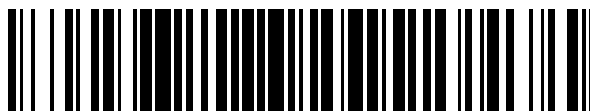


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 130**

51 Int. Cl.:
C12N 5/09

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08737810 .5**
96 Fecha de presentación: **11.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2146742**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2010**

54 Título: **Líneas celulares, composiciones que las comprenden para el tratamiento de los melanomas, procedimientos para preparar las composiciones y métodos de tratamiento**

30 Prioridad:
11.04.2007 AR P070101520

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.11.2012

73 Titular/es:
**CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS Y TECNICAS (CONICET) (33.3%)
AV. RIVADAVIA 1906 3 "F"
BUENOS AIRES C1033 AAJ, AR;
FUNDACION SALES (33.3%) y
INISBIOTECH LLC (33.3%)**

72 Inventor/es:
**MORDOH, JOSÉ;
BARRIO, MARÍA MARCELA y
VON EUW, ERIKA MARÍA**

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

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).

ES 2 390 130 T3

DESCRIPCIÓN

Líneas celulares, composiciones que las comprenden para el tratamiento de los melanomas, procedimientos para preparar las composiciones y métodos de tratamiento.

La presente invención se refiere a líneas celulares, composiciones para el tratamiento de melanomas que las comprenden, procedimientos para preparar las composiciones y métodos de tratamiento. Más particularmente la invención se refiere a varias líneas celulares de melanoma humano para el tratamiento de enfermedades malignas, en las que las líneas celulares son: (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) o (e) subpoblaciones de las mismas. Las líneas celulares pueden ser irradiadas obteniéndose poblaciones con fenotipo apoptótico y poblaciones con fenotipo necrótico de dichas líneas. Las composiciones pueden comprender adyuvantes y/o inmunomodificadores y/o células dendríticas autólogas.

Antecedentes de la invención

En la actualidad se realizan muchos esfuerzos y se destinan muchos recursos para investigar en el área de la inmunoterapia del cáncer. Existen importantes evidencias que indican el rol central de los linfocitos T en las respuestas inmunes efectivas contra el cáncer (Oliver RT, Nouri AM. T; Cancer Surv 1992; 13:173-204). Para ello se han utilizado en los tratamientos células alogeneicas solas, con adyuvantes, o en combinación con inmunomoduladores tales como algunas citoquinas.

Por otra parte es conocido que las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígenos que pueden iniciar una respuesta de células T debido a su extraordinaria capacidad para estimular los linfocitos T naïve (Schuler G, Steinman RM. J Exp. Med 1997; 186:1183-7 y Banchereau J, Steinman RM. Nature 1998; 392:245-52).

Varios autores han demostrado en modelos murinos y en humanos que las CD incorporan células apoptóticas, y de esta manera se presentan los antígenos para la generación de complejos HLA clase I/péptidos, permitiendo la inducción de linfocitos T citotóxicos (Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. J Exp Med. 1998; 188: 1359-1368; Chen Z, Moyana T, Saxena A, Warrington R, Jia Z, Xiang J. Int J Cancer. 2001; 93: 539-548 y Shaif-Muthana M, McIntyre C, Sisley K, Rennie I, Murray A. Cancer Res. 2000; 60: 6441-6447). Para este proceso es fundamental que las células apoptóticas induzcan la maduración de las células dendríticas (CD), sin embargo muchos autores han reportado que las células apoptóticas humanas no maduran a las CD o inducen a la pérdida de la maduración de dichas CD (Pietra G, Mortarini R, Parmiani G, Anichini A. Cancer Res 2001; 61: 8218-8226; Labarriere N, Bretaudeau L, Gervois N, Bodinier M, Bougras G, Diez E, Lang F, Gregoire M, Jotereau F. Int J Cancer 2002; 101: 280-286 y Demaria S, Santori FR, Ng B, Liebes L, Formenti SC, Vukmanovic S. J Leukoc Biol. 2005; 77: 361-368).

La patente US nº 6.187.306 de Pardoll y colaboradores divulga un método para tratar o proteger contra el melanoma que comprende utilizar al menos una línea celular alogeneica o más que expresen antígenos inmunodominantes de melanoma, en donde la línea celular ha sido modificada de manera tal que expresa citoquinas y administrar dicha línea transformada a un paciente que presenta melanoma o se encuentra en riesgo de adquirir la enfermedad. Si bien se destaca la importancia que la línea celular o las líneas celulares empleadas expresen la mayoría de los antígenos inmunodominantes no se divulga una nueva línea celular o combinación de líneas celulares que expresen la mayoría de dichos antígenos. La invención comprende fundamentalmente líneas celulares transformadas que expresan citoquinas tales como GM-CSF.

Las patentes nº US 5.882.654 y nº US 5.840.317 divulgan líneas celulares de melanoma irradiadas para utilizarse como vacunas alogeneicas. El tratamiento divulgado alcanza valores inferiores al 50% de pacientes NED (16/37) y se muestra una efectiva actividad antitumoral de tipo humoral.

El documento de patente US 2006/0034811 de Wallack y colaboradores divulga vacunas comprendidas por células presentadoras de antígenos cargadas con células tumorales lisadas o rotas que incluyen al citosol y las membranas. Las células tumorales pueden ser células del paciente, líneas celulares o células que han sido infectadas con el virus vaccinia recombinante que codifica a IL-2. En el documento de patente US 2006/0140983 de Palucka y colaboradores se divulga una composición para inducir inmunidad en pacientes con cáncer que comprende aislar y purificar células presentadoras de antígenos cebadas por exposición con una o más proteínas de choque térmico y células tumorales muertas. Las células presentadoras de antígenos son células dendríticas y las células tumorales pueden ser células singeneicas o alogeneicas, por ejemplo líneas celulares. Este documento divulga la necesidad de incorporar proteínas de choque térmico a través de la ruptura por calentamiento de células tumorales. Los ensayos mostrados no revelan necesariamente que la composición tenga actividad inductora de la inmunidad en pacientes con melanoma.

La patente US nº 6.602.709 de Albert y colaboradores se divulga el uso de células apoptóticas para presentar antígenos a las células dendríticas para la inducción de células T. El método es útil para inducir linfocitos T

citotóxicos antígeno específicos y células T cooperadoras. Las células dendríticas son cebadas por células apoptóticas o fragmentos de las mismas y son capaces de procesar y presentar a los antígenos procesados e inducir la actividad de linfocitos T citotóxicos, pudiendo ser empleadas como vacunas terapéuticas.

Breve descripción de la invención

5 En un aspecto de la presente invención están previstas varias líneas celulares de melanoma humano para el tratamiento de enfermedades malignas, en las que las líneas celulares son (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) o (e) subpoblaciones de las mismas. Las líneas celulares pueden ser posteriormente irradiadas obteniéndose poblaciones con fenotipo apoptótico y poblaciones con fenotipo necrótico de dichas líneas.

15 En otro aspecto de la presente invención está prevista una composición para el tratamiento del melanoma, en donde dicha composición comprende al menos una línea celular de melanoma alogeneica, por ejemplo (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) o combinaciones de las mismas, en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar. La composición puede también comprender excipientes, adyuvantes tales como BCG e inmunomoduladores tales como GM-CSF o IFN α . En una forma de realización preferida la composición comprende combinaciones de las cuatro líneas celulares de melanoma alogeneicas (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar. En otra forma de realización preferida la composición de la invención comprende combinaciones de las tres líneas celulares de melanoma alogeneicas (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831) y (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar.

En otro aspecto de la presente invención está prevista una composición para el tratamiento adyuvante del melanoma, en donde dicha composición comprende al menos una línea celular de melanoma alogeneica, por ejemplo (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) y combinaciones de las mismas, y en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar. La composición puede además comprender excipientes, adyuvantes como BCG y inmunomodificadores como GM-CSF y/o IFN α . En una forma de realización preferida la composición de la invención comprende una combinación de las líneas celulares de melanoma alogeneicas (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) o (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar. En otra forma de realización preferida la composición de la invención comprende una combinación de las líneas celulares de melanoma alogeneicas (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831) o (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar.

En otro aspecto está prevista una composición para el tratamiento de melanomas humanos que comprende células dendríticas autólogas maduras, células dendríticas autólogas cargadas con células de al menos una línea celular de melanoma humano alogeneico, células apoptóticas de dicha al menos una línea celular de melanoma humano heterólogo y células necróticas de dicha al menos una línea celular de melanoma humano heterólogo. La línea celular de melanoma humano es una o más de las siguientes líneas: (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection

of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) o (e) subpoblaciones de las mismas.

En otro aspecto de la invención está prevista una composición para el tratamiento adyuvante de melanomas humanos, que comprende células dendríticas maduras, células dendríticas cargadas con células de al menos una línea celular de melanoma humano alogeneico, células apoptóticas de una línea celular de melanoma humano heterólogo y células necróticas de una línea celular de melanoma humano heterólogo. La línea celular de melanoma es una o más de las siguientes líneas celulares: (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) o subpoblaciones de las mismas.

En otro aspecto de la presente invención está previsto un procedimiento para preparar la composición, en donde dicho procedimiento se lleva a cabo en las siguientes etapas:

a) descongelar y cultivar las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831) y (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832);

b) mezclar dichas tres líneas celulares;

c) irradiar dichas tres líneas celulares;

d) agregar a la mezcla de líneas celulares adyuvantes y excipientes. El procedimiento puede comprender además en la etapa a) el agregado de la línea celular Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829).

En otro aspecto de la presente invención está previsto un procedimiento para preparar la composición que comprende las etapas de:

a) descongelar y cultivar las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829);

b) mezclar dichas líneas celulares;

c) irradiar dichas líneas celulares;

d) obtener células dendríticas autólogas; y

e) cocultivar durante un tiempo las células dendríticas autólogas con las líneas celulares irradiadas de la etapa c).

En otro aspecto de la presente invención está previsto un método para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral en pacientes que portan melanoma que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de una combinación de las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831) y (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar. La administración se puede realizar conjuntamente con adyuvantes y/o inmunomoduladores.

En otro aspecto de la presente invención está previsto un método para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral en pacientes que presentan melanoma que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de una combinación de las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM

ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar.

En otro aspecto de la presente invención está previsto un método para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral en pacientes que portan melanoma que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un cocultivo de entre 6 y 72 horas de células dendríticas autólogas y una combinación de las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar.

Descripción de las figuras

En la figura 1 se muestra un ejemplo representativo de los resultados de la irradiación Gamma de la mezcla de líneas celulares de la invención en relación a la inducción de la apoptosis y necrosis (células Apo-Nec). En el panel A se muestran las células no irradiadas y en el panel B se muestran las células luego de la irradiación Gamma a 70Gy y teñida con Anexina V-FITC y IP (yoduro de propidio). Las células apoptóticas tempranas se definieron como Anexina V-FITC⁺/IP⁻, mientras que las células necróticas fueron las doblemente positivas.

En la figura 2 se muestra un gráfico de Kaplan Meier de los pacientes tratados con la composición de la invención CD/Apo-Nec.

En la figura 3 se muestra la proliferación *in vitro* de linfocitos en respuesta a células tumorales autólogas presentadas por las células CD. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD cpm (cuentas por minuto) de los triplicados. Como controles positivos se incubaron linfocitos con fitohemoaglutinina (PHA) incorporando más de 7×10^4 cpm.

En la figura 4 se muestra la coloración de tetrámeros para los antígenos Melan A/MART-1 y gp100. En el panel A se observan los resultados obtenidos con muestras de PBMC de pacientes HLA-A*0201 que participaron del estudio. *ND significa: no determinado por insuficiente cantidad de células CD8⁺T en las muestras posaplicación. En el panel B se muestra el incremento de linfocitos T CD8⁺ HLA/péptido tetrámero⁺ en PBMC del paciente #2. Los números representan el porcentaje de CD8⁺ HLA/péptido tetrámero⁺. Como control se tiñeron PBMC HLA-A*0201 de donantes sanos.

En la figura 5 se muestra La medición intracitoplasmática de IL-10 e IL-12 en las células Apo-Nec de la invención. En el panel A se muestran los resultados de FACS de las CDin y en el panel B se muestran los resultados FACS de las células CD/Apo-Nec.

En la figura 6 se muestra la expresión de los antígenos HMB45 y Mart-1 en la línea Mel-XY1 y en los clones derivados de dicha línea celular. Los tres paneles superiores corresponden a la línea celular y los tres paneles inferiores corresponden a los clones. La columna 1 corresponde a la línea celular y clones controles, la columna 2 corresponde a la expresión de HMB45 de la línea celular y los clones, respectivamente; y la columna 3 corresponde a la expresión de Mart-1 de la línea celular y los clones.

En la figura 7 se muestra una biopsia de melanoma del paciente #100. En el panel A se puede ver una imagen de bajo aumento (25X) en donde se observan células tumorales positivas y negativas para el Ag gp100, en el panel B se observa la expresión heterogénea de gp100, en donde se pueden ver células con expresión alta, moderada y nula (400x); en el panel C se observa la expresión heterogenea para el Ag MART-1, observandose un clon de células con alta expresión rodeado de células negativas (400x).

En la figura 8 se muestra un gráfico de Kaplan Meier de los pacientes tratados con la composición de la invención Apo-Nec.

En la figura 9 se observan metástasis dérmicas extirpadas del paciente #200 tratado con la composición de la invención Apo/Nec, más GM-CSF y BCG. En el panel A se observan macrófagos en la zona necrótica del tumor (1), infiltrado de linfocitos en contacto con células tumorales (2) y una zona de tumor viable (3). El panel B es un detalle a 100x de la zona de fuerte infiltración tumoral, el panel C es un detalle a 400x de la misma zona en donde se observan linfocitos infiltrantes y el panel D muestra un detalle de la misma metástasis donde se observa la mayor parte de la misma necrosada con macrófagos cargados con melanina (1) y una zona viable (2) (25X).

En la figura 10 se muestran imágenes de tomografía axial computarizada del paciente #300 tratado con la composición de la invención Apo-Nec más BCG. En el panel A Se muestra con una flecha la ubicación de la metástasis pulmonar y en el panel B se observa una imagen de tomografía axial tomada 5 meses después.

Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente solicitud los términos “combinación” y “mezcla” son intercambiables.

- 5 En la presente invención se hace referencia a composiciones que modifican el sistema inmunitario de los mamíferos debe considerarse que estas composiciones también son conocidas por los expertos en la materia como composiciones de vacuna, vacunas basadas en células o simplemente vacunas.

Las cuatro líneas celulares de la invención fueron depositadas bajo el Tratado de Budapest en la German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ el día 23 de Marzo de 2007 bajo los siguiente números de acceso: Línea celular Mel-XY1 DSM ACC2830, línea Mel XY2 DSM ACC2831, línea Mel XY3 DSM ACC2832 y línea Mel XX4 DSM ACC2829.

- 10 Los resultados de los ensayos de caracterización de las líneas celulares se muestran en la siguiente Tabla:

Tabla 1: MARCADORES DE CELULAS TUMORALES DE MELANOMA HUMANO DE LA INVENCION

MARCADOR	XY1	XY2	XY3	XX4
Gp100 (HMB45)	ND	ND	+	+
Gp100 (PCR)	+	+	+	+
Tirosinasa (PCR)	+	+	+	+
MART-1 (PCR)	+	-	+	-
MAGE 1 (PCR)	ND	-	+	+
S100	+	+	+	+
Vimentina	ND	+	+	+
CEA	ND	+	+	ND
GD2	+	+	+	+
GD3	+	+	+	+
P53	+	+	+	+
MIA	+	+	+	+
MCP-1	-	+	+	+
TRP-2	+	+	ND	+
MDR1	-	ND	-	-
HLA clase I	A02/23 B18/B37	A30/33 B18/B65	A02/A23 B18	A24(9)/A33(19) B18/B65 (14)
HLA clase II	DR7/DR11 DR52/DR53	DR1/DR1	DR11 DR13 DR52	DR1/DR11
Tumorigenicidad en ratones desnudos	+	+	+	+
Crecimiento de colonias en agar agar blando	++	++	++++	++

De la caracterización de la línea celular MEL-XY1 surge que las células crecen como una monocapa de células amelanóticas heterogéneas en tamaño y forma, siendo en su mayoría de forma cúbica o alargada y sin prolongaciones. A alta densidad de crecimiento son ligeramente melanóticas. Las células MEL-XY1 forman numerosas colonias en agaragar semisólido. Las células MEL-XY1 son tumorigénicas en ratones atímicos (desnudos) y no generan metástasis.

De la caracterización de la línea celular MEL-XY2 surge que las células crecen como una monocapa de células amelanóticas heterogéneas en tamaño. Se presentan células pequeñas, y en menor número, multinucleadas con nucleolos prominentes. Se observan también células con prolongaciones dendríticas características en el melanoma. Creciendo a alta densidad pueden apilarse y formar microtumores. Las células MEL-XY2 son tumorigénicas en ratones atímicos (desnudos) y no generan metástasis.

De la caracterización de la línea celular MEL-XY3 surge que las células crecen en monocapa. Las células son uniformes, pequeñas y algo redondeadas. Creciendo a alta densidad pueden apilarse y formar microtumores. Las células MEL-XY3 forman numerosas colonias en agaragar semisólido. Las células MEL-XY3 son tumorigénicas en ratones atímicos (desnudos) y no generan metástasis.

De la caracterización de la línea Mel-XX4 surge que dicha línea crece en monocapa en forma de huso o fusiformes a alta densidad. A baja densidad muestra proyecciones dendríticas similares a los melanocitos. Las células son melanóticas algunas de las cuales presentan múltiples núcleos con prominente nucleolo. El tiempo de duplicación de la población es de entre 172-173 horas y forman colonias en los ensayos de agaragar blando.

Cuando la línea celular Mel-XX4 de la invención fue transplantada a ratones desnudos (inmunodeprimidos) se generaron líneas celulares tumorales *in vivo*. Los pasajes seriados a partir de los tumores iniciales demostraron que el 100% de los animales transplantados desarrollaban tumores durante el primer mes. El crecimiento de los tumores era lento y a los 84 días alcanzaban un valor promedio de 372 ± 63 mm³. La línea celular de la invención Mel-XX4 es tumorigénica cuando se inyecta de forma subcutánea una cantidad de 3×10^6 células.

Del análisis del número modal de cromosomas surge lo siguiente: La línea MEL-XY1 de la invención muestra una dispersión en el recuento cromosómico (entre 105 y 110) y por lo tanto no se destacó un número modal claro (sexo masculino). La línea MEL-XY2 de la invención muestra una tendencia bimodal con números cromosómicos 89 y 91 (sexo masculino). La línea celular MEL-XY3 de la presente invención muestra un número modal de 69 (sexo masculino), Las alteraciones numéricas más frecuentes fueron la ausencia de cromosomas en los pares 2 y 6 y cromosomas extra en los pares 20 y 22. La línea celular de la invención MEL-XY4 muestra un número modal de 57-58 (sexo femenino).

Se ensayó la energía de radiación gamma que induce apoptosis en las líneas celulares de la invención. La aplicación de 50 Gy de irradiación fue suficiente para suprimir completamente la capacidad clonogénica en agaragar blando para cada línea celular de la invención. Cuando las células se irradiaron con 70 o 100 Gy, no se observaron diferencias significativas en el grado de inducción de apoptosis/necrosis. En la figura 1 A se puede observar que las células de melanoma no irradiadas contenían entre 6-9% de células apoptóticas tempranas caracterizadas por coloración Anexina-V⁺/IP⁺ (panel inferior a la derecha). Tras la radiación a 70 Gy y 72 hs de cultivo, se obtuvo un 45-53% de células apoptóticas tempranas (ver Figura 1 B, panel inferior a la derecha). Las células necróticas teñidas con Anexina-V e IP se incrementaron desde el 7,5% en las células no irradiadas hasta aproximadamente 15% en las células irradiadas (paneles superiores a la izquierda). Por lo tanto en el contexto de la presente solicitud de patente las células de melanoma irradiadas de la invención se denominan células Apo-Nec y la composición que comprende una o más de cualquiera de las líneas celulares Apo-Nec (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y/o Mel-XX4) se denomina composición Apo-Nec.

La radiación de las células permitió obtener células incapaces de proliferar útiles para la elaboración de composiciones, tales como la composición Apo-Nec de la invención. Resulta evidente para un experto en la materia que la composición Apo-Nec de la invención puede comprender cualquiera de las líneas de la invención o diferentes combinaciones de las mismas. En una forma de realización preferida la composición Apo-Nec de la invención comprende una mezcla o combinación de las líneas celulares Mel-XY1, Mel-XY2 y Mel-XY3. En otra forma de realización preferida la composición Apo-Nec de la invención comprende una mezcla o combinación de las líneas celulares Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4. La mezcla de las líneas celulares preferidas Apo-Nec de la invención proporciona una combinación de múltiples antígenos que inducen una excelente respuesta inmunitaria antitumoral.

Sorprendentemente la combinación de antígenos tumorales presentados por la mezcla de las cuatro líneas celulares Apo-Nec de la invención inducen una respuesta inmunitaria de células T específica contra el tumor y permite obtener más de un 80% de pacientes libre de enfermedad cuando son tratados con la composición Apo-Nec de la invención (ver figura 8).

Las líneas de la invención se utilizaron también para preparar la composición de la invención denominada CD/Apo-Nec que comprende al menos una de las líneas celulares de la invención y células dendríticas autólogas.

En una forma de realización preferida las líneas celulares son diferentes combinaciones de las líneas Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4. A título de ejemplo no limitativo la combinación podría comprender una mezcla de las líneas celulares Mel-XY1 y Mel-XY2 o una mezcla de las líneas Mel-XY1, Mel-XX4. En una forma de realización preferida la combinación de líneas celulares comprende una mezcla de las líneas celulares Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4, estando por lo tanto las cuatro líneas celulares presentes.

En una forma de realización preferida la composición CD/Apo-Nec de la invención comprende una combinación de las líneas celulares Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, Mel-XX4 irradiadas y células dendríticas autólogas.

La particular combinación de las cuatro líneas celulares de la invención proporciona una fuente única de antígenos nativos para cargar células dendríticas, proveyendo además antígenos de células clonogénicas. Debe considerarse que la combinación de las cuatro líneas celulares irradiadas de la invención no solo proporciona una particular combinación de antígenos nativos sino también comprenden una particular combinación de poblaciones de células en donde están presentes alrededor de un 50% de células apoptóticas y alrededor de un 15% de células necróticas. Esta combinación de poblaciones induce la maduración de las CD.

El estudio de Fase I con la composición CD/Apo-Nec de la invención se llevó a cabo en 16 pacientes de melanoma cuyas características se muestran en la Tabla 2

Tabla 2: Características de los pacientes

Paciente	Sexo	Edad	Estadio clínico	ts	PBMC (x10 ⁹ cells)	Dosis de CD/Apo-Nec (x10 ⁶ cells)	Dosis	Evolución Clínica (30/3/07)	DTH índice
1	F	42	IV	LN	3.5	5	4	P (8 m)	4
2	F	57	III	ND	3.6	5	4	NED (54 m+)	8
3	M	32	III	ND	3.3	5	4	NED (35 m+)	14.25
4	F	17	III	ND	4.4	5	4	NED (45 m+)	9.5
5	M	56	IV	L	5	10	4	P (4 m)	4
6	M	60	III	ND	1.5	3	4	NED (37 m+)	4.5
7	M	27	IV	SC	4.2	10	2	WP (1 m)	ND
8	M	26	III	ND	3.6	10	4	P (7 m)	10.5
9	F	42	III	ND	7.5	15	4	NED (71m+)	5.6
10	M	34	IV	LN	6.2	15	4	P (11 m)	5.5
11	M	44	IV	L	4.7	15	4	P (4 m)	10
12	M	56	III	ND	8	15	4	NED (25m+)	4.5

13	M	47	IIC	ND	9.3	20	4	NED (26 6.5 m+)
14	M	30	III	ND	7.5	20	4	NED (39 7.25 m+)
15	M	52	IV	LN	6	20	4	P (10 m) 3.75
16	F	57	IV	SC	8.2	20	4	P (6 m) 5.25

ND: No detectable; SC: subcutáneos; L: pulmón LN: nódulo linfático

El promedio de edad estaba en los 42 años (comprendido entre 17 y 60 años). Se trataron cinco mujeres y once hombres. Uno de los pacientes tenía melanoma AJCC estadio IIC, ocho tenían melanoma estadio III y siete tenían melanoma estadio IV. A los pacientes #5 y #11 se les había efectuado cirugía de las metástasis de pulmón; el paciente #16 tenía metástasis subcutáneas y los pacientes #1, #10 y #15 habían recibido radioterapia en la zona axilar después de la cirugía por la ruptura de la cápsula de los nódulos linfáticos. Se prepararon cohortes de cuatro pacientes y fueron tratados con 5, 10, 15 o 20 x10⁶ de células dendríticas (CD) cocultivadas con células Apo-Nec (composición CD/Apo-Nec de la invención). Todos los pacientes recibieron cada dos semanas una dosis de la composición CD/Apo-Nec (0,3 ml) sin adyuvantes. El paciente #7 fue retirado del protocolo tras la segunda aplicación debido a la rápida progresión de la enfermedad luego de un traumatismo deportivo en el muslo derecho y una infección descontrolada; este paciente no fue reemplazado.

Las células dendríticas inmaduras (CDin) mostraban el siguiente patrón: el 95.1 ± 3.6% eran CD14⁺/ CD11c⁺ y el 70 ± 6% eran CD1a⁺. Se estimó que la pureza era de aproximadamente 60%.

Aproximadamente se obtuvieron 3x10⁶ CD a partir de 1x10⁸ PBMC sembradas en medio libre de suero.

5 Cuando se caracterizaron las CDin obtenidas de los pacientes y las células comprendidas en la composición CD/Apo-Nec de la invención se encontró que el 42,3 % ± 13,7 de las células CDin de los pacientes (n= 15) fueron capaces de fagocitar a las células Apo-Nec de la invención. La fagocitosis de las células Apo-Nec se corroboró por microscopía electrónica, observándose células Apo-Nec enteras o partes de ellas dentro de las CD en vacuolas.

10 La capacidad de las células Apo-Nec de la invención para influir en el proceso de maduración de las células CD derivadas de monocitos se examinó mediante mediciones de marcadores específicos para células CD por citometría de flujo (FACS) (FACSCalibur, BD Biosciences, San José, CA). La fagocitosis de las células Apo-Nec de la invención dio como resultado un fenotipo maduro de las células CD en comparación con los controles incubados con LPS. La maduración de las células CD se evidenció por el incremento en la expresión de CD83, CD80, CD86, HLA clase I, y II y CD40. Luego de la fagocitosis se observó un 75,2 % ± 16 de reducción en la endocitosis FITC-Dx en comparación con las CDin.

15 El receptor de quimiocina (motivo C-C) receptor 7 (CCR7) incrementó su expresión en las CD luego de la fagocitosis de las células Apo-Nec de la invención, en la totalidad de los pacientes y esto se correlacionó con la migración *in vitro* de las células CD hacia MIP-3β. Las células CDin (9.6% CCR7+, MFI: 23.3) migraron hacia MIP-1α pero no migraron hacia MIP-3β; en cambio las células CD/Apo-Nec (81.8% CCR7+, MFI: 41.2) claramente migraron hacia MIP-3β y no lo hicieron hacia MIP-1α.

20 Excepto para el paciente #6, el cual mostró un bajo rendimiento de PBMC, y por lo tanto no se pudo obtener la dosis de 10 x 10⁶ células CD/Apo-Nec, lo cual condujo a tener que administrarle dosis de 3 x 10⁶ células por aplicación, todos los pacientes restantes recibieron la dosis esperada de la composición CD/Apo-Nec de la invención cohorte 1: 5 x 10⁶, cohorte 2: 10 x 10⁶, cohorte 3: 15 x 10⁶ y cohorte 4: 20 x 10⁶. La composición CD/Apo-Nec de la invención fue bien tolerada y sólo se produjeron casos de toxicidad media siempre de Grado 1. Se observaron reacciones locales débiles en los sitios de aplicación y DTH, que consistieron en eritema y pápula. Ninguno de los pacientes desarrolló manifestaciones de enfermedades autoinmunitarias (Tabla 3).

Tabla 3

Toxicidad asociada a la aplicación de la composición CD/APO-NEC de la invención

Síntomas	Composición	Composición	Composición	Composición
	5 x10 ⁶	10 x10 ⁶	15 x10 ⁶	20 x10 ⁶
Fatiga	1/4	1/3	0/4	0/4
Dolor de cabeza	1/4	0/3	0/4	0/4
Escalofríos	1/4	0/3	0/4	0/4
Calambres	0/4	0/3	0/4	1/4
Abdominal				
Reacción Local	4/4	3/3	4/4	4/4
Astenia	0/4	1/3	0/4	0/4
Náusea	0/4	0/3	0/4	1/4
Dolor Abdominal	0/4	0/3	0/4	1/4
Vómito	0/4	0/3	0/4	1/4
Anorexia	0/4	1/3	0/4	0/4
Diarrea	0/4	0/3	0/4	1/4
Mialgia	1/4	0/3	¼	0/4

Tras un seguimiento medio de 41,5 meses poscirugía (entre 25 y 71 meses), los pacientes en estadio IIC no presentaban evidencias de enfermedad (NED); 7/8 (87,5%) de los pacientes en estadio III eran NED y 7/7 de los pacientes en estadio IV mostraron progresión de la enfermedad (ver figura 2).

- 5 Se evaluó para cada aplicación las reacciones DTH a las células Apo-Nec heterólogas de la invención y se determinó la intensidad de la reacción, el índice de DTH tal como se describe en los ejemplos. Sólo 6/15 pacientes mostraron una leve reacción DTH preaplicación contra las células Apo-Nec de la invención. Los ensayos DTH revelaron que la aplicación de células Apo-Nec induce una reactividad específica en todos los pacientes, dado que el índice DTH fue significativamente mayor luego de la aplicación de la segunda dosis de la composición CD/Apo-Nec en comparación con las reacciones basales observadas luego de la primera aplicación (Mann Whithney test P=0.029, n=15). Los índices DTH fueron mayores en los pacientes NED que en aquéllos que experimentaron progresión de la enfermedad (P= 0.28, Mann Wilcoxon Rank Sum test).

El incremento en la cantidad de células CD/Apo-Nec por aplicación no incrementó significativamente el índice DTH.

- 15 No se indujo respuesta humoral contra las células vivas de melanoma comprendidas en la composición de la invención antes y después de la aplicación, y evaluada mediante análisis por FACS. También se analizó la presencia de anticuerpos reactivos contra las células Apo-Nec en sueros pre- y posaplicación mediante la técnica de transferencia Western. En cuatro pacientes (#3, #4, # y #16) se observó solo una tenue banda de proteínas de melanoma (>200 kDa) detectada en el suero post aplicación que no se reconoció en los extractos de células de cáncer de mama utilizadas como control inespecífico.
- 20 Se estableció una línea celular de melanoma autóloga para el paciente #1 y de esta manera se pudo analizar si la aplicación en dicha paciente de las células CD/Apo-Nec inducía una respuesta de proliferación de linfocitos hacia las propias células tumorales. Se midió la proliferación de linfocitos luego de 5 días de incubación de los linfocitos de pre- y posaplicación con células Apo-Nec#1 (células tumorales irradiadas del paciente #1 obtenidas tal como se describe en los ejemplos). En la figura 3 se muestra que la proliferación de los linfocitos posaplicación en respuesta a las células CD/Apo-Nec#1 fue mayor respecto de los linfocitos preaplicación, sugiriendo que existe inmunización específica a los antígenos tumorales presentados por las células Apo-Nec, los cuales también están presentes en el tumor del paciente #1, después de la aplicación de las células CD/Apo-Nec.

- 30 Siete de 15 pacientes integrados en el estudio tenían el haplotipo HLA-A*0201 clase I, y esto permitió estudiar la respuesta tumor-específica HLA restringida en sus proPlas muestras de PBMC. Se analizaron las respuestas anti-gp100 y Melan A/MART-1 células T CD8+ específicas inducidas por la composición CD/Apo-Nec mediante la unión específica tetrámeros HLA/péptidos y secreción de IFN-γ medida por ELISpot, directamente en las muestras de sangre periférica.

En 5/7 pacientes se obtuvieron suficientes PBMC pre (7 días antes de la primera aplicación) y post (15 días después de la cuarta aplicación) para analizar la presencia de linfocitos T CD8+ específicos reactivos con gp100 y Melan A/MART-1 mediante tinción de tetrámeros. Los resultados se muestran en la Figura 4 A. Los pacientes #2 y #6 incrementaron significativamente su frecuencia de gp100 y Melan A/MART-1 células T CD8+ específicas T después de la aplicación por encima del 1% y ellos estaban aún como NED (53 y 36 meses, respectivamente, después de la cirugía), mientras que los pacientes #5, # 8 y #16 disminuyeron su coloración de tetrámeros preaplicación y la totalidad de ellos progresaron en la enfermedad luego de la aplicación (Figura 3 A). Como ejemplo se muestran en la Figura 4 B los resultados del paciente #2. Los porcentajes de células T CD8+ T que reconocen a los péptidos gp100 o Melan A/Mart-1 se incrementaron después de la aplicación desde 0,17 y 0,26 a 1,15 y 1,16 respectivamente. No se observó reactividad en un experimento realizado bajo las mismas condiciones de donantes sanos HLA-A*0201 positivos.

Se ensayó la liberación de IFN- γ en un ELISpot de los PBMC totales pre- y posaplicación luego de 24 hs de incubación con células CD autólogas pulsadas con gp100 o Melan A/MART-1 y usando como control péptidos de influenza (flu₅₈₋₆₆). Este ensayo fue evaluado en 5/7 pacientes HLA-A*0201. Se observó que dos pacientes (#5 y #16) luego de la aplicación de la composición CD/Apo-Nec de la invención indujeron IFN- γ secretado por células T CD8+ específicas para gp100 y Melan a/MART-1. Se indujeron en los pacientes #5 y #16 frecuencias de $7-3,5 \times 10^{-4}$ células T CD8+ que secretan IFN- γ . En el paciente #2 se encontró una alta cantidad de células T CD8+ específicas para gp100 y Melan A/MART-1 antes y después de la aplicación. Este paciente se encuentra aun libre de enfermedad, 54 meses después de la cirugía. Los pacientes #8 y #15 mostraron una baja cantidad de puntos de base (preaplicación) y no se observaron cambios luego de cuatro aplicaciones con la composición CD/Apo-Nec de la invención.

El balance entre IL-12 e IL-10 en las células CD/Apo-Nec de la invención fue cuantificado mediante FACS en diferentes momentos luego de la fagocitosis y seguido de 8 horas de tratamiento con Brefeldin A para acumular intracitoplasmáticamente a las citoquinas. Tal como se muestra en la Figura 5 sólo el 6,1% de las CDin producen IL-12, pero después de 32 hs. Del cocultivo el 30,8% de las células CD/Apo-Nec estaban inducidas a producir IL-12. Por otra parte, el 81,6% de las CDin contenían dentro del citoplasma las citoquinas y estas no se modificaron luego de la fagocitosis. Las células doblemente positivas que producían IL-10 e IL-12 fueron a las 24 horas el 27,8% (ver Figura 5).

La composición CD/Apo-Nec de la invención fue segura y bien tolerada por los pacientes.

La composición CD/Apo-Nec de la invención induce respuestas celulares en los pacientes ya que la reacción de DTH utilizando células Apo-Nec como inmunógeno se incrementó en todos los pacientes luego de la segunda aplicación respecto de los valores de base.

El 85% de los pacientes (estadio IIc y III) tratados con la composición CD/Apo-Nec de la invención se encuentran libres de enfermedad, luego de un seguimiento promedio de 41,5 meses cuando fueron tratados después de la cirugía (ver figura 2). La composición CD/Apo-Nec de la invención es útil *per se* para el tratamiento de los pacientes con melanoma, siendo además útil como adyuvante luego de tratamientos radicales ya que estimula en el paciente una respuesta inmune, en donde el sistema inmunitario elimina a las células tumorales residuales, protegiendo al paciente de posibles recaídas. Más específicamente la composición CD/Apo-Nec de la invención es útil para el tratamiento de pacientes en estadio IIB, IIC y III, los cuales contienen menor masa tumoral y es útil como adyuvante luego de teraPlas radicales para los pacientes en estadio IV.

Es evidente para un experto en la materia que la composición CD/Apo-Nec de la invención se puede emplear para el tratamiento del melanoma humano, también se la puede emplear como adyuvante junto con otros tratamientos y como estimulante del sistema inmunitario dependiendo por ejemplo del estadio del paciente y la etapa del tratamiento.

Es importante destacar que la combinación de células Apo-Nec de la invención inducen la maduración de las células CD autólogas. La mezcla o combinación de las células Apo-Nec de la invención son una buena fuente de antígenos de melanoma para cargar a las células dendríticas. Debe apreciarse que las células dendríticas maduran sólo mediante contactar y fagocitar a la combinación de células Apo-Nec de la invención, sin el agregado de un estímulo extra tal como por ejemplo Interleukina 1, Factor de Necrosis Tumoral α , CD40 ligando o Prostaglandina E, los cuales son usados comúnmente como un cóctel de maduración. Las CD que fagocitan a las células Apo-Nec de la invención incrementan la migración *in vitro* en respuesta a la quimiocina MIP-3 β y la producción intracelular de IL-12. Las células CD/Apo-Nec de la invención tienen capacidad para presentar en forma cruzada antígenos tumorales nativos a antígenos CTL específicos.

Tal como se mencionó anteriormente la fagocitosis de las células Apo-Nec por las CDin de cada paciente indujo la maduración de dichas CD.

Por otra parte, se analizaron las líneas celulares de la invención en relación a sus capacidades clonogénicas. Las colonias en agaragar blando de la línea celular de la invención MEL-XY3 presentan una morfología heterogénea, con baja adhesión entre las células. Se observa una baja proporción de colonias melanóticas. Las colonias en

agaragar blando de la línea celular de la invención MEL-XY1 presentan una morfología compacta, con una alta adhesión entre las células que la componen. Rara vez se observan colonias melanóticas.

Como una forma de caracterizar a las colonias se compararon los niveles de expresión de antígenos de melanoma normalizados respecto de la expresión de β -actina en las líneas celulares de la invención y en las colonias en agaragar blando de dichas líneas celulares. Los resultados de caracterización de los clones se observan en la Tabla 4 y figura 6.

Tabla 4

Estudio comparativo en la expresión de antígenos entre las líneas celulares de la invención y las líneas clonogénicas de la invención.

Antígenos de diferenciación de Melanoma	Líneas celulares			
	MEL-XY3 línea	MEL-XY3 colonias	MEL-XY1 línea	MEL-XY1 colonias
MART1	+++	+	+	+
MAGE1	+	ND	+	ND
NYESO-1	++++	+	+	+
GP100	+	++	+	+
TYR	+	ND	+	ND
TRP2	+*	+*	+*	+*
B-ACTINA	+	+	+	+

ND: no determinado

* Datos aún

Tal como se puede observar existen dentro de la población y de cada línea celular de la invención una subpoblación de células clonogénicas, dichas células clonogénicas también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. La presencia de células clonogénicas permite proporcionar al paciente antígenos típicos de células indiferenciadas o troncales también denominadas células madre.

La heterogeneidad de los tumores de melanoma es elevada, de ahí que sea fundamental para la inmunoterapia emplear mezclas complejas de antígenos provistas por la mezcla o combinación de líneas celulares y sus subpoblaciones. A título de ejemplo se muestra en la figura 7 una biopsia de melanoma primario que evidencia la heterogeneidad de dichos tumores en relación a la expresión de antígenos de diferenciación melanocítica.

Cuando se trataron pacientes con la composición Apo-Nec de la invención más BCG como adyuvante y GM-CSF como inmunomodulador de acuerdo al esquema que se divulga en los ejemplos a continuación se observó que el 75 % de los pacientes (estadios IIC y III) estaban libres de enfermedad con un seguimiento máximo de 51 meses (ver Figura 8), y la toxicidad fue escasa y solo de grado 1.

Se muestran los resultados ejemplificativos de uno de los pacientes del protocolo seleccionado. El paciente #200 es de sexo femenino, raza caucásica, de 67 años, consultó en noviembre de 2003. En junio de 2002 fue intervenido quirúrgicamente por un nevo dorsal que había crecido. La anatomía patológica reveló un melanoma cutáneo, nivel IV de Clark, nivel de Breslow 5.7 mm. En agosto de 2002 aparecieron satelitosis que fueron extirpadas. Al paciente se le administró Apo-Nec + BCG + GM-CSF, recibiendo 600 μ g GM-CSF (por composición) y finalizó el tratamiento con escasa toxicidad. En el último examen clínico se detectó un nódulo sospechoso en dorso, que fue extirpado, y cuya imagen microscópica se muestra en la Figura 9. Se observa una intensa infiltración linfóide, con zonas remanentes de tumor viable, pero también una intensa necrosis del tejido tumoral, así como la presencia de macrófagos cargados de melanina.

A título de ejemplo se muestran también los resultados de un paciente tratado con la composición Apo-Nec de la invención + BCG + IFN- α . El paciente #300 es de sexo masculino, de 17 años de edad que consultó por adenopatía inguinal izquierda. A los dos meses se efectuó otro vaciamiento inguinal izquierdo, aislándose 4/11 ganglios con metástasis de melanoma. Efectuó tratamiento con interleuquina-2 en bajas dosis.

A los 14 meses del segundo vaciamiento se detectó recaída en la arcada inguinal izquierda, y se efectuó nuevamente cirugía, aislándose 5/7 ganglios con metástasis de melanoma. El paciente presentaba dolor lumbar. La

tomografía axial computada reveló adenopatías retroperitoneales, se efectuó quimioterapia con esquema de Dartmouth. Al finalizar la quimioterapia inició el tratamiento con la composición Apo-Nec de la invención + BCG. A los 14 meses de iniciado el tratamiento con la composición de la invención se detectó nódulo en región inguinal izquierda. Reoperado, se detectó metástasis de melanoma con infiltrado linfoplasmocitario abundante. El paciente continuó tratamiento con la composición Apo-Nec + IFN- α . En la figura 10 se muestra la remisión de un nódulo pulmonar izquierdo. El paciente se encuentra actualmente libre de enfermedad.

La presente invención divulga líneas celulares de melanoma que en combinación expresan la mayoría de los antígenos asociados a melanoma, composiciones que comprenden a dichas líneas irradiadas y composiciones que comprenden CD autólogas generadas *ex vivo* que han fagocitado a una mezcla de células apoptóticas/necróticas de las líneas celulares de melanoma.

La presente invención se pone más claramente de manifiesto según los siguientes ejemplos, los cuales no deben ser interpretados como una limitación impuesta al alcance de la misma. Por el contrario, debe entenderse claramente que puede recurrirse a otras formas de realización, modificaciones y equivalentes de la misma a partir de la presente descripción, puede sugerir a los expertos en la materia sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Obtención, establecimiento y mantenimiento de las líneas celulares de la invención

Mel-XY1: La línea Mel-XY1 se obtuvo de un paciente masculino de raza caucásica, a partir de una metástasis pulmonar secundaria a un melanoma primario de la espalda. El paciente falleció dos años después de metástasis cerebrales.

Mel-XY2: El paciente del cual se originó la línea tenía 44 años y era un hombre de raza caucásica que presentaba melanoma ulcerado en la espalda (Clark's nivel III). Dos años más tarde desarrolló en forma simultánea adenopatías axilares y metástasis pulmonares. Se extrajeron las adenopatías axilares, se la disoció y dichas células dieron origen a la línea celular.

Mel-XY3: El paciente era un hombre de raza caucásica de 43 años que había desarrollado un melanoma primario en el brazo. Dos años después aparecieron metástasis de nódulos linfáticos axilares. El paciente recibió quimioterapia con DTIC, sin mostrar respuesta clínica alguna. Las metástasis axilares fueron retiradas, y las células dieron origen a la línea celular Mel-XY3.

Mel-XX4: Se obtuvo por cirugía una adenopatía inguinal de una mujer blanca de 33 años, dicha adenopatía fue diagnosticada como una metástasis de melanoma. El tumor primario era desconocido. Quince meses más tarde la paciente tuvo una recurrencia en el nódulo linfático inguinal. El nódulo macroscópicamente melanótico fue removido, se lo cortó en trozos pequeños, se removió el tejido graso y conectivo y se los resuspendió en medio Dulbecco's Modified Tagle (DMEM), se lo disgregó mecánicamente haciendo presión en una malla de nailon y los agregados celulares se trataron enzimáticamente durante una noche a 37°C.

Las células se resuspendieron en medio de cultivo de melanoma suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Natocor, Córdoba, Argentina), se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm² y se incubaron a 37°C bajo humedad y una atmósfera de 5% CO₂-95% en aire. Luego de 24 hs el medio de cultivo fue retirado en función de extraer las células no adheridas.

Se realizaron cuatro pasajes de la suspensión celular en columnas de microesferas antifibroblastos (Miltenyi Biotec, Germany). Las células obtenidas fueron denominadas Mel-XX4.

El mantenimiento de las cuatro líneas celulares de la invención (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4) se llevó a cabo mediante cultivos en medio para melanoma DMEM: mezcla nutritiva F12 (1:1) suplementada con 2 mM de glutamina, 20 nM de sodio selenite, 100 μ M de ácido ascórbico, 0.3 mg/ml de galactosa, 0.15 mg/ml de Piruvato de sodio y 5 μ g/ml de insulina, 100IU/ml de penicilina, 10 μ g/ml de estreptomycin más 10% de suero fetal bovino (FBS) (Natocor, Córdoba, Argentina) en un laboratorio GMP del Centro de Investigaciones Oncológicas-FUCA.

Los clones CTL (HLA A*0201 restringidos) específicos para antígenos Melan A/MART-1 (M27: AAGIGILTV) y gp100 (G154: KTWGQYWQV) se expandieron en medio RPMI más 10% de suero AB humano inactivado y antibióticos, en ciclos de 14 días utilizando 30 ng/ml de anticuerpo anti-CD3 (OKT-3, BD Biosciences) y series de 300 UI/ml de IL-2 (Chiron BV, Amsterdam, Netherlands) cada 3 días.

Ejemplo 2: Caracterización de las líneas celulares:

Cinética de crecimiento in vitro:

Se sembraron 10⁴ células por pocillo en placas de 24 pocillos (Corning). Cada 2-3 días las células fueron tratadas con EDTA (0,02%), cosechadas y contadas. El tiempo de duplicación de la población fue estimado a partir de la pendiente de la curva de crecimiento durante la fase exponencial.

Clonogenicidad

5 El crecimiento de las células no dependiente del anclaje se determina mediante el método de agaragar blando (Hamburger y Slamon, Science 197: 461, 1977). Se sembraron $3-10 \times 10^3$ células en la capa superior. Las placas fueron incubadas durante 21 días y fueron alimentadas cada semana con 50 μ l de medio de cultivo. Se contaron bajo microscopio las colonias con más de 36 células.

Caracterización de los antígenos de melanoma mediante inmunocitoquímica (ICQ) y FACS

Para la evaluación mediante ICQ se trataron las células en crecimiento exponencial con EDTA, se centrifugaron, se fijaron con formaldehído, se embebieron en parafina y se cortaron en finas secciones. Se utilizaron como control muestras de tejido normal del paciente.

10 Los tejidos y las células fueron ensayados con anticuerpos monoclonales (Mabs) contra queratinas, vimentina y gp100/HMB 45 (Biogenex), MART1/Melan-A (Dako), y con anticuerpos policlonales anti S100 (Biogenex).

Las reacciones se visualizaron con complejos de avidina-biotina (Vectastain ABC). Las peróxidas endógenas se bloquearon con 0,6% de H_2O_2 .

15 Las reacciones de inmunofluorescencia indirecta se realizaron resuspendiendo las células tratadas con EDTA. Luego de bloquear con suero normal de cabra diluido al 10%, se incubaron las células con anticuerpos primarios, se lavaron, se incubaron con anticuerpos secundarios (inmunoglobulina de cabra antirrátón-FITC (Dako), se lavaron, se fijaron en 1% de paraformaldehído y se analizaron por FACS (FACS Vantage SE, Becton-Dickinson, USA). Los anticuerpos primarios fueron Mabs murinos anti-p53 (DO-7, BD Pharmingen), 3F8 anti-GD2, R24 anti-GD3. En el caso de p53 las células fueron permeabilizadas. Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) Clase I y Clase II
20 fueron tipificados por PCR-SSP.

Determinación de antígenos asociados a melanoma mediante RT-PCR:

Se extrajo ARN total con Trizol (Invitrogen). En función de iniciar la síntesis de ADNc se agregaron a 1-3 μ g de ARN los correspondientes cebadores y se incubaron con 200 U de enzima MMLV-RT (Promega), 25-40 U de RNAsin (Promega) y 250-500 μ M de dNTPs (Invitrogen) durante 5 min a 70 °C y luego por 60 min a 42°C. Las alícuotas de ADNc (2-10 μ l) se amplificaron con Taq DNA polymerase (Invitrogen) y usando los pares de cebadores específicos.

Los cebadores específicos se muestran a continuación:

Gp100

5'-GCTTGGTGTCTCAAGGCAACT-3' (SEC ID Nº 1)

5'-CTCCAGGTAAGTATGAGTGAC-3' (SEC ID Nº 2)

30 MART-1

5'-CAAGATGCCAAGAGAAGATGCTCACT-3' (SEC ID Nº 3)

5'-GCTTGCATTTTTCCTACACCATTCCA-3' (SEC ID Nº 4)

Tirosinasa

5'-TTGGCAGATTGTCTGTAGCC-3' (SEC ID Nº 5)

35 5'-AGGCATTGTGCATGCTGCTT-3' (SEC ID Nº 6)

5'-GTCTTTATGCAATGGAACGC-3' (SEC ID Nº 7)

5'-GCTATCCCAGTAAGTGGACT-3' (SEC ID Nº 8)

TRP-2

40 5'-GAGTGGTCCCTACATCCTACG-3' (SEC ID Nº 9)

5'-GCGTCCTGGTCCTAATAATGT-3' (SEC ID Nº 10)

MAGE-1

5'-GAGTCCTCAGGGAGCCTCC-3' (SEC ID Nº 11)

5'-TTGCCGAAGATCTCAGGAAA-3' (SEC ID Nº 12)

NY-ESO-1

5'-AGCCGCCTGCTTGAGTTCTACCTC-3' (SEC ID N° 13)

5'-AGGGAAAGCTGCTGGAGACAG-3' (SEC ID N° 14)

MDR-1

5 5'-TCCAAGAAGCCCTGGACAAAG- 3' (SEC ID N° 15)

5'-TTGATGATGTCTCTCACTCTGTTCC-3' (SEC ID N° 16)

MIA

5'-CATGCATGCGGTCTATGCCCAAGCTG-3' (SEC ID N° 17)

5'-GATAAGCTTTCACTGGCAGTAGAAATC-3' (SEC ID N° 18)

10 β -actina

5'-ATGTTTGAGACCTTCAACACCCC-3' (SEC ID N° 19)

5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTCCAG-3' (SEC ID N° 20)

Los cebadores antisentido se muestran en la línea a continuación.

15 Para la detección de la tirosina se amplificó además una alícuota de 1/100 de la primera reacción de PCR con cebadores internos (PCR anidada).

Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa y teñidos con bromuro de etidio; el tamaño de los fragmentos se calculó comparándolo con la serie sembrada con marcadores de PM de ADN de 100 pb (Promega).

Análisis citogenéticos y citomoleculares:

20 Para los análisis citogenéticos se incubaron las células correspondientes a las cuatro líneas de la invención en crecimiento exponencial con colquicina (0,1 μ g/ml) a 37°C durante 8-16 hs, se recolectaron con una solución de Tripsina-EDTA y se procesaron de acuerdo a los protocolos estándar. Se utilizó la técnica de bandeo-G. La identificación de los cromosomas se llevó a cabo de acuerdo al Sistema Internacional de la Nomenclatura de Citogenética Humana (Mitelman, 1995 ISCN.: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, (ed. S Karger, Basel).

25 **Ejemplo 3: Generación de células dendríticas (CD) a partir de monocitos, caracterización de las mismas y cargado con las células Apo-Nec.**

30 Las células dendríticas fueron obtenidas a partir de capas leucocíticas o de productos de leucoféresis provenientes de donantes sanos. Las células mononucleares periféricas (PBMCs) fueron purificadas en un gradiente de densidad de Fycoll-Hypaque. Se resuspendieron las PBMC en medio fresco libre de suero AIM-V™ (Invitrogen) y se las dejó adhiriendo en frascos de cultivo (TPP, Alemania). Luego de 2 hs a 37°C, se removieron las células no adherentes, y los monocitos adheridos se cultivaron durante 5 días en AIM-V suplementado con 800 U/ml de rhuGM-CSF y 50 ng/ml de IL-4 (Peprotech, Mexico), obteniéndose así las CDin. Se analizaron los cambios en el fenotipo mediante microscopio óptico y FACS. Para inducir la maduración controlada de las CDin se agregaron 2 μ g/ml de LPS (Lipopolisacárido de E. coli J5, Sigma, St. Louis, CA) y finalmente las células fueron cultivadas durante 48 hs.

35 La caracterización del fenotipo de las células CD se realizó cuando las células estaban en el estado inmaduro (CDin) y tras los ensayos de fagocitosis de las células apoptóticas/necróticas (células Apo-Nec) mediante la tinción de 5×10^5 células con anticuerpos marcados con fluorocromos contra los antígenos CD14, CD11c, CD1a, HLA clase II, CD80, CD86, CD83, CD40, HLA clase I y CCR7 (BD Biosciences, San Jose, CA), mediante análisis por FACS, (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los controles de isotipo correspondientes fueron Rata IgG2a PE y ratón IgG1 e IgG2a (BD Biosciences, San Jose, CA). También, se analizó la expresión de CD83 en CD que fagocitaron células Apo/Nec, se empleó un anticuerpo monoclonal no marcado anti-CD83 (IgG1) y el correspondiente isotipo como control, en el revelado se empleó un anticuerpo antirratón IgG1-PerCP (BD Biosciences, San José, CA).

45 La capacidad de endocitosis de las CD se evaluó incubando 1×10^6 CD con 1 mg/ml de dextrano conjugado con FITC (Dx-FITC) (Sigma, St Louis, CA) durante 30 min a 37°C. Tras la incubación se lavaron las células con PBS y se analizaron por FACS. Los controles incluyeron CD incubadas con Dx-FITC durante 30 min a 4°C para inhibir el proceso de endocitosis por otro lado la incorporación basal se consideró en el momento 0 del ensayo. La incorporación de DX-FITC (endocitosis) fue cuantificada mediante FACS.

Evaluación de la fagocitosis de las células CD:

Las células CDin fueron cocultivadas con las células Apo-Nec (preparadas tal como se muestra anteriormente) en medio fresco AIM-V a diferentes tiempos. En algunos ensayos las CD fueron teñidas de rojo con PKH26 y las células Apo-Nec fueron teñidas de verde con PKH67 (Sigma, St. Louis, CA). Después del cocultivo se llevó a cabo el análisis por FACS y se definió el porcentaje de CD que fagocitaron células Apo-Nec como el porcentaje de células doble positivas. Se realizaron los controles apropiados para cada color. El control de unión inespecífica de las células Apo-Nec a las CD se llevó a cabo incubando las células a 4°C durante los mismos períodos de tiempo.

Migración in vitro de las CDs:

Se ensayó la migración *in vitro* de las CD antes y después del cocultivo con las células Apo-Nec, utilizando una cámara de quimiotaxis de 48 pocillos (AP 48 Neuroprobe Inc., Gaithersburg, MD). En el compartimiento inferior se colocaron 10 ng/ml de MIP-1 α o MIP-3 β (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) diluido en RPMI. La migración basal se ensayó colocando RPMI en la cámara inferior. Las CD fueron sembradas en la cámara superior (3×10^4 CDs/pozo) en RPMI. Entre la cámara superior e inferior se colocó una membrana de polycarbonato de 5 μ m de poro (Neuroprobe, Inc., Bethesda, MD). Después de 90 min a 37°C, las células de la cara superior de la membrana fueron retiradas y las células que migraron adheridas a la cara inferior de la membrana fueron coloreadas con Giemsa 10% diluido en agua neutra. Las membranas fueron secadas al aire, montadas sobre un portaobjeto con Bálsamo de Canadá y las células migrantes se las contó utilizando un microscopio. Se analizaron cinco campos por pocillo a un aumento de 40X y se analizaron 3 pocillo/condiciones. El análisis estadístico se realizó empleando la prueba de Student.

Microscopía electrónica:

También se estudio el proceso de fagocitosis por microscopía electrónica. Se fijaron las muestras de los cocultivos con glutaraldehído al 2,5% 0,1 M de tampón fosfato, y luego se realizó una tinción posfijación con tetróxido de osmio 1%, se lavaron dos veces con agua destilada y se contrastaron con acetato de uranilo 5% durante 2 horas. Luego de un lavado y de la deshidratación las muestras se embebieron en resina (Durkupan). Se realizaron cortes ultrafinos (70-90 nm), se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con citrato de plomo de Reynold. Se analizaron las rejillas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 109. Alternativamente, para obtener figuras de las células completas, se obtuvieron cortes finos (0.5 μ m) en un ultramicrotomo (Reichert-Jung), se colorearon con azul de toluidina 0,4% 0,1 M de tampón carbonato, se montaron en Durkupan y se analizaron bajo un microscopio óptico (1.000x). Se obtuvieron las fotos con una cámara digital Sony Cybershot Digital (5 megapíxels) y las imágenes fueron procesadas con el programa Adobe photoshop 6.0.

Ensayo in vitro cross presentación, secreción de IFN- γ :

Se purificaron monocitos CD14+ al 98% a partir de donantes HLA A*0201 utilizando microesferas anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Germany) y fueron diferenciadas a células CDin mediante 5 días de cultivo tal como se describió anteriormente. Las células CDin se incubaron con células Apo-Nec durante 6, 12, 24 y 48 horas y se enfrentaron durante toda la noche a clones CTL MelanA/MART-1 o gp100 específicos en 1 ml de medio AIMV. La secreción de IFN- γ al sobrenadante se determinó por triplicado mediante la técnica de ELISA (OptEIA IFN- γ , Pharmingen BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo a las sugerencias del proveedor. Se realizó una curva de calibración para cada experimento y la concentración de las muestras se calculó usando un análisis de regresión log-log y empleando el software Cembal 2.2. Los controles incluyeron: CD más 20 μ g/ml de péptidos MART-1 o gp100, líneas celulares viables de melanoma HLA A*0201⁺ que expresan los antígenos MART-1 y gp100 (controles positivos) o células CD sembradas con péptidos no específicos y líneas celulares viables de melanoma HLA A*0201⁺ que no expresan los correspondientes antígenos (controles negativos).

Mediciones de las citoquinas IL-10 e IL-12 intracitoplasmáticas:

Las CD marcadas con PKH26 (rojo) fueron cocultivadas con células Apo-Nec marcadas con PKH67 a diferentes tiempos (6, 12, 24 y 48 hs). Se realizó la medición de las citoquinas acumuladas por la técnica de Inmunofluorescencia intracelular, luego del bloqueo de la salida de las mismas con Brefeldina A (8 hs) poscultivo (Golgi Plug, BD Biosciences, San José CA). Las células fueron permeabilizadas con 0,05% de saponina y teñidas con anti-IL10 (Isotipo IgG2a de rata)-APC y anti-IL12 subunidad p40-p70 (Isotipo IgG1 de ratón)-PerCp (BD Biosciences, San José, CA). Para los estudios por FACS la población doblemente teñida PKH26/PKH67 fue seleccionada y las citoquinas fueron evaluadas para dicha población en un experimento de cuatro colores. Se utilizó como control el cocultivo a 4°C.

Ejemplo 4: Elaboración de las composiciones de la invención y esquemas de aplicación:*Composición Apo-Nec:**Irradiación de las líneas celulares:*

Las cuatro líneas celulares de la invención (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4) se irradiaron con radiación gamma a 70Gy (Siemens, Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Argentina), posteriormente las células se congelaron (50% de DMEM, 40% de albúmina humana y 10% de DMSO) en nitrógeno líquido hasta su utilización.

- 5 El día de la aplicación de las células, estas se descongelaron, se lavaron y se prepararon en dosis de composición que contenían entre $5 - 10 \times 10^6$ células de cada una de las líneas celulares de la invención aisladas o combinaciones de las mismas resuspendiéndolas en medio DMEM.

Se inyectaron 300 μ l en forma intradérmica.

Composición CD/Apo-Nec:

Preparación de células tumorales apoptóticas/necróticas:

- 10 Las células (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4) irradiadas y congeladas tal como se describe anteriormente fueron descongeladas y sembradas en medio de melanoma más suero fetal bovino al 10% hasta completar el proceso apoptótico. Después de 72 hs de cultivo, las células fueron despegadas del fondo de los frascos, lavadas, contadas y resuspendidas en medio fresco libre de suero AIMV™ Medium (grado terapéutico, GIBCO, Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y). La apoptosis y la necrosis se sometieron a ensayo mediante la técnica de unión de
- 15 Anexina-V FITC e incorporación de Ioduro de Propidio (IP) (Anexina-V kit de detección de apoptosis, BD Biosciences, San José, CA) y se analizó por FACS. Los ensayos clonogénicos en agaragar blando se llevaron a cabo por sextuplicado (1.5×10^4 células/pocillo) en función de analizar en las células irradiadas la capacidad de proliferación en comparación con células control no irradiadas.

- 20 Se cocultivaron 5, 10, 15 o 20×10^6 CDs, según la dosis para cada paciente, con células Apo-Nec en medio AIMV durante 48 horas, a 37°C. El día de la aplicación las células de los cocultivos fueron centrifugadas a 1.200 rpm por 5 min, resuspendidas en medio DMEM (300 μ l) e inyectada vía intradérmica en una de las cuatro extremidades que tuviera intacto el drenaje de los nódulos linfáticos.

Para todas las preparaciones de las composiciones se realizaron los controles de calidad y los ensayos de esterilidad.

25 **Ejemplo 5: Diseño de los estudios con pacientes y criterios de selección:**

- Los estudios realizados en pacientes se llevaron a cabo para evaluar la toxicidad, viabilidad y respuesta inmunitaria al tratamiento. Los estudios fueron aprobados por el consejo Revisor Institucional del Instituto Alexander Fleming, y por un comité de ética. Los criterios de viabilidad fueron (a) melanoma cutáneo, histológicamente confirmado en los estadios IIB, IIC, III ó IV (AJCC); (b) pacientes con enfermedad mínima o no detectable (ND) después de la cirugía
- 30 evaluados por Tomografía Axial Computada y valores de la enzima lactatodeshidrogenasa (LDH). Los pacientes de melanoma con primario desconocido podían ser incluidos en el estudio; (c) edad entre 15 y 60 años; (d) expectativa de vida > 6 meses; (e) rendimiento (ECOG) 0 o 1; (f) pacientes en estadio III tratados previamente con IFN- α que hubieran finalizado o suspendido el tratamiento debido a la progresión de la enfermedad, toxicidad u otra razón clínica o aquellos pacientes que no hubieran iniciado el tratamiento con IFN- α seis meses antes de la cirugía (g)
- 35 adecuado acceso venoso para el procedimiento de leucoféresis, (h) Los criterios de elección de laboratorio fueron: hemoglobina > 10 gr%; recuento de glóbulos blancos > 4800/mm³, plaquetas > 150.000/mm³; bilirubina total y directa, transaminasas oxalacéticas y transaminasas glutámico pirúvicas < 1,5 veces el valor superior normal; LDH $\leq$ 450 mU/ml; i) ausencia de embarazo con β -HCG sérica determinada una semana antes de cada aplicación en las mujeres premenopáusicas; (j) creatinina < 1,4 mg % (k) sin tratamiento de quimioterapia, radioterapia o tratamiento biológico durante el mes previo; (k) sin medicación con corticosteroides o antiinflamatorios no esteroideos (AINEs); (l) sin metástasis de cerebro activas; (m) ECG normal (n) todos los pacientes debían de firmar el consentimiento informado.

Evaluaciones de los pacientes y esquema de tratamiento:

- 45 La evaluación de base de los pacientes fue realizada dentro de los 35 días previos a la primera aplicación. La evaluación clínica incluyó una historia médica clínica completa, examen físico, electrocardiograma (ECG), Tomografía Axial Computada (tórax, abdomen, pelvis y cerebro), determinación del estadio tumoral, tamaño del tumor y documentación de los sitios de enfermedad, examen químico de sangre y hematología. Los pacientes seleccionados fueron sometidos a leucoféresis para obtener PBMC para generar CD.

- 50 Los pacientes recibieron 4 aplicaciones de CD/Apo-Nec en intervalos de 2 semanas. La inoculación se realizó vía intradérmica (300 μ l) con cada dosis se ensayaron pruebas de DTH que consistió en la inoculación en el antebrazo de entre 5 y 20×10^6 células CD/Apo-Nec sin adyuvante. Se analizaron los signos vitales y las reacciones cutáneas de la DTH a las 2, 24 y 48 horas posaplicación. Al día 70 se investigó el estatus de los pacientes mediante ecografía abdominal y rayos X del tórax y al día 75 los pacientes finalizaron el protocolo con un examen clínico.

- 55 Para las aplicaciones de las células Apo/Nec de la invención los pacientes fueron inyectados intradérmicamente (id) en una de las extremidades con ganglios linfáticos intactos. Veinte (20) pacientes recibieron una dosis de 400 μ g

rhGM-CSF (100 µg por día, cuatro días). En el día de la aplicación, 0,1 ml de hGM-CSF se mezcló con Apo-Nec (16 x 10⁶ células irradiadas en 0,3 ml) y BCG (1 x 10⁶ unidades formadoras de colonias) en 0,05 ml). Durante los siguientes 3 días, 0,1 ml de rhGM-CSF se inyectó i.d. en el sitio de aplicación. Cada paciente recibió 4 aplicaciones con separación de 3 semanas, luego 1 composición cada dos meses por un año, 1 composición cada tres meses el segundo año y luego continuaron con 1 composición cada 6 meses.

Análisis estadístico:

Todos los resultados adversos fueron clasificados de acuerdo a los Criterios Comunes de Toxicidad del Instituto Nacional de Cáncer (NCI).

La población evaluable se definió como todos los pacientes que recibieron las cuatro aplicaciones. Dado que la mayoría de los datos de los pacientes no estaban normalmente distribuidos, la totalidad de los datos se analizaron empleando la prueba de suma de rangos Wilcoxon. El valor de DTH de los diferentes grupos que recibieron diferente cantidad de CDs/Apo-Nec se compararon entre cada grupo mediante ANOVA de una variable y el test de comparaciones múltiples de Dunnett. Se consideró como significativo un valor de P < 0.05.

Métodos para evaluar la respuesta inmunológica de los pacientes tratados:

Para evaluar la respuesta inmunitaria de los pacientes, se obtuvo suero el día 7 previo a la aplicación (suero pre), y el día 15 posterior a la finalización del tratamiento (suero post), las muestras se conservaron a -80°C. Las células PBMC se purificaron mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque y posterior centrifugación a partir de leucoféresis (preaplicación) o a partir de 100 ml de sangre tomados 15 días posteriores a la última dosis (posaplicación), los PBMC fueron congelados en 50% de DMEM, 40% de albúmina humana y 10% de DMSO hasta ser utilizados en los ensayos inmunológicos. La tipificación HLA de HLA-A*0201 se determinó luego de una incubación de las muestras de los pacientes con anticuerpos monoclonales de ratón anti-HLA-A*0201 conjugados con FITC (BD-Pharmingen, San Jose, CA).

Reacción DTH:

En cada uno de los días de aplicación se realizó una prueba de DTH en el antebrazo con 2x10⁶ células Apo-Nec y la reacción se evaluó a las 2, 24 y 48 horas posaplicación. Se estableció el valor de intensidad DTH de la siguiente manera: 0: eritema < 0.5 cm; 1: eritema macular 0.5-1.0 cm; (2) eritema macular 1.0-2.0 cm; 3: eritema macular > 2.0 cm o eritema papular <1.5 cm; 4: eritema papular > 1.5 cm. El score DTH corresponde a la sumatoria de todas las intensidades DTH individuales/4.

Ensayo de proliferación:

Se obtuvieron PBMC pre- y poscomposición mediante un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y fueron conservados congelados en nitrógeno líquido hasta su utilización. Para los ensayos las células fueron descongeladas e incubadas en un medio AIM-V (Gibco, Grand Island, NY) durante 1 hora a 37°C. Se sembraron 5x10⁵ células en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de fitohemoaglutinina (PHA) (5 µg/ml) (Gibco, Grand Island, NY) y se incubaron a 37°C por 72 hs. Durante las últimas 16 hs, las células se pulsaron con (³H)dThd (Amersham, 1 µCi/pocillo) y se midió tras la lisis celular la radiactividad incorporada al ADN (Cell Harvester, Nunc, Rochester, NY), en un contador de centelleo líquido.

Determinación de citoquinas:

Se determinaron las concentraciones de IL-10 e IL-12 en el suero de los pacientes previo a la aplicación (suero preaplicación) y dos semanas después de la cuarta aplicación (suero posaplicación). Los sueros se congelaron a -80 °C hasta realizar el ensayo ELISA (OptEIA IL-10 and IL-12, BD Biosciences, San Diego, CA). Para cada ensayo se realizó una curva de calibración y la concentración de la muestra se calculó mediante un análisis de regresión lineal log-log usando el software Cembal 2.2.

Medición de IFN-γ por la técnica de ELISpot:

Como estimuladores, se purificaron células CD14⁺ a partir de PBMC de pacientes HLA-A2 positivos usando microesferas recubiertas con anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Paris France), se cultivaron 5 días en medio sintético SYN-H (AbCys, Paris, France) con 100 ng/ml de GM-CSF y 20 ng/ml de IL-4, y se maduraron con 10 µg/ml de LPS durante 48 horas adicionales. Las CD maduras fueron pulsadas durante 1 hora a 37°C con 10 µg/ml del péptido correspondiente diluido en medio SYH-H, se lavaron y se mezclaron con PBMC hasta alcanzar una relación E/T de 10:1, usando un total de 10⁵ linfocitos CD8+ células/pocillo.

Se recubrieron placas 96 pocillos de nitrocelulosa (MAIPS 450; Millipore, Bedford, MA) toda la noche a 4°C con 10 µg/ml de mAb anti-IFN-γ humano (Mabtech, Nacka, Sweden) en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6, se lavaron y se bloquearon con medio IMDM + 10% suero humano AB (Biowest, Nuaille, France) por 1 hr a 37°C. Las células efectoras fueron sembradas en 100 µL de medio y se agregaron células blanco hasta alcanzar una relación E/T de 10:1, en un total de 200 µL/pocillo. Luego de 24 hs de incubación, los pocillos se lavaron 5 veces con 0,1% de

Tween-20 en PBS. Se incubaron las placas 2 hs a temperatura ambiente con 1 µg/ml de mAb de ratón anti-IFN-γ humano biotinilado (Mabtech) en PBS/HSA (0,4 g/L). Luego de varios lavados con 0,1% de Tween-20 en PBS, se agregó 1:1.000 de fosfatasa alcalina-estreptavidina (Mabtech) en PBS/HSA y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas fueron luego lavadas y se agregó el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/nitrozol de tetrazolio durante 30 minutos a temperatura ambiente (Mabtech). Se detuvo el desarrollo del color lavando las placas con agua. Luego de ser secadas se contaron las células T CD8+ que secretan IFN-γ, visualizada por un punto de color en la membrana de nitrocelulosa, usando el lector de sistema de lectura automática de imágenes ELISpot (AID, Strassberg, Germany).

Tinción con tetrámeros HLA/péptidos:

Se utilizaron los tetrámeros HLA-A0201 para identificar clones de linfocitos T CD8+ específicos para MART-1 (AAGIGILTV) o gp-100 (KTWGQYWQV) conjugados con PE (ficoeritrina) o APC (aloficocianina) respectivamente. El procedimiento de tinción se realizó a 37°C por 15 minutos y se colocó inmediatamente en hielo. Luego, las muestras fueron incubadas con anti-CD8 FITC (BD Biosciences, San Jose CA) a 4°C durante 40 minutos adicionales y se analizaron mediante FACS. Los controles positivos se realizaron con clones CTL (HLA A*0201 restringidos) específicos para los antígenos MART-1 (M27: AAGIGILTV) y gp100 (G154: KTWGQYWQV) expandidos en ciclos de 14 días en medio RPMI en presencia de anticuerpos anti-CD3 (OKT-3, BD Biosciences) a 30 ng/ml y series de IL-2 (Chiron BV) a 300 UI/ml cada 3 días, más 10% suero AB humano inactivado y antibióticos. Los controles negativos se realizaron con muestras de PBMC de donantes HLA-A0201 sanos.

Determinación de la respuesta humoral:

Las células viables que comprenden células Apo-Nec, se mezclaron en proporciones iguales, se bloquearon con suero de conejo al 10% por 30 min y se incubaron con suero pre- y posaplicación diluido 1/10 durante 1 hora a 4°C. Después se lavaron, y las células se incubaron con un anticuerpo antiinmunoglobulinas humanas (IgG+A+M) realizado en conejo (DakoCytomation, Glostrup, DK) durante 1 hora a 4 °C. Las células fueron lavadas, fijadas en paraformaldehído al 1% y se analizaron por FACS. Alternativamente, las células fueron primero permeabilizadas con saponina al 0,05% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) en PBS en la etapa de bloqueo y se agregó 0,05% de saponina/PBS en cada una luego de la etapa de reacción. Un suero normal fue usado como control de primer anticuerpo.

Se prepararon extractos proteicos a partir de las líneas celulares Apo-Nec de la invención. Los pellets celulares se congelaron a -80°C, se descongelaron y se trataron durante 20 min a 4 °C con tampón de lisis (50 mM Tris-CIH pH 7,5, 1% de NP40, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA y 1 mM de PMSF). La suspensión fue homogeneizada con un Polytron (Brinkmann Instruments, USA) y fue centrifugada durante 40 min a 10.000 g. Se conservó el sobrenadante en alícuotas congeladas a -20 °C. La concentración proteica se midió según el método de Lowry. Se prepararon de la misma forma extractos proteicos de la línea celular de carcinoma de mama humano IIB-BR-G.

Se pasaron los extractos proteicos (50 µg) en un gradiente SDS-PAGE 3%-12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (poro 0.45 µm, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Después de bloquearlas con leche bovina descremada al 3% (Molico, Argentina), se incubaron toda la noche a 4°C con suero del paciente diluido 1/10. Luego de varios lavados las membranas se incubaron con un anticuerpo anti IgG + A + M humanas realizado en cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Zymed, San Francisco, CA) y se revelaron con 4-Cl-naftol más H₂O₂.

Análisis histopatológicos de las metástasis de melanoma:

Se utilizaron biopsias embebidas en parafina para analizar las células linfoides y la infiltración de células CDs. Se colorearon entre tres y cinco secciones con hematoxilina/eosina o se inmunotifieron con anticuerpos anti-CD4 (clon 1F6), anti-CD8 (clon C8E-144b), anti-CD20 (clon L26), anti-CD1a (clon 010) (DakoCytomation, Glostrup, DK) y anti-CD57 (clon NK1, Zymed, San Francisco, CA) y se revelaron con el reactivo ABC y diaminobenzidina (DAB) o Novared como sustrato (Vectastain, Vector, Burlingame, CA). Como control se realizaron las reacciones omitiendo los anticuerpos primarios. Las secciones se analizaron bajo un microscopio Olympus BX40.

Listado de secuencias

<110> CONICET

Mordoh, José

<120> Líneas celulares, composiciones para el tratamiento de melanomas que las comprenden, procedimientos para preparar las composiciones y métodos de tratamiento

<130> CONICET

<160> 20

<170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> CEBADOR GP100 5'-3'
 <400> 1
 gcttggtgtc tcaaggcaac t 21
 10 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador Gp100 antisentido
 <400> 2
 ctccaggtaa gtagtgatga c 21
 <210> 3
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador MART-1 dirección 5'-3'
 <400> 3
 25 caagatgccca agagaagatg ctact 26
 <210> 4
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> cebador MART-1 antisentido
 <400> 4
 gcttgcattt ttctacacc attcca 26
 <210> 5
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador de tirosinasa en sentido 5'-3'
 <400> 5
 ttggcagatt gtctgtagcc 20
 5 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 10 <223> cebador de tirosinasa antisentido
 <400> 6
 aggcattgtg catgctgctt 20
 <210> 7
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador interno de tirosinasa (ADN anidado) en sentido 5'-3'
 <400> 7
 20 gtctttatgc aatggaacgc 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador interno de Tirosinasa (PCR anidada) antisentido
 <400> 8
 gctatcccag taagtggact 20
 <210> 9
 30 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador TRP-2 en sentido 5'-3'
 35 <400> 9
 gagtgggtccc tacatcctac g 21
 <210> 10

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> cebador TRP-2 antisentido
 <400> 10
 gcgtcctggt cctaataatg t 21
 <210> 11
 <211> 19
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador MAGE-1 en sentido 5'-3'
 <400> 11
 15 ggtcctcag ggagcctcc 19
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> cebador de MAGE-1 antisentido
 <400> 12
 ttgccgaaga tctcaggaaa 20
 25 <210> 13
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> cebador NY-ESO-1 en sentido 5'-3'
 <400> 13
 agccgcctgc ttgagttcta cctc 24
 <210> 14
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> cebador NY-ESO-1 antisentido
 <400> 14
 agggaaagct gctggagaca g 21
 <210> 15
 5 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador de MDR-1 en sentido 5'-3'
 10 <400> 15
 tccaagaagc cctggacaaa g 21
 <210> 16
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador de MDR-1 antisentido
 <400> 16
 20 ttgatgatgt ctctactct gtcc 25
 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> cebador de MIA en sentido 5'-3'
 <400> 17
 catgcatgcg gtcctatgcc caagctg 27
 <210> 18
 30 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador de MIA antisentido
 35 <400> 18
 gataagcttt cactggcagt agaaatc 27

<210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> cebador de beta-actina en sentido 5'-3'
 <400> 19
 atgtttgaga ccttcaacac ccc 23
 <210> 20
 10 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador de beta-actina antisentido
 15 <400> 20
 gccatctctt gctcgaagtc cag 23

REIVINDICACIONES

1. Combinación de líneas celulares de melanoma humano para el tratamiento de enfermedades malignas caracterizada porque dicha combinación comprende las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) y (e) subpoblaciones de las mismas.
2. Combinación de líneas celulares según la reivindicación 1, caracterizada porque dichas líneas celulares han sido irradiadas, y no pueden proliferar.
3. Combinación de líneas celulares según la reivindicación 1, caracterizada porque las líneas celulares a), b), c) y d) comprenden una población de células con fenotipo apoptótico.
4. Combinación de líneas celulares según la reivindicación 3, caracterizada porque la población de células apoptóticas comprende una cantidad de 35% a 60% de dichas células.
5. Combinación de líneas celulares según la reivindicación 1, caracterizada porque las líneas celulares a), b), c) y d) comprenden una población de células con fenotipo necrótico.
6. Combinación de líneas celulares según la reivindicación 5, caracterizada porque la población de células necróticas comprende una cantidad de 10% a 25% de dichas células.
7. Combinación de líneas celulares según la reivindicación 1, caracterizada porque la subpoblación comprende células de melanoma humano que pueden formar colonias en agaragar blando.
8. Composición para su utilización en el tratamiento del melanoma, caracterizada porque comprende una combinación de línea celular de melanoma alogeneica (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) en la que dichas líneas celulares han sido irradiadas y no pueden proliferar.
9. Composición para su utilización en el tratamiento de melanomas humanos, caracterizada porque comprende células dendríticas autólogas maduras; células dendríticas autólogas cargadas con una combinación de líneas celulares de melanoma humano heterólogo; células apoptóticas de dicha combinación de líneas celulares de melanoma humano heterólogo y células necróticas de dicha combinación de líneas celulares de melanoma humano heterólogo, en la que la combinación de líneas celulares está constituida por (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), (e) subpoblaciones de las mismas.
10. Composición según la reivindicación 9, caracterizada porque las células dendríticas maduras presentan el fenotipo CD14⁺, CD11c⁺, CD1a⁺ y CD83⁺.
11. Procedimiento para la preparación de la composición según la reivindicación 8, caracterizado porque comprende las etapas que consisten en:
 - a) descongelar y cultivar las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829);
 - b) irradiar dichas líneas celulares;
 - c) agregar adyuvantes y/o excipientes.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque las células son irradiadas a un valor de 50 a 100 Gy.

13. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el adyuvante es BCG.
14. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el inmunomodulador es seleccionado de entre el grupo que comprende GM-CSF, G-CSF, IFN α , ciclofosfamida y mezclas de los mismos.
- 5 15. Procedimiento para preparar la composición según la reivindicación 9, caracterizado porque comprende las etapas que consisten en:
 - a) descongelar y cultivar las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829);
 - 10 b) irradiar dichas líneas celulares;
 - c) obtener células dendríticas autólogas; y
 - d) cocultivar durante un tiempo determinado las células dendríticas autólogas con las líneas celulares irradiadas de la etapa b).
- 15 16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque las células son irradiadas a un valor de 50 a 100 Gy.
17. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el cocultivo se lleva a cabo a una temperatura de 35 a 39°C y durante un periodo de tiempo de 6 a 72 horas.
- 20 18. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque en la etapa d) la relación entre células dendríticas autólogas y las líneas celulares es de 1:1 a 3:1.
19. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque las células dendríticas de la etapa d) comprenden células dendríticas inmaduras.
- 25 20. Procedimiento según la reivindicación 11 o 15 caracterizado porque comprende una etapa que consiste en mezclar las líneas celulares.
21. Líneas celulares según la reivindicación 1 para preparar una composición para inducir una respuesta inmunitaria antitumoral en mamíferos que presentan melanoma.
22. Líneas celulares según la reivindicación 1, para preparar una composición para el tratamiento de mamíferos que presentan melanoma.
- 30 23. Líneas celulares según la reivindicación 1, para preparar una composición para el tratamiento adyuvante de mamíferos que presentan melanoma.

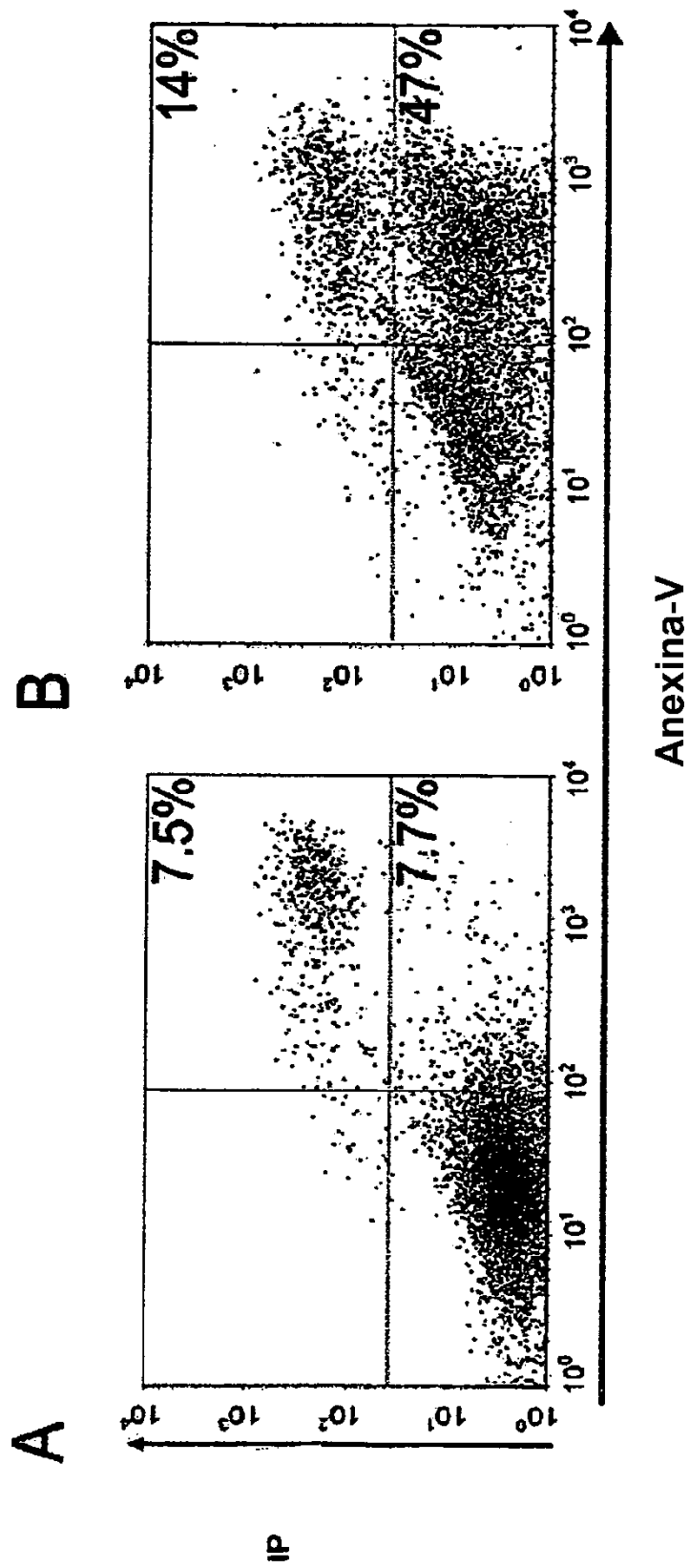


Fig. 1

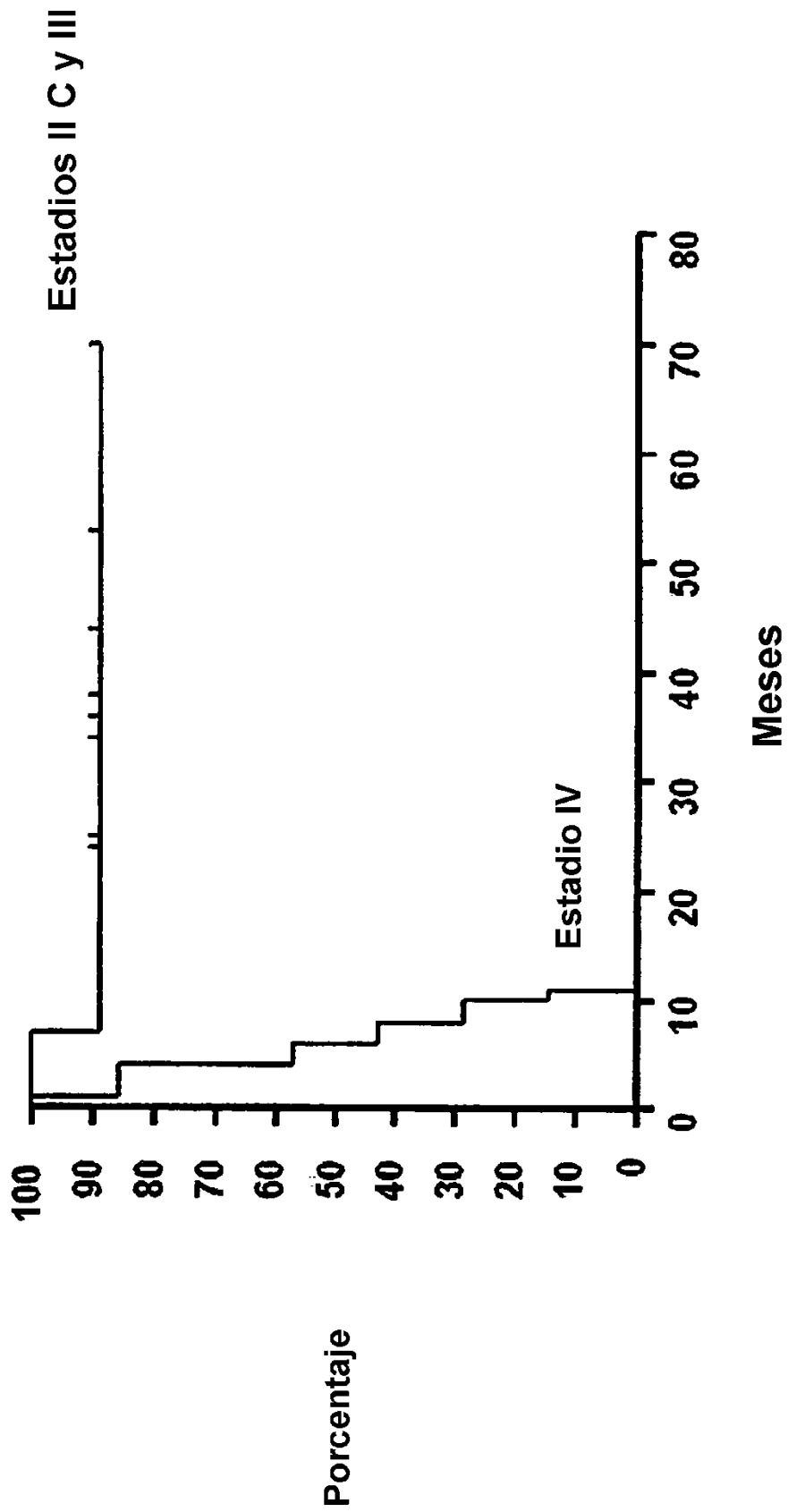


Fig. 2

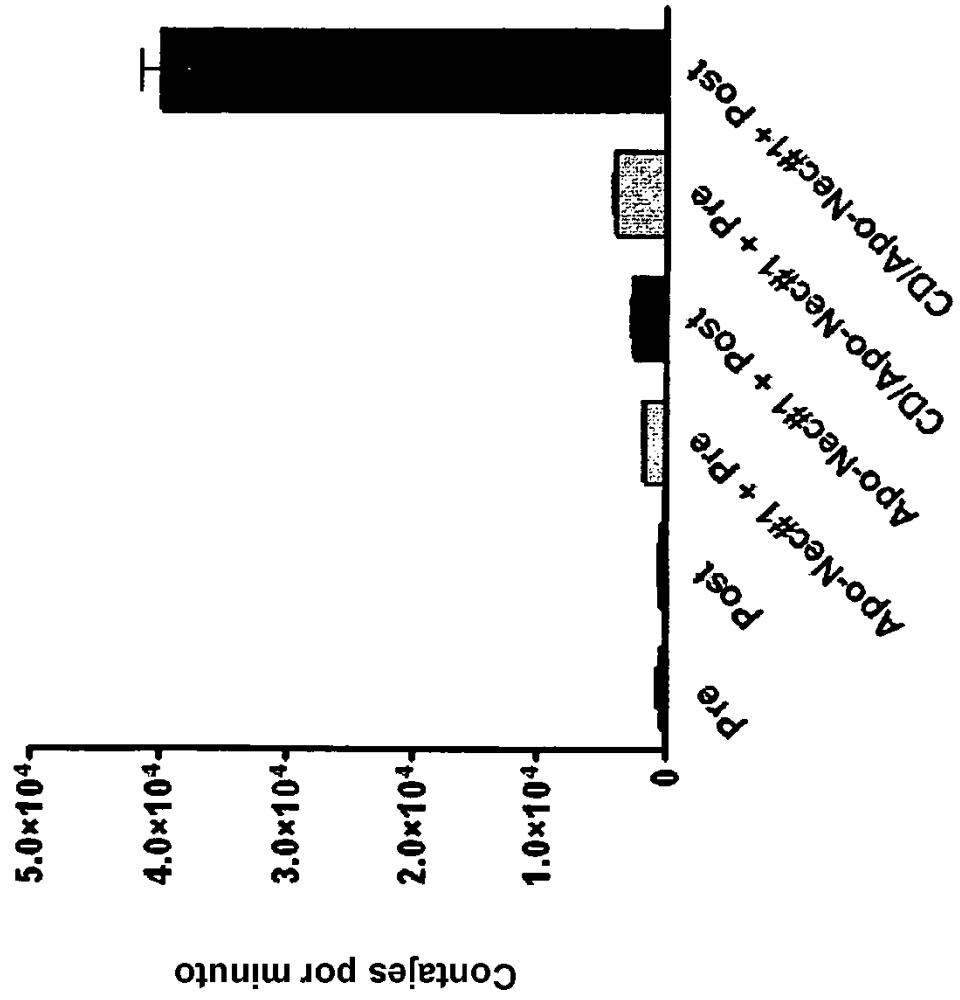
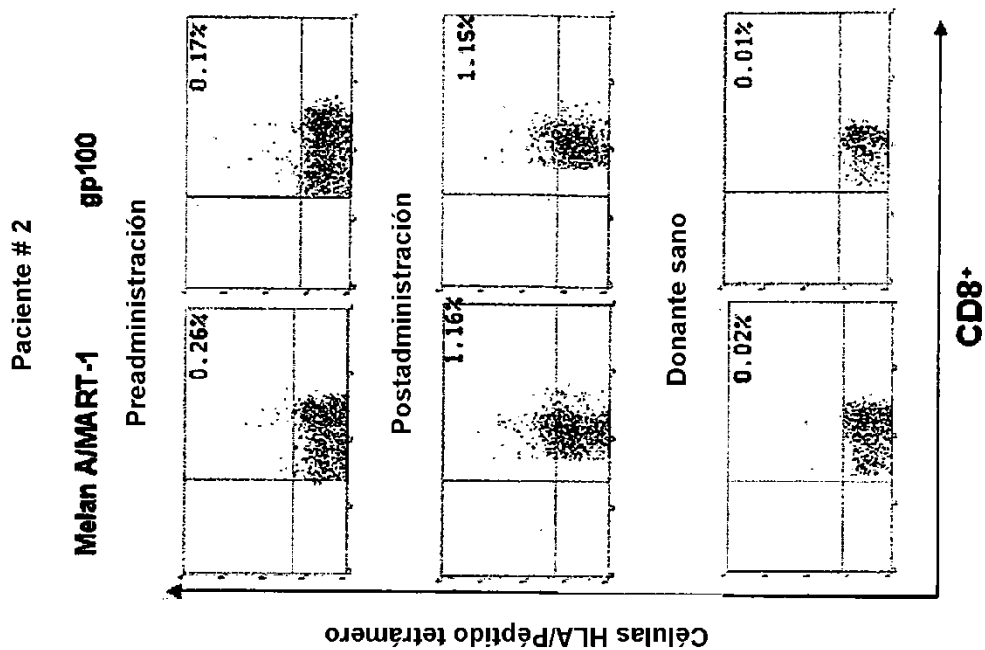


Fig. 3



B

Pacientes HLA- A*0201	% linfocitos T CD8 + Tetramero					
	gp100		MelanA/MART-1			
	PRE	POST	PRE	POST	PRE	POST
pt # 2	0.17	1.15	0.26	1.14		
pt # 5	1.12	0.64	0.58	0.1		
pt # 6	0.39	1.26	0	1.77		
pt # 8	0.98	0.93	0.93	0.25		
pt # 10	0.26	ND*	0.13	*ND		
pt # 15	0.74	ND	1.52	ND		
pt # 16	1.88	0.98	1.66	1.06		

Fig. 4

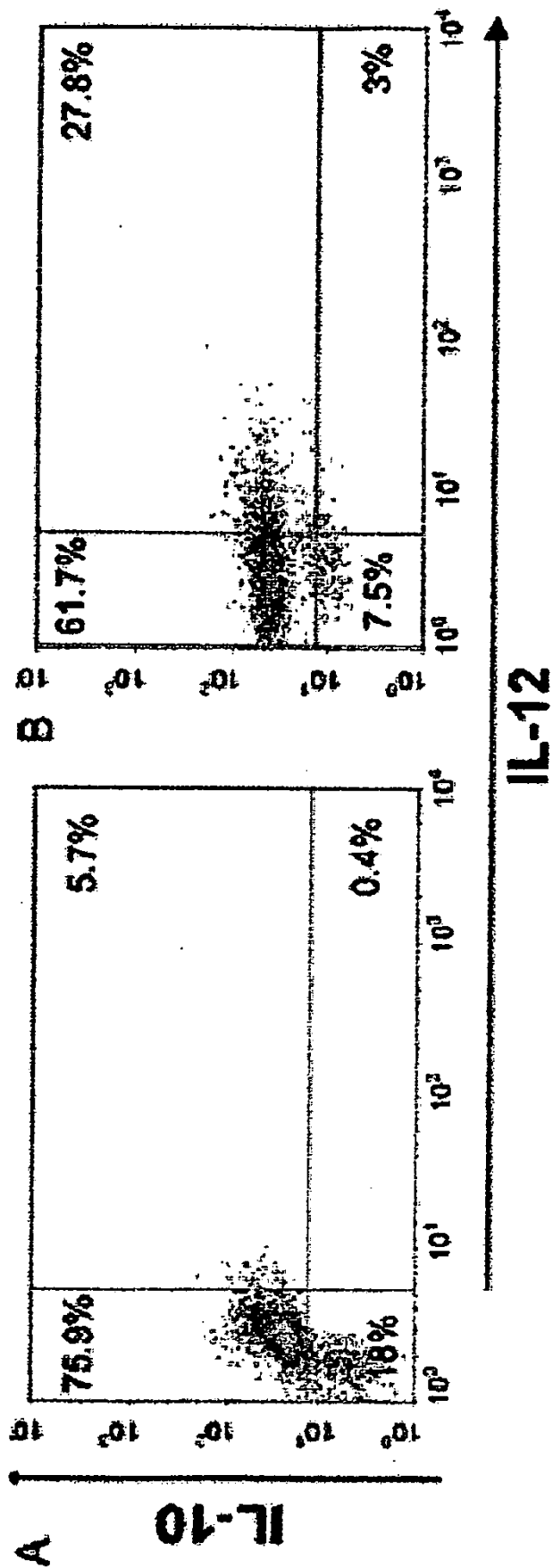


Fig. 5

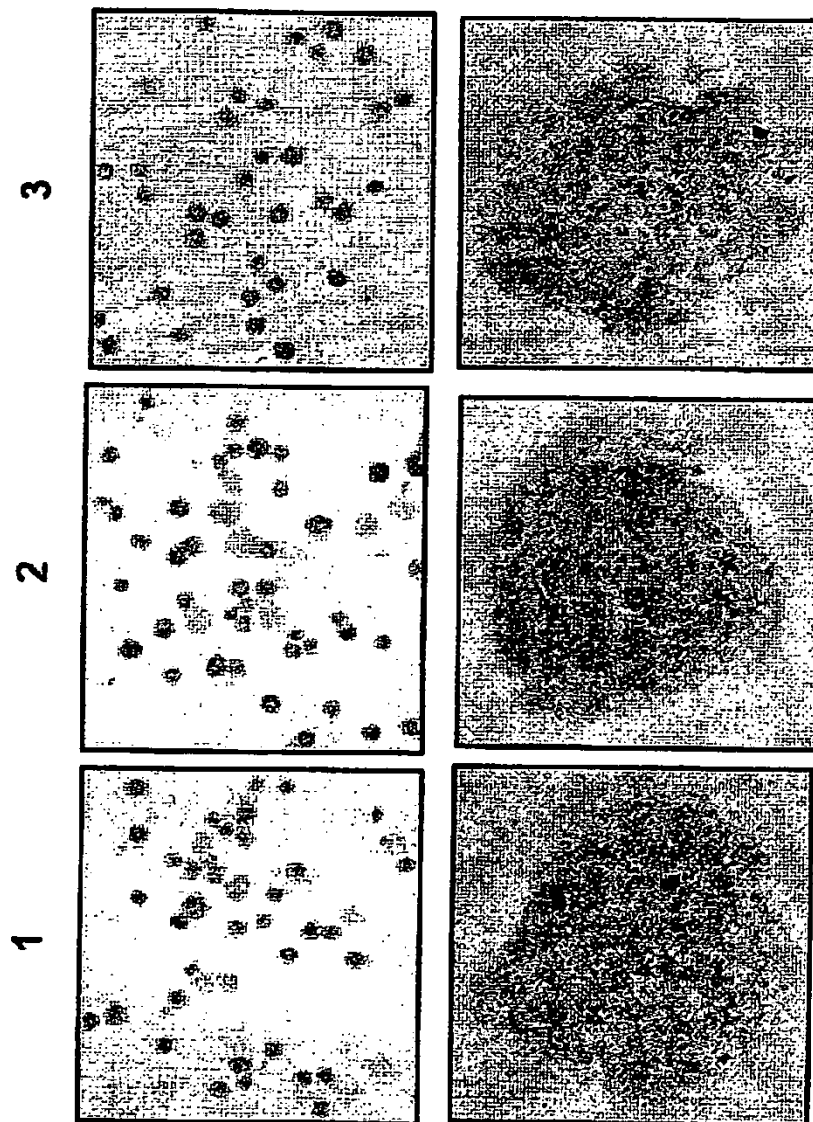


Fig. 6

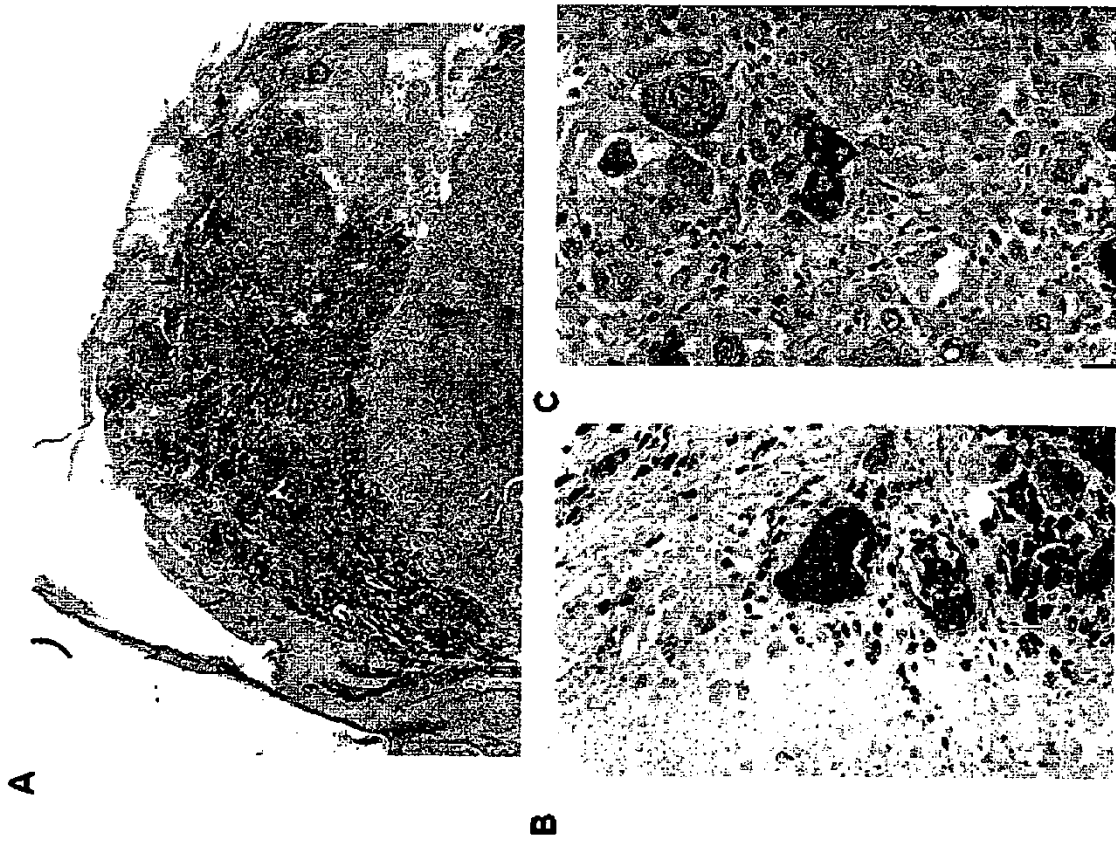


Fig. 7

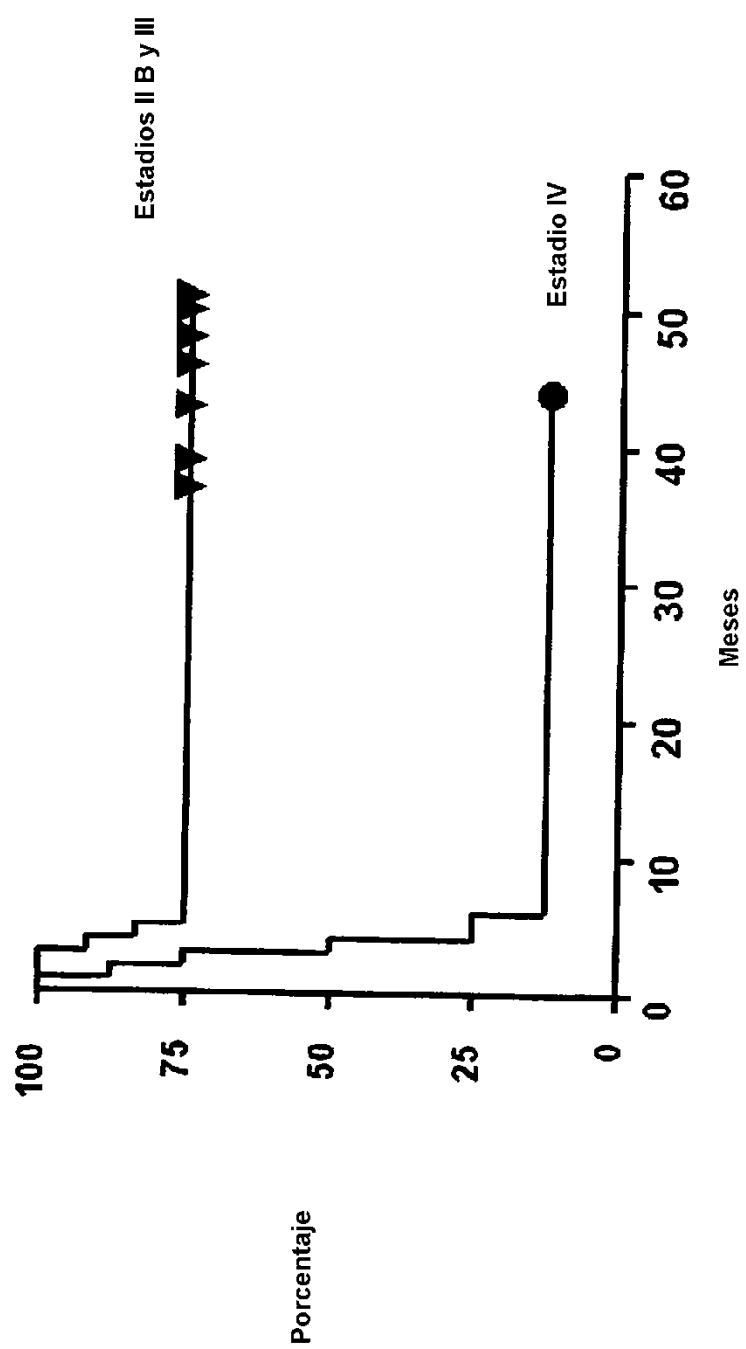


Fig. 8

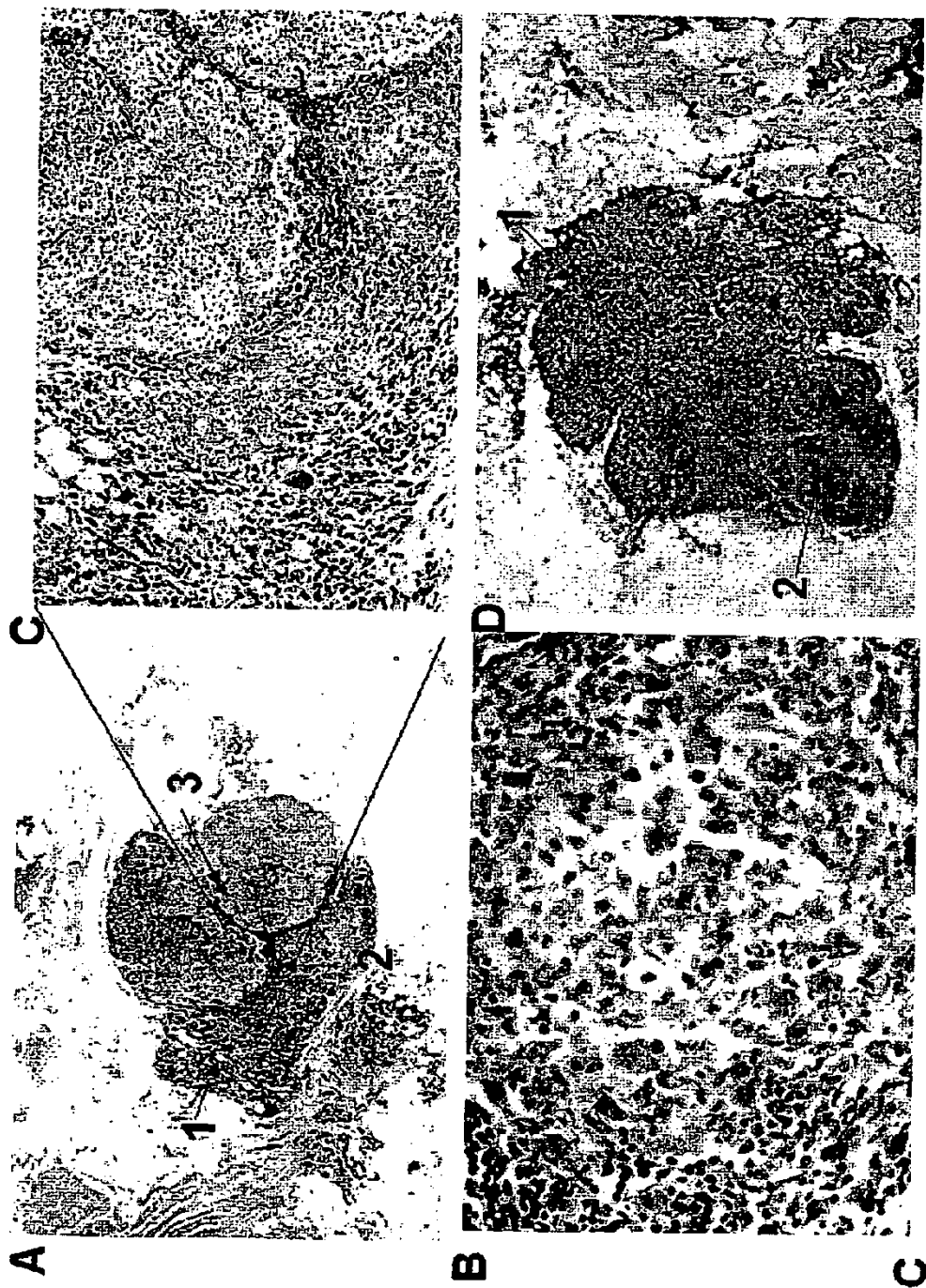


Fig. 9

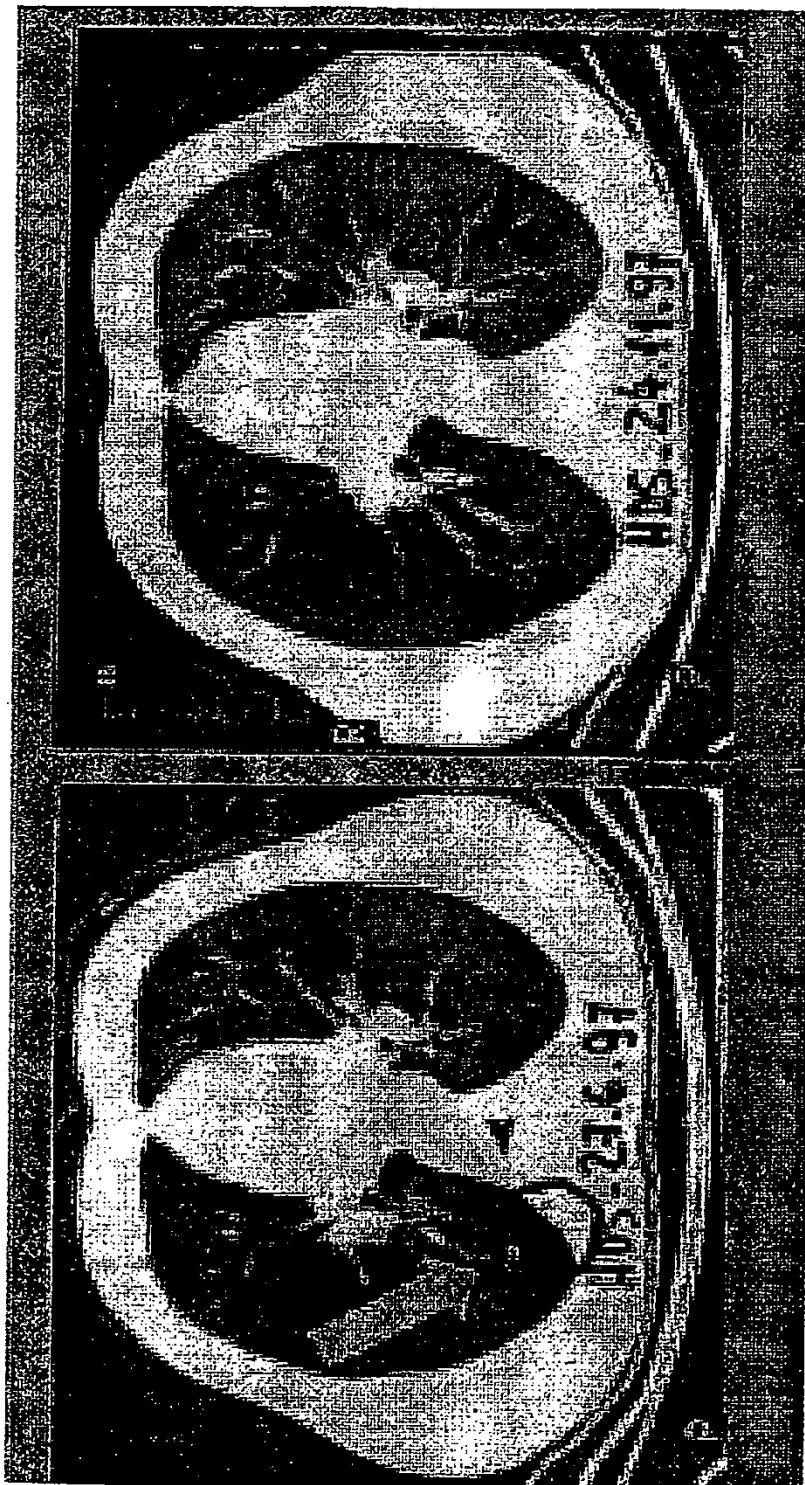


Fig. 10