo de citidina. La zebularina puede producir un efecto similar a la 5-Aza-CdR (Chong y col., 2003). También hay algunos agentes de desmetilación no nucleosídicos pero su efecto es más débil que el de la 5-Aza-CdR para desencadenar, por ejemplo, la expresión de MAGE-1 en células 45 tumorales (Chong y col., 2005).

Un tratamiento químico alternativo para inducir antígenos es la acetilación de histonas, que puede conseguirse usando inhibidores de la histona desacetilasa. La usada más comúnmente y mejor estudiada es la Tricostatina A (TSA). Puede inducir una débil expresión de algunas proteínas, incluyendo antígenos de cáncer/testículo, pero el espectro de estos antígenos puede no coincidir completamente con los expresados mediante 5-Aza-CdR). Si se emplean juntos, estos reactivos pueden inducir una fuerte expresión de genes "silenciados" que pueden superar un efecto aditivo (Wlachnewski y col., 2006). Otro grupo de inhibidores de la histona desacetilasa son algunos 50 depsipéptidos que también pueden usarse en combinación con 5-Aza-CdR (Weiser y col., 2001).

El trabajo experimental de los inventores ha usado necesariamente en esta fase sangre de donantes normales. Cuando se autoricen para su uso con pacientes, las terapias ofrecidas por esta invención usarán normalmente 55 sangre de pacientes con cáncer. Sin embargo, el hecho de que la invención implique inducir antígenos en células normales señala la posibilidad de generar vacunas a partir de donantes normales para el tratamiento de pacientes con cáncer. En este caso será necesaria una selección muy cuidadosa de parejas de donante-receptor para disminuir la reacción específica de aloantígeno contra linfocitos de donante.

Además, el trabajo experimental ha usado células dendríticas obtenidas de las mismas muestras de sangre que los

linfocitos. El uso de células dendríticas que no sean de la misma persona sería mucho más conveniente, pero crea un problema de ensayo de seguridad de las células dendríticas de donante. Además, es posible que trazas de aloantígenos derivados de células dendríticas puedan adquirirse por linfocitos que, a su vez, puedan estimular una alo-respuesta además de la respuesta contra antígenos tumorales, conduciendo posiblemente a una disminución en la respuesta específica de tumor.

En el uso clínico de la invención, las composiciones pueden incluir adyuvantes convencionales según se desee o sea necesario. Por ejemplo, a veces se usan composiciones de presentación de antígenos junto con la inyección separada de IL-2, pero más frecuentemente como una composición celular en solitario. Las composiciones de linfocitos citotóxicos se usan habitualmente junto con la inyección de adyuvantes tales como IL-2. Además, la inyección de una composición de linfocitos citotóxicos está a veces precedida por quimioterapia (tal como una combinación de ciclofosfamida y fludarabina) conduciendo a una reducción linfocitaria. Para la inyección, las células se suspenden habitualmente en solución salina tamponada con fosfato complementada con albúmina de suero humano o plasma autólogo. Puede observarse información adicional sobre una formulación de administración en revisiones sobre la terapia adoptiva de células T, por ejemplo, (Gattinoni y col, 2006; Yee, 2005).

También pueden usarse interleucinas tales como IL-2 para aumentar la proliferación de linfocitos. Hay interleucinas opcionales y diferentes que podrían usarse. Por ejemplo, podría usarse IL-7 e IL-15 en lugar de IL-2. La generación de células dendríticas a partir de monocitos requiere habitualmente la presencia de citocinas, siendo GM-CSF la más preferida, aunque otras podrían sustituirse.

La práctica de la invención se ilustra adicionalmente en los Ejemplos experimentales siguientes.

Ejemplo 1

Generación de cultivos en proliferación de linfocitos enriquecidos en células CD4+

Para inducir la expresión de CTA en células presentadoras de antígenos mediante tratamiento químico (por ejemplo, con Aza-5-CdR), este cultivo debería estar en proliferación. Las células presentadoras de antígenos profesionales, células dendríticas, no proliferan en condiciones normales y, por lo tanto, los inventores estaban buscando otro tipo de células presentadoras de antígenos. Hay varios tipos de células presentadoras de antígenos que pueden estimular la activación específica de antígeno de linfocitos T CD8+. En particular, se ha demostrado que las células T auxiliares CD4+ activadas pueden emplearse como células presentadoras de antígenos (Naota y col., 2006; Kennedy y col., 2005). La ventaja adicional de células CD4+ como células presentadoras de antígenos es que son capaces de estimular la formación de células CD8+ de memoria (Kennedy y col., 2005). Por lo tanto, los presentes inventores decidieron primero optimizar la preparación de cultivos en proliferación de linfocitos enriquecidos en CD4+. En el ejemplo descrito a continuación se empleó con éxito la adición de células dendríticas maduras a cultivos de linfocitos aislados de sangre periférica.

La preparación de células dendríticas maduras se realizó de acuerdo con los procedimientos originales (Romani y col., 1994; Thurner y col., 1999b) en modificaciones. Los componentes de la capa leucoplaquetaria retirados de sangre donada se obtuvieron del Banco de Sangre local. Tras su llegada, las capas leucoplaquetarias se transfirieron al matraz con 60 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin Ca y sin Mg (DPBS, N° Producto BE17-512F, Cambrex, Bélgica), y se depositaron en capas aproximadamente 30 ml sobre 15 ml de Lymphoprep (N° Producto 1053980, AXIS-SHIELD PoC AS, Noruega) en tubos de 50 ml. Después de la centrifugación a 460 g, 30 min, 20°C, se recogió la capa superior que contenía plasma diluido (aproximadamente el 40%) para su uso posterior como aditivo al medio de cultivo y para la congelación de células. Después de la adición de heparina (25 UI/ml final), el plasma se centrifugó a 1500 g durante 15 min y se mantuvo congelado a -80°C hasta su uso. Se recogieron células mononucleares de la superficie de contacto del gradiente de Lymphoprep en 25 ml de DPBS-EDTA previamente enfriado (Cambrex) y se lavaron cuatro-cinco veces con DPBS-EDTA previamente enfriado por centrifugación primero a 250 g, después a 200 g, y después a 150 g, cada vez durante 12 min a 4°C. Después del último lavado, las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Cambrex) y se contaron usando el Coulter Counter, modelo Z2. La concentración de linfocitos y monocitos se determinó por selección de los picos de células correspondientes. La suspensión celular se congeló en alícuotas, cada una de las cuales contenía aproximadamente 10^7 monocitos y un número variable de linfocitos en el medio de congelación, que consistía en el 90% del plasma diluido y el 10% de DMSO. Las suspensiones celulares se pusieron en cajas de congelación (Nalgen) a -80°C y se almacenaron a esta temperatura durante hasta 6-9 meses. Todos los cultivos se establecieron a partir de las células mononucleares congeladas. La generación de células dendríticas se realizó en matraces de cultivo de tejido T25 pretratados con 5 ml de suero humano al 5% en medio RPMI 1640 durante al menos 30 min antes del experimento. Se descongeló 1 ampolla de las células mononucleares congeladas en un baño de agua (37°C), se diluyó inmediatamente 1 ml de suspensión celular en 13 ml de medio AIM-V previamente calentado (Gibco, Invitrogen). El medio de pretratamiento se retiró de los matraces y se sustituyó inmediatamente por 7 ml de suspensión celular. Después de 45 min de incubación a 37°C, se recogieron los linfocitos no adherentes, y los monocitos adherentes se aclararon dos veces con medio RPMI 1640 previamente calentado. Después de la adición de 5 ml de medio AIM-V que contenía plasma al 0,5% los matraces se pusieron en una incubadora de CO₂ a 37°C. Los linfocitos recogidos se centrifugaron y se resuspendieron en el medio de congelación que consistía en AIM-V (70%), suero humano (20%) y DMSO (10%) y se congelaron. Después de una incubación durante una noche (día 1),

se añadió GM-CSF e IL-4 (ambos de Gentaur, Bélgica) a las células a concentraciones finales de 100 ng/ml y 25 ng/ml. El día 3, se añadió 1 ml de AIM-V con el 0,5% de plasma junto con GM-CSF e IL-4 a concentraciones finales de 100 ng/ml y 25 ng/ml. El día 4, se añadió un cóctel de maduración que consistía en IL-1beta (10 ng/ml), IL-6 (1000 UI/ml), TNF-alfa (10 ng/ml) (todos de Gentaur) y PGE2 (Sigma) (1 ng/ml). El día 5 ó 6, se recogieron las células no adherentes, se contaron y se usaron para el experimento, o se congelaron en alícuotas de 10^6 células en el medio de congelación que consistía en AIM-V (70%), suero humano (20%) y DMSO (10%).

La pureza de las células dendríticas generadas superaba el 95%. El fenotipado de células dendríticas se realizó por tinción con los anticuerpos conjugados directos, HLA-DR,DP,DQ-FITC y CD86-PE (BD Biosciences, Dinamarca, N° cat. 555516 y 555558) y CD3-FITC (Beckman Coulter, Suecia, pn. IM1281). Los controles isotípicos recomendados se usaron para el fenotipado de las células. Las muestras de células se analizaron usando un Citómetro de Flujo FC500 MPL (Beckman Coulter) y el software analítico CXP (Beckman Coulter). El grado de maduración, definido por la proporción de células con altos niveles de expresión de la molécula coestimuladora CD86 y MHC clase II, superaba el 95%, como se muestra en la Figura 1.

Para la preparación de un cultivo de linfocitos en proliferación, se usó la propiedad conocida de las células dendríticas maduras de inducir la proliferación de linfocitos autólogos. El medio de linfocitos consistía en medio AIM-V (Gibco, Invitrogen) y el 5% de suero humano AB parcialmente deslipidado. La deslipidación se realizó de acuerdo con el procedimiento siguiente. Se descongeló suero humano, almacenado a -80°C , durante una noche en el frigorífico y sin mezclar se centrifugó a $3000 \times g$ durante 1 h a 4°C . El sobrenadante se fraccionó desde la parte inferior en tres porciones y se centrifugó de nuevo, como anteriormente. Las fracciones, comenzando por la parte inferior, se distribuyeron en nuevos tubos, y la capa lipídica flotante restante se desechó. Las fracciones se centrifugaron a $29500 \times g$ durante 1 h a 4°C . El líquido se recogió mediante una jeringa, de modo que el sedimento de proteína inactivada y la capa lipídica en la parte superior se dejaran en el tubo. Las fracciones combinadas se esterilizaron por filtración a través de un filtro de $0,2 \mu\text{m}$ y se almacenaron congeladas a -80°C en alícuotas. Las células dendríticas y los linfocitos no adherentes se descongelaron, se lavaron y se resuspendieron en medio de linfocitos y se dispensó 0,1 ml de suspensión celular que contenía 10^4 células dendríticas y $4-8 \times 10^4$ linfocitos en pocillos de una placa de 96 pocillos de cultivo de tejido de fondo en U. Los días 2 y 5, se añadieron 0,05 ml de medio de linfocitos que contenía interleucina 2 (se añadió una concentración final de IL-2 de 15 UI/ml a cada uno de los pocillos. El día 7 u 8, cuando los linfocitos alcanzaron una concentración de aproximadamente $10^6/\text{ml}$, las células se recogieron y se usaron en los experimentos sobre la inducción de la expresión de antígeno de cáncer/testículo (Ejemplo 2). El fenotipado de muestras de células se realizó por tinción con los anticuerpos conjugados directos, CD4-isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD8-ficoeritrina (PE), CD56-PE, CD3-FITC (BD Biosciences, Dinamarca, 555346, 555635, 555516 y Beckman Coulter, Suecia, IM1281). La caracterización fenotípica de las células realizada por análisis citométrico de flujo indicó un aumento en la proporción de células CD4+ en comparación con el cultivo original, como se muestra en la Figura 2.

Ejemplo 2

Inducción de la expresión de antígenos de cáncer/testículo en linfocitos en proliferación

En experimentos preliminares sobre la cinética y la dependencia de la concentración de Aza-5-CdR, se observó una inducción variable de la expresión de CTA en cultivos de linfocitos. Eran más fácilmente inducibles MAGE-A1, MAGE-A4 y MAGE-A12 (no se muestra). Para normalizar las condiciones de inducción, se comparó la inducción de CTA en linfocitos tomados de la fase logarítmica de crecimiento celular (habitualmente el día 7 u 8, cuando la concentración celular era de aproximadamente $10^6/\text{ml}$) con linfocitos tomados de la "meseta" (día 9 ó 10, cuando la concentración de linfocitos supera $2 \times 10^6/\text{ml}$). La población de linfocitos expandida a partir de sangre periférica en presencia de células dendríticas maduras autólogas se recogió, se lavó, se resuspendió a $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ en medio de cultivo de linfocitos que contenía $10 \mu\text{M}$ de 5-aza-2'-desoxicitidina (Sigma) y 150 UI/ml de IL-2 y se puso en los pocillos de una placa de cultivo de tejido de 24 pocillos en 2 ml por pocillo. Las células se incubaron durante 3 días, después de lo cual se recogieron y se contaron. Algunas células se usaron en cultivo con linfocitos autólogos (Ejemplo 3), aunque otras se congelaron en alícuotas como se describe en el Ejemplo 1 para linfocitos no adherentes. Aproximadamente 2×10^6 células se lavaron en DPBS y se congelaron como sedimento para el análisis de RT-PCR.

La expresión de antígenos individuales se detectó usando un análisis de RT-PCR que identificaba la expresión de ARN que codifica estas proteínas. Se centrifugaron 2×10^6 células, se desechó el sobrenadante y el sedimento se solubilizó en 0,3 ml de Solución de Lisis Celular (kit de aislamiento de ARN Purescript[®], Genra Systems, Minneapolis, MN). El ARN total se aisló de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se precipitó por adición de dos volúmenes de isopropanol al 100% sobre la solución de lisis, se lavó con etanol al 70% y se rehidrató en 10 μl de agua destilada sin ARNasa. El ARN aislado se trató mediante ADNasa usando los reactivos del kit sin ADN[™] (Ambion, Austin, TX). Se añadió 1 μl de tampón de ADNasa 10x y 1 μl de ADNasa (2 unidades) a la muestra, la mezcla se incubó durante 30 min a 37°C , y la reacción se terminó por adición de 2 μl de reactivo de inactivación de ADNasa. El ADNc se sintetizó usando hexámeros aleatorios, cebadores oligo(dT), kit de transcriptasa inversa de ARNasa H SuperScript III (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) y 10 μl de ARN en un volumen total de 20 μl de acuerdo con el protocolo del fabricante. La transcripción inversa (RT) se realizó a 50°C durante 60 min, seguida de 70°C durante 15 min. El ADNc sintetizado se diluyó 2 veces por adición de un volumen igual de DMSO al 10% en

agua destilada sin ARNasa. El perfil de expresión de MAGE-A1, -A3, -A4, -A6, -A10 y -A12, así como la expresión de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control positivo para determinar el rendimiento de la reacción y para determinar la integridad del ARN, se detectó por PCR usando los cebadores directo (con sentido) e inverso (antisentido) descritos antiguamente (De Plaen y col., 1994; thor Straten y col., 1997). Se usó 1/20 de ADNc en la amplificación por PCR en el medio que contenía KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, cresol 0,2 mM, sacarosa al 12%, DMSO al 0,5%, BSA al 0,05%, pH 8,6/25°C, 10 pmol de cada cebador, y durante el primer ciclo en el "inicio en caliente" se añadió 1,25 U de ADN polimerasa AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA) y 50 µM de concentración final de cada dNTP, volumen total de 30 µl. Los parámetros usados para la amplificación de MAGE y GAPDH eran: desnaturalización inicial de 95°C durante 2 min, primer ciclo de 95°C 30 s, 80°C 1-3 min para "inicio en caliente", 60°C 30 s y 72°C 40 s, seguido de 27-36 ciclos (94°C 30 s, 60°C 30 s y 72°C 1 min) y 10 min a 72°C de extensión final. Para la detección de NY-ESO-1, se amplificó un fragmento específico de 272 pb entre BLE73 y BLE71 en la estructura del gen (Lethe y col., 1998), y se detectó GAGE₃₋₇ por amplificación del fragmento específico VV1-VDE24, 244 pb (De Backer y col., 1999). Los parámetros de la reacción para NY-ESO-1 y GAGE₃₋₇ después del "inicio en caliente" eran: 32-36 ciclos de 95°C 30 s, 60°C 1 min, 72°C 2 min en el mismo medio que para los antígenos MAGE. Para la amplificación del fragmento específico de 1074 pb en BORIS humano, se usaron los cebadores seleccionados por (Vatolin y col., 2005). El medio y el primer ciclo eran los mismos que anteriormente excepto por 2 U de Taq polimerasa y dNTP 150 µM en la reacción, y el "inicio en caliente" seguido de 40-45 ciclos (94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 2 min) y la extensión final a 72°C durante 15 min. Todas las reacciones se realizaron en el termociclador GeneAmp^R PCR System 9700 (Applied Biosystems). Los controles negativos contenían alícuotas de agua en lugar de ADNc y, además, en algunos experimentos sobre la detección de NY-ESO-1 también se realizó una reacción (sin RT), en la que se usó una muestra de ARN después del tratamiento con ADNasa pero antes de la etapa de transcripción inversa en lugar de ADNc para excluir las bandas no originadas a partir de ADNc. Los productos de PCR se separaron junto con el marcador de pesos moleculares de 100 pb, presentando 100 pb y 800 pb como bandas más intensas (Amersham Pharmacia Biotech) por electroforesis a través de un gel de agarosa al 2% a 100 V, se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron bajo iluminación con UV y se registraron mediante un sistema de registro de imágenes.

Las Figuras 3 y 4 presentan datos sobre la inducción de la expresión de CTA en linfocitos tratados con 5-Aza-CdR. Por comparación, también se demuestra la expresión de antígenos de cáncer en líneas celulares tumorales usadas a continuación en el Ejemplo 3. En este experimento se comparó el tratamiento con 5-Aza-CdR de dos cultivos de linfocitos en proliferación: uno tomado de la fase logarítmica de crecimiento (día 8), y el otro tomado de la "meseta" (día 10), en la que la proliferación se detuvo debido a la elevada densidad celular. Como podía observarse, después de la dilución y del tratamiento mediante 5-Aza-CdR todos los antígenos investigados están presentes en los linfocitos inducidos, con una mayor expresión en cultivos tomados de la fase logarítmica de crecimiento en comparación con las células tomadas de la "meseta". Esto indica que para obtener la mayor inducción de la expresión de CTA, las células deberían tomarse durante la fase logarítmica de su crecimiento y su alta tasa de proliferación es significativa en la inducción de la expresión de CTA. El perfil de expresión de CTA resultante en dichos linfocitos abarca todos los antígenos ensayados y es incluso más amplio que el perfil en algunas células tumorales.

La expresión en las células tratadas con 5-Aza-CdR de un grupo de antígenos de cáncer/testículo, antígenos MAGE-A también a nivel de proteína, se confirmó mediante un ELISA basado en células. Se modificó un procedimiento original descrito para la cuantificación de gp100 (Erdile y col., 2001). Todas las células se lavaron dos veces en DPBS que contenía calcio y magnesio, y después del recuento se titularon a 2 veces y cada dilución se puso en 4 pocillos (dos para la unión total y dos para la unión inespecífica de Ac). Las células se centrifugaron a 1400 rpm durante 10 min, y se secaron, se permeabilizaron y se fijaron con metanol como en el procedimiento original. Para el bloqueo, se usó HS deslipidado que contenía azida sódica al 0,05% después de la dilución hasta el 10% mediante DPBS que contenía calcio y magnesio. Después del bloqueo a 4°C durante una noche, los pocillos se incubaron durante 1 h a 37°C y después durante 1 h a temperatura ambiente con anti-MAGE o con anticuerpos de control del mismo isotipo. Como anticuerpo anti-MAGE, se usó sobrenadante de hibridoma del clon 57B específico de MAGE de amplio espectro (proporcionado por cortesía del Dr. Spagnoli, Suiza), que detecta todos los antígenos MAGE enumerados anteriormente excepto el MAGE-A10 (Rimoldi y col., 2000). Se diluyó 10 veces en HS al 5%/azida-DPBS que contenía calcio y magnesio, y se añadió una concentración de IgG igual de Ac de control del mismo isotipo a los pocillos de control. A continuación, las células se incubaron durante 1,5 h a temperatura ambiente con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón biotinilado, seguido de estreptavidina-HRP durante 30 min a temperatura ambiente. (ambos de "Dako", diluidos en BSA al 1%-DPBS 500 y 1000 veces, respectivamente). Los pocillos se lavaron con Tween al 0,05%-DPBS entre etapas. Se usaron 100 µl de sustrato líquido de TMB, supersensible (Sigma) para la reacción enzimática de HRP, y la reacción se terminó por adición de un volumen igual de HCl 1 N. La absorbancia del producto soluble se midió a 450 nm con el filtro de referencia de 550 nm. La diferencia entre las lecturas para la unión total e inespecífica se representó como la densidad óptica específica (DO) en dependencia del número de células por pocillo.

Para la normalización de la expresión de proteínas MAGE por la cantidad de proteína total en cada muestra de las líneas celulares, la proteína se midió en presencia de Triton X-100 al 0,25% en las alícuotas de células lavadas con DPBS usando el kit de ensayo de proteína del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, Illinois) y BSA como patrón, de acuerdo con el procedimiento recomendado por el fabricante.

La Figura 5 ilustra los resultados del análisis de ELISA basado en células de la expresión de MAGE-A en linfocitos no tratados y tratados con 5-Aza-CdR, así como en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231. Como puede observarse, no se detecta expresión de proteína MAGE en linfocitos normales, mientras que los linfocitos tratados con 5-Aza-CdR expresan una cantidad significativa de proteína, demostrando la inducción de la expresión de antígenos MAGE no sólo en el ARN, sino también a nivel de proteína. El análisis comparativo de las curvas para células MDA-MB-231 y linfocitos tratados con 5-Aza-CdR muestra que el número absoluto de proteínas MAGE por célula es aproximadamente 40 veces mayor en células tumorales que en linfocitos. Por otro lado, las células MDA-MB-231 son significativamente más grandes, conteniendo 3,61 mg de proteína total por 10^7 células en comparación con 0,81 mg de proteína por 10^7 linfocitos (medida por el procedimiento de BCA que se ha descrito anteriormente). Por lo tanto, la fracción de MAGE en la proteína celular total entre la línea celular tumoral de alta expresión de MAGE en progresión MDA-MB-231 (Figura 3) y los linfocitos tratados con 5-Aza-CdR difiere en menos de 10 veces. Es notable que esta cantidad de proteínas MAGE se localiza intracelularmente (en el citosol), y ya dentro de células presentadoras de antígenos, evitando por lo tanto las etapas de baja eficacia de captación y presentación cruzada, que se supone que son críticas para la estimulación de una respuesta de CTL específicos de antígeno tumoral.

5 Ejemplo 3

Inducción de respuesta de células T citotóxicas contra linfocitos autólogos en proliferación enriquecidos en CD4 tratados con 5-Aza-CdR

Después de la inducción de CTA en linfocitos normales después del tratamiento con 5-Aza-CdR, estos linfocitos se emplearon para la generación de una respuesta inmune específica de tumor *in vitro*. Los cultivos tratados con 5-Aza-CdR se recogieron, se contaron y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 20×10^3 por pocillo junto con $20-40 \times 10^3$ de linfocitos autólogos no adherentes descongelados en 0,1 ml de medio de linfocitos. Después de 2 días de incubación, se añadieron 0,05 ml de medio de linfocitos complementado con 75 UI/ml de IL-2 a cada pocillo. La adición de 0,05 ml de medio de linfocitos solamente se repitió los días 5 y 7. El día 9, los cultivos se recogieron y se contaron y se usaron para el análisis de la respuesta inmune. El fenotipado de las células se realizó por tinción con los anticuerpos conjugados directos, CD4-isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD8-ficoeritrina (PE), CD56-PE, CD3-FITC y CD62L-cianuro de ficoeritrina 5 (PC5) (BD Biosciences, Dinamarca, 555346, 555635, 555516, Beckman Coulter, Suecia, IM1281, IM2655). Se usaron los controles isotópicos recomendados para el fenotipado de las células. Las muestras de células se analizaron usando un Citómetro de Flujo FC500 MPL (Beckman Coulter) y el software analítico CXP (Beckman Coulter). Los resultados del análisis de uno de dichos cultivos se presentan en la Figura 7. Como podía observarse, la proporción relativa de células CD8+ en comparación con células CD4+ ha aumentado significativamente como resultado de la estimulación, demostrando que estas condiciones de estimulación promueven la generación de células CD8+. Es especialmente reseñable el hecho de que una parte significativa de las células CD8+ generadas expresa CD62L, el marcador de células de memoria centrales (Sallusto y col., 2004). Por otro lado, hay un número significativo de células doblemente negativas, entre ellas células NK CD56+. Por lo tanto, para ensayar la actividad citotóxica de sólo las células CD8+ generadas, se aislaron usando un procedimiento convencional de Miltenyi Biotec, Alemania para la purificación de células T CD8. Las células se lavaron dos veces por adición de tampón DPBS frío (Cambrex, Dinamarca, BE02-017F) que contenía suero fetal de ternera al 0,5% (Cambrex, DE14-801 F) a la suspensión celular. Después de la eliminación del tampón, las células se marcaron magnéticamente con microperlas CD8 (Miltenyi Biotec, 130-045-201).

La suspensión celular se cargó en una columna que se puso en el campo magnético de un separador MACS. Las células positivas para CD8 marcadas magnéticamente se retuvieron en la columna. Las células no marcadas discurrieron a través y esta fracción celular presenta un número reducido de células positivas para CD8. Después de la retirada de la columna del campo magnético, las células positivas para CD8 retenidas magnéticamente se eluyeron como la fracción seleccionada positivamente.

La Figura 7 ilustra el fenotipo de las células aisladas positivamente, que muestra que la pureza de las células CD8+ aisladas es superior al 90%. Después del aislamiento, los linfocitos se lavaron intensamente, se resuspendieron en medio de cultivo complementado con 25 UI/ml de IL-2 y se pusieron en una placa de 24 pocillos. Después de la incubación durante una noche, los linfocitos se recogieron, se lavaron una vez, se resuspendieron a 1×10^6 /ml, y se añadieron a un panel de líneas celulares de cáncer de próstata y mama. Se usaron las líneas de células tumorales siguientes: líneas celulares de cáncer de próstata: LNCaP (HLA-A2+) y PC3 (HLA-A2-); líneas celulares de cáncer de mama: MCF-7 (HLA-A2+), MDA-MB-231 (HLA-A2+) y T47D (HLA-A2-). Se sembraron 25×10^3 células tumorales en una placa de 48 pocillos en 1 ml de medio RPMI-1640 con adición del 10% de FCS y se incubaron 2 días antes del ensayo. Antes de la adición de linfocitos, se eliminaron 0,5 ml de sobrenadante de cultivo y se añadieron 0,25 ml de la suspensión de linfocitos aislados que contenía $0,25 \times 10^6$ células a las células tumorales. Las células se cultivaron juntas durante 18-20 horas.

La actividad citotóxica de linfocitos aislados se determinó por detección de la producción de IFN-gamma en el sobrenadante de cultivo, así como por control microscópico de la desaparición de células tumorales. Para la determinación de IFN-gamma, se recogieron 0,35 ml de sobrenadante de cultivo y se mantuvo congelado (-20°C) hasta su análisis. La concentración de IFN-g en los sobrenadantes de cultivo se midió mediante un ELISA de tipo sándwich usando el kit "Ready-Set-Go" (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) que incluía Ac de captura, Ac de detección biotinilados convencionales y HRP-estreptavidina. El procedimiento se realizó esencialmente de

acuerdo con las recomendaciones del fabricante con las modificaciones siguientes: (1) después de la unión durante una noche de anticuerpos de captura a las placas de 96 pocillos Nunc Maxisorp y del lavado de las placas, la etapa de bloqueo se prolongó hasta al menos 3 h a temperatura ambiente; (2) la curva patrón se generó mediante siete diluciones seriadas del patrón, comenzando con 500 ó 1000 pg/ml de IFN-g, y los patrones y las muestras por triplicado se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h, seguido de incubación a 4°C durante una noche. Las etapas siguientes se realizaron de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Se usó una solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) del mismo kit en la reacción enzimática de HRP, y después de terminar la reacción, se midió la densidad óptica con corrección por longitud de onda como una diferencia entre las lecturas a 450 y 550 nm.

La Figura 8 muestra la liberación de IFN-gamma por linfocitos después de la incubación durante una noche con diferentes células tumorales. Se observa claramente que la liberación en presencia de las líneas celulares positivas para HLA-A2 LNCaP, MCF-7 y MDA-MB-231 es superior que la liberación en presencia de las líneas celulares negativas para HLA-A2 PC3 y T47D.

Se realizó un control microscópico de los cultivos mixtos usando un microscopio invertido equipado con la cámara digital. Se observó una disminución significativa en el número de células LNCaP y MDA-MB-231 después del contacto durante una noche con linfocitos inmunes (Figura 9), mientras que la desaparición de células MCF-7 requiere 2-3 días de incubación (no se muestra).

Cierta liberación de IFN-gamma después de la incubación con líneas celulares negativas para HLA-A2 observada en la Figura 8 puede estar mediada por células NK CD56+ que todavía estén presentes en la población de linfocitos enriquecidos en CD8+ (véase la Figura 7). Para imitar el desarrollo posterior en el organismo del paciente, en un ejemplo se recuperaron linfocitos después del contacto con células tumorales y se expandieron en presencia de células dendríticas e IL-2. Después de 3 semanas de expansión, uno de dichos cultivos, que mostraba una alta citotoxicidad contra líneas celulares tumorales HLA-A2+, producía IFN-gamma solamente de modo restringido a HLA-A2 (véase la Figura 10; obsérvese que en este experimento sólo se añadieron $0,062 \times 10^6$ linfocitos a cada pocillo con células tumorales). Estos datos indican que los linfocitos T citotóxicos específicos de tumor inducidos por linfocitos enriquecidos en CD4 tratados con 5-Aza-CdR no están dañados como resultado del contacto con células tumorales. Por el contrario, existe una proliferación selectiva de estos linfocitos que conduce al enriquecimiento de linfocitos citotóxicos específicos de tumor, reflejando el fenotipo de memoria de la respuesta inmune CD8+. Esta interpretación concuerda con la Figura 6 en el Ejemplo 2 que demostraba la presencia del marcador de memoria central CD62L en la mitad de las células CD8+ activadas, y demuestra que esta estrategia puede usarse para la inmunoterapia adoptiva.

Ejemplo 4. Aumento a escala de la producción de linfocitos citotóxicos para inmunoterapia adoptiva

El uso de linfocitos citotóxicos específicos de tumor generados *ex vivo* para inmunoterapia adoptiva requiere el establecimiento de un sistema de cultivo capaz de producir un gran número de células efectoras de una forma segura. El procedimiento descrito en el Ejemplo 3 emplea placas de 96 pocillos y de 24 pocillos que hacen que todo el procedimiento sea muy laborioso y esté sometido a un alto riesgo de contaminación. Este Ejemplo emplea dos tipos de matraces de cultivo de tejido grandes: matraces de cultivo de tejido T225 convencionales (Nunc) para la generación de células dendríticas y matraces de superficie ampliada de 235 cm² (Corning, N° cat. 431346) para la activación y el cultivo de linfocitos.

La idea de usar matraces de área ampliada de 235 cm² se basa en la observación de que el crecimiento de linfocitos es en general mejor si se ponen en estrecho contacto. Por ejemplo, los linfocitos crecen mucho mejor en placas de 96 pocillos de fondo en U que en placas de fondo plano de 24 pocillos o en matraces de cultivo de tejido T225. En la búsqueda de matraces de cultivo de tejido que pudieran servir de soporte a la formación de dichas estrechas asociaciones celulares, los inventores dieron con los matraces de superficie ampliada de 235 cm², en los que el fondo consiste en numerosas hendiduras en forma de V. En los primeros experimentos, los inventores compararon el crecimiento de linfocitos activados en una placa de 96 pocillos y en un matraz de superficie ampliada de 235 cm². Los resultados demostraron que los linfocitos eran capaces de expandirse en matraces de superficie ampliada de 235 cm² con la misma eficacia que en placas de fondo en U de 96 pocillos.

Todo el procedimiento se adapta a estos matraces de cultivo de tejido. Emplea células mononucleares de sangre periférica aisladas y consiste en 5 etapas: 1) generación de las células dendríticas maduras a partir de monocitos, 2) estimulación de linfocitos por las células dendríticas maduras que conduce a una proliferación preferente de células CD4+, 3) tratamiento de los linfocitos activados con agente de desmetilación que conduce a la inducción de la expresión de antígenos de cáncer/testículo, 4) generación de linfocitos citotóxicos por cocultivo de los linfocitos con linfocitos activados y tratados, y 5) expansión de linfocitos citotóxicos en presencia de células dendríticas autólogas como células alimentadoras.

55 Generación de las células dendríticas maduras

El aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1. Las células aisladas no se congelaron sino que se usaron inmediatamente en los experimentos. La suspensión celular que contenía 50 millones de monocitos se incubó en un matraz de cultivo de tejido T225

pretratado durante 45 minutos con medio RPMI 1640 complementado con suero humano AB al 5%. Después de la recogida de linfocitos no adherentes, los monocitos adherentes se lavaron una vez y se añadieron 40 ml de medio AIM-V complementado con suero humano AB al 2% en cada pocillo. Los linfocitos recogidos se congelaron en el medio que consistía en el 70% de medio AIM-V, el 20% de suero humano AB y el 10 % de DMSO. Se añadió GM-CSF (100 ng/ml) e IL-4 (25 ng/ml) después de la incubación durante una noche y dos días después. El día 4, se añadió mezcla de maduración que consistía en IL-1beta (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml), TNF-alfa (10 ng/ml) y prostaglandina E2 (0,1 µg/ml) a los matraces. Después de 2 días, se recogieron células no adherentes y parte de ellas se usaron para el inicio inmediato de la activación de linfocitos, mientras que el resto se congelaron para su uso posterior en la etapa de expansión.

10 Estimulación de linfocitos por las células dendríticas maduras

Los linfocitos no adherentes congelados al inicio del cultivo se descongelaron, se contaron y se mezclaron 40×10^6 células con 4×10^6 células dendríticas. Después de la centrifugación, esta mezcla se suspendió en 40 ml de medio de cultivo de linfocitos que consistía en medio AIM-V complementado con suero humano AB al 5%, se puso en un matraz de superficie ampliada de 235 cm^2 y se cultivó durante 8 días. Los días 2 y 5, se añadieron 20 ml de medio recién preparado complementado con interleucina 2 (concentración final de 15 U/ml) al matraz.

Inducción de la expresión de antígenos de cáncer/testículo.

El día 8, los linfocitos activados se recogieron, se contaron, y se centrifugaron 20×10^6 células, se suspendieron en 40 ml de medio de cultivo de linfocitos complementado con $10 \mu\text{M}$ de 5-aza-2'-desoxicitidina (5-Aza-CdR) y se pusieron en un matraz de superficie ampliada de 235 cm^2 . Después de 3 días, las células se recogieron, se contaron y se usaron como estimuladores para la generación de linfocitos citotóxicos.

Generación de linfocitos citotóxicos

Los linfocitos no adherentes congelados al inicio del cultivo se descongelaron, se contaron y se mezclaron 20×10^6 células con 20×10^6 células tratadas con 5-Aza-CdR. Después de la centrifugación, esta mezcla se suspendió en 40 ml de medio de cultivo de linfocitos que consistía en medio AIM-V complementado con suero humano AB al 5%, se puso en un matraz de superficie ampliada de 235 cm^2 y se cultivó durante 11 días. Los días 2, 5 y 8 se añadieron 20 ml de medio recién preparado complementado con interleucina 2 (concentración final de 25 U/ml) al matraz.

Expansión de linfocitos citotóxicos

Actualmente se usan diferentes protocolos para la expansión de linfocitos activados, y muchos de ellos emplean células alimentadoras. Para bloquear la proliferación de células alimentadoras, se irradian. Esto hace que todo el procedimiento sea laborioso y esté sometido al riesgo de extensión de variantes mutadas. Para evitar estos problemas, los inventores decidieron usar células dendríticas como células alimentadoras, ya que las células dendríticas maduras no proliferan. Además se ha demostrado que las células dendríticas autólogas son capaces de servir de soporte al crecimiento de linfocitos activados (Langhoff y Steinman, 1989). Por lo tanto, los inventores usaron células dendríticas generadas el día 6 de la reacción y congeladas en alícuotas para la estimulación del crecimiento de linfocitos citotóxicos. El día 11 de coincubación de linfocitos intactos con linfocitos activados tratados con 5-Aza-CdR, se retiraron 60 ml del medio de cultivo, y se añadieron al cultivo 4×10^6 células dendríticas descongeladas suspendidas en 40 ml del medio de cultivo. Los días 13 y 15, el cultivo se dividió 1:1 con adición de 40 ml de medio de cultivo recién preparado e IL-2. Los días 17 ó 18, los cultivos se recogieron y se caracterizaron por análisis de citometría de flujo.

Los inventores han realizado la preparación de linfocitos citotóxicos mediante este procedimiento a partir de linfocitos aislados de sangre de seis donantes (Tabla 2). La caracterización del fenotipo celular de los linfocitos generados por el procedimiento de citometría de flujo demuestra que tienen un fenotipo similar al descrito en el Ejemplo 3. Estaban presentes tres poblaciones principales: linfocitos CD8+, linfocitos CD4+ y células NK CD3-CD56+. La población de células CD8+ es habitualmente dominante, variando del 17% al 57% (promedio del 40,8%), mientras que la proporción de células CD4+ varía del 2 al 15% excepto en un donante en el que su proporción estaba próxima al 30%. La proporción de células NK varía del 3% al 54% (promedio de 25,59). El número total de células generadas después de 35 días desde el inicio de la reacción variaba entre 3×10^8 y 7×10^8 .

Tabla 2. Porcentaje de poblaciones de linfocitos principales en los cultivos de MLC generados en matraces de área ampliada T235.

Cultivo	CD4+ CD8-	CD8+ CD4+	CD56+ CD3-
51/07-1	14,7	17,2	54,2
52/07-1	12,8	57,4	15,3
54/07-1	28,8	31,2	10,5

(continuación)

Cultivo	CD4+ CD8-	CD8+ CD4+	CD56+ CD3-
59/07-1	3,7	51,5	34
60/07-1	1,9	54,9	3,3
61/07-1	6,6	32,8	35,6
Promedio	11,42	40,83	25,48

En resumen, el procedimiento descrito permite la generación de un gran número de linfocitos citotóxicos empleando solamente matraces de cultivo de tejido que permiten realizar toda la reacción de un modo seguro y relativamente no laborioso.

- 5 Este procedimiento puede adaptarse fácilmente a la producción de linfocitos citotóxicos específicos de tumores en condiciones GMP.

Lista de referencias

Bevan, M.J. (2004). Helping the CD8+ T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 595-602.

10 Brasseur, F., Rimoldi, D., Lienard, D., Lethe, B., Carrel, S., Arienti, F., Suter, L., Vanwijck, R., Bourlond, A., Humblet, Y., Vacca, A., Conese, M., Lahaye, T., Degiovanni, G., Deraemaeker, R., Beauduin, M., Sastre, X., Salamon, E., Dreno, B., Jager, E., Knuth, A., Chevreau, C., Suci, S., Lachapelle, J.M., Pouillart, P., Parmiani, G., Lejeune, F., Cerottini, J.C., Boon, T., y Marchand, M. (1995). Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer* 63, 375-380.

15 Castellino, F. y Germain, R.N. (2006). Cooperation between CD4+ and CD8+ T cells: when, where, and how. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 519-540. Chong J.C., Matsen, C.W, Gonzales, F.A., Ye, W., Greer, S., Marquez, V.E., Jones, P, A y Selker, E.U. (2003). Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *I. Natl. Cancer Inst.* 95, 399-409,

20 Chuang, J.C., Yoo, C.B., Kwan, J.M., Li, T.W, Liang, G., Yang, A.S. y Jones, P.A. (2005). Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-Aza-2'-desoxycitidina. *Mol. Cancer Ther.* 4, 1515-1520. Cresswell, P., Ackerman, A.L., Giodini, A., Peaper, D.R. y Wearsch, P.A. (2005). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol. Rev.* 207, 145-157.

De Backer, O., Arden, K.C., Boretti, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., Viars, C.S., De Plaen, E., Brasseur, F., Chomez, P., Van den Eynde, B.J., Boon, T. y van der Bruggen, P. (1999). Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res.* 59, 3157-3165.

25 De Plaen, E., Arden, IC., Traversari, C., Gaforlo, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B y Lurquin. C. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 4, 360-369.

De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. y Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 7149-7153.

30 De Vries, I.J., Lesterhuis, W.J., Scharenborg, N.M., Engelen, L.P., Ruiter, D.J., Gerritsen, M.J., Croockewit, S., Britten, C.M., Torensma, R., Adema, G.J., Figdor, C.G. y Punt, C.J. (2003). Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* 9, 5091-5100.

Dupont, J., Latouche, JB, Ma, C. y Sadelain, M. (2005). Artificial antigen-presenting cells transduced with telomerase efficiently expand epitope-specific human leukocyte antigen restricted cytotoxic T cells. *Cancer Res* 65, 5417-5427.

35 Erdile, L.F., Smith, D. y Berd. D. (2001). Whole cell ELISA for detection of tumor antigen expression In tumor samples. *J Immunol Methods*, 258, 47-53. Eura, M., Ogi, K., Chikamatsu, K., Lee, K.D., Nakano, K., Masuyama, K., Itoh, K. y Ishikawa, T. (1995). Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 64, 304-308.

40 Gilboa, E. y Vieweg, J. (2004). Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol. Rev.* 199, 251-263.

Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T.B., Paragnik, L., Kandemir, A., Lee, P.P., Schuler, G., Knop, J. y Enk, A.H. (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 93, 243-251.

- Karpf, A.R., Lasek, A.W., Ririe, T.O., Hanks, A.N., Grossman, D. y Jones, D.A. (2004). Limited gene activation in tumor and normal epithelial cells treated with the DNA methyltransferase inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Mol. Pharmacol.* 65, 18-27.
- 5 Katano, M., Nakamura, M., Morisaki, T. y Fujimoto, K. (1997). Melanoma antigen-encoding gene-1 expression in invasive gastric carcinoma: correlation with stage of disease. *J. Surg. Oncol.* 64, 195-201.
- Kennedy, R., Undale, A.H., Kieper, W.C., Block, M.S., Pease, L.R. y Celis, E. (2005). Direct cross-priming by Th lymphocytes generates memory cytotoxic T cell responses. *J. Immunol.* 174, 3967-3977.
- Kirkin, A.F., Dzhandzhugazyan, K.N. y Zeuthen, J. (2002). Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties. *Cancer Invest* 20, 222-236. Klebanoff, C.A., Gattinoni, L. y Restifo, N.P. (2006). CD8 T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol. Rev.* 211, 214-224.
- 10 Kyte, J.A., Mu, L., Aamdal, S., Kvalheim, G., Dueland, S., Hauser, M., Gullestad, H.P., Ryder, T., Lislud, K., Hammerstad, H. y Gaudernack, G. (2006). Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther.* 13, 905-918.
- Langhoff y Steinman, 1989, Clonal expansion of human T lymphocytes initiated by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 169, 315-320.
- 15 Lethé, B., Lucas, S., Michaux, L., De Smet, C., Godelaine, D., Serrano, A., De Plaen, E. y Boon, T. (1998). LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int. J. Cancer* 76, 903-908.
- Liang, G., Gonzales.F.A., Jones, P, A., Orntoft.TP. y Thykjaer, T. (2002). Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 62, 961-966. Marshall, J.A., Forster, T.H., Purdie, D.M., Lanagan, C.M., O'Connor, L.E., O'Rourke, M.G., Johnson, M.K., See, J.L., Ellem, K.A., Martinez, N.R., Lopez, J.A. y Schmidt, C.W. (2006). Immunological characteristics correlating with clinical response to immunotherapy in patients with advanced metastatic melanoma. *Immunol. Cell Biol.* 84, 295-302.
- 20 Naota, H., Miyahara, Y., Okumura, S., Kuzushima, K., Akatsuka, Y., Hiasa, A., Kitano, S., Takahashi, T., Yuta, A., Majima, Y. y Shiku, H. (2006). Generation of peptide-specific CD8(+) T cells by phytohemagglutinin-stimulated antigen-mRNA-transduced CD4(+) T cells. *J. Immunol. Methods.* 314, 54-66.
- Novellino, L., Castelli, C. y Parmiani, G. (2005). A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, 187-207.
- O'Rourke, M.G., Johnson, M., Lanagan, C., See, J., Yang, J., Bell, J.R., Slater, G.J., Kerr, B.M., Crowe, B., Purdie, D.M., Elliott, S.L., Ellem, K.A. y Schmidt, C.W. (2003). Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 387-395. Palucka, A.K., Ueno, H., Connolly, J., Kerneis-Norvell, F., Blanck, J.P., Johnston, D.A., Fay, J. y Banchereau, J. (2006). Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J. Immunother.* 29, 545-557.
- 30 Patard, J.J., Brasseur, F., Gil-Diez, S., Radvanyi, F., Marchand, M., Francois, P., Abi-Aad, A., Van Cangh, P., Abou, C.C., Chopin, D. y Boon, T. (1995). Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int. J. Cancer* 64, 60-64.
- Reynolds, S.R., Zeleniuch-Jacquotte, A., Shapiro, R.L., Roses, D.F., Harris, M.N., Johnston, D. y Bystry, J.C. (2003). Vaccine-induced CD8+ T-cell responses to MAGE-3 correlate with clinical outcome in patients with melanoma. *Clin. Cancer Res.* 9, 657-662.
- 40 Rimoldi, D., Salvi, S., Schultz-Thater, E., Spagnoli, G.C. y Cerottini, J.C. (2000). Anti-MAGE-3. antibody 57b and anti-MAGE-1 antibody 6C1 can be used to study different proteins of the MAGE-A family. *Int. J. Cancer* 86, 749-751.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R.M. y Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180, 83-93.
- 45 Salcedo, M., Bercovici, N., Taylor, R., Vereecken, P., Massicard, S., Duriau, D., Vernel-Pauillac, F., Boyer, A., Baron-Bodo, V., Mallard, E., Bartholeyns, J., Goxe, B., Latour, N., Leroy, S., Prigent, D., Martiat, P., Sales, F., Laporte, M., Bruyns, C., Romet-Lemonne, J.L., Abastado, J.P., Lehmann, F. y Velu, T. (2005). Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 819-829.
- Sallusto, F., Geginat, J. y Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745-763.
- 50 Schaft, N., Dorrie, J., Thumann, P., Beck, V.E., Muller, I., Schultz, E.S., Kampgen, E., Dieckmann, D. y Schuler, G. (2005). Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs

after rather than before maturation. *J. Immunol.* 174, 3087-3097.

5 Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Brocker, E.B., Steinman, R.M., Enk, A., Kampgen, E. y Schuler, G. (1999). Vaccination with Mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J. Exp. Med.* 190, 1669-1678.

thor Straten, P., Kirkin, A. F., Seremet, T. y Zeuthen, J. Expression of transporter associated with antigen processing 1 and 2 (TAP1/2) in malignant melanoma cell lines. *Int. J. Cancer*, 70: 582-556, 1997.

10 Thurner, B., Roder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kampgen, E., Bender, A. y Schuler, G. (1999b). Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods* 223, 1-15.

van Pel, A., van der Bruggen, P., Coulie, P.G., Brichard, V.G., Lethé, B., Van den Eynde, B.J., Uyttenhove, C., Renauld, J.C. y Boon, T. (1995). Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 145, 229-250.

15 Vatolin, S., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Flanagan, P.T., Custer, M., Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Hong, J.A., Morse, H., III, Schrupp, D.S., Risinger, J.I., Barrett, J.C. y Lobanenkov, V.V. (2005). Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res.* 65, 7751-7762.

20 Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., Treisman, J. y Rosenberg, S.A. (1994). Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 54, 1766-1771. Weiser, T.S., . Ohnmachi, G.A., Guo, Z.S, Fischette.M R. Chen, G.A., Hong, J.A.. Nguyen, D.M. y Schrupp, D.S. (2001). Induction of MAGE-3 expression in lung and esophageal cancer cells. *Ann. Thorac. Surg.* 71, 295-301.

Wischniewski, F., Pantel, K y Schwarzenbach, H (2006). Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol, Cancer Res.* 4, 339-49.

25 Yee, C. (2005). Adoptive T cell therapy: Addressing challenges in cancer Immunotherapy. *J. Transl. Med.* 3, 17.

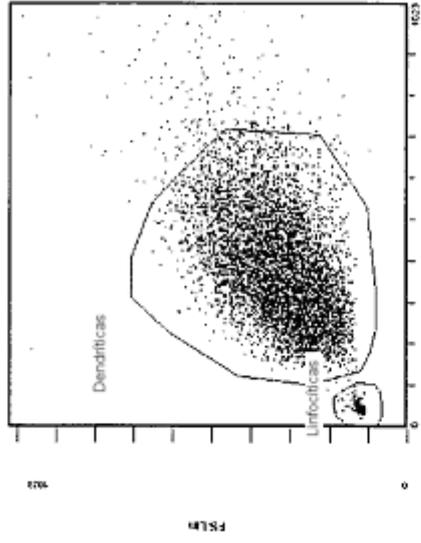
Zendman, A.J., Ruiter, D.J. y van Muijen, G.N.P. (2003). Cancer/testis-associated genes: Identification, expression profile, and putative function. *J. Cell Physiol* 194, 272-288.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de preparación de una composición de presentación de antígenos enriquecida en células CD4+, que comprende estimular la proliferación de células linfoides inactivadas normales usando células dendríticas maduras normales que no se han cargado con antígenos contra los que debería dirigirse la reacción inmune que se va a inducir, y tratar químicamente las células en proliferación con agentes que inducen la desmetilación del ADN o la acetilación de histonas, para inducir la expresión de antígenos de cáncer/testículo.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células linfoides son linfocitos de sangre periférica extraídos de sangre heteróloga o autóloga.
- 10 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que los antígenos se han inducido durante la fase logarítmica de proliferación.
4. Un procedimiento de preparación de una composición citotóxica, que comprende preparar una composición de presentación de antígenos por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y usar la composición de presentación de antígenos para activar linfocitos de células T activados, obteniendo de este modo una composición citotóxica que contiene linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de tumores.
- 15 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el número de linfocitos de células T se expande después de la activación mediante el uso de células dendríticas maduras.
- 20 6. Una composición para inducir una respuesta inmune en un mamífero, que comprende células linfoides en las que la expresión de antígenos de cáncer/testículo se ha inducido químicamente por metilación del ADN o acetilación de histonas después de la activación con células dendríticas maduras normales que no se han cargado con antígenos contra los que debería dirigirse la reacción inmune que se va a inducir.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que las células linfoides son linfocitos, preferentemente linfocitos de sangre periférica.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en la que los antígenos se han inducido durante la fase logarítmica de proliferación.
- 25 9. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en la que los linfocitos que expresan antígenos incluyen células CD4+.
10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que la desmetilación del ADN comprende el tratamiento con 5-aza-2-desoxicitidina o un inhibidor de la desacetilación de histonas.
- 30 11. Una vacuna para el tratamiento profiláctico o terapéutico que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 y un vehículo aceptable.
12. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 para la preparación de una vacuna para la estimulación de una respuesta inmune contra los antígenos tumorales.
13. Uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 como células presentadoras de antígenos para la activación de linfocitos T citotóxicos.
- 35 14. Un procedimiento de preparación linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de tumores que comprende activar linfocitos T usando una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 como células presentadoras de antígenos.
15. Uso de linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos de tumores obtenidos por el procedimiento de la reivindicación 14 para la preparación de una composición farmacéutica para la inmunoterapia adoptiva de células T.

Figura 1

(MFC00008) 12_04112_Spectrum_1_2006-11-08 01:02:40: 55 LxV55 Lin - v830



Superposición gráfica 1

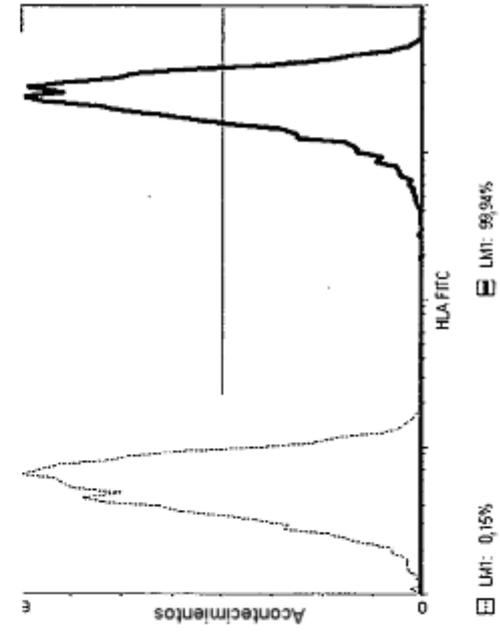
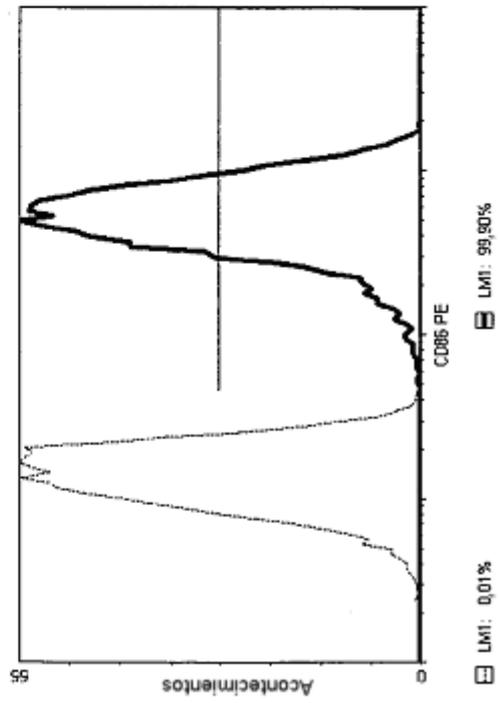


Figura 2

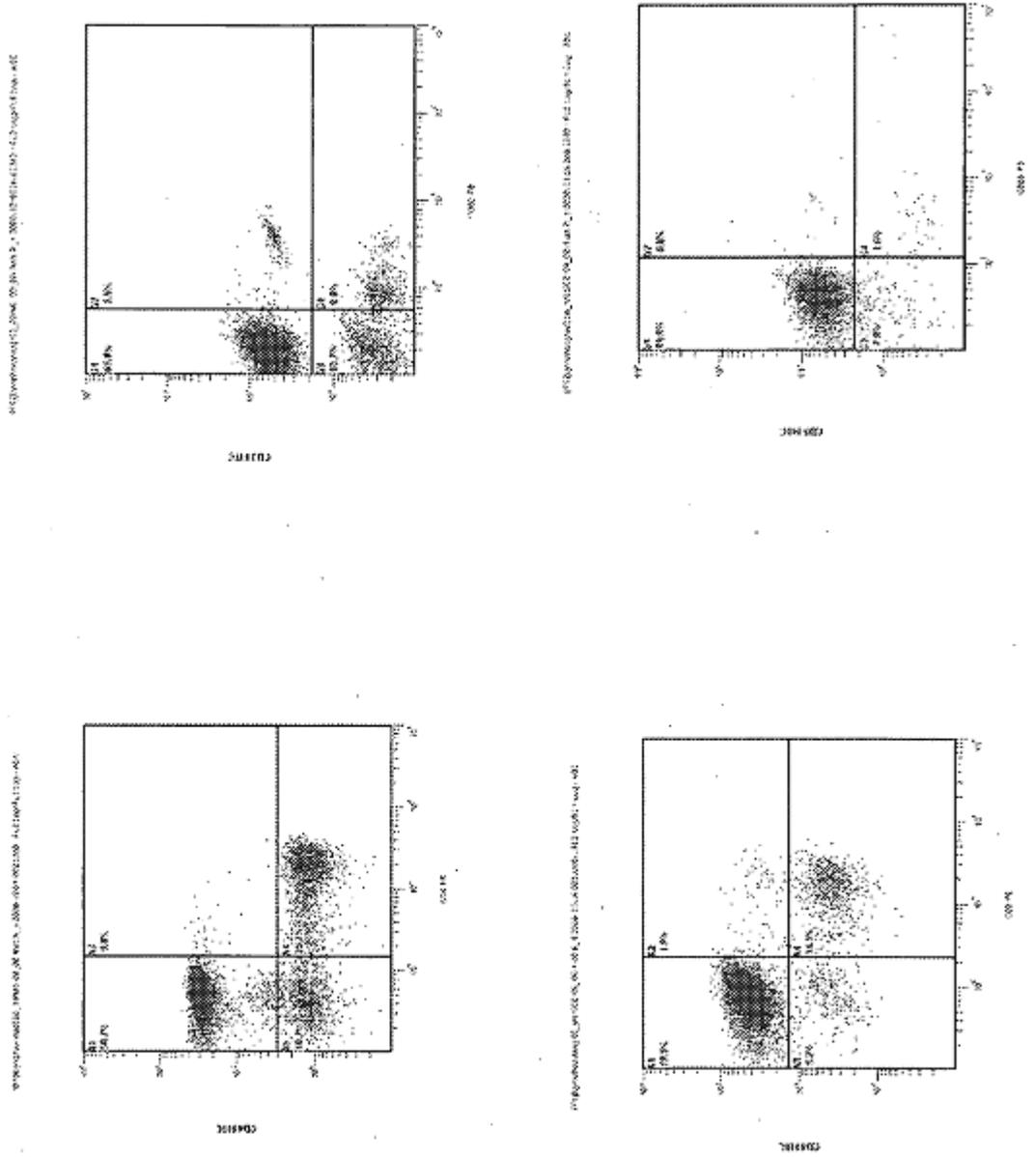
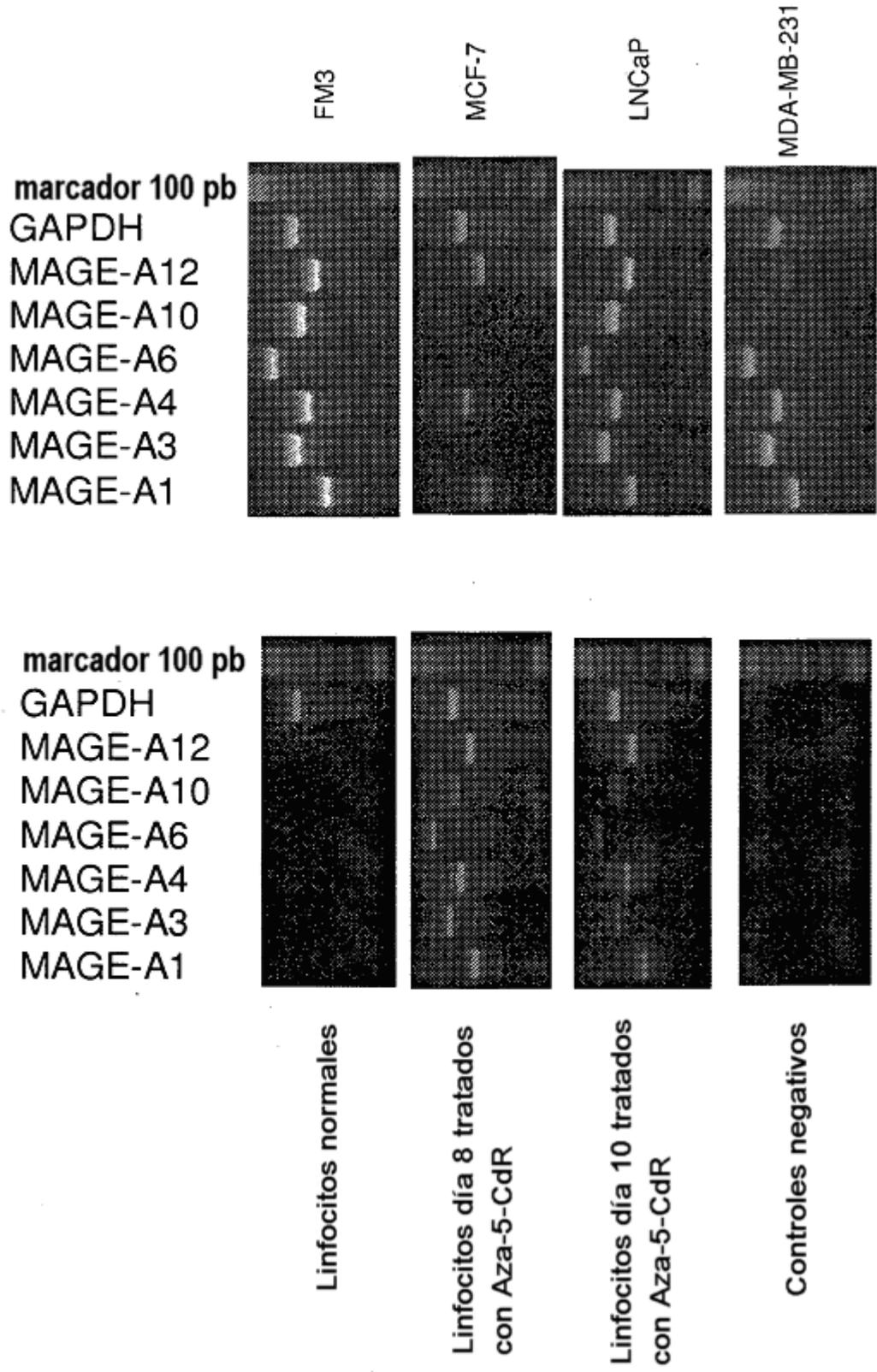


Figura 3



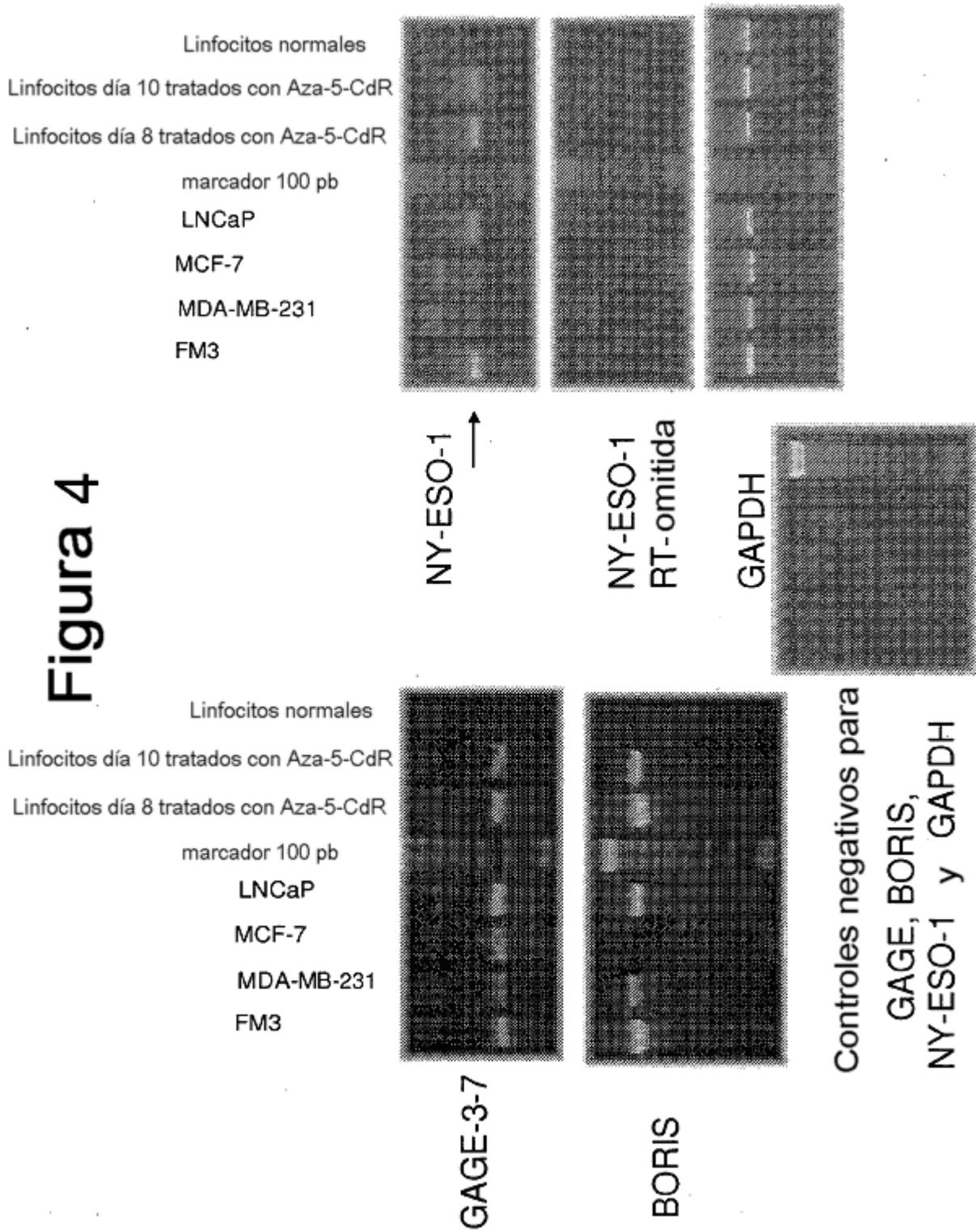


Figura 5

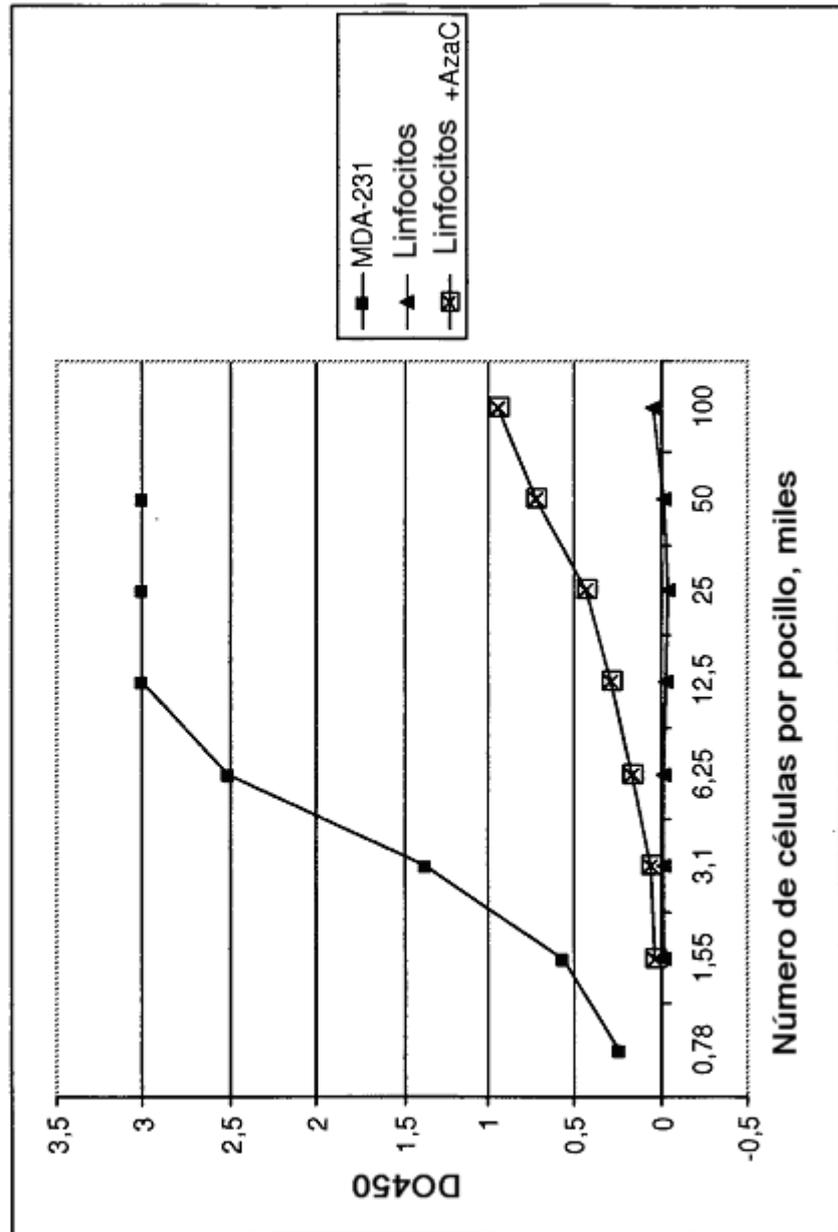


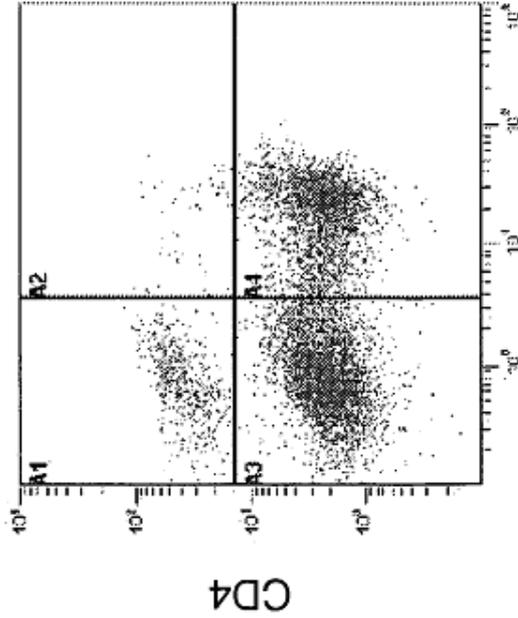
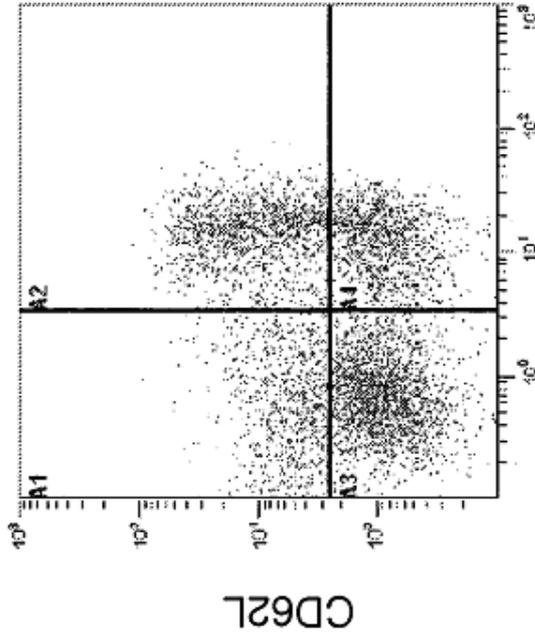
Figura 6

FNJC12 SEC12 063-1-R-1 2006-11-21 0011MB : FL1 Log FI Lc

Región	Número	%Total	%Seleccionad.	X-Media
TODAS	7283	75.53	100.00	6.08
A1	1294	25.04	31.37	6.401
A2	1368	18.68	19.84	16.6
A3	2534	25.34	31.74	6.845
A4	1377	13.77	17.25	14.1

FNJC01 SEC12 063-1-R-1 2006-11-21 0011MB : FL1 Log FI Lc

Región	Número	%Total	%Seleccionad.	X-Media
TODAS	8255	32.55	100.00	8.63
A1	604	6.04	7.32	8.845
A2	24	0.54	0.65	29.9
A3	4527	45.27	54.85	8.999
A4	3068	30.68	37.17	21.2



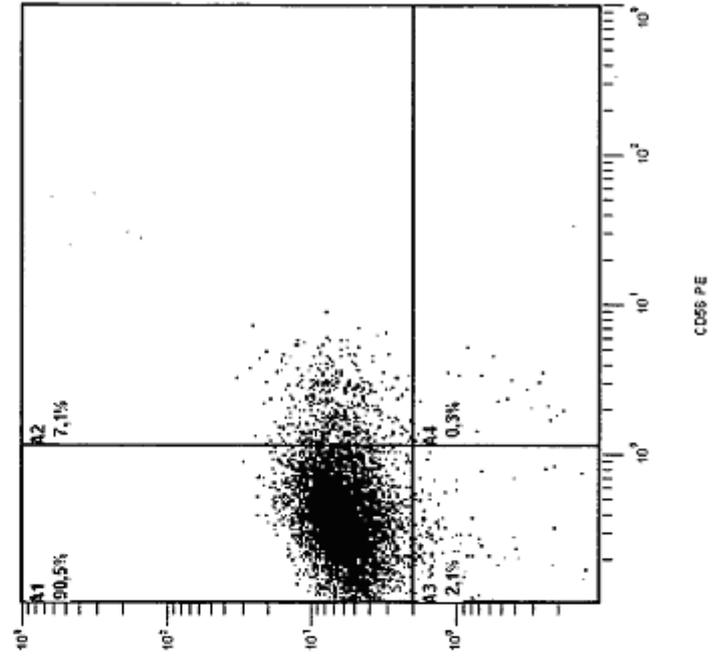
CD8

CD8

MLC-12/06-3-1

Figura 7

(F1)C04_MLC_12_06-1-1 3rd CD8 Purity R_1 2006-11-15 00d LMD : FL2 Log/FL1 Log - ADC



(F1)C03_MLC_12_06-1-1 3rd CD8 Purity R_1 2006-11-15 00d LMD : FL2 Log/FL1 Log - ADC

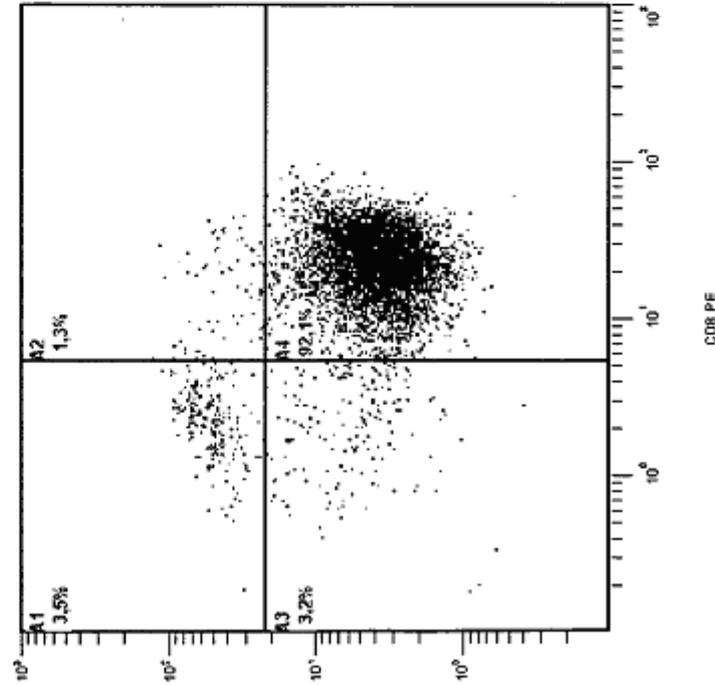


Figura 8

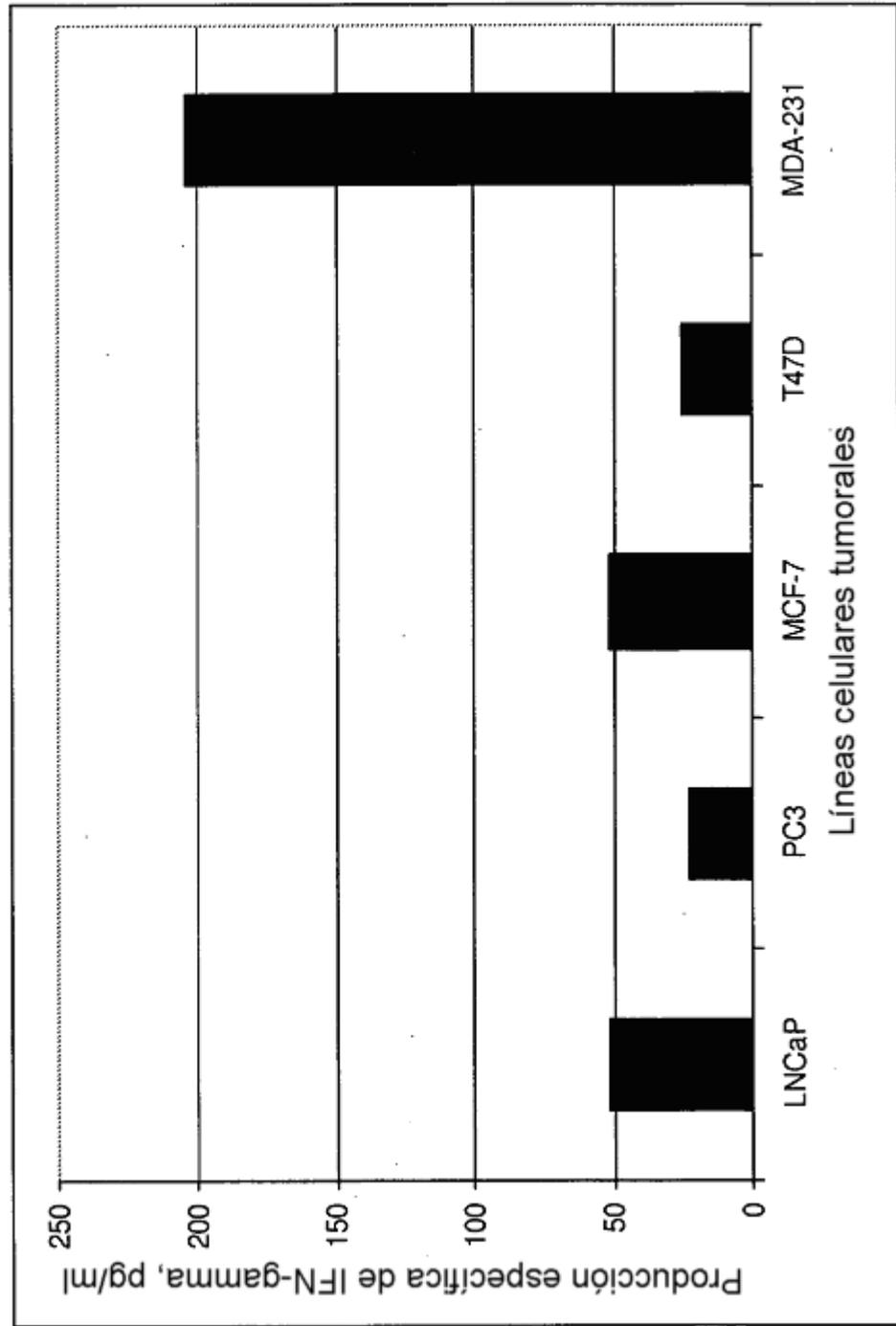
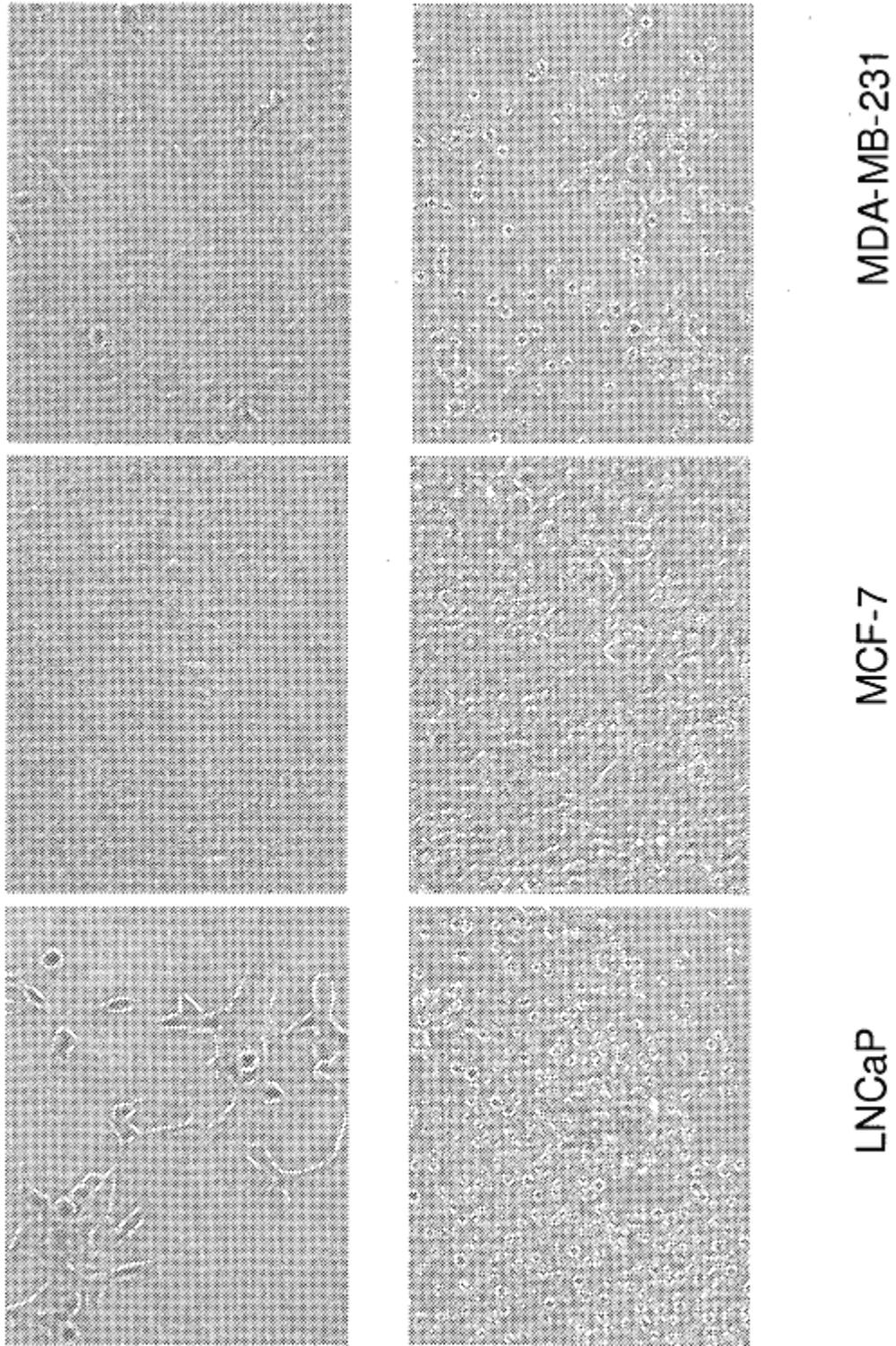


Figura 9



Células tumorales de control

Cultivo con linfocitos

Figura 10

