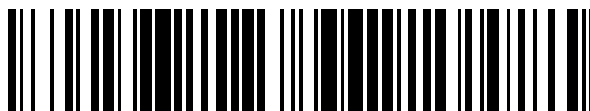


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 948**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01933328 .5**
96 Fecha de presentación: **11.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1292321**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2003**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA PRESENTACIÓN DE CLASE I DE ANTÍGENOS EXÓGENOS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS.**

30 Prioridad:
12.05.2000 US 203758 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.03.2012

73 Titular/es:
**NorthWest Biotherapeutics, Inc.
4800 Montgomery Lane, Suite 800
Bethesda, MD 20814, US**

72 Inventor/es:
**SALGALLER, Michael, L. y
BOYNTON, Alton, L.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 375 948 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

Procedimiento para aumentar la presentación de clase I de antígenos exógenos por células dendríticas humanas

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de Estados Unidos N° 60/203.758, presentada el 12 de mayo de 2000.

Antecedentes de la invención

10 Es bien sabido que el sistema inmunitario puede funcionar para destruir las células tumorales, incluyendo las células cancerosas tanto primarias como metastásicas. De hecho, la prueba de que el sistema inmunitario reconoce la presencia de células neoplásicas cancerosas se apoya en la existencia de linfocitos infiltrantes en los tejidos tumorales (Haskill y col. Contemp. Top. Immunobiol. 8: 107-170 (1978); Vose and Moore, Semin. Hematol. 22: 27-40 (1985)). A pesar de la presencia de las células inmunitarias, los tumores suelen prevalecer, y no sólo sobrevivir, sino también metastatizar hacia sitios distantes con un crecimiento sin restricciones.

15 Recientes avances en la comprensión de la activación de las células T y el reconocimiento de las células diana han permitido realizar algunos progresos en el desarrollo de la inmunoterapia del cáncer mediada por células T (Schwartz, Cell 71: 1065-1068 (1992); Pardoll, Curr. Opin. Immunol. 4: 619-623 (1992)).

El sistema inmunológico se desarrolla a partir de una célula progenitora única pluripotencial en los principales subgrupos de células linfoides y mieloides. Las células linfoides comprenden las células B y las células T. Las células mieloides incluyen los macrófagos, monocitos y neutrófilos. Las células inmunitarias son capaces de permanecer en circulación, buscar antígenos extraños y eliminarlos.

20 En el subgrupo linfoide, la respuesta inmunitaria da lugar a la activación de las células T ayudantes (T_H , del inglés T helper), que son positivas para la expresión de la molécula de superficie $CD4^+$ y de las células T citotóxicas (T_C), que son positivas para la expresión de la molécula de superficie $CD8^+$. Las células T se activan a través de la interacción con las células presentadoras de antígenos (CPA), que expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I o clase II, asociadas con fragmentos antigénicos. Las secuencias de aminoácidos antigénicos asociadas derivan específicamente de los antígenos procesados.

25 Las CPA utilizan dos procedimientos alternativos para presentar los antígenos en función de la fuente del antígeno. El antígeno exógeno, soluble sufre un proceso de endocitosis en las vacuolas y de degradación por el pH bajo. Los fragmentos de péptidos resultantes se dirigen a continuación a las proteínas del CMH de clase II y se presentan en la superficie celular. La presentación en el CMH de clase I requiere que los antígenos sean degradados en el citosol y transportados por el sistema de transporte TAP al retículo endoplasmático. Por lo general, para que esto suceda es necesario que el antígeno se encuentre en el citosol, por ejemplo en el caso de una infección viral o por traducción celular, y a continuación los péptidos resultantes se asocian con el CMH de clase I.

30 El complejo antígeno-CMH es reconocido por el receptor específico de las células T que reconoce el antígeno y las moléculas $CD4$ y $CD8$ de la superficie. $CD4$ y $CD8$ interactúan con regiones conservadas de una sola clase de CMH cada una. Mientras que el CMH de clase II es reconocido por las células T_H debido a la interacción con $CD4$, la presentación al CMH de clase I se limita a la activación de las células T_C a través de la interacción con $CD8$.

35 La activación de las células T que no han recibido estímulo previo y las que ya están cebadas sigue un mecanismo definido. Las CPA presentan los antígenos endógenos en el CMH de clase I y los antígenos exógenos solubles en el CMH de clase II. Los complejos antígeno-CMH de clase I o CMH de clase II interactúan con $CD8$ o $CD4$ respectivamente, y también interactúan con el receptor de las células T específico para el antígeno. Tras esta interacción específica, moléculas secundarias tales como la β -microglobulina y $CD28$ desencadenan la activación de las células T que a su vez ejercen la respuesta inmunitaria apropiada.

40 Las células T $CD4^+$ sensibilizadas o "cebadas" producen quimiocinas que participan en la activación y el reclutamiento de las células B, así como varios subgrupos de células T. La cantidad de células T $CD8^+$ sensibilizadas aumenta en respuesta a las linfocinas y son capaces de destruir cualquier célula que exprese los fragmentos antigénicos específicos asociados con las moléculas del CMH de clase I correspondientes (Jondal y col., Immunity 5: 295-302 (1996)).

45 Los linfocitos infiltrados en el tejido tumoral representan la prueba de que los tumores cancerosos inducen la aparición de linfocitos T citotóxicos (LTC) $CD8^+$ capaces de erradicar los antígenos asociados al cáncer o específicos del cáncer, lo que limita la progresión de la extensión del tumor y el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, con frecuencia los tumores crecen y hacen metástasis, superando esta inmunidad natural. Se han sugerido diversos procedimientos de inmunoterapia dirigidos a una serie de tipos de cáncer en particular para mejorar esta respuesta inmunitaria natural, sin embargo, la principal dificultad ha sido la inducción de CPA para presentar los antígenos solubles asociados a tumores humanos o antígenos específicos de tejido a través del CMH de clase I. Experimentos recientes en sistemas murinos han demostrado que la activación de linfocitos T

citotóxicos in vitro pueden conferir una protección potente del crecimiento de los tumores singénicos in vivo (Fields y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 9482-9487 (1998)). Sin embargo, los experimentos en el sistema inmunitario murino no son completamente predictivos de la respuesta inmunitaria humana. Hasta la fecha no existen procedimientos terapéuticos que provoquen con éxito una respuesta de inmunoterapia eficaz de los LTC humanos contra el cáncer primario o metastásico utilizando CPA incubadas con una proteína soluble o un antígeno proteico.

Las células presentadoras de antígeno (CPA) son particularmente importantes en la obtención de una respuesta inmune eficaz. Por definición, las CPA no solo presentan antígenos a las células T con receptores de células T específicos de antígeno, sino que aportan todas las señales necesarias para la activación de las células T. Las señales necesarias para la activación de las células T no están totalmente definidas, pero probablemente incluyan una diversidad de moléculas de superficie celular, así como las citocinas o los factores de crecimiento. Además, los factores necesarios para la activación de las células T no estimuladas previamente o no cebadas pueden ser diferentes de los requeridos para la reactivación de las células T de memoria previamente cebadas. Comúnmente se conoce a la capacidad de las CPA de presentar antígenos y enviar señales para la activación de las células T como una función celular accesoria. Aunque se ha demostrado que los monocitos y las células B son CPA competentes, su capacidad para presentar antígenos in vitro parece estar limitada a la reactivación de las células T previamente sensibilizadas. Por lo tanto, no son capaces de activar directamente las poblaciones de células T funcionalmente no estimuladas o no cebadas.

La expresión "células dendríticas" se refiere a una población diversa de tipos de células morfológicamente similares que se encuentran en una variedad de tejidos linfoides y no linfoides (Steinman, Ann. Rev. Immunol. 9: 271-296 (1991)). Estas células incluyen las células dendríticas linfoides del bazo, las células de Langerhans de la epidermis y las células veladas en el torrente circulatorio sanguíneo. A pesar de que se clasifican colectivamente como un grupo en base a su morfología, los altos niveles de expresión superficial del CMH de clase II, y la ausencia de ciertos otros marcadores de superficie expresados en las células T, células B, monocitos y células citolíticas naturales, en la actualidad no se sabe si las células dendríticas derivan de un precursor común o pueden funcionar todas como CPA de la misma manera. Las células dendríticas son las CPA más potentes del sistema inmunitario capaces de estimular respuestas primarias de linfocitos T y B. (Banchereau y col., Nature 392: 245-252 (1998)).

Estudios han descrito procedimientos para el aislamiento y la expansión de CD humanas a partir de muchas fuentes, incluyendo, a partir de sangre periférica humana. (Macatonia y col., Immunology 74: 399-406 (1991); O'Doherty y col., J. Exp. Med. 178: 1067-1078 (1993) (aislamiento); y Markowicz y col., J. Clin. Invest. 85: 955-961 (1991); Romani y col., J. Exp. Med. 180: 83-93 (1994); Sallusto y col., J. Exp. Med. 179: 1109-1118 (1994); Bernhard y col., Cancer Res. 55: 1099-1104 (1995) (expansión)). La Publicación PCT WO 94/02156 describe un procedimiento para aislar CD humanas para presentar antígenos para inducir respuestas mediadas por células T específicas de antígeno. Se hace mención de la inmunoterapia celular adoptiva y del uso de CD aisladas contra enfermedades infecciosas y cáncer.

Se han iniciado ensayos clínicos relacionados con el uso de células dendríticas tratadas con pulsos con un antígeno relevante contra el melanoma (Nestle, F. O., y col., Nat. Med. 4: 328-332 (1998)); contra el linfoma de células B (Hsu, F. J., y col., Nat. Med. 2: 52-58 (1996)); y contra el cáncer de próstata (Patente de EE.UU. Nº 5.788.963 concedida a Murphy y col.; Murphy y col., Prostate 29: 371-380 (1996); Salgaller, y col., Prostate 35: 144-151 (1998)).

El procesamiento de antígenos exógenos da lugar a la presentación de antígenos en el CMH de clase II, mientras que la vía de procesamiento endógeno utiliza el CMH de clase I (Jondal y col., Immunity, 5: 295-302 (1996)). La activación de las células T_H por la presentación del antígeno por el CMH de clase II ha tenido éxito terapéutico, pero los experimentos en modelos murinos sugieren que la protección contra el cáncer podría resultar significativamente más potente si la presentación se hiciera a través del CMH de clase I. Sin embargo, el éxito en un modelo murino no siempre es predictivo de éxito cuando se utilizan células humanas y no ha habido informes de presentación de antígenos exógenos solubles a través del CMH de clase I por medio de CPA humanas.

Aunque hay un pequeño subgrupo de antígenos solubles que se presentan en el CMH de clase I, incluyendo algunos antígenos bacterianos y virales, no se ha informado un procedimiento para inducir de manera fiable la presentación de muchos antígenos en el CMH de clase I, incluyendo por ejemplo, antígenos exógenos solubles asociados a tumores humanos o antígenos específicos de tejido. Se han desarrollado técnicas para crear proteínas de fusión de antígenos solubles que se presentan en el CMH de clase I y antígenos de interés, sin embargo, este proceso requiere mucho tiempo y manipulaciones moleculares para que la aplicación sea efectiva. El procesamiento por el CMH de clase I de un antígeno exógeno podría representar una mejora significativa en las inmunoterapias actuales.

El cáncer de próstata es la forma más común de cáncer diagnosticado en la actualidad en hombres estadounidenses. Es la segunda causa de muerte por cáncer en importancia después del cáncer de pulmón entre los hombres adultos. Casi un tercio de los pacientes con cáncer de próstata recién diagnosticados se presentan con enfermedad metastásica o localmente avanzada. En la actualidad, las terapias disponibles para la enfermedad metastásica, incluyendo los enfoques hormonales, de quimioterapia y de radiación, no han logrado un potencial curativo en un porcentaje significativo de pacientes. Para los pacientes con carcinoma localizado, la prostatectomía y

la radioterapia, los estándares actuales de tratamiento dan como resultado tasas de fracaso de entre el 20 y el 50%. Las opciones para estos fracasos del tratamiento primario, así como para los pacientes con enfermedad avanzada, son pocas en cantidad y limitadas en cuanto al beneficio clínico.

5 Con la dilucidación de los mecanismos implicados en el reconocimiento inmunológico, han aparecido y están disponibles nuevas y emocionantes estrategias en la terapéutica contra el cáncer. Resultan especialmente promisorias las vacunas contra el cáncer que utilizan la presentación de antígenos por las células dendríticas (CD) para aumentar la respuesta antitumoral. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que es importante mejorar la administración de los antígenos solubles, exógenos, asociados a tumores en el compartimiento de procesamiento del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I de las CD para aumentar al máximo la respuesta inmunitaria celular. La presente invención aborda estas y otras necesidades en la técnica.

Resumen de la invención

15 La presente invención está definida en las reivindicaciones y proporciona procedimientos para la activación de células T por medio de células dendríticas en las respuestas de inmunoterapia contra el cáncer primario o metastásico. Las CD obtenidas de donadores humanos se administran a un paciente con cáncer que necesita las mismas, después de la exposición a un antígeno soluble, asociado al tejido, específico del tejido, asociado al tumor o específico del tumor en combinación con un adyuvante que aumenta la respuesta de células T citotóxicas asociadas al CMH de clase I in vivo en comparación con la respuesta inducida por el antígeno solo. Como alternativa, el antígeno utilizado para la exposición a las CD puede ser un fragmento de antígeno asociado al tejido, específico del tejido o asociado al tumor. Las CD pueden exponerse simultáneamente al adyuvante y al antígeno soluble asociado al tejido, específico del tejido o tumor, o a fragmentos antigénicos del mismo. Esta respuesta incluye la activación de las células T ayudantes (T_H) y las células T citotóxicas (T_C). Como alternativa, las células T humanas se cultivan in vitro con las anteriores CD, y posteriormente las células T activadas in vitro se administran a un paciente con cáncer que las necesita.

25 En la invención, según se reivindica en las reivindicaciones, se utiliza el bacilo de Calmette Guerin (BCG) *Mycobacteria bovis* con un antígeno de célula tumoral para obtener el procesamiento por el CMH de clase I. El antígeno exógeno es procesado normalmente por el compartimiento de clase II del CMH en las células presentadoras de antígeno (CPA) y los antígenos endógenos son procesados por el compartimiento de clase I del CMH. Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que cuando las CD son tratadas con pulsos con un antígeno soluble, incluyendo antígenos tumorales humanos o antígenos específicos de tejido con un adyuvante como el BCG, se produce una mejora de la presentación al CMH de clase I. Por consiguiente, la presencia de un adyuvante tal como el BCG por lo general aumenta el procesamiento de antígenos tumorales solubles en las CD en el compartimiento de clase I del CMH y, en consecuencia, se activa un mayor porcentaje de células T CD8⁺ en comparación con los individuos a quienes se les administra el antígeno solo.

35 Las CD pueden exponerse a antígenos solubles, incluyendo antígenos virales, bacterianos, tisulares, específicos de tejido, asociados al tumor o específicos de tumor en presencia de una combinación de BCG y una exotoxina bacteriana, tal como lipopolisacárido (LPS). Según una forma de realización, se puede utilizar como antígeno un lisado celular de tumor de próstata recuperado de una pieza quirúrgica. Por ejemplo, se puede utilizar una muestra del tumor del propio paciente con cáncer de próstata, obtenida en la biopsia o la resección quirúrgica, para proporcionar un lisado de células para obtener el antígeno. Además, se puede utilizar el antígeno prostático específico de membrana purificado (PSMA, también conocido como antígeno PSM), que reacciona específicamente con el anticuerpo monoclonal 7E11-C.5 como antígeno. Otros antígenos incluyen fragmentos antigénicos proteicos de un antígeno asociado al tejido, específico del tejido, específico del tumor o asociado al tumor, es decir, tales como el PSMA, el antígeno prostático mucinoso, el antígeno prostático específico, la fosfatasa ácida prostática (PAP), el antígeno PD41 y similares. Según una forma de realización, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico que tiene la secuencia de aminoácidos Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val (ID. SEC. N° 1) (designado PSM-1) que corresponde a los restos de aminoácidos 4-12 del PSMA. Además, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico que tiene una secuencia de aminoácidos Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val (ID. SEC. N° 2) (designado PSM-2), que corresponde a los restos de aminoácidos 711-719 del PSMA.

50 Se puede hacer coincidir un péptido antigénico seleccionado de fragmentos de péptidos antigénicos del PSM con un motivo de unión de un haplotipo específico. Se pueden seleccionar los péptidos para que sean presentados por las CD para activar las células T de un paciente cuyo haplotipo sea compatible con el indicado para cada péptido de PSA y que se hayan hecho coincidir con un motivo de unión de un haplotipo específico.

55 Las CD cargadas con antígenos del CMH de clase I, descritas anteriormente, pueden incubarse in vitro con células T cebadas o no cebadas para activar las respuestas de células T relevantes. Las células T activadas pueden administrarse posteriormente a un paciente, es decir, a un cáncer para la inmunoterapia. En cualquier caso, las CD se utilizan ventajosamente para provocar una respuesta de inmunoterapia de inhibición del crecimiento contra, por ejemplo, una infección o un cáncer primario o metastásico humano. En particular, el cáncer humano es el cáncer de próstata.

La invención, según se define en las reivindicaciones, es útil en un procedimiento para producir una respuesta de inhibición del crecimiento proliferativo de células tumorales, que comprende administrar a un paciente con cáncer que lo necesite, una cantidad eficaz de células T activadas, en el que las células T se activaron in vitro. La activación in vitro incluye la exposición de las células dendríticas humanas a un antígeno asociado a un tejido, específico del tejido, asociado al tumor, específico del tumor o fragmentos antigénicos del mismo en combinación con BCG, ya sea en combinación con o sin LPS, para mejorar el procesamiento a través del CMH de clase I. La invención se refiere a un procedimiento para producir una respuesta de inhibición del crecimiento tumoral o de la proliferación de las células cancerosas, que comprende administrar a un paciente con cáncer que lo necesite, una cantidad eficaz de células dendríticas humanas, expuestas in vitro a un antígeno asociado a un tejido, específico del tejido, asociado al tumor o específicos del tumor o un fragmento antigénico del mismo en combinación con BCG, en combinación con o sin LPS, de tal manera que después de la administración, las CD humanas provoquen una respuesta inmunitaria predominantemente de células T CD8⁺ o aumente una respuesta inmunitaria existente contra el tumor o las células cancerosas.

Los antígenos útiles para los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a, extractos solubles de células tumorales de una biopsia de un paciente, extractos solubles de las células tumorales obtenidas durante la resección quirúrgica, antígenos específicos del tumor, antígenos asociados a tejidos o específicos del tejido correspondiente al tipo de tumor, antígenos tumorales recombinantes purificados, antígenos asociados a un tejido o específicos del tejido recombinantes purificados, y similares, según se establecen en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La presente invención se puede comprender mejor por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención, a los ejemplos ilustrados de formas de realización específicas de la invención y a las figuras adjuntas.

La figura 1A hasta la figura 1C representan la activación de las células T de pacientes con cáncer de próstata por células dendríticas autólogas (figura 1A) o alogénicas (figura 1B y figura 1C) previamente cargadas por medio de pulsos con antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) derivado de LNCaP y BCG, o BCG y LPS, o células T que se sometieron a tratamiento con pulsos con células dendríticas cargadas osmóticamente con PSMA solo. Las células T cultivadas del día 18 del paciente 92 se lavaron y se añadieron a placas de 96 pocillos a razón de 5×10^4 células por pocillo por duplicado. Las CD autólogas (figura 1A) o las CD alogénicas del paciente 105 (figura 1B) y del paciente L.T. (figura 1C), osmóticamente cargadas con PSMA (barras vacías) o con ovoalbúmina (OVA; barras rayadas) (o sin tratamiento, barras cruzadas) se añadieron a las células T a razón de 5×10^4 células por pocillo para realizar la prueba de activación, medida por la producción de citocinas. Después de 24 horas de incubación, se retiraron 150 μ l del sobrenadante de cada pocillo de cultivo y se midió la cantidad de IFN- γ presente por ELISA y se graficó frente al eje y.

La figura 2A hasta la figura 2C representan la reactividad específica de las células T activadas in vitro, incluyendo tanto grupos de células T CD8⁺ como CD4⁺. Las células T cultivadas del día 25 del paciente 105 se lavaron y se añadieron a placas de 96 pocillos a razón de 5×10^4 células por pocillo por duplicado. Las CD se sometieron a tratamiento con pulsos con el antígeno (PSMA u OVA) y BCG (figura 2A) o BCG + LPS (figura 2B). Como alternativa, se cargó osmóticamente PSMA u OVA (figura 2C). Se añadieron las CD autólogas tratadas con pulsos con PSMA (CD + PSMA), OVA (CD + OVA), o sin tratamiento con pulsos (CD sola) a las células T del paciente 105 a razón de 5×10^4 CD por pocillo. Las células efectoras se incubaron con disolución salina (Sin Acm; barras vacías) o con Acm anti-CD8 μ g/ml (barras rayadas) o con Acm anti-CD4 1 μ g/ml (barras cruzadas), en pocillos por duplicado. La producción de IFN γ se midió como en la figura 1.

La figura 3A hasta la figura 3C representan los efectos dependientes de la dosis de las células dendríticas activadas in vitro con PSMA soluble combinado con BCG o con BCG y LPS sobre las células T. Las células T del paciente 105 con cáncer de próstata se activaron por medio de células dendríticas autólogas previamente cargadas con diluciones en serie de PSMA derivado de células LNCaP. Para evaluar la secreción de IFN γ se realizaron pruebas ELISA. Las células cultivadas del día 32 o 39 (figura 3C) se lavaron y se añadieron a placas de 96 pocillos a razón de 5×10^4 células por pocillo por duplicado. Las CD autólogas tratadas con pulsos con PSMA (barras vacías), OVA (barras rayadas) o sin tratamiento con pulsos (barras cruzadas) se añadieron a las células T a razón de 5×10^4 células por pocillo, con o sin BCG, o BCG más LPS. BCG, día 32 de cultivo (figura 3A); BCG + LPS, día 32 de cultivo (figura 3B); BCG, día 39 de cultivo (figura 3C). Después de 24 horas de incubación, se retiraron 150 μ l de sobrenadante de cada cultivo y se midió la cantidad de IFN γ presente por ELISA.

La figura 4A y la figura 4B demuestran la estimulación de la actividad lítica para dianas específicas de antígeno de células T de pacientes con cáncer de próstata estimuladas in vitro con las CD que expresan PSMA. Se incubaron diferentes proporciones de efector (E) (es decir, las células T) a diana M (es decir, las células dendríticas autólogas) (E:T) durante cuatro horas. Las CD autólogas, osmóticamente cargadas con PSMA (●), OVA (■) o no tratadas (▲) se marcaron radiactivamente con ¹¹¹In. Se calculó el porcentaje de lisis utilizando la siguiente fórmula: [(liberación experimental - liberación espontánea) / (liberación máxima - liberación espontánea)] x 100. Paciente I.T., día 32 de cultivo (figura 4A). Paciente 92, día 39 de cultivo (figura 4B).

La figura 5A y la figura 5B representan la reactividad específica de PSMA de las células T del paciente 105 con cáncer próstata activadas por CD autólogas recién preparadas o crioconservadas, cargadas con PSMA parcialmente purificado a partir de células LNCaP (pureza de aproximadamente el 80%). Las células T cultivadas del día 39 se lavaron y se añadieron a placas de 96 pocillos a razón de 5×10^4 células por pocillo por duplicado. Las dianas de CD autólogas se trataron con pulsos con PSMA, OVA o se dejaron sin tratamiento con pulsos y se añadieron a las células T a razón de 5×10^4 células por pocillo. Se observó la reactividad específica de PSMA frente a las dianas de CD recién preparadas (barras vacías) y a las crioconservadas (barras rayadas). La reactividad específica de PSMA se produjo tanto cuando los efectores habían sido estimulados con las CD cargadas osmóticamente como con las cargadas con BCG. La producción de IFN γ se midió como en la figura 1.

La figura 6 demuestra que las células T del paciente 92 con cáncer de próstata pueden ser activadas por la línea celular de presentación de antígenos, T2, cargado de manera exógena con 25 μ g de péptido, ya sea con PSM-P1 (barras vacías), con la proteína de matriz M1 de la gripe (barras rayadas) o sin nada (barras cruzadas). Se realizaron pruebas ELISA convencionales para evaluar la secreción de IFN γ . Día 46 de cultivo (figura 6A) o Día 53 de cultivo (figura 6B).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a procedimientos y composiciones para el uso de células dendríticas (CD) para activar células T para obtener una respuesta inmunoterapéutica contra un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno, incluido un antígeno viral o bacteriano, un antígeno tisular, un antígeno asociado a tumores u otro antígeno asociados con, por ejemplo, un cáncer primario o metastásico. Las CD obtenidas de donadores humanos se administran a un paciente para activar las respuestas relevantes de células T in vivo posteriormente a la exposición a un virus, una bacteria o a un tejido asociado, un tejido específico, un tumor o cáncer asociado o a un antígeno específico del tumor en combinación con un factor o agente que promueve el procesamiento por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I. El antígeno puede ser un fragmento de uno de los antígenos anteriormente mencionados. Por otra parte, y opcionalmente, los procedimientos y las composiciones inducen la maduración de las CD. El factor o agente sirve de este modo para promover la activación de las células T por medio de las CD de manera tal que al menos el 25%, e incluso más del 50% de las células T, en comparación con el antígeno solo, sean CD8 $^+$. Como alternativa, las CD se exponen a un antígeno específico de tejido, a un antígeno de cáncer o a un fragmento antigénico de cualquier antígeno con el factor que promueve el procesamiento por el CMH de clase I y la maduración de las CD in vitro y posteriormente se incuban con células T cebadas o no cebadas para activar las respuestas relevantes de células T in vitro. A continuación, se administran las células T activadas a un paciente con cáncer que las necesite. En cualquier caso, las CD se utilizan de manera ventajosa para provocar una respuesta inmunoterapéutica de inhibición del crecimiento frente a un tumor de un cáncer primario o metastásico.

Únicamente para facilitar la explicación, la descripción de la invención se divide en las siguientes secciones: (1) fuentes de antígeno, (2) procedimientos para obtener o aislar las células dendríticas, incluidas las CD con vida útil ampliada o CD crioconservadas, y (3) aplicaciones o procedimientos de uso de las CD para estimular células T citotóxicas y ayudantes contra un virus, bacteria o cáncer in vitro e in vivo.

Las células T que reaccionan frente a un antígeno son células efectoras específicas del antígeno que son importantes en la resistencia a la enfermedad, incluyendo el cáncer. Las células T que reaccionan frente a un antígeno, que son CD8 $^+$, reconocen los antígenos presentados por moléculas del CMH de clase I. Las moléculas del CMH de clase I se expresan en casi todos los tipos celulares. Las células T que reaccionan frente a un antígeno, que son CD4 $^+$, reconocen los antígenos presentados por moléculas del CMH de clase II. Las moléculas del CMH de clase II se expresan en una variedad de tipos de células, incluyendo las células dendríticas, células endoteliales, los monocitos, macrófagos y linfocitos. La capacidad de las células T que reaccionan frente a un antígeno para lisar las células diana está limitada por factores genéticos y antigénicos. Para que se produzca la lisis de las células diana, las células diana deben llevar el mismo antígeno que originalmente indujo la estimulación de las células T, y la misma clase de molécula del CMH que las células T.

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a procedimientos de generación de células T reactivas a un antígeno que se pueden utilizar en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como una infección viral o bacteriana o un cáncer. La presente invención se hizo posible gracias al sorprendente descubrimiento de que el bacilo de Calmette Guérin (BCG) estimula el procesamiento por el CMH de clase I de antígenos exógenos solubles y, posteriormente, aumenta la activación preferencial de las células T CD8 $^+$ hasta al menos el 25%, e incluso superior al 50% de la población de células T activadas, en comparación con los individuos a los que se administra el antígeno solo. La proporción de células T CD8 $^+$ puede aumentar al 25%, 50%, o más, y puede ser incluso superior al 75% de la respuesta total de células T.

Se puede añadir el BCG con un antígeno viral, bacteriano, asociado al tejido, específico del tejido, asociado al tumor o específico del tumor, o uno de sus fragmentos antigénicos varias veces a los cultivos in vitro con el fin de reestimar la proliferación de células T reactivas al antígeno. Las células T que reaccionan con el antígeno generadas por los procedimientos de la invención son capaces de específicamente dirigirse a, matar o causar la lisis de las células infectadas o las células del cáncer, u otras células diana, según el caso, o cualquier célula portadora

de los mismos antígenos y con moléculas del CMH similares con las que se preparan las células T. Las células T que reaccionan con el antígeno de la invención también pueden secretar una o más citocinas que pueden medirse, tales como IL-2, IFN- γ , TNF- β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-3 y/o GM-CSF. La producción de estas citocinas se puede utilizar para controlar la activación de células T específicas in vitro.

5 Anteriormente, se ha utilizado BCG como un componente de diversas composiciones de vacuna para actuar como adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria de anticuerpos o serológica contra el inmunógeno diana. Además, se ha demostrado que las células dendríticas internalizan partículas, incluyendo micobacterias BCG. (Inaba, y col., J. Exp. Med. 178: 479-488 (1993)). Se ha demostrado que las células dendríticas cargadas de micobacterias son más potentes en la presentación de antígenos a las células T cebadas con los correspondientes cultivos de células dendríticas maduras resultantes que están expuestas a un tratamiento con pulsos de BCG. (Inaba y col., supra (1993)).

10 Se ha caracterizado la activación de las células dendríticas por el BCG por implicar agregación homotípica, regulación positiva de los antígenos de superficie, modulación negativa de la actividad endocítica y la liberación de factor de necrosis tumoral- α . (Thurnher, y col., Int. J. Cancer 70: 128-134 (1997)). Se ha documentado una mayor expresión para el antígeno de maduración de células dendríticas CD83 y del coestimulador de células T CD86 (B7-2). Se ha sugerido que la inducción de la secreción de TNF- α fue al menos en parte responsable de los cambios fenotípicos y funcionales observados en las células dendríticas después de la captación del BCG. La estimulación de la expresión del ARNm de IL-8 y la secreción de la proteína IL-8 también se han asociado con efectos del BCG sobre las células T. (Ramoner y col., J. Urology 159: 1488-1492 (1998)).

15 Hasta la fecha, a pesar de que el BCG se ha administrado en combinación con diversos antígenos, incluyendo células cancerosas y antígenos asociados al cáncer, al parecer no ha habido ninguna demostración ni reconocimiento de una activación preferencial de las células T CD8⁺ cuando tras la exposición a células dendríticas que han sido activadas con un antígeno específico de tejido combinado con BCG, o con BCG y LPS con inducción de una respuesta del CMH de clase I.

20 Las células T que reaccionan con un antígeno se puede administrar in vivo de manera autóloga (es decir, a la misma persona de quien se obtuvieron originalmente las células T (o células precursoras de las células T)) o de manera singénica (es decir, a un hermano gemelo de la persona de quien se obtuvieron inicialmente las células cancerosas o infectadas); o de manera alogénica a una persona que comparte al menos un alelo común del CMH con la persona de quien se obtuvieron originalmente las células antigénicas y las células T.

25 Según se utiliza en el presente documento, la expresión "células antigénicas" se refiere a cualquier célula, por lo general células infectadas o células cancerosas, y en particular a las células del cáncer de próstata, que pueden provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En esta sección se discuten las fuentes de células antigénicas y los procedimientos de preparación de las células antigénicas para su uso en los presentes procedimientos.

30 La expresión "tratada con pulsos", según se utiliza en el presente documento, incluye el proceso de inmunización in vitro. El proceso de inmunización in vitro puede realizarse por una diversidad de procedimientos, incluyendo, pero no limitado a, las células dendríticas tratadas con pulsos con antígenos (Steel and Nutman, J. Immunol. 160: 351-360 (1998), Tao y col., J. Immunol. 158: 4237-4244 (1997); Dozmorov and Miller, Cell Immunol 178: 187-196 (1997); Inaba y col., J. Exp Med. 166: 182-194 (1987); Macatonia y col., J. Exp Med. 169: 1255-1264 (1989), De Bruijn y col., Eur. J. Immunol. 22: 3013-3020 (1992)); células RMA-S (células mutantes que expresan un alto número de células "sin" moléculas de clase I del CMH en su superficie) cargadas con péptido (De Bruijn y col., Eur. J. Immunol. 21: 2963-2970 (1991); De Bruijn y col., Eur. J. Immunol 22: 3013-3020 (1992); Houbiers y col., Eur. J. Immunol 26: 2072-2077 (1993)) y perlas cargadas con péptidos fagocitadas por macrófagos (De Bruijn y col., Eur. J. Immunol. 25: 1274-1285 (1995)), y células antigénicas sometidas a presión osmótica (publicación PCT WO 98/15616)). El cebado, por lo tanto, da como resultado la primera exposición a una molécula antigénica de las células inmunitarias sin estímulo previo.

35 La expresión "tratar con pulsos", según se utiliza en el presente documento, se refiere al proceso de exposición de las células inmunitarias cebadas in vitro al BCG, y, como alternativa, al BCG y LPS, y un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno específico de tejido, un antígeno tumoral o un fragmento antigénico del antígeno. El BCG y el antígeno viral, antígeno bacteriano, los antígenos específicos de tejido o asociados a tumores, según se utiliza en el presente documento, comprende una mezcla no covalente de BCG y una molécula antigénica.

40 El término "antígeno" y la expresión "molécula antigénica", según se utilizan en el presente documento, comprenden antígenos proteicos virales, bacterianos, asociados al tejido o específicos del tejido y asociados a tumores o específicos de tumores, útiles para la presentación por medio de células dendríticas para activar las células T para lograr la inmunoterapia. En particular, para el desarrollo de una respuesta inmunitaria contra el virus o las bacterias de la infección o las células de la próstata o los antígenos asociados a la próstata, es decir, el PSMA en la vasculatura del tumor prostático.

45 Según una forma de realización, se puede utilizar como antígeno un lisado celular de tumor de próstata recuperado de las piezas quirúrgicas. Por ejemplo, una muestra del propio tumor del paciente con cáncer, obtenida en la biopsia

o la resección quirúrgica, se puede utilizar para proporcionar un lisado de células para el antígeno. Como alternativa, se puede utilizar una preparación de membranas de las células tumorales de un paciente con cáncer de próstata.

- Según otra forma más de realización, se puede utilizar como antígeno el antígeno prostático específico de membrana purificado (PSMA, también conocido como antígeno PSM), que reacciona específicamente con el anticuerpo monoclonal 7E11-C.5 (véase en general Horoszewicz y col. Prog Clin. Biol. Res. 37: 115-132 (1983), Patente de EE.UU. N° 5.162.504, Patente de EE.UU. N° 5.788.963, Feng y col., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 32: (Abs. 1418) 238 (1991)). La clonación del gen que codifica el antígeno PSMA ha sido descrita por Israeli y col., Cancer Res. 54: 1807-1811. La expresión del gen clonado, por ejemplo, en células de levadura, puede proporcionar una fuente de antígeno PSMA para su uso según la presente invención.
- 5 En otra forma más de realización, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico que tiene la secuencia de restos de aminoácidos Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val (ID. SEC. N° 1) (designado PSM-P1) que corresponde a los restos de los aminoácidos 4-12 del PSMA. Según otra forma de realización, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico que tiene la secuencia de restos de aminoácidos Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val (ID. SEC. N° 2) (designado PSM-P2) que corresponde a los restos de los aminoácidos 711-719 del PSMA.
- 10 Según otra forma de realización, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico que tiene la secuencia de restos de aminoácidos Xaa Leu (o Met) Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val (o Leu) (designado PSM-PX), donde Xaa representa cualquier resto de aminoácido. Este péptido se asemeja al motivo de unión de HLA-A0201, es decir, un motivo de unión de 9-10 restos de aminoácidos con "restos de anclaje", leucina (Leu) y valina (Val) que se encuentran en pacientes HLA-A2 (Grey y col. Cancer Surveys 22: 37-49 (1995)). Este péptido se suele utilizar como antígeno para pacientes HLA-A2+. (véase, Central Data Analysis Committee' Allele Frequencies", Sección 6.3, Tsuji, K. y col., (eds.), Tokyo University Press, páginas 1066-1077).
- 15
- 20

En otra forma más de realización, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico seleccionado de los péptidos que se presentan en la Tabla 1A (a continuación). Los péptidos que se presentan en la Tabla 1A tienen las secuencias de restos de aminoácidos correspondientes a los fragmentos del PSM y se han hecho coincidir con un motivo de unión de un haplotipo específico. Según una forma de realización, los péptidos se seleccionan para que sean presentados por las células dendríticas para activar las células T de un paciente cuyo haplotipo coincide con el indicado para cada péptido en la Tabla 1A.

25

Tabla 1A

Péptidos del PSM*				
Nº de ID	Haplotipo	Resto de aminoácido inicial**	Secuencia de aminoácidos	ID. SEC. Nº
PSM-P3	A2	20	Trp Leu Lys Ala Gly Ala Leu Val Leu	3
PSM-P4	A2	27	Val Leu Ala Gly Gly Phe Phe Leu Leu	4
PSM-P5	A2	109	Glu Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu	5
PSM-P6	A2	260	Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu	6
PSM-P7	A2	461	Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu	7
PSM-P8	A2	660	Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu	8
PSM-P9	A2	568	Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val	9
PSM-P10	A2	57	Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu Leu	10
PSM-P11	A2	469	Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu	11
PSM-P12	A2	663	Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu	12
PSM-P 16	A1	171	Glu Gly Asp Leu Val Tyr Val Asn Tyr	13
PSM-P17	A1	264	Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr	14
PSM-P18	A1	463	Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr	15
PSM-P19	A1	143	Leu Phe Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr	16
PSM-P20	A1	558	Thr Tyr Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr	17
PSM-P21	A1	701	Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr	18
PSM-P22	A1	725	Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr	19
PSM-P26	A11	398	Ile Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu	20
PSM-P27	A11	63	Asp Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe	21
PSM-P28	A11	491	Lys Ser Leu Tyr Glu Ser Trp Thr Lys Lys Ser	22
PSM-P36	A24	448	Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile	23
PSM-P37	A24	606	Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile	24
PSM-P38	A24	298	Gly Tyr Tyr Asp Ala Gin Lys Leu Leu	25
PSM-P39	A24	624	Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu	26

(continuación)

Péptidos del PSM*				
Nº de ID	Haplotipo	Resto de aminoácido inicial**	Secuencia de aminoácidos	ID. SEC. Nº
PSM-P40	A24	178	Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe	27
PSM-P41	A24	227	Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe	28
PSM-P46	B3501	289	Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile	29
PSM-P47	B3501	501	Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met	30

* "Péptidos del PSM" se refiere a péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a un fragmento del PSMA (PSM a/k/a).

** "Resto de aminoácido inicial" se refiere al número del resto del aminoácido del PSM al que corresponde el primer aminoácido del péptido.

5 En otra forma de realización de la presente invención, se puede utilizar como antígeno el antígeno prostático específico (PSA) (véase, Pepsidero y col., Cancer Res. 40: 2428-2432 (1980); McCormack y col., Urology 45: 729-744 (1995)).

10 Según otra forma de realización, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico seleccionado de los péptidos que se presentan en la Tabla 1B (a continuación). Los péptidos en la Tabla 1B tienen secuencias de restos de aminoácidos correspondientes a fragmentos del PSA y se han hecho coincidir con un motivo de unión de un haplotipo específico, como se indica en la Tabla 1B. Según una forma de realización, el péptido es presentado por las células dendríticas para activar las células T de pacientes cuyo haplotipo coincide con el indicado para cada péptido en la Tabla 1B.

Tabla 1B

Péptidos del PSA*				
Nº de ID	Haplotipo	Resto de aminoácido inicial**	Secuencia de aminoácidos	ID. SEC. Nº
PSA-P1	A2	53	Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu	31
PSA-P2	A2	171	Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val	32
PSA-P11	A1	235	Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr	33
PSA-P21	A11	25	Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys	34
PSA-P22	A11	185	Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys	35
PSA-P23	A11	245	Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys	36
PSA-P31	A24	152	Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile	37

* "Péptidos del PSA" se refiere a péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a un fragmento del PSA.

** "Resto de aminoácido inicial" se refiere al número del resto del aminoácido del PSA al que corresponde el primer aminoácido del péptido.

15 Según otra forma más de realización, se puede utilizar como antígeno un antígeno prostático mucinoso, reconocido por el anticuerpo monoclonal PD41, descrito por Wright (patentes de EE.UU. Nº 5.227.471 y Nº 5.314.996; Beckett y col. Cancer Res. 51: 1326-1222 (1991)). Como alternativa, se puede utilizar como antígeno un lisado bruto de células tumorales de próstata que comprenda un antígeno que se una al anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ATCC HB 11094 y que exprese el antígeno mucinoso PD41.

20 Otros antígenos de próstata que se pueden utilizar en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a los siguientes: antígeno epitelial de seis dominios transmembranarios de la próstata (STEAP; Hubert y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14523-14528 (1999)), antígeno tumoral del carcinoma de próstata (PCTA-1, Su y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252-7257 (1996)); antígeno de células madre de la próstata (PSCA; Reiter, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735-1740 (1998)). Los fragmentos antigénicos de cada antígeno también se consideran abarcados por el ámbito de la presente invención.

25 Otros antígenos incluyen, pero no se limitan a, los antígenos de neutralización de virus o péptidos antigénicos. Además, las proteínas, glicoproteínas, glicolípidos o hidratos de carbono bacterianos y fragmentos antigénicos de los mismos, se consideran parte de la presente invención.

Según la presente invención, la inmunoterapia celular se desarrolla por medio de la obtención de células antigénicas y células inmunitarias de uno o más individuos, más generalmente del mismo sujeto, y la estimulación de las células

T dentro de la población de células inmunitarias por medio de los procedimientos de la invención. Esta estimulación de células T in vitro, seguida por la expansión clonal en cultivo celular de las células T CD4⁺ y/o CD8⁺ que reaccionan con el antígeno, y la administración al sujeto de las células T que reaccionan con el antígeno, constituye una estrategia terapéutica útil y profiláctica. Cuando se infunden en el sujeto, las células T de la invención que reaccionan con el antígeno pueden dirigirse específicamente y/o lisar directamente in vivo las células diana que llevan el mismo antígeno que las células antigénicas, inhibiendo de este modo el desarrollo del cáncer y/o la proliferación de las células tumorales, o pueden prevenir o limitar la propagación de un agente patógeno en las células antigénicas del receptor.

Las células antigénicas, las células T a activar y el receptor de las células T que reaccionan con el antígeno pueden tener el mismo haplotipo del CMH (HLA). La invención se refiere al uso de células T autólogas estimuladas in vitro con el antígeno obtenido de manera autóloga para el tratamiento del cáncer, la inhibición de la proliferación de células tumorales o la prevención del desarrollo del cáncer en el mismo sujeto de quien se obtuvieron originalmente las células T (o más generalmente, todas las células inmunitarias) y el antígeno. En un aspecto particular, las células inmunitarias y las células antigénicas se aíslan de un sujeto humano que necesita inmunoterapia celular.

Las células T y el receptor pueden tener el mismo haplotipo, mientras que las células antigénicas son alogénicas con respecto a las células T y el receptor, pero coinciden en al menos un alelo del CMH, es decir, las células antigénicas se utilizan para activar las células T, células T que posteriormente se administran a un receptor del cual fueron obtenidas originalmente las células T, y en el que las células antigénicas y las células T comparten al menos uno, pero no todos los alelos del CMH. En una forma de realización menos típica de la invención, las células antigénicas, las células T y el receptor son todos alogénicos con respecto entre sí, pero todos tienen al menos un alelo común del CMH compartido entre las células antigénicas, las células T y el receptor.

Los procedimientos para generar linfocitos T que reaccionan con el antígeno pueden comprender el cebado de células inmunitarias vivas, el tratamiento con pulsos de las células inmunitarias con BCG y un antígeno asociado al tejido, específico del tejidos, asociado al tumor o específico del tumor (con o sin LPS), mientras que las células inmunitarias comprenden CPA, por ejemplo, pero no limitado a las células dendríticas, y células tratadas con pulsos, cocultivadas con las células cebadas. Se pueden enriquecer las células inmunitarias cebadas por CPA antes del tratamiento con pulsos. Las células inmunitarias cebadas se pueden separar para generar poblaciones enriquecidas o purificadas de células T o CPA. Las células inmunitarias se pueden separar para generar poblaciones enriquecidas o purificadas de células T CD4⁺ antes del tratamiento con pulsos. El cocultivo de las células tratadas con pulsos con las células T da lugar a la estimulación de células T específicas que maduran y se convierten en células T CD4⁺ que reaccionan con el antígeno o células T CD8⁺ que reaccionan con el antígeno, respectivamente.

Sin limitación alguna de la presente invención a un modelo o mecanismo científico específico, los resultados descritos en el presente documento sugieren que el BCG con células inmunitarias tratadas con pulsos (las células pulsadas con un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno asociado al tejido o específico del tejido, un antígeno asociado al tumor o específico del tumor, o fragmentos antigénicos de los mismos según lo establecido anteriormente), que comprenden las CPA están capacitadas de manera única para inducir una activación específica de las células T CD8⁺ in vitro dirigidas contra virus, bacterias, células infectadas o tumorales. Los resultados descritos en el presente documento sugieren además que se puede añadir un factor de promoción de la maduración para mejorar la duración de la respuesta inmunitaria. El BCG sirve para aumentar la expresión en las CD de los marcadores de maduración de superficie CD83 y CD86, concomitantes con la exclusión de antígenos de la endocitosis. Además, el lipopolisacárido (LPS) también regula de manera negativa la actividad endocítica y promueve la maduración de las CD, lo que podría aumentar la duración de la respuesta inmunitaria.

Los procedimientos pueden comprender además la reestimulación de las células T que reaccionan con el antígeno in vitro, mediante el cultivo de las células con células alimentadoras y células antigénicas irradiadas, opcionalmente en presencia de una composición que comprende una o más citocinas (por ejemplo, IL-2 purificada, sobrenadante de células de bazo estimuladas con concanavalina A). La reestimulación in vitro de las células T mediante la adición de CPA y BCG con antígeno soluble exógeno, es decir, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno asociado al tumor o un antígeno específico del tejido o un fragmento antigénico de cualquiera de los antígenos al cultivo se puede utilizar para promover la expansión de las poblaciones de células T.

Las células T pueden ser estimuladas con células de bazo irradiadas o CPA purificadas de sangre periférica como células alimentadoras en presencia de BCG y un antígeno viral, bacteriano, específico del tejidos o un antígeno tumoral o un fragmento antigénico de cualquiera de los antígenos (con o sin LPS). De esta manera, por medio de la reestimulación de vez en cuando, se puede mantener una línea celular o un cultivo estable de células T específicas del tejido in vitro durante largos períodos de tiempo. El cultivo de células T o la línea celular creados de esta manera se pueden almacenar, y si se conservan (por ejemplo, por medio de la formulación con un crioprotector y la congelación) se pueden utilizar para reabastecer células T que reaccionan con el antígeno en intervalos deseados para su uso durante largos períodos de tiempo.

Se pueden generar células T CD8⁺ que reaccionan con el antígeno y se pueden utilizar como profilaxis para prevenir la progresión (la proliferación de virus, bacterias o células tumorales) o el desarrollo de un tumor, o para inducir la remisión del cáncer. También se pueden generar células T CD4⁺ que reaccionan con el antígeno y se pueden utilizar

- como profilaxis para prevenir la progresión o el desarrollo un tumor (proliferación de células tumorales) o para inducir la remisión del cáncer. Las células T se pueden utilizar terapéuticamente para tratar el cáncer. Normalmente, las células antigénicas utilizadas para generar las células T que reaccionan con el antígeno son singénicas al sujeto al que han de ser administradas, por ejemplo, se obtienen del sujeto. Sin embargo, si no se dispone de células antigénicas que sean singénicas al sujeto para su uso, los procedimientos de la invención proporcionan la posibilidad de preparar las células antigénicas con el mismo haplotipo HLA que el receptor previsto de las células, in vitro, utilizando células no cancerosas (por ejemplo, células normales) recogidas del receptor. Los lisados o preparaciones de células tumorales, se pueden utilizar para la reestimulación de las células T que reaccionan con el antígeno de la invención.
- 5 Las células normales se pueden inducir para que se conviertan en cancerosas o transformadas, por ejemplo, por el tratamiento con agentes cancerígenos, tales como productos químicos y/o radiación o por infección con un virus de transformación, y a continuación se utilizan para realizar el tratamiento con pulsos directamente o se utilizan para preparar un lisado para tratar con pulsos a las células dendríticas en combinación con BCG o BCG en combinación con LPS.
- 10 Se pueden utilizar lisados o preparaciones de tales células asociadas al tejido o específicas del tejido, células cancerosas o transformadas, y similares, para el tratamiento con pulsos de las células inmunitarias o CPA in vitro. Los lisados o preparaciones de estas células, se pueden utilizar para la reestimulación de las células T que reaccionan con el antígeno de la invención.
- 15 Si está disponible el gen clonado de un antígeno de interés, las células normales del sujeto se pueden transformar o transfectar con el gen, de tal manera que el antígeno de interés se exprese de manera recombinante en las células. Posteriormente, estas células se pueden utilizar para cebar, tratar mediante pulsos y/o en reacciones de reestimulación. En un aspecto menos típico, se pueden preparar células antigénicas para su uso a partir de células que no son singénicas pero que tienen al menos un alelo del CMH en común con el receptor previsto.
- 20 En una respuesta inmunitaria, el proceso de activación de las células T inducido por el antígeno se produce in vivo por lo general en los tejidos linfoides secundarios, tales como los ganglios linfáticos y el bazo. Siguiendo los presentes procedimientos, se puede utilizar cualquier célula antigénica de interés para cebar células T in vitro, incluso células cancerosas o células infectadas que se consideran no seguras para su uso en la inmunización activa. Tales células T cebadas se exponen a continuación a las CPA tratadas con pulsos con el antígeno viral, bacteriano, específico del tejido, el antígeno tumoral o fragmentos antigénicos de cualquiera de los antígenos y BCG. Las células T CD8⁺ que reaccionan con el antígeno se pueden expandir in vitro como fuente de células para la inmunoterapia. Por consiguiente, una de las ventajas de los presentes procedimientos es que las células T específicas de antígeno se pueden expandir in vitro para crear una fuente de células para la inmunoterapia que se pueden utilizar para el tratamiento o la prevención de enfermedades.
- 25 Hay muchas ventajas de la inmunoterapia según lo proporcionado por la presente invención. La carga tumoral después de la cirugía es mínima y la inmunoterapia es más eficaz en esta situación. Los procedimientos de la invención están dirigidos a mejorar la inmunocompetencia de un paciente con cáncer antes de la cirugía o después de la cirugía, y a mejorar la inmunidad contra las células cancerosas específicas del tumor mediada por células, siendo el objetivo la inhibición de la proliferación de las células cancerosas y la erradicación total de las células cancerosas residuales en el cuerpo. En otro aspecto, las células T que reaccionan con el antígeno reactivas contra las células cancerosas humanas se pueden utilizar, solas o en combinación con cirugía, quimioterapia, radioterapia u otros tratamientos contra el cáncer, para erradicar la metástasis o micrometástasis, o para purgar la médula ósea de las células cancerosas durante el trasplante de médula ósea. Por ejemplo, para erradicar o inhibir el crecimiento de las metástasis o micrometástasis, se administran las células T que reaccionan con el antígeno proporcionadas por la invención, por lo general células T CD3+CD8⁺ o CD3+CD4⁺, in vivo, al sujeto que tenga o pueda tener una metástasis o micrometástasis.
- 30 Hay muchas ventajas de la inmunoterapia según lo proporcionado por la presente invención. La carga tumoral después de la cirugía es mínima y la inmunoterapia es más eficaz en esta situación. Los procedimientos de la invención están dirigidos a mejorar la inmunocompetencia de un paciente con cáncer antes de la cirugía o después de la cirugía, y a mejorar la inmunidad contra las células cancerosas específicas del tumor mediada por células, siendo el objetivo la inhibición de la proliferación de las células cancerosas y la erradicación total de las células cancerosas residuales en el cuerpo. En otro aspecto, las células T que reaccionan con el antígeno reactivas contra las células cancerosas humanas se pueden utilizar, solas o en combinación con cirugía, quimioterapia, radioterapia u otros tratamientos contra el cáncer, para erradicar la metástasis o micrometástasis, o para purgar la médula ósea de las células cancerosas durante el trasplante de médula ósea. Por ejemplo, para erradicar o inhibir el crecimiento de las metástasis o micrometástasis, se administran las células T que reaccionan con el antígeno proporcionadas por la invención, por lo general células T CD3+CD8⁺ o CD3+CD4⁺, in vivo, al sujeto que tenga o pueda tener una metástasis o micrometástasis.
- 35 A modo de ejemplo, para purgar la médula ósea de células cancerosas durante el trasplante de médula ósea, la médula ósea del donador se pone en contacto in vitro con las células T que reaccionan con el antígeno proporcionadas por la invención, de modo que las células T que reaccionan con el antígeno produzcan la lisis de cualquier célula cancerosa residual en la médula ósea, antes de administrar la médula ósea al sujeto a los efectos de la reconstitución hematopoyética. El trasplante de médula ósea es típicamente autólogo. En una forma de realización, las células T que reaccionan con el antígeno son células T CD3+CD8⁺ o CD3+CD4⁺. Como alternativa, la administración de las células T que reaccionan con el antígeno T implica tanto células T CD4⁺ como células T CD8⁺.
- 40 Por otra parte, si los pacientes con cáncer se someten a cirugía con anestesia, y posterior quimioterapia, la inmunosupresión resultante experimentada por el paciente puede reducirse por la inmunoterapia celular en el período preoperatorio, reduciendo de este modo la incidencia de complicaciones infecciosas. También existe la posibilidad de que las células tumorales se desprendan a la circulación durante la cirugía, y por lo tanto, una inmunoterapia eficaz aplicada en este momento puede eliminar estas células in vivo. La invención se refiere, por consiguiente, a un procedimiento para la profilaxis o el tratamiento que comprende administrar a un paciente con cáncer las células T que reaccionan con el antígeno proporcionadas por la presente invención, reactivas contra un
- 45
- 50
- 55
- 60

antígeno de las células cancerosas del paciente, antes, durante y/o después de la cirugía y/o quimioterapia a las que se somete el paciente con cáncer.

Una serie de antígenos o compuestos antigénicos son útiles, según la presente invención, para su presentación por las CD para activar las células T para la inmunoterapia. En una forma de realización, se utiliza como antígeno un lisado de células tumorales de cáncer de próstata recuperadas de las piezas quirúrgicas. Por ejemplo, se puede utilizar una muestra del tumor del propio paciente con cáncer, obtenida en la biopsia o la resección quirúrgica, para proporcionar un lisado de células para el antígeno. Como alternativa, se puede utilizar como antígeno una preparación de membranas de las células tumorales de un paciente con cáncer, por ejemplo, un paciente con cáncer de próstata, o líneas celulares establecidas. Otros antígenos útiles en los presentes procedimientos, incluidos los antígenos virales y bacterianos, se analizan en detalle anteriormente.

Las CD pueden exponerse a un antígeno deseado, viral, bacteriano, asociado al tejido o específico del tejido, antígeno asociado al cáncer de próstata, o un fragmento antigénico de los antígenos mediante la incubación de las CD con el antígeno en el medio de cultivo in vitro. El antígeno, en forma de suspensión acuosa o acuosa soluble en combinación con BCG solo o en combinación con BCG y LPS, se añade al medio de cultivo celular. Como se ha demostrado en el presente documento, las CD captan de manera ventajosa el antígeno para su presentación exitosa a las células T en el contexto del CMH de clase I.

Los antígenos se pueden introducir en el citosol de las CD por medio de procedimientos alternativos, incluyendo, pero no limitados a, la lisis osmótica de vesículas pinocíticas y el uso de liposomas sensibles al pH, y similares. Véase, en general, (Okada y col., 29: 33 (1982); Poste y col., *Methods Cell Biol.* 14: 33 (1976), Reddy y col., *J. Immunol. Methods* 141: 157 (1991)).

Aislamiento de células dendríticas

Las células dendríticas humanas (CD) se obtienen de cualquier tejido en el que residan incluyendo los tejidos no linfoides tales como la epidermis de la piel (células de Langerhans) y los tejidos linfoides tales como el bazo, la médula ósea, los ganglios linfáticos y el timo. Las CD también se pueden aislar y del sistema circulatorio incluyendo la sangre (CD de la sangre) y los ganglios linfáticos (células veladas). La sangre periférica humana es una fuente inmediata de fácil acceso de CD humanas y se utiliza como fuente según una forma de realización específica de la invención. La sangre del cordón umbilical es otra fuente de CD humanas y en los casos en que un niño nace en una familia que se sabe que tiene alto riesgo de padecer cáncer de próstata, la sangre del cordón umbilical puede ser utilizada como fuente de CD que pueden crioconservarse para su uso posterior, si es necesario.

Debido a que las CD se producen en pequeñas cantidades en cualquiera de los tejidos en que residen, como la sangre periférica humana, las CD deben ser enriquecidas o aisladas para su uso. Para obtener poblaciones enriquecidas o aisladas de CD se puede utilizar cualquiera de una serie de procedimientos que implican la separación repetitiva en gradiente de densidad, la selección positiva, la selección negativa o una combinación de los mismos. Ejemplos de tales procedimientos para aislar las CD a partir de sangre periférica humana incluyen: (O'Doherty y col., *J. Exp. Med.* 178: 1067-1078 (1993), Young and Steinman, *J. Exp. Med.* 171: 1315-1332 (1990), Freudenthal and Steinman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7698-7702 (1990); Macatonia y col., *Immunol.* 67: 285-289 (1989) y Markowicz and Engleman, *J. Clin. Invest.* 85: 955-961 (1990)). En la publicación PCT WO94/02156 se describe un procedimiento para aislar las CD a partir de sangre periférica humana que evita la exposición de las células a glóbulos rojos de oveja y/o a suero de ternera fetal. Un ejemplo de un procedimiento para aislar las CD a partir de tejido linfóide se describe en Macatonia y col., *J. Exp. Med.* 169: 1255-1264 (1989).

Una vez que se han obtenido las CD, se cultivan en medio de cultivo apropiado para expandir la población de células y/o para mantener las CD en un estado óptimo para la captación, el procesamiento y la presentación del antígeno.

Según una forma de realización, que también proporciona el mantenimiento del estado de "madurez" adecuado de las CD en el cultivo in vitro, se realiza el cultivo de las CD en presencia de los factores estimulantes de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4). En un ejemplo, se utiliza una combinación de GM-CSF e IL-4 en una concentración de aproximadamente 500 unidades/ml de cada uno. Un estudio reciente revela la óptima presentación de antígenos por CD "inmaduras" frente a maduras (Koch y col., *J. Immunol.* 155: 93-100 (1995)). Las CD inmaduras se puede utilizar según ciertas formas de realización de la presente invención. Experimentos recientes han demostrado que las CD maduras tratadas con pulsos conservan la capacidad de estimular una respuesta de células T durante hasta diez veces más tiempo que las CD inmaduras tratadas con pulsos.

Como se ilustra en los ejemplos, a continuación, las CD humanas se aislaron de sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata, y después de aproximadamente 5 días en cultivo in vitro, se recuperaron las CD competentes y capaces de activar las células T específicas del cáncer de próstata. Según una forma de realización de la invención, las CD se obtienen de un paciente con cáncer a tratar. Las CD se someten a tratamiento con pulsos con uno de los diversos antígenos proporcionados en el presente documento en presencia de BCG, con o sin LPS, y a continuación se usas para activar las células T autólogas del paciente, ya sea in vitro o in vivo, para llevar a cabo la inmunoterapia del cáncer y/o la inhibición del crecimiento tumoral.

Según una forma de realización alternativa, las CD se obtienen de una persona sana que se sabe que no padece cáncer. Se identifican los antígenos HLA pertinentes (CMH clase I y II, por ejemplo, HLA-A, B, C y DR) en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) del individuo y se aíslan y expanden las CD que proporcionan una compatibilidad de HLA con el paciente con cáncer como se describió anteriormente. Por ejemplo, en ciertos casos, los pacientes con cáncer de próstata en estadio tardío que han sido tratados con radiación y/o agentes de quimioterapia a menudo no son capaces de proporcionar CD suficientes o eficaces. Por consiguiente, se pueden obtener y expandir CD de individuos sanos HLA compatibles, tales como hermanos, a través de cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente y posteriormente se pueden incubar in vitro con un antígeno relevante en presencia de BCG para formar las CD naturales activadas, que a su vez pueden usarse para producir células T activadas para la inmunoterapia y/o para inhibir el crecimiento tumoral en los pacientes con cáncer de próstata HLA compatibles.

Según otra forma de realización de la invención, se utilizan "células dendríticas con vida útil ampliada". Las células humanas tienen una vida útil finita in vitro, limitada por lo general a aproximadamente 50-70 duplicaciones de la población antes de sufrir la apoptosis. Como se utiliza en el presente documento, el término "células dendríticas con vida útil ampliada" significa que las CD han sido modificadas genéticamente para que puedan expandirse en un medio de cultivo celular in vitro durante un largo período de tiempo, incluyendo, pero no limitado a, al menos aproximadamente 100 duplicaciones adicionales de la población. Las CD con vida útil ampliada se obtienen, por ejemplo, por transformación con VEB de las CD obtenidas de sangre periférica de pacientes con cáncer de próstata, o por medio de la inserción en las CD, utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, de un gen específico regulador del ciclo celular, incluyendo, pero no limitado a, un gen que codifica la ciclina A, B, D o E, o la proteína del retinoblastoma.

Como se ilustra en los ejemplos presentados en la Patente de EE.UU. N° 5.788.963, las CD con vida útil ampliada se han obtenido mediante la transformación con VEB de una población de CD aisladas. Tales CD con vida útil ampliada son útiles por consiguiente en los procedimientos de la presente invención.

Según otra forma de realización de la invención, las CD pueden conservarse, por ejemplo, por medio de crioconservación ya sea antes de la exposición o después de la exposición a un antígeno relevante. Los agentes de crioconservación, que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido (DMSO) (Lovelock and Bishop, *Nature* 183: 1394-1395 (1959); Ashwood-Smith, *Nature* 190: 1204-1205 (1961)), glicerol, polivinilpirrolidona (Rinfret, *N. Y Acad. Sci.* 85: 576 (1960)), polietilenglicol (Sloviter and Ravdin, *Nature* 196: 548 (1962)), albúmina, dextrano, sacarosa, etilenglicol, i-eritritol, D-ribitol, D-manitol (Rowe y col., *Fed. Proc.* 21: 157 (1962)), D-sorbitol, i-inositol, D-lactosa, cloruro de colina (Bender y col., *J. Appl. Physiol.* 15: 520 (1960)), aminoácidos (Phan and Bender, *Exp. Cell. Res.* 20: 651 (1960)), metanol, acetamida, monoacetato de glicerol (Lovelock, *Biochem. J.* 56: 265 (1954)) y sales inorgánicas (Phan and Bender, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104: 388 (1960); Phan and Bender, en *Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology*, Ilbery, P.L.T., ed., Butterworth, Londres, pág. 59 (1961)).

Una velocidad de enfriamiento lenta controlada es fundamental. Diferentes agentes crioprotectores (Rapatz y col., *Cryobiology* 5: 18-25 (1968)) y diferentes tipos de células tienen diferentes velocidades de enfriamiento óptimas (véase, por ejemplo, Rowe and Rinfret, *Blood* 20: 636 (1962); Rowe, *Cryobiology* 3: 12-18 (1966); Lewis y col., *Transfusion* 7: 17-32 (1967) y Mazur, *Science* 168: 939-949 (1970)), para los efectos de la velocidad de enfriamiento sobre la supervivencia de las células madre de médula ósea y sobre su potencial de trasplante). El calor de la fase de fusión, en la que el agua se convierte en hielo, debe ser mínimo. El proceso de enfriamiento se puede realizar mediante el uso de, por ejemplo, un dispositivo de congelación programable o un procedimiento con baño de metanol. Los aparatos de congelación programables permiten la determinación de las velocidades de enfriamiento óptimas y facilitan el enfriamiento reproducible estándar. Los congeladores programables de velocidad controlada, tales como Cryomed o Planar permiten ajustar el régimen de congelación a la curva de velocidad de enfriamiento deseada.

Después de la congelación completa, las células se pueden transferir rápidamente a un recipiente criogénico de almacenamiento a largo plazo. En una forma de realización particular, las muestras se pueden almacenar criogénicamente en nitrógeno líquido (-196 °C) o su vapor (-165 °C). Este almacenamiento es fácil de realizar en gran medida por la disponibilidad de refrigeradores de nitrógeno líquido de alta eficiencia.

Las consideraciones y procedimientos para la manipulación, crioconservación y el almacenamiento a largo plazo de células madre hematopoyéticas, en particular de la médula ósea o de sangre periférica, son en gran parte aplicables a las CD preparadas por los procedimientos de la invención. Este análisis se puede encontrar, por ejemplo, en las siguientes referencias, que se incorporan por referencia en el presente documento: (Gorin, *Clinics in Haematology* 15: 19-48 (1986); Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, *Proceedings of a Panel*, Moscú, 22 al 26 de julio de 1968, International Atomic Energy Agency, Viena, páginas 107-186). Otros procedimientos de crioconservación de células viables, o sus modificaciones, están disponibles y para su uso previsto (por ejemplo, técnicas de espejo con metal frío; Livesey and Linner, *Nature* 327: 255 (1987); Linner y col., *J. Histochem. Cytochem.* 34: 1123-1135 (1986), véase también la Patente de EE.UU. N° 4.199.022 concedida a Senken y col., la Patente de EE.UU. N° 3.753.357 concedida a Schwartz, la Patente de EE.UU. N° 4.559.298 concedida a Fahy, y la Patente de EE.UU. N° 5.364.756 concedida a Livesey, y col.

Las células congeladas por lo general se descongelan rápidamente (por ejemplo, en un baño de agua a 37-41 °C) y se refrigeran inmediatamente después de la descongelación. Puede resultar conveniente someter las células a tratamiento para evitar que se produzca agrupamiento celular tras la descongelación. Para evitar el agrupamiento, se pueden utilizar diversos procedimientos, incluyendo, pero no limitados a, la adición de DNasa antes y/o después de la congelación (Spitzer y col., *Cancer* 45: 3.075-3085 (1980)), dextrano de bajo peso molecular y citrato, hidroxietil almidón (Stiff y col., *Cryobiology* 20: 17-24 (1983)), y similares. El agente crioprotector, si es tóxico para los seres humanos, debe ser eliminado antes de la administración de las CD descongeladas a un individuo. Una forma por la que se puede eliminar el agente crioprotector es por dilución hasta una concentración insignificante. Una vez que las CD congeladas se han descongelado y recuperado, se utilizan para activar las células T como se describió anteriormente con respecto a las CD no congeladas.

Aplicaciones o procedimientos de uso

Exclusivamente para facilitar la presentación, la siguiente discusión es ilustrativa de los usos particulares de los procedimientos de la invención como podrán entender claramente los expertos en la técnica. Los ejemplos proporcionados en el presente documento no están destinados a limitar el alcance de la presente invención, que puede ser utilizada para prácticamente cualquier antígeno, incluyendo virus y bacterias para todos los tipos de cáncer.

Como se mencionó anteriormente, según una forma de realización de la invención, se pueden utilizar CD humanas aisladas, expuestas a un antígeno prostático específico, soluble, exógeno y BCG por cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento para activar las células T in vitro contra el cáncer de próstata. En particular, la respuesta de células T es una respuesta dirigida al CMH de clase I que proporciona una población de células T activadas que comprende más de 25% de células T CD8⁺. Las CD se pueden utilizar inmediatamente después de la exposición al antígeno para estimular las células T. Como alternativa, las CD se pueden mantener en presencia de una combinación de GM-CSF e IL-4 antes de la exposición simultánea al antígeno y a las células T.

Se pueden obtener células T o una subserie de células T de diversos tejidos linfoides para su uso como células de respuesta. Tales tejidos incluyen, pero no se limitan al bazo, los ganglios linfáticos y la sangre periférica de cordón umbilical. Las células se pueden cocultivar con CD expuestas al antígeno como una población mixta de células T o como una subserie de células T purificadas. Por ejemplo, puede resultar deseable cultivar células T CD8⁺ purificadas con CD expuestas al antígeno para obtener linfocitos T citotóxicos (LTC) específicos de próstata. Además, la eliminación temprana de las células T CD4⁺ en el cultivo celular in vitro puede prevenir el crecimiento excesivo de células CD4⁺ en un cultivo mixto de ambas células T, CD8⁺ y CD4⁺. La purificación de las células T se puede conseguir por selección positiva y/o negativa, incluyendo, pero no limitado al uso de anticuerpos dirigidos a CD2, CD3, CD4, CD8 y similares.

Según una forma de realización, las células T se obtienen del mismo paciente con cáncer de próstata de quien se obtuvieron las CD. Después de la estimulación o activación in vitro, las células T autólogas se administran al paciente para provocar y/o aumentar la respuesta inmunitaria existente que retrasa o inhibe el crecimiento del tumor canceroso de próstata. Por ejemplo, se pueden administrar las células T, por infusión intravenosa, en dosis de aproximadamente 10⁸-10⁹ células/m² de superficie corporal (véase, Ridell y col., *Science* 257: 238-241 (1992)). La infusión se puede repetir a intervalos deseados, por ejemplo, mensualmente. Se realizan controles a los receptores durante y después de las infusiones de células T para detectar cualquier evidencia de efectos adversos.

Según otra forma de realización, las células T se obtienen de un paciente con cáncer de próstata y las CD que se utilizan para estimular las células T se obtienen de un donador sano HLA compatible. Según otra forma más de realización, tanto las células T como las CD se obtienen de un donador sano HLA compatible, por ejemplo, un hermano del paciente con cáncer de próstata. Esta forma de realización puede ser ventajosa, por ejemplo, cuando el paciente es un paciente en estadio tardío de cáncer de próstata que sido tratado con radiación y/o agentes de quimioterapia y puede no ser capaz de proporcionar CD suficientes o eficientes. Después de la estimulación, las células T se administran como se describió anteriormente.

En un ejemplo específico de los procedimientos de la presente invención, el PSMA cargado en las células dendríticas (CD), utilizando diversos procedimientos, produjo células presentadoras de antígenos que pueden estimular las células T autólogas y alogénicas de manera específica del antígeno. Estos procedimientos incluyen: 1) el tratamiento durante la noche de las CD de aproximadamente el día 6 con la proteína PSMA y el bacilo de micobacterias Calmette-Guerin (BCG), con o sin lipopolisacárido (LPS), y 2) la carga osmótica de las CD de aproximadamente el día 7 utilizando un medio hipertónico. Las CD estimuladas con BCG demuestran elevados niveles de expresión de CD83 y CD86, mientras que el LPS mejora aún más la maduración de las CD. La carga osmótica se llevó a cabo utilizando un medio hipertónico para aumentar la fagocitosis y la macropinocitosis.

Después de dos estímulos semanales in vitro con CD cargadas con PSMA (preparadas con BCG ± LPS o con carga osmótica) y una o más reestimulaciones semanales con CMSP tratados de manera exógena con pulsos de PSMA, se demostró la reactividad específica para el inmunógeno (Fig. 1-6).

Según otra forma de realización de la invención, las CD aisladas de un paciente con cáncer de próstata se cultivan in vitro, y a continuación se exponen a un antígeno específico del tejido prostático, un antígeno de cáncer de próstata o un fragmento antigénico de cualquiera de los antígenos de manera suficiente para obtener la presentación del antígeno al CMH de clase I y que aumente el número relativo de LTC CD8⁺. Después de la expansión o la crioconservación, las CD se administran de nuevo al paciente para estimular una respuesta inmunitaria, incluyendo la activación de células T, contra las células cancerosas del paciente in vivo. El uso de este enfoque con las propias células dendríticas del paciente proporciona las siguientes ventajas: (1) no se utiliza ADN extraño; (2) se elimina la infección de células con fines de expresión del ADNc utilizando diversos vectores virales; (3) el antígeno se presenta a las células dendríticas en la forma de proteína soluble que ingresará en las células dendríticas y se procesará para la presentación del CMH/péptido de la superficie de la célula; (4) las células dendríticas expresan B7 en su superficie lo que alivia la necesidad de transfectar este ADNc en las células dendríticas; (5) el uso de B7 endógeno (ya sea B7.1 y/o B7.2) en la superficie de las células dendríticas elimina la necesidad de proporcionar células T con IL-2 u otras citocinas, ya sea en la forma de la citocina misma o la transfección del ADNc en células específicas; (6) todos los procedimientos se llevan a cabo utilizando las propias células del paciente.

Las CD obtenidas como se describió anteriormente, se exponen in vitro a un antígeno específico de la próstata, un antígeno de cáncer de próstata o un fragmento antigénico de cualquiera de los antígenos (por ejemplo, PSMA a aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 1000 µg) en combinación con BCG (concentración final de aproximadamente 2 x 10⁵ hasta aproximadamente 1 x 10⁶ unidades/ml) o BCG en combinación con LPS (40 unidades/ml), se lavan y se administran a un paciente para provocar una respuesta inmunitaria o para aumentar la respuesta inmunitaria existente. Por lo tanto, las CD constituyen una vacuna y/o un agente inmunoterapéutico contra el cáncer de próstata. Las CD que presentan un antígeno específico de la próstata se administran a un paciente, a través de infusión intravenosa, en dosis de aproximadamente 10⁶-10⁸ células. Se puede controlar la respuesta inmunitaria del paciente. La infusión se puede repetir a intervalos deseados en función de la respuesta inmunitaria medida del paciente.

Los siguientes ejemplos demuestran que las células dendríticas humanas, obtenidas de pacientes con cáncer de próstata, tratadas con pulsos con el antígeno, por ejemplo en forma de péptido o lisado del tumor autólogo en presencia de una combinación de BCG y LPS, o con BCG solo, estimulan la respuesta humoral y de células T citotóxicas específicas del antígeno a los antígenos del cáncer de próstata humano. Estos ejemplos se presentan solamente con fines de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

30 **Ejemplo 1**

El siguiente ejemplo describe el aislamiento y el cultivo de células dendríticas humanas. Las células dendríticas se aislaron y se pusieron en contacto con el lisado de células tumorales y el lisado de células tumorales parcialmente purificado en combinación con BCG para demostrar la estimulación de la respuesta de células T citotóxicas específicas del antígeno.

35 **Cultivo de las células dendríticas del paciente**

Se establecieron cultivos de CD humanas como se describió anteriormente en el presente documento y en la Patente de EE.UU. Nº 5.788.963. Brevemente, se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de la "capa leucocitaria" rica en leucocitos por centrifugación convencional en Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las CMSP con capacidad de adherencia al plástico (aproximadamente 1 hora a 37 °C) se cultivaron durante 6 a 7 días en AIM-V suplementado o no con suero autólogo al 2%, penicilina 50 U/ml, estreptomycin 50 µg/ml, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato 1 mM (conocido como "medio de cultivo"; todos de Boehringer Ingelheim, Biowhittaker, Verviers, Bélgica), en presencia de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) 1000 U/ml o 500 U/ml (Leucomax™ 1,11 x 10⁷ U/mg de Novartis, Basilea, Suiza) e interleucina-4 (IL-4) 500 U/ml (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ).

Determinación del fenotipo de las CD del paciente

Para determinar la expresión del antígeno de superficie (Ag), se marcaron las células (10⁵ CD en 50 µl) con el anticuerpo monoclonal primario (Acm) en medio completo seguido por fragmentos F(ab')₂ de Ig anti-ratón de cabra conjugados con FITC (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se pueden utilizar los siguientes anticuerpos monoclonales, aunque muchos otros que tienen la misma especificidad son muy conocidos: G46-2.6 (IgG1, anti-HLA-ABC), L243 (IgG_{2a}, anti-HLA-DR), HB-15a (IgG_{2b}, anti-CD83), BU63 (IgG1, anti-CD86). Los lavados se realizaron en HBSS que contenía albúmina al 0,2%. Después del último lavado, las células se almacenaron en HBSS que contenía albúmina al 0,2% y formaldehído al 2%. Las muestras se analizaron en un FACScan® (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Los datos se analizaron y se presentaron utilizando el programa CellQuest® de Becton Dickinson.

55 **Preparación de lisados de células tumorales**

Se utilizaron BCG y LPS para estimular la carga del CMH de clase I de las CD de la siguiente manera: se añadieron 1-100 µg de PSMA derivado de LNCaP o PSMA recombinante parcialmente purificado (rPSMA) al medio de cultivo de las CD del día 6 por medio de una pipeta con micropunta estéril. Al mismo tiempo, se añadió BCG (concentración

final $0,2 - 1,6 \times 10^6$ U/ml; Tice-BCG, Organon Teknika, Durham, NC) y, en un matraz de replicación, LPS (concentración final 40 U/ml) al medio de cultivo utilizando el mismo procedimiento. A continuación se mezcló el medio de cultivo suavemente antes de volver a colocarlo en una incubadora de CO_2 .

5 La carga osmótica se realizó de la siguiente manera: se recogieron las CD del día 7 por medio de pipeteo vigoroso con disolución salina tamponada de fosfato (PBS), a continuación se incubaron con PBS antes de desprenderlas por medios mecánicos. Se centrifugaron las CD a baja velocidad y se retiró todo el sobrenadante mediante aspiración. Se resuspendieron los sedimentos celulares en la cantidad deseada de PSMA y PBS hasta un volumen final de 100 μ l. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de medio hipertónico (sacarosa 1 M y glicerol al 20%) y se mezcló la suspensión de células con una micropunta de pipeta. Las células se colocaron a continuación en un baño de agua a 10 37 °C durante 10 minutos, en un tubo de centrifuga de 15 ml. Tras la incubación, se restauraron las condiciones isotónicas rellenando el tubo con DMEM o AIM-V, posteriormente se volvió a colocar el tubo en el baño de agua a 37 °C durante 3 minutos. A continuación se centrifugaron las células y se resuspendieron en medio de cultivo a la concentración deseada.

15 Después de dos estímulos semanales in vitro con CD cargadas con PSMA y una o más reestimulaciones semanales con CMSP tratadas con pulsos de manera exógena con PSMA, se demostró la reactividad específica para el inmunógeno (Fig. 1-5). Para el día 18 de cultivo, las células efectoras del paciente 92 reconocieron específicamente las CD autólogas que presentaban el PSMA, pero no la proteína irrelevante ovoalbúmina (OVA) ni las CD sin tratar (Fig. 1A). Las células efectoras del paciente 92 también reconocieron específicamente las CD alogénicas de los pacientes 105 e I.T. (Fig. 1B y Fig. 1C). Las células efectoras de los pacientes 105 y T.I. secretaron citocinas de una 20 manera específica tras el cocultivo con CD tanto autólogas como alogénicas que presentaban el PSMA.

Lo actividad restringida al PSMA observada contenía un importante componente de células T $CD8^+$ (Fig. 2A-Fig. 2C). Como se ilustra, cuando se estimularon las células efectoras del paciente 105 con las CD en las que se había cargado PSMA en presencia de BCG, la secreción de citocinas fue significativamente mediada por $CD8$, independientemente de la inclusión de LPS durante las estimulaciones (Fig. 2A y Fig. 2B). Cuando se estimularon 25 las células efectoras con las CD que expresaban PSMA después de la carga osmótica, no hubo una diferencia estadísticamente significativa en la contribución relativa de células T $CD8^+$ y $CD4^+$ para la reactividad observada (Fig. 2C). Se obtuvieron similares resultados utilizando efectores estimulados de forma idéntica de los pacientes 92 e I.T. (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que el uso de BCG, con o sin LPS, como se enseña en el presente, da lugar a una respuesta inmunitaria sesgada hacia las células T citotóxicas (es decir, más del 50% de 30 las células T fueron $CD8^+$).

Después de reestimulaciones adicionales con CMSP cargadas con PSMA (utilizando carga osmótica), se evaluaron efectores específicos del paciente 105 para determinar si estos efectores tenían la capacidad de secretar citocinas de una manera dependiente de la dosis (Fig. 3). Para la estimulación inicial en los días 0 y 10, si estaban presentes BCG o BCG + LPS durante la carga del PSMA en las CD, la cantidad de citocinas secretadas por los efectores 35 estaba directamente asociada con la cantidad de PSMA cargado osmóticamente en las CD diana autólogas (Fig. 3A y 3B). La mayor cantidad de secreción de IFN γ se observó cuando se cargó la mayor concentración de PSMA probada en las CD, sin llegar a alcanzar un máximo. Todos los estímulos in vitro se realizaron utilizando las CD o CMSP cargadas con 10 μ g de PSMA. Esta cantidad de proteína fue suficiente para la fuerte estimulación y activación de las células T. Cuando se repitió el experimento con la concentración máxima de PSMA aumentada hasta 30 μ g, se alcanzó una meseta (Fig. 3C). 40

Se pudo detectar un nivel moderado de citólisis específica del PSMA (Fig. 4A y 4B). A los 32 días de cultivo, las células efectoras del paciente I.T. mostraron un 37% de lisis de CD autólogas que presentaban PSMA en una relación efector:diana 40:1, en comparación con el 23% frente a las CD autólogas que presentaban OVA o el 19% frente a las dianas sin tratar (Fig. 4A). A los 39 días de cultivo, las células efectoras del paciente 92 mostraron el 45 23% de lisis de CD autólogas que presentaban PSMA en una relación efector:diana de 36:1, en comparación con el 14% frente a las CD autólogas que presentaban OVA o el 10% frente a las dianas sin tratar (Fig. 4B).

También se determinó la especificidad de los péptidos derivados de PSMA reconocidos por las células T estimuladas in vitro con las CD osmóticamente cargadas con proteínas intactas, solubles. Utilizando células efectoras del paciente 92 que eran específicas del PSMA después de la estimulación in vitro, se midió la secreción 50 de citocinas después del cocultivo con la línea celular T2 presentadora de antígeno tratada de manera exógena con pulsos con uno de los péptidos HLA-A2 $^+$ derivados de PSMA:PSM-1 o la proteína M1 de la gripe (Fig. 6A y Fig. 6B).

En otro experimento se demostró que las células dendríticas cargadas osmóticamente o directamente con péptido o proteína M1 de la gripe, que comprendía un fragmento de antígeno y maduras en presencia de BCG solo o en combinación con interferón gamma son capaces de estimular una actividad mediada por células T según la medición 55 de la producción de interferón gamma por la subserie de células T $V_{\beta 17}$.

Ejemplo 2

El presente ejemplo examina si las células dendríticas retienen su función después de la criopreservación. Esta característica es especialmente importante porque los enfoques de inmunoterapia incluyen múltiples tratamientos y

es preferible que para cada paciente se preparen y carguen todas las CD con el antígeno durante una única preparación, a continuación se separen en alícuotas y posteriormente se crioconserven para su infusión posterior. Existía la posibilidad de que la congelación y descongelación de las CD pudiera limitar su eficacia como activadores de las células T CD8⁺.

- 5 Se aislaron las células dendríticas de CMSP de un paciente con cáncer de próstata y se cultivaron, como se describió anteriormente, durante 7 días en presencia de GM-CSF 500 U/ml e IL-4 500 U/ml. El día 7, se recogieron las CD aisladas y se crioconservaron utilizando suero de ternera fetal al 90% y dimetilsulfóxido al 10%. Las CD crioconservadas se almacenaron posteriormente congeladas durante un período de tiempo, se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 15 ml y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 5 minutos. Las CD descongeladas se resuspendieron a continuación en medio que contenía suero humano inactivado por calor al 10% y se contaron y utilizaron como se describe a continuación.

Las CD del día 7 del paciente 105 se cargaron osmóticamente con PSMA o con OVA (o se dejaron sin tratar). Las CD tratados se congelaron posteriormente en un medio de congelación convencional de suero humano al 90% y DMSO al 10% como se describió anteriormente. El mismo día, se estableció una segunda serie de cultivos de CD. 15 Una semana más tarde, se recogieron CD frescas del día 7 y se cargaron osmóticamente con PSMA o con OVA (o se dejaron sin tratar). Además, las CD que se habían crioconservado la semana anterior fueron descongeladas mediante técnicas convencionales y utilizadas inmediatamente en un ELISA. Las células efectoras restringidas al PSMA del paciente 105 mostraron una fuerte reactividad tanto para las dianas frescas como para las crioconservadas (Fig. 5). Como se enseña en este ejemplo concreto, la crioconservación no disminuye la eficacia de 20 las CD para funcionar como células presentadoras de antígeno.

La posibilidad de provocar a una respuesta antitumoral potente mediante la inmunoterapia ha estado limitada en cuanto a eficacia, en parte debido a la dificultad para estimular una respuesta de células T citotóxicas. La presente invención describe procedimientos y composiciones para superar esta limitación. La invención implica la exposición 25 de las células dendríticas a un antígeno soluble específico del tejido en presencia del bacilo de Calmette Guerin (BCG), de tal manera que el BCG ayude a dirigir el antígeno a la vía de procesamiento del CMH de clase I induciendo una respuesta predominantemente de células T citotóxicas. Un trabajo reciente de Cella y colaboradores (Cella y col., Nature 388: 782-787 (1997)), también ha demostrado la importancia del proceso de maduración para la presentación de antígenos. En ausencia de estímulos inflamatorios, la semivida de un antígeno presentado en las moléculas del CMH de clase II en las CD fue de 10 horas. En contraste, el tratamiento de las CD con pulsos con el 30 antígeno en presencia de factores inflamatorios aumentó la semivida del antígeno hasta 100 horas. La semivida más larga permite a las CD dirigirse a los órganos linfoides secundarios y activar los linfocitos T específicos del antígeno.

Ejemplo 3

En este ejemplo, las células dendríticas aisladas de un paciente de cáncer se aislaron y se trataron con varias concentraciones de BCG. Después de varios días de cultivo, se realizaron pruebas con las CD para determinar: 1) la 35 capacidad de captación de partículas por pinocitosis y 2) la expresión en la superficie de ciertos marcadores de maduración de células dendríticas, incluyendo HLA-DR, CD86, CD40, CD83, CD80 y HLA de clase I.

Se aislaron las células dendríticas del paciente 57 como se describió anteriormente. Las células aisladas ($1-5 \times 10^6$) se cultivaron durante 6 días en ocho matraces T-75. Se añadió BCG (1×10^6 unidades/ml) a matraces por duplicado para lograr una dilución de 1:250, 1:2500 o 1:25000. En los dos matraces de cultivo restantes no se 40 añadió BCG. Se recogió una primera serie de matraces de cultivo que comprendía las CD sin BCG, o con dilución de BCG 1:250, 1:2500 o 1:25000 después de una incubación de 48 o 72 horas. La serie de matraces de cultivo por duplicado se recogió después de un total de 72 horas en la cultivo. Cada cultivo de CD se analizó para determinar: (1) la capacidad de captación de FITC/Dextrano por pinocitosis y (2) el nivel de expresión en la superficie de determinados marcadores de maduración de CD, incluyendo HLA-DR, CD86, CD40, CD83, CD80 y HLA de clase I.

45 La capacidad de captación de partículas de dextrano marcadas por pinocitosis se probó de la siguiente manera: se tomaron alícuotas del contenido de cada matraz de cultivo de CD, se colocaron en tubos por duplicado y se incubaron en medio AIM-V en hielo durante 30 minutos. Después de la incubación en hielo, se añadió FITC/Dextrano a cada tubo hasta lograr una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml. Una serie de tubos se incubaron a 37 °C, en CO₂ al 5%, durante 1 hora, mientras que la serie duplicada de tubos se incubó en hielo 50 (0 °C) durante aproximadamente 1 hora. Las CD se lavaron 3 veces en disolución salina tamponada de fosfato (PBS) antes de realizar el análisis por citometría de flujo. Se comparó la cantidad relativa de pinocitosis por las CD después de restar la captación de fondo a 0 °C (Tabla 2).

Para el análisis de los marcadores de maduración de las CD, cada cultivo de CD se incubó con los siguientes pares de anticuerpo monoclonal: FITC-anti HLA-DR/PE-anti CD86; FITC-anti CD40/PE-anti CD83; FITC-anti CD80/PE-anti 55 HLA de clase I; o bien FITC-/PE-contrroles de anticuerpo de isotipo por medio de procedimientos convencionales. La expresión de superficie de cada uno de los marcadores de CD se analizó por citometría de flujo (Tabla 3).

Tabla 2

Captación de FITC – Dextrano (Fluorescencia media a 37 °C – Fluorescencia media a 0 °C)					
Nº de exp.	Concentración de BCG	Duración (h)	Media	Media GEO	Mediana
1	0	48	51	36,3	39,15
2	1:250	48	28,09	20,76	22,03
3	1:2500	48	37,02	27,11	29,28
4	1:25000	48	40,44	34,12	38,04
5	0	72	63,8	43,2	47,3
6	1:250	72	34,76	22,85	22,6
7	1:2500	72	49,79	36,24	39,6
8	1:25000	72	55,62	38,27	41,41

Tabla 3

Diferencia de FL media								
Nº de exp.	Concentración de BCG	Duración (h)	HLA-DR FITC	CD89 PE	CD40 FITC	CD83 PE	CD80 FITC	HLA de clase I-PE
1	0	48	250	613,07	19,64	15,14	-1,1	140,28
2	1:250	48	276,54	957,38	24,78	62,58	-1,27	173,69
3	1:2500	48	267,94	734,1	21,9	21,4	-0,94	135,45
4	1:25000	48	277,1	632	18,2	17,59	-1,62	148,97
5	0	72	337,13	705,75	20,89	22,42	-1,26	193,06
6	1:250	72	331,71	1106,12	33,39	127,65	-2,11	373,06
7	1:2500	72	336,87	694,74	24,2	35,1	-1,41	177,6
8	1:25000	72	298,96	646,95	19,81	24,25	-1,15	170,26

5 A una concentración de 1:250, las CD mostraron un incremento significativo en CD86, CD40, CD83 y HLA de clase I, tanto en el cultivo de 48 como en el de 72 horas. El efecto del BCG fue más pronunciado a las 72 horas. Por ejemplo, HLA de clase I aumentó en un 24% después de 48 horas con la concentración de BCG 1:250, pero aumentó un 93% después de 72 horas con la concentración de BCG 1:250. Del mismo modo, CD83 aumentó 40 veces en 48 horas con la concentración de BCG 1:250 y 5,7 veces después de 72 horas con la concentración de BCG 1:250.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Salgaller, Michael L. Boynton, Alton L. NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS, INC.

15 <120> Procedimiento para aumentar la presentación de clase I de antígenos exógenos por células dendríticas humanas

<130> 20093-8-1PC

<140> PCT/US01/

20 <141> 11-05-2001

<150> 60/203.758

<151> 12-05-2000

25 <160> 37

ES 2 375 948 T3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val
1 5

10 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 2

Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val
1 5

<210> 3

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu
1 5

25

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

ES 2 375 948 T3

<400> 4

Val Leu Ala Gly Gly Phe Phe Leu Leu
1 5

<210> 5

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

10

Glu Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 6

Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu
1 5

20 <210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 7

Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu
1 5

<210> 8

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 375 948 T3

<400> 8

Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu
1 5

<210> 9

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

10

Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 10

Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu Leu
1 5

20 <210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 11

Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu
1 5

<210> 12

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 375 948 T3

<400> 12

Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu
1 5

<210> 13

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

10

Glu Gly Asp Leu Val Tyr Val Asn Tyr
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
1 5

20 <210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 15

Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr
1 5

<210> 16

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 375 948 T3

<400> 16

Leu Phe Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr
1 5

<210> 17

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

10

Thr Tyr Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 18

Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr
1 5

20 <210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 19

Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr
1 5

<210> 20

<211> 11

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 375 948 T3

<400> 20

Ile	Val	Arg	Ser	Phe	Gly	Thr	Leu	Lys	Lys	Glu
1				5					10	

<210> 21

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

10

Asp	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Asn	Ile	Lys	Lys	Phe
1				5					10	

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 22

Lys	Ser	Leu	Tyr	Glu	Ser	Trp	Thr	Lys	Lys	Ser
1				5					10	

20 <210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 23

Ala	Tyr	Ile	Asn	Ala	Asp	Ser	Ser	Ile
1				5				

<210> 24

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 375 948 T3

<400> 24

Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile
1 5

<210> 25

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

10

Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys Leu Leu
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu
1 5

20 <210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 27

Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe
1 5

<210> 28

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 375 948 T3

<400> 28

Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe
1 5

<210> 29

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

10

Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile
1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 30

Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met
1 5

20 <210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 31

Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu
1 5

<210> 32

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 375 948 T3

<400> 32

Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val
1 5

<210> 33

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

10

Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr
1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 34

Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys
1 5

20 <210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 35

Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys
1 5

<210> 36

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 375 948 T3

<400> 36

Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys
1 5

<210> 37

5 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

10

Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para promover el procesamiento de un antígeno por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase I por medio de células dendríticas (CD) humanas, en el que dichas CD se exponen in vitro a un antígeno asociado con una célula tumoral en presencia del bacilo de Calmette Guerin (BCG) o BCG con lipopolisacárido (LPS) como factor o agente que promueve el procesamiento del antígeno por el CMH de clase I.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el antígeno es un lisado de células tumorales aisladas de un paciente, un antígeno purificado asociado al tumor, un antígeno purificado asociado al tejido o un fragmento antigénico de los mismos.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que el antígeno es un antígeno asociado al tumor de próstata.
- 10 4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el antígeno asociado al tumor de próstata es el antígeno prostático específico de membrana purificado (PSMA).
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las CD humanas se obtienen de la piel, el bazo, la médula ósea, el timo, los ganglios linfáticos, la sangre de cordón umbilical o la sangre periférica.
- 15 6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células dendríticas son células dendríticas con vida útil ampliada.
7. Un procedimiento para producir células T activadas in vitro que implica:
 - a) proporcionar CD aisladas a las que se ha añadido
 - BCG en una concentración de 1×10^6 unidades/ml para alcanzar una dilución seleccionada del grupo que consiste en 1:250, 1:2500 y 1:25000, y
 - 20 - un antígeno asociado con una célula tumoral, y
 - b) poner en contacto las células T in vitro con dichas CD.

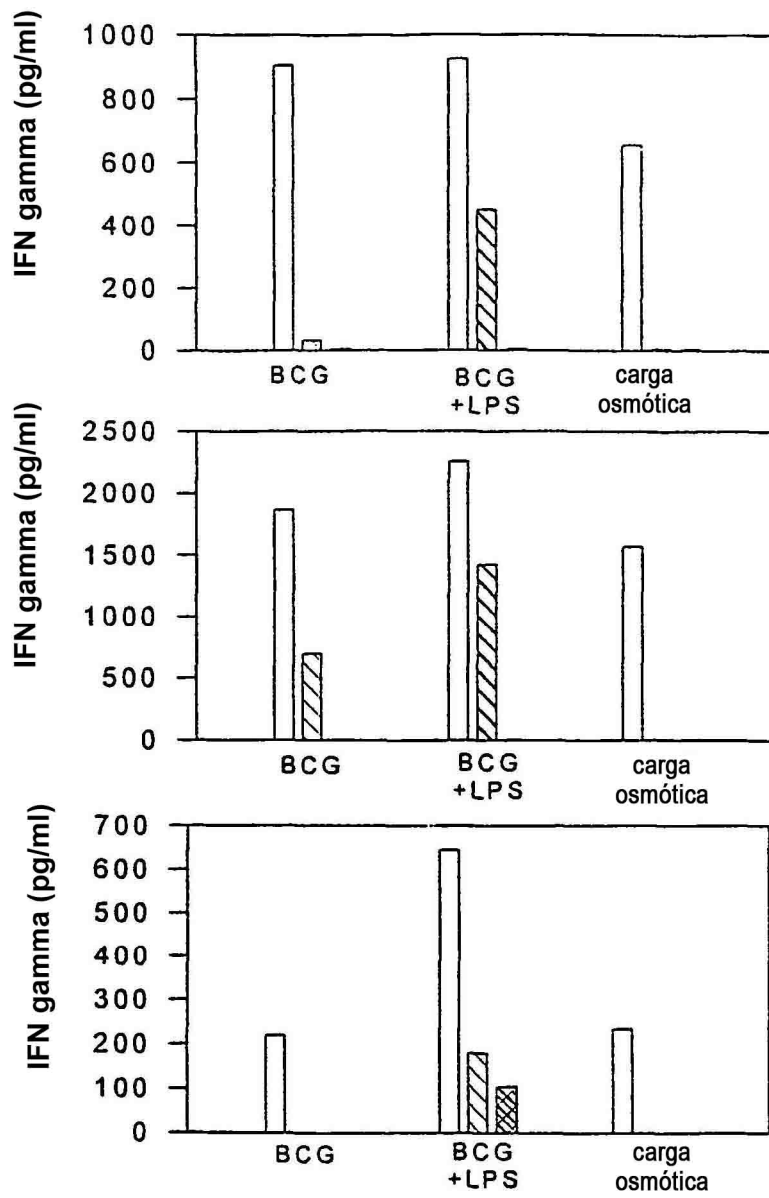


FIG. 1

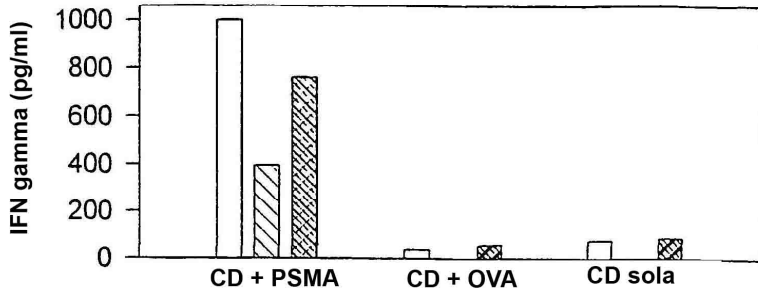


FIG. 2A

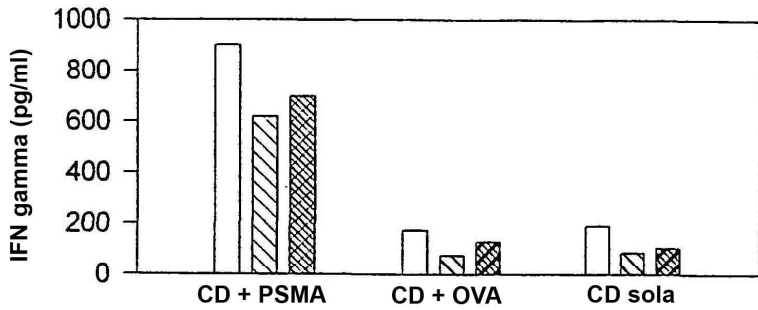


FIG. 2B

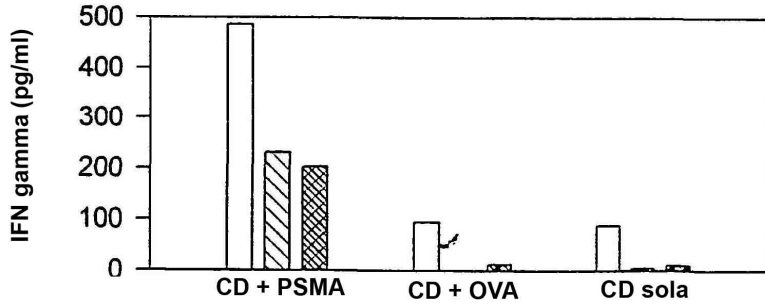


FIG. 2C

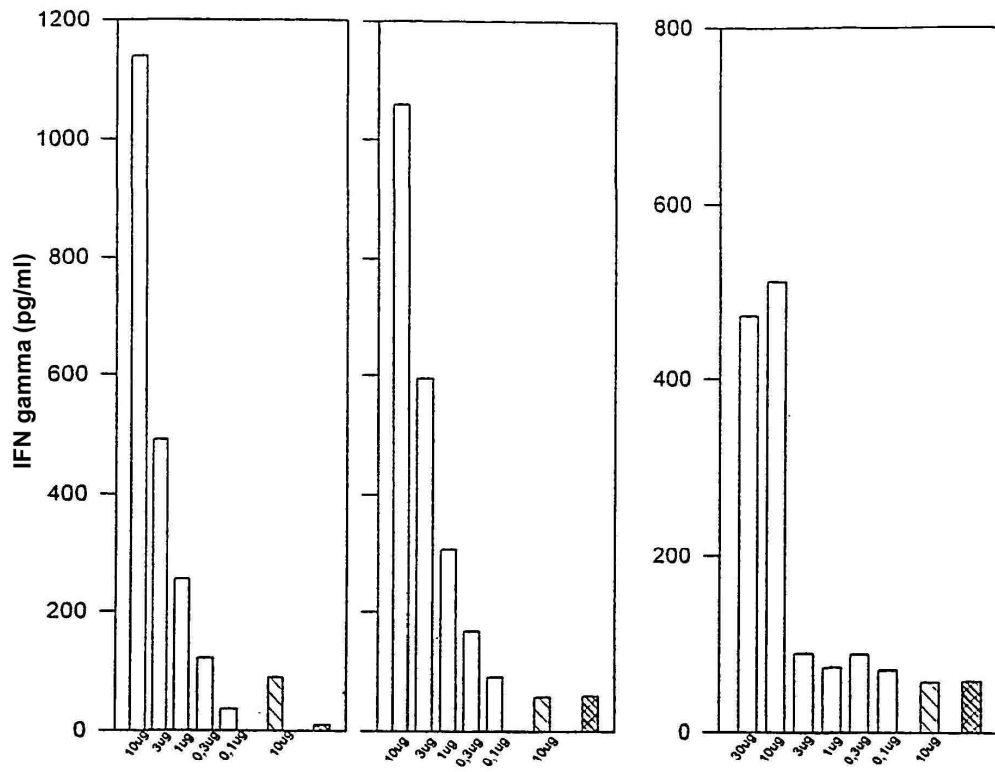


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

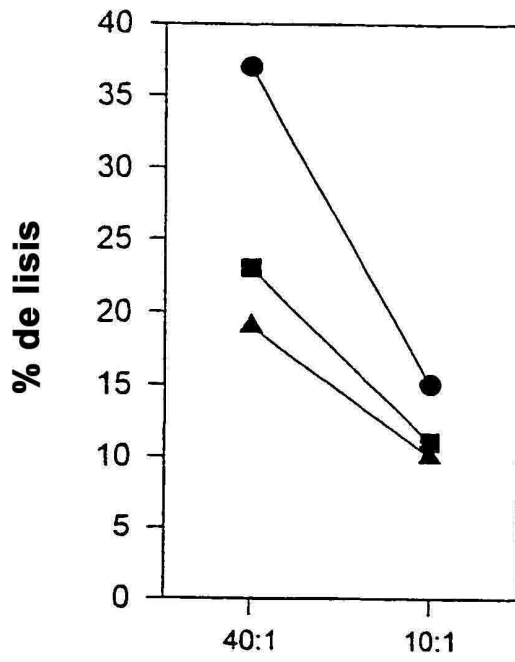


FIG. 4A

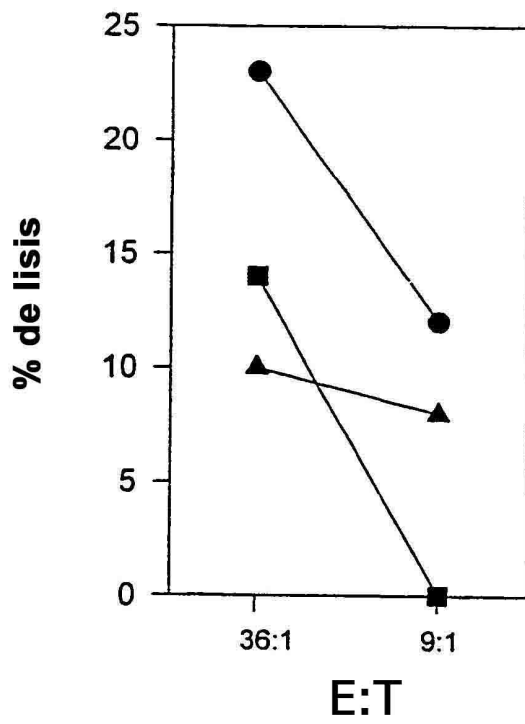
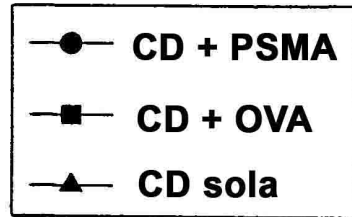


FIG. 4B



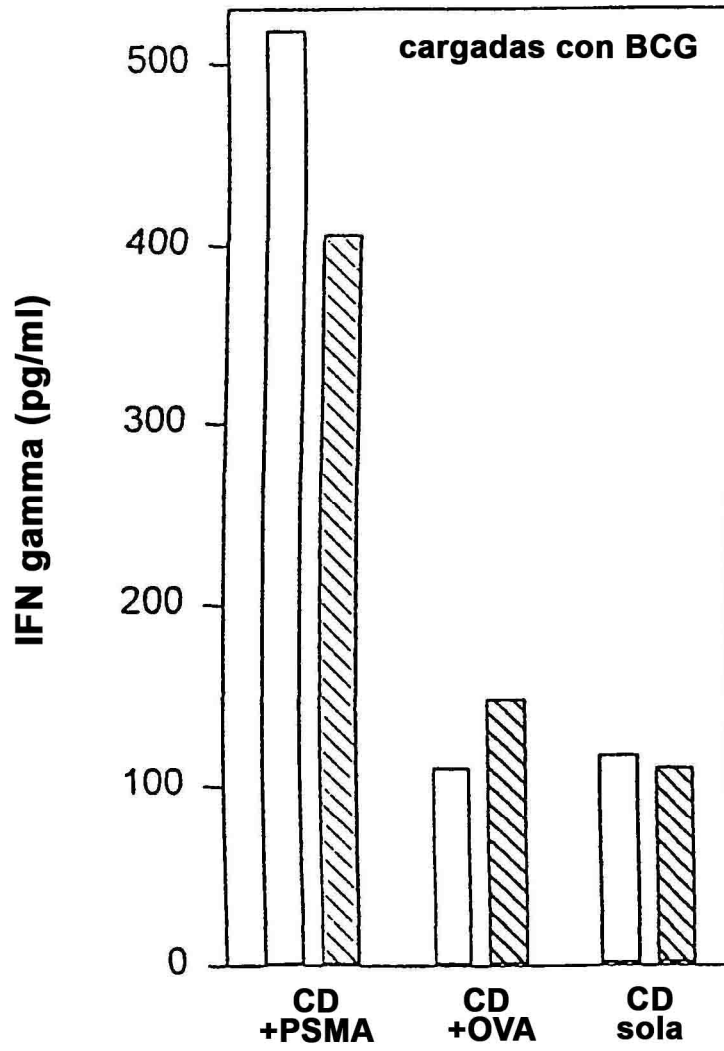


FIG. 5A

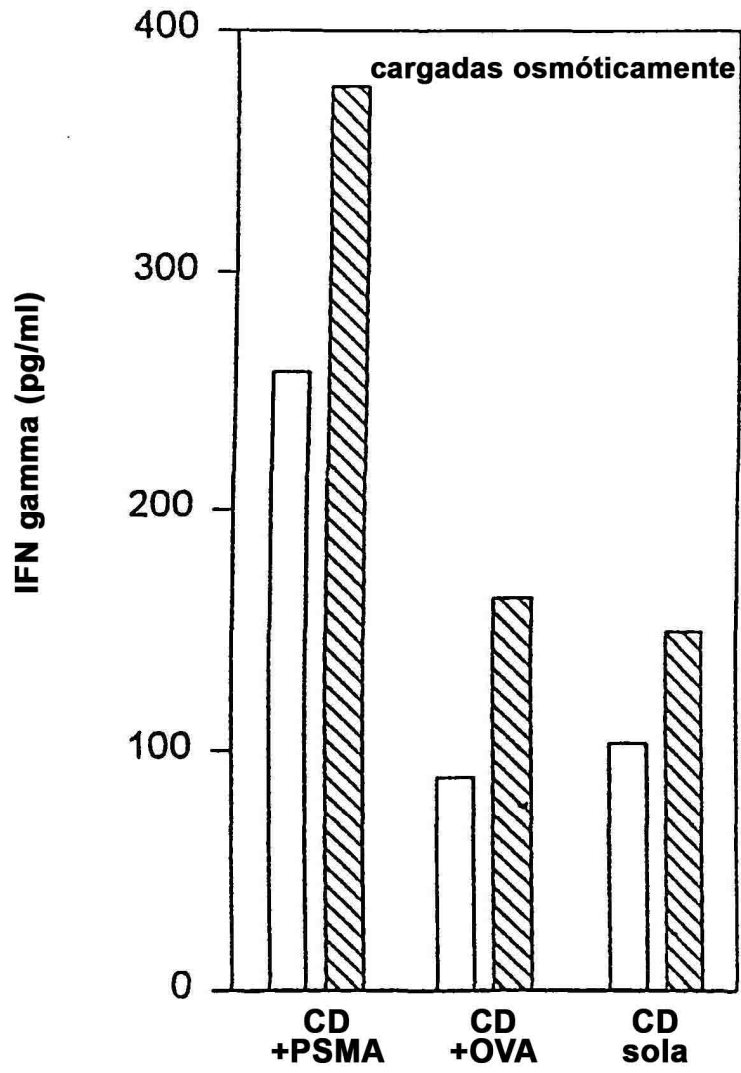


FIG. 5B

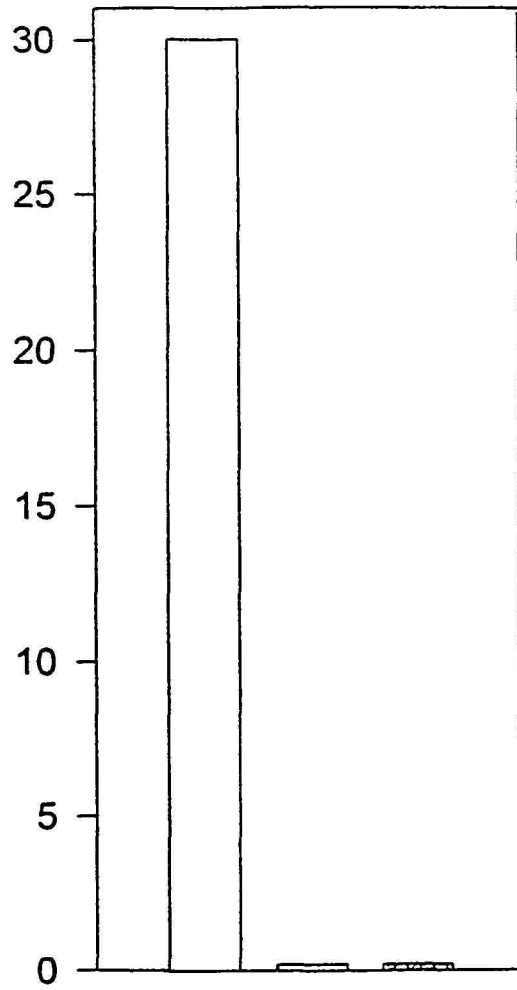


FIG. 6A

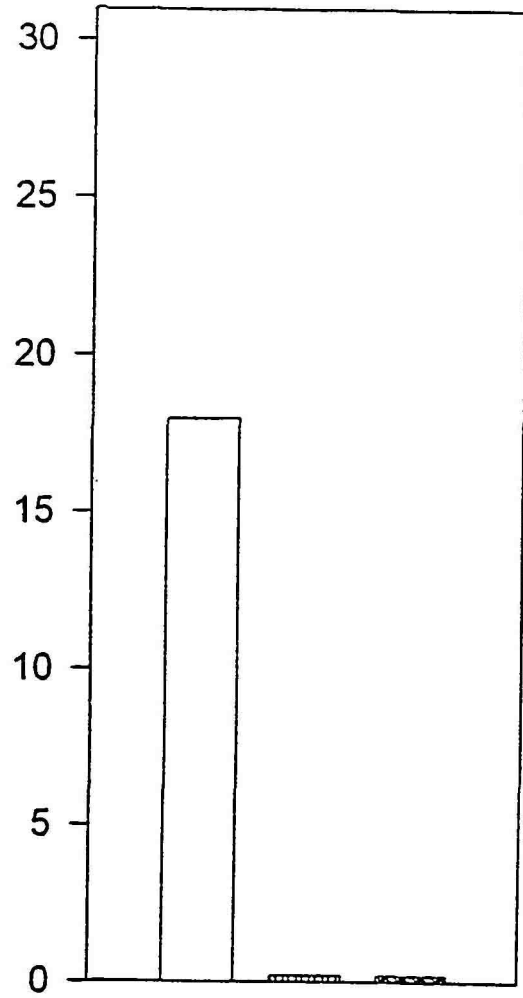


FIG. 6B