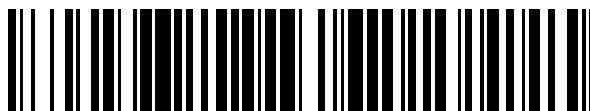


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 749**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2003 E 03749229 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 1542609**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden Interferón beta para su uso en el tratamiento de melanoma**

30 Prioridad:

29.08.2002 US 407492 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.04.2013

73 Titular/es:

**CYTOCURE LLC (100.0%)
100 Cummings Center, Suite 430C
Beverly, MA 01915, US**

72 Inventor/es:

**DURDA, PAUL, J.;
KURNICK, JAMES, T. y
DUNN, IAN, S.**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 399 749 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden Interferón beta para su uso en el tratamiento de melanoma

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

10 **Antecedentes**

15 Actualmente se conocen muchos tumores sólidos que implican la infiltración de linfocitos autólogos. Estos linfocitos autólogos, conocidos como linfocitos de infiltración tumoral (TIL), han mostrado que reconocen antígenos específicos expresados por células del tumor sólido. La expresión de tales antígenos asociados a tumor (AAT) en combinación con señales auxiliares apropiadas conduce a una reactividad citolítica (citotóxica) específica de los TIL hacia los tumores sólidos. Además, los anticuerpos que pueden reconocer antígenos similares y únicos también han mostrado que se unen selectivamente a y facilitan la destrucción de células tumorales.

20 Se han identificado varios antígenos tumorales en asociación con una variedad de tumores (Boon, *et al.* (1994). *Ann Rev Immunol*, 12:337; Kawakami, *et al.* (1994). *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:3515; y Bakker, *et al.* (1994). *J Exp Med*, 179:1005). Además de la identificación de AAT, también se han descrito epítopos inmunodominantes reconocidos por TIL para antígenos específicos de linaje expresados ampliamente, por ejemplo, el Melan-A/MART-1 restringido por HLA-A2 en melanomas (Sensi, *et al.*, (1995). *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:5674; y Kawakami, *et al.*, (1994). *J Exp Med*, 180:347).

25 Aunque cada vez hay más pruebas de que es posible inducir inmunidad mediada por células frente a melanomas autólogos, las estrategias de inmunoterapia clínica (Kradin, *et al.* *Cancer Immunol. Immunother.* (1987). 24:76); Kradin, *et al.* *Lancet*, (1989). 1:577; Rosenberg *et al.*, (1987). *N. Eng. J. Med.*, (1988). 25:1676; Dillman, *et al.* (1991). *Cancer*, 68: 1; Gattoni, *et al.*, (1966). *Semin. Oncol*, 23:754; y Kan-Mitchell, *et al.* (1993). *Cancer Immunol. Immunother.*, 37:15), no han conseguido alcanzar eficacia de manera rutinaria. Este fracaso se ha debido, al menos
30 en parte, a la capacidad de los tumores para evadir la destrucción inmunitaria (Becker, *et al.*, (1993). *Int Immunol.*, 5:1501; Jager, *et al.*, (1997). *Int. J. Cancer*, 71:142; Macurer, *et al.*, (1996). *J. Clin. Invest.*, 98:1633; y Marincola, *et al.*, (1996). *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 9:192).

35 **Sumario**

La memoria descriptiva describe métodos de aumento de una respuesta inmunitaria frente a una célula tumoral. En una realización, un método incluye administrar a un sujeto con un tumor una cantidad de agonista del receptor de IFN- β y antígeno asociado a tumor (AAT) suficiente para aumentar una respuesta inmunitaria frente a la célula tumoral. Una respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias mediadas por células o humorales.

40 También se describen métodos de inhibir el silenciamiento de un antígeno asociado a tumor (AAT), y métodos de aumento de la expresión de un antígeno asociado a tumor (AAT). Un método incluye administrar a un sujeto con un tumor una cantidad de agonista del receptor de IFN- β suficiente para inhibir el silenciamiento del antígeno asociado a tumor (AAT). En un aspecto, al sujeto se le ha administrado un antígeno asociado a tumor (AAT) antes de,
45 sustancialmente de manera contemporánea a o después de la administración del agonista del receptor de IFN- β . Un método incluye poner en contacto una célula que puede expresar un AAT con un compuesto que modula una actividad de una proteína de unión a motivos NFAT en una cantidad suficiente para aumentar la expresión de un antígeno asociado a tumor (AAT) de la célula.

50 En una realización de la invención, se usa un agonista del receptor de IFN- β tal como se define en las reivindicaciones y antígeno asociado a tumor (AAT) para tratar el tumor tal como se define en las reivindicaciones. En otra realización de la invención, se usa un agonista del receptor de IFN- β tal como se define en las reivindicaciones y un anticuerpo o una célula que produce un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor (AAT) para tratar el tumor tal como se define en las reivindicaciones. Aún en otra realización de la
55 invención, se usa un agonista del receptor de IFN- β tal como se define en las reivindicaciones y una célula inmunitaria que interacciona con una célula tumoral, para tratar el tumor tal como se define en las reivindicaciones.

Adicionalmente se describe el tratamiento de un sujeto que tiene o corre el riesgo de tener un tumor. El tratamiento incluye administrar al sujeto una cantidad de agonista del receptor de IFN- β y antígeno asociado a tumor (AAT) suficiente para tratar al sujeto. El tratamiento también incluye administrar al sujeto una cantidad de agonista del receptor de IFN- β y un anticuerpo o una célula que produce un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor (AAT) suficiente para tratar al sujeto. El tratamiento también incluye administrar al sujeto una cantidad de agonista del receptor de IFN- β y una célula inmunitaria que interacciona con una célula tumoral suficiente para tratar al sujeto.

65

Además, en el presente documento se describen métodos de aumento de la eficacia de una terapia antitumoral. Un método incluye administrar a un sujeto que está sometiéndose o que se ha sometido a terapia de tumores, una cantidad de agonista del receptor de IFN-β y antígeno asociado a tumor (AAT) suficiente para aumentar la eficacia de la terapia antitumoral. Un método incluye administrar a un sujeto que está sometiéndose o que se ha sometido a

5 terapia de tumores, una cantidad de agonista del receptor de IFN-β y un anticuerpo o una célula que produce un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor (AAT) suficiente para aumentar la eficacia de la terapia antitumoral. Un método incluye administrar a un sujeto que está sometiéndose o que se ha sometido a terapia de tumores, una cantidad de agonista del receptor de IFN-β y una célula inmunitaria que interacciona con una célula tumoral suficiente para aumentar la eficacia de la terapia antitumoral.

10 Los agonistas del receptor de IFN-β descritos en el presente documento, por ejemplo, IFN-β, un mimético de IFN-β o un anticuerpo contra el receptor de IFN-β. Los compuestos y agentes descritos en el presente documento también incluyen moléculas que tienen actividad similar a IFN-β (por ejemplo, que tienen actividad de inducción de AAT).

15 Los compuestos que modulan una actividad de una proteína de unión a motivos NFAT incluyen moduladores del flujo de calcio (por ejemplo, ionomicina y verapamilo), VIVIT, gosipol, una benzamida N-sustituida, rapamicina, una quinazolin-2,4-diona, 1-3, una pirrolo[3,4-d]pirimidin-2,4-diona, 4-8, 1-alfa,25-dihidroxitamina D3, FK506, FK520, ciclosporina, 3,5-bis(trifluorometil)pirazoles, ditiocarbamatos, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y polipéptido de activación de adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP), carboxiamidotriazol, morfina, un derivado de C32-O-ariletil éter de ascomicina, derivado de macrolactama de ascomicina SDZ ASM 981 o MCIP1. Compuestos adicionales incluyen,

20 por ejemplo, un ácido nucleico antisentido de NFAT, proteína de unión a NFAT (por ejemplo, un anticuerpo) o un polipéptido de NFAT negativo dominante.

25 Los tumores descritos en el presente documento incluyen cualquier neoplasia o cáncer metastásico o no metastásico, sólido o líquido (por ejemplo, hematopoyético), maligno o no maligno en cualquier estadio, por ejemplo, un tumor en estadio I, II, III, IV o V. Los ejemplos de los mismos incluyen un sarcoma, carcinoma, melanoma, mieloma, blastoma, linfoma o leucemia.

30 Los tratamientos proporcionados incluyen un beneficio terapéutico, por ejemplo, la reducción del volumen tumoral, la inhibición de un aumento en el volumen tumoral, la estimulación de la lisis o apoptosis de células tumorales, la reducción de la metástasis tumoral o la inhibición de la progresión tumoral. Los tratamientos proporcionados también incluyen la reducción de uno o más síntomas adversos asociados con el tumor, incluyendo la reducción de la mortalidad o la prolongación de la duración de vida.

35 Los tratamientos proporcionados incluyen además el uso de una terapia antitumoral (por ejemplo, resección quirúrgica, radioterapia o quimioterapia), terapia de potenciación inmunitaria (por ejemplo, un anticuerpo o una célula que produce un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor (AAT); o una célula inmunitaria que interacciona con una célula tumoral) y un agente de potenciación inmunitaria tal como se define en las reivindicaciones. Las células que producen un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor (AAT) incluyen una célula plasmática, célula B o célula de mamífero o que no es de mamífero transfectada con un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo. Las células inmunitarias que interaccionan con una célula tumoral incluyen célula T, célula NK, célula LAK, monocito o macrófago, incluyendo células preseleccionadas para unirse a un antígeno expresado por el tumor.

40

45 Adicionalmente se dan a conocer métodos de identificación de un agente que aumenta la expresión de un antígeno asociado a tumor (AAT) de melanoma. Un método incluye poner en contacto una célula que puede expresar un AAT de melanoma (por ejemplo, una célula de melanoma) con un agente de prueba; medir la cantidad de AAT (por ejemplo, Melan-A/MART-1, tirosinasa, gp100/pmel 17, TRP-1, TRP-2 o MITF-M) expresado en presencia del agente de prueba; y determinar si la cantidad de AAT expresado es mayor en presencia que en ausencia del agente de prueba. El aumento de la expresión de AAT identifica el agente de prueba como un agente que aumenta la expresión de un AAT de melanoma.

50

55 Los AAT modulados incluyen, por ejemplo, antígenos cuya expresión se aumenta en una célula tumoral en comparación con un homólogo de célula no tumoral (por ejemplo, normal); antígenos cuya expresión es aproximadamente igual o menor en una célula tumoral en comparación con un homólogo de célula no tumoral; y antígenos cuya expresión cambia durante el desarrollo, la diferenciación o en respuesta a un estímulo. Los AAT pueden estar presentes sobre o en una célula (por ejemplo, en el citoplasma o el núcleo o unidos a la superficie celular). Los AAT pueden estar presentes en cualquier tumor, por ejemplo, un sarcoma, carcinoma, melanoma, mieloma, blastoma, linfoma o una leucemia.

60

Los AAT a modo de ejemplo incluyen: Melan-A/MART-1, tirosinasa, gp100/pmel 17, TRP-1, TRP-2, un MITF, MITF-A, MITF-M, GP75 de melanoma, anexina I, anexina II, proteína de unión a adenosina desaminasa (ADA bp), PGP 9.5, antígeno asociado a cáncer colorrectal (CRC)--C017-1A/GA733, Ab2 BR3E4, C117-1A/GA733, Hsp70, Hsp90, Hsp96, Hsp105, Hsp110, HSPPC-96, proteína de estrés gp96 (un antígeno de rechazo de tumor de cáncer colorrectal humano, Heike 2000), péptido celular asociado a gp96, G250, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV),

65

mamoglobina, tiroglobulina, STn, antígeno carcinoembrionario (CEA), epítipo CAP-1 del antígeno carcinoembrionario, epítipo CAP-2 del antígeno carcinoembrionario (CEA), etv6, am11, antígeno específico de próstata (PSA), epítipo de PSA PSA-1, epítipo de PSA PSA-2, epítipo de PSA PSA-3, Ad5-PSA, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), fosfatasa ácida prostática (PAP), factor de transcripción Ets derivado de epitelio de próstata (PDEF), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTH-rP), EGFR, PLU1, receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal (OFA-iLR), MN/CA IX (CA9), HP59, citocromo oxidasa 1, sp100, msa, proteína de activación de Ran GTPasa, una proteína Rab-GAP (de activación de Rab GTPasa), PARIS-1, receptor de células T/cadena zeta de CD3, cTAGE-1, SCP-1, antígeno de glicolípido-GM2, GD2 o GD3, GM3, fucosil-GM1, antígenos de glicoproteína (mucina)-Tn, sialil-Tn, TF y mucina-1, CA125 (MUC-16), un antígeno de la familia MAGE, GAGE-1,2, BAGE, RAGE, LAGE-1, GnT-V, EP-CAM/KSA, CDK4, un antígeno de la familia MUC, HER2/neu, ErbB-2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, β -catenina y γ -catenina, NeuGcGM3, antígeno relacionado con Fos, ciclofilina B, RCAS1, S2, L10a, L10a, péptido rt de telomerasa, cdc27, fodrina, p120ctn, PRAME, GA733/EoCam, NY-BR-1, NY-BR-2, NY-BR-3, NY-BR-4, NY-BR-5, NY-BR-6, NY-BR-7, NY-ESO-1, L19H1, MAZ, PINCH, Prp1p/Zer1p, WT1, proteína de poliposis adenomatosa coli (APC), PHF3, LAGE-1, SART3, SCP-1, SSX-1, SSX-2, SSX-4, TAG-72, TRAG-3, MBAAT, un antígeno tumoral de Smad, Imp-1, HPV-16 E7, c-erbB-2, antígeno nuclear codificado por VEB (EBNA)-1, timidina cinasa del herpes simple (HSVtk), isoforma de corte y empalme alternativo de XAGE-1 (L552S), mutación del marco de lectura de TGF-beta-RII, mutación del marco de lectura de BAX, SOX-10, o un fragmento antigénico de los mismos.

20 Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1D ilustran datos que indican la regulación por disminución de la expresión de antígenos en melanoma. Células tumorales MU en A) medio de control o D) medio de control complementado con oncostatina M humana (OSM), o en B) sobrenadantes de células tumorales EW (que contiene OSM producida por EW) o C) A375 (sin OSM). Se tiñeron las células para determinar la expresión citoplásmica de proteína Melan-A/MART-1 (A-C) o gp100 (D) y se sometieron a ensayo mediante citometría de flujo. Se muestra el canal medio de fluorescencia dentro de cada uno.

Las figuras 2A-2I ilustran datos que indican que el interferón-beta (IFN- β) aumenta la expresión de antígenos del linaje de melanocitos (Melan-A/MART-1 y GP100) en las líneas celulares de melanoma 453A, A375, MU-X, MU-89, MM96L(-) y MM96L(+). Los números entre paréntesis indican el número de canal medio. En cada conjunto, la curva a la derecha (fluorescencia más fuerte) indica un aumento de la expresión después del tratamiento con IFN- β .

La figura 3 ilustra datos que indican que el interferón-beta supera la regulación por disminución del antígeno gp100 por OSM. MU-89 de control (41,6) frente a MU-89 más OSM (29,5) frente a MU-89 más IFN-beta + OSM (63,3).

La figura 4 ilustra datos que indican que el interferón-beta con 5-azacitidina (AZA) o tricostatina induce altos niveles de expresión de antígenos en células de baja expresión constitutiva de antígenos, MU-X. Control de MU-X (12,8) frente a MU-X + interferón-beta 5.000 U.I./ml (23,2) frente a MU-X + 5-AZA 40 μ M (39,0) frente a AZA 40 μ M + interferón-beta 5.000 U.I./ml (57,3)

Las figuras 5A y 5B ilustran el efecto de A) OSM sobre la expresión génica del melanoma en células MU-89. Todos se muestran a 0,39 ng de ARN/muestra excepto GADPH y β -actina a 24,4 pg y TRP-1 a 15,6 ng; y B) OSM sobre el reconocimiento por células T citotóxicas de dianas que expresan Melan-A/MART-1, MU.

La figura 6 ilustra el efecto de la transfección de MITF-M sobre la expresión endógena de Melan-A/MART-1. Datos mostrados para células tumorales A375 y MU-X transfectadas con MITF-M durante 24 horas en presencia (10 μ M) o ausencia de U0126 antes de amplificación por PCR de Melan-A/MART-1. Carril 1, plásmido de expresión de MITF-M; 2, control de vector vacío; 3, sólo reactivos de transfección; 4, control no transfectado.

La figura 7 ilustra el aumento de la destrucción por linfocitos T después de tratamiento con IFN- β de células de melanoma.

La figura 8 ilustra un constructo indicador a modo de ejemplo para identificar compuestos que tienen una actividad de IFN- β . El gen indicador GFP dirigido por el promotor de Melan-A/MART-1 de 1176 pb.

La figura 9 ilustra un aumento de la fluorescencia de GFP después de la exposición de células transfectadas a IFN- β .

60 Descripción

La invención se basa al menos en parte en el hallazgo de que el interferón-beta (IFN- β) 1a o 1b aumenta la expresión de uno o más antígenos asociados a tumor (AAT). El aumento de la expresión de un antígeno asociado a tumor de una célula, tal como una célula tumoral, aumenta el reconocimiento por el sistema inmunitario. Por tanto, el tratamiento de una célula tumoral o población de células tumorales con IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o

un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β , puede aumentar la antigenicidad de células tumorales, aumentando de ese modo el reconocimiento de células tumorales por linfocitos T y anticuerpos. Por consiguiente, es más probable que el sistema inmunitario seleccione como diana la(s) célula(s) tumoral(es) para su destrucción.

5 La expresión de AAT en una célula puede aumentarse con IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad similar a IFN- β (tiene actividad de inducción de AAT). Puede combinarse IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene una actividad de inducción de AAT como IFN- β con uno o más de otros compuestos, agentes, tratamientos o terapias que tienen un efecto antitumoral. Por tanto,
10 puede usarse IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene una actividad de inducción de AAT como IFN- β 1a o 1b en combinación con cualquier otro protocolo terapéutico o tratamiento antitumoral. Por ejemplo, puede combinarse IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene una actividad de inducción de AAT como IFN- β 1a o 1b con cualquier tratamiento que aumente una respuesta inmunitaria frente a un tumor, inhibiendo de ese modo el crecimiento de células tumorales.

15 Por tanto, en el presente documento se describen métodos de aumento de una respuesta inmunitaria frente a una célula tumoral. Un método incluye administrar a un sujeto que tiene un tumor una cantidad de agonista del receptor de IFN- β y un antígeno asociado a tumor (AAT) suficiente para aumentar una respuesta inmunitaria frente a la célula tumoral. En diversos aspectos, un agonista del receptor de IFN- β comprende IFN- β , un mimético de IFN- β (por ejemplo, variante o forma modificada), o un anticuerpo contra el receptor de IFN- β . En aspectos adicionales, la respuesta inmunitaria está mediada por células o es humoral. En aspectos adicionales, se administra AAT como fragmentos de longitud completa o antigénicos, o con células (por ejemplo, células que expresan AAT, tales como células tumorales).

25 Tal como se usa en el presente documento, "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta mediada por células o humoral (mediada por anticuerpos) que se sabe en la técnica que es una función del sistema inmunitario. La estimulación, inducción o regulación por incremento de una respuesta inmunitaria significa que se aumenta o se desencadena una respuesta inmunitaria o bien mediada por células o bien humoral. Por ejemplo, puede administrarse un AAT de melanoma (por ejemplo, un epítipo de Melan-A/MART-1) y se provoca una respuesta de CTL (linfocitos T citotóxicos) a este antígeno en un sujeto con melanoma metastásico.
30

Tal como se usa en el presente documento, un "agonista del receptor de IFN- β " significa una molécula que se une al receptor de IFN-alfa/beta (IFNAR), las subunidades IFNAR-1 o IFNAR-2, y que provoca una respuesta típica de IFN- β . Una respuesta a modo de ejemplo incluye el aumento de la expresión de AAT, es decir, una actividad de inducción de AAT.
35

La memoria descriptiva también describe métodos de aumento de la expresión de antígenos asociados a tumor en una célula (por ejemplo, una célula tumoral). En una realización, un método incluye administrar a un sujeto que tiene un tumor una cantidad de agonista del receptor de IFN- β y un antígeno asociado a tumor (AAT) suficiente para
40 aumentar la expresión de antígenos asociados a tumor en una célula tumoral. En un aspecto, se administra un agente de potenciación inmunitaria (por ejemplo, linfocitos o anticuerpo o células que expresan anticuerpos específicas para AAT expresado por el tumor) antes de, sustancialmente de manera contemporánea a o después de la administración del agonista del receptor de IFN- β o un antígeno asociado a tumor (AAT).

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno asociado a tumor" o "AAT" se refiere a un antígeno que puede expresarse por una célula tumoral, o sobre células del mismo linaje que el tumor. El AAT en tumor puede expresarse en cantidades mayores que las normales con respecto a un homólogo de célula no tumoral (normal), o puede expresarse a niveles similares, o a niveles menores que en los homólogos de células normales, particularmente si el gen que codifica para el AAT está modulado por disminución en la célula tumoral.
50

Los antígenos asociados a tumor son moléculas antigénicas cuya expresión facilita la interacción de células inmunitarias o moléculas inmunitarias (por ejemplo, anticuerpos) con células tumorales. Los AAT son moléculas o partes de las moléculas que se unen a moléculas de selección como diana inmunitarias (es decir, receptores sobre células inmunitarias y anticuerpos). Tal como se comentó, los AAT pueden estar presentes en o sobre células normales; puede no ser necesario que la expresión de AAT tumoral se desvíe de las células homólogas normales (no tumorales) (por ejemplo, una célula normal que no expresa AAT, expresa menos del AAT que una célula tumoral, o expresa lo mismo o más AAT que el tumor.)
55

Un antígeno asociado a tumor puede expresarse durante una fase más temprana de desarrollo o de diferenciación diferente de la célula; tras progresar a través de la fase de desarrollo, la expresión del AAT normalmente está alterada. Por ejemplo, un gen asociado a la diferenciación de melanoma (*mda*) que presenta una expresión potenciada o suprimida durante la diferenciación e inhibición del crecimiento, tal como *MAGE* y *Melan-A/MART-1*. Tal como se da a conocer en el presente documento, la expresión de AAT también puede inducirse o aumentarse en respuesta a un estímulo (por ejemplo, IFN- β). Además, los inhibidores de cinasa pueden regular por incremento la expresión de AAT (Englaro *et al.* (1998). *J Biol Chem* 273:9966) de *Melan-A/MART-1*, gp100, tirosinasa, TRP-1 y
65

TRP-2 en melanomas y se ha notificado que la expresión de AAT está regulada por incremento por interferón-gamma (Gudagni *et al.* (1996). *In Vivo* 7:591). La expresión de células tumorales de uno o más AAT que son atípicos para la célula se debe presumiblemente a la regulación génica aberrante del AAT.

- 5 Aunque sin desear limitarse por ninguna teoría, se cree que la regulación por disminución de AAT contribuye al escape de células de la detección inmunitaria. La oncostatina M (OSM) (Durda *et al.* (2003). *Mol Cancer Res* 1:411) e IFN- γ (Le Poole *et al.* (2002) *Am J Pathol* 160:521) pueden modular por disminución la expresión de Melan-A/MART-1 en células de melanoma.
- 10 Los ejemplos no limitativos específicos de AAT cuya expresión puede aumentarse o inducirse según la invención incluyen, para melanoma, antígeno específico de testículos asociado a tumor (por ejemplo, MAGE, BAGE, y GAGE), antígeno de diferenciación de melanocitos (por ejemplo, tirosinasa, Melan-A/MART-1), una molécula mutada o expresada de manera aberrante (por ejemplo, CDK4, MUM-1, beta-catenina), gp100/pmel 17, TRP-1, TRP-2, un MITF, MITF-A y MITF-M (King, *et al.* (1999). *Am J Pathol* 155:731). Ejemplos específicos adicionales de AAT
- 15 expresados por tumores incluyen GP75 de melanoma, anexina I, anexina II, proteína de unión a adenosina desaminasa (ADAAbp), PGP 9.5 (Rode, *et al.* (1985). *Histopathology* 9:147), antígeno asociado a cáncer colorrectal (CRC)-C017-1A/GA733, Ab2 BR3E4, C117-1A/GA733, Hsp70 (Chen, *et al.* (2002). *Immunol Lett* 84:81), Hsp90, Hsp96, Hsp105, Hsp110, HSPPC-96 (Caudill, M. M. y Z. Li (2001). *Expert Opin Biol Ther* 1:539), proteína de estrés gp96 (un antígeno de rechazo de tumor de cáncer colorrectal humano, Heike *et al.* (2000). *Int J Can* 86:489), péptidos celulares asociados a gp96, G250, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), mamoglobina (Tanaka, *et al.* (2003). *Surgery* 133:74), tiroglobulina, STn (Morse, M. A. (2000). *Curr Opin Mol Ther* 2:453), antígeno carcinoembrionario (CEA), epítipo CAP-1 del antígeno carcinoembrionario (CEA), epítipo CAP-2 del antígeno carcinoembrionario (CEA), *etv6*, *aml1*, antígeno específico de próstata (PSA), epítipo de PSA PSA-1, epítipo de PSA PSA-2, epítipo de PSA PSA-3 (Correale, *et al.* (1998). *J Immunol* 161:3186) (Roehrbom, *et al.* (1996). *Urology* 47:59), Ad5-PSA,
- 20 antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), fosfatasa ácida prostática (PAP), factor de transcripción Ets derivado de epitelio de próstata (PDEF), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTH-rP), EGFR (Plunkett, *et al.* (2001). *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:467), PLU1 (Plunkett, *et al.* (2001). *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:467), receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal (OFA-iLR), MN/CA IX (CA9) (Shimizu *et al.*, (2003). *Oncol. Rep.* sep-oct; 10:1307), HP59, citocromo oxidasa 1, sp100, msa (Devine, *et al.* (1991). *Cancer Res* 51:5826), proteína de activación de Ran GTPasa, una proteína Rab-GAP (de activación de Rab GTPasa), PARIS-1 (Zhou, *et al.* (2002). *Biochem Biophys Res Commun* 290:830), receptor de células T/cadena zeta de CD3, cTAGE-1, SCP-1, antígeno de glicolípido-GM2, GD2 o GD3, GM3 (Bada, *et al.* (2002). *Hum Exp Toxicol* 21:263), fucosil-GM1, antígenos de glicoproteína (mucina)-Tn, sialil-Tn (Lundin, *et al.* (1999). *Oncology* 57:70), TF y mucina-1 (Mukherjee, *et al.* (2003). *J Immunother* 26:47), CA125 (MUC-16) (Reinartz, *et al.* (2003). *Cancer Res* 63:3234), un antígeno de la familia MAGE, GAGE-1,2, BAGE, RAGE, LAGE-1 (Eichmuller, *et al.* (2003). *Int J Cancer* 104:482) (Chen, *et al.* (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6919), GnT-V (Murata, *et al.* (2001). *Dis Colon Rectum* 44:A2-A4), MUM-1 (Kawakami, *et al.* (1996). *Keio J Med* 45:100), EP-CAM/KSA (Ullenhag, *et al.* (2003). *Clin Cancer Res* 9:2447), CDK4, un antígeno de la familia MUC, HER2/neu, ErbB-2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, β -catenina y γ -catenina, NeuGcGM3 (Carr, *et al.* (2003). *J Clin Oncol* 21:1015), antígeno relacionado con Fos (Luo, *et al.* (2003). *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8850), ciclofilina B (Tamura, *et al.* (2001). *Jpn J Cancer Res* 92:762), RCAS1, S2 (Koga, *et al.* (2003). *Tissue Antigens* 61:136), L10a (Koga, *et al.* (2003). citado anteriormente), L10a, péptido rt de telomerasa (Wang, *et al.* (2001). *Oncogene* 20:7699), cdc27, fodrina, p120ctn, PRAME, GA733/EoCam (Ross, *et al.* (1986). *Biochem Biophys Res Commun* 135:297), NY-BR-1, NY-BR-2 NY-BR-3, NY-BR-4 NY-BR-5, NY-BR-6 NY-BR-7 (Jager, *et al.* (2001). *Cancer Res* 61:2055), NY-ESO-1, L19H1, MAZ (Daheron, *et al.* (1998). *Leukemia* 12:326), PINCH (Greiner, *et al.* (2000). *Exp Hematol* 28:1413), PRAME (Ikeda, *et al.* (1997). *Immunity* 6:199), Prp1p/Zer1p, WT1 (Oka, *et al.* (2002). *Curr Cancer Drug Targets* 2:45), proteína de poliposis adenomatosa coli (APC), PHF3, LAGE-1, SART3 (Miyagi, *et al.* (2001). *Clin Cancer Res* 7:3950), SCP-1 (Jager, *et al.* (2002). *Cancer Immun* 2:5), SSX-1, SSX-2, SSX-4, TAG-72 (Buchsbaum, *et al.* (1999). *Clin Cancer Res* 5(10 Supl.): 3048s-3055s), TRAG-3 (Chen, *et al.* (2002). *Lung Cancer* 38:101), MBAAT (Basu, *et al.* (2003). *Int J Cancer* 105:377), un antígeno tumoral de Smad, Imp-1, HPV-16 E7, c-erbB-2, antígeno nuclear codificado por VEB (EBNA)-1, timidina cinasa del herpes simple (HSVtk), isoforma de corte y empalme alternativo de XAGE-1 (L552S; Wang, (2001). *Oncogene* 20:7699), mutación del marco de lectura de TGF-beta-RII (Saeterdal, *et al.* (2001). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13255), mutación del marco de lectura de BAX (Saeterdal, *et al.* (2001). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13255).
- 55 También se incluyen fragmentos inmunogénicos (subsecuencias, incluyendo péptidos antigénicos que pueden seleccionarse como diana) de AAT. Además, también se incluyen variantes y formas modificadas de AAT que pueden provocar, aumentar o estimular una respuesta inmunitaria.
- 60 Los AAT pueden suministrarse mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, cuando se administran uno o más AAT con IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene una actividad de inducción de AAT como IFN- β , puede formularse el AAT para presentarse al sistema inmunitario para estimular una respuesta inmunitaria hacia el AAT. Por tanto, puede administrarse *in vivo* un AAT o un fragmento antigénico, o tumor u otra célula que tiene AAT. Pueden tratarse células tumorales que expresan AAT opcionalmente *ex vivo* (por ejemplo, con
- 65 IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad similar a IFN- β) y

administrarse por transfusión a un paciente durante la terapia. Puede usarse cualquier agente que potencie la expresión de antígenos o la antigenicidad del tumor, para tratar el tumor *in vivo* o *ex vivo*. También pueden administrarse lisados o extractos de células tumorales, o células irradiadas o destruidas por calor que hace que no puedan crecer, pero que todavía pueden inducir una respuesta inmunitaria.

5 Los AAT pueden suministrarse como péptidos (Jäeger *et al.* (1996) *Int J Cancer* 66:162; Jäger *et al.* (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12198; Marchand *et al.* (1999) *Int J Cancer*. 80:219), o como péptidos en combinación con adyuvantes (Jäger *et al.* (1996). *Int J Cancer* 67:54; Rosenbere *et al.* (1998). *Nat Med* 4:321; Cormier *et al.* (1997). *Cancer J Sci Am*. 3:37; Wang *et al.* (1999). *Clin Cancer Res*. 5:2756).

10 Los AAT pueden suministrarse con otras células. Por ejemplo, pueden cargarse péptidos de AAT en células dendríticas (Chen *et al.* (2001) *Gene Ther* 8:316; Fong *et al.* (2001). *J Immunol* 167:7150; Theme *et al.* (1999). *J Exp Med* 190:1669; Tso *et al.* (2001). *Cancer Res* 61:7925), o cargarse en otras células presentadoras de antígenos (Pardoll (2002). *Nature Rev Immunol* 2:227).

15 Se han usado tres tipos de vacunas contra el cáncer recombinantes basadas en ADN para suministrar los AAT: puede usarse ADN que codifica para AAT 1) para modificar células dendríticas, 2) como vacuna de ADN “desnudo” o 3) para construir vacunas virales recombinantes. Se han desarrollado vacunas recombinantes y estrategias de vacunación para inducir y potenciar respuestas de células T de un huésped a AAT. Un ejemplo particular de una estrategia de este tipo son vectores de poxvirus recombinantes en los que el antígeno asociado a tumor (AAT) se inserta como un transgén. Se han empleado vacunas de Vaccinia recombinante y vacunas de avipox recombinantes (defectuosos para la replicación) para estimular la respuesta inmunitaria hacia el AAT; el uso de estrategias de sensibilización y refuerzo diversificadas usando diferentes vacunas; y la inserción de moléculas coestimuladoras de células T múltiples en vectores de poxvirus recombinantes, junto con el gen de AAT, para potenciar la respuesta inmunitaria de células T al AAT y potenciar o inducir inmunidad antitumoral.

20 La memoria descriptiva describe además métodos de inhibición del silenciamiento de un antígeno asociado a tumor (AAT). Un método incluye administrar a un sujeto con un tumor una cantidad de agonista del receptor de IFN- β suficiente para inhibir el silenciamiento del antígeno asociado a tumor (AAT). En un aspecto, al sujeto se le ha administrado un antígeno asociado a tumor (AAT) antes de, sustancialmente de manera contemporánea a o después de la administración del agonista del receptor de IFN- β .

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “silenciamiento” se refiere a una regulación por disminución de la expresión de AAT en células tumorales, un mecanismo mediante el cual las células tumorales reducen la expresión de antígenos para evitar la detección inmunitaria y la destrucción. Por tanto, los términos “inhibición del silenciamiento,” “reversión del silenciamiento,” “reducción del silenciamiento” y variaciones gramaticales de los mismos, significan que la regulación por disminución de los AAT observada en células tumorales disminuye o se supera. Es decir, “inhibición del el silenciamiento,” significa que la expresión de AAT aumenta o que la expresión de AAT se estabiliza al menos en la medida en que se produce poca, si acaso alguna reducción adicional en la expresión de AAT en una célula tumoral.

35 Un mecanismo mediante el cual se produce el silenciamiento de AAT es a través de la supresión o la inhibición de la expresión génica de AAT a nivel transcripcional, lo que puede producirse mediante lo que se denomina en la técnica “silenciamiento génico” o mediante un mecanismo en el que se inhibe el promotor del gen (Kurnick *et al.* (2001) *J Immunol* 167:1204; Durda *et al.* (2003) *Mol Cancer Res* 1: 411). Se cree que el “silenciamiento génico” se produce a través de remodelación de cromatina o proteínas que se unen a ADN y esto inhibe directa o indirectamente la transcripción del gen. También puede producirse la inhibición basada en promotores mediante influencias positivas o negativas sobre factores de transcripción requeridos para la transcripción génica. Un mecanismo adicional mediante el cual se produce silenciamiento de AAT es a través de un aumento de la degradación proteica de AAT o una reducción de la estabilidad proteica de AAT. La memoria descriptiva incluye “inhibición,” “reversión” y “reducción” del silenciamiento de AAT, independientemente del mecanismo biológico.

45 La invención proporciona medios de tratamiento de un tumor de melanoma. En una realización, se usa un agonista del receptor de IFN- β tal como se define en las reivindicaciones y antígeno asociado a tumor (AAT) para tratar el tumor tal como se define en las reivindicaciones. En aspectos particulares, el tratamiento reduce el volumen tumoral, inhibe un aumento en el volumen tumoral, estimula la lisis o apoptosis de células tumorales, o reduce la metástasis tumoral. En otro aspecto, se usa una terapia antitumoral adicional (por ejemplo, resección quirúrgica, radioterapia, inmunoterapia o quimioterapia). En aspectos adicionales, se usa un anticuerpo o una célula que produce un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor (AAT), una célula inmunitaria que interacciona con una célula tumoral, o un agente de potenciación inmunitaria tal como se define en las reivindicaciones.

50 La memoria descriptiva describe además el tratamiento a un sujeto que tiene o que corre el riesgo de tener un tumor. Un método incluye administrar a un sujeto una cantidad de agonista del receptor de IFN- β y antígeno asociado a tumor (AAT) suficiente para tratar al sujeto. En un aspecto, el sujeto es un candidato para, está

sometiéndose o se ha sometido a terapia antitumoral. En un aspecto adicional, al sujeto se le administra una célula inmunitaria que interacciona con una célula tumoral.

En el presente documento también se describen métodos de aumento de la efectividad de una terapia antitumoral. Un método incluye administrar a un sujeto que está sometido o que se ha sometido a terapia de tumores, una cantidad de agonista del receptor de IFN- β y antígeno asociado a tumor (AAT) suficiente para aumentar efectividad de la terapia antitumoral.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aumentar la efectividad”, “promover la efectividad” o “mejorar la efectividad,” cuando se usan en referencia a una terapia, tal como un protocolo de tratamiento o terapia antitumoral en combinación con agonista del receptor de IFN- β sólo o en combinación con antígeno asociado a tumor (AAT), significa que se ha mejorado la terapia global con respecto a la terapia sin tratamiento con agonista del receptor de IFN- β o antígeno asociado a tumor (AAT). Por tanto, el beneficio terapéutico detectable o medible para un sujeto, tal como se expone en el presente documento, es mayor con tratamiento con agonista del receptor de IFN- β o antígeno asociado a tumor (AAT), que en ausencia de tratamiento con agonista del receptor de IFN- β o antígeno asociado a tumor (AAT).

Los ejemplos no limitativos de agonistas del receptor de IFN- β incluyen, por ejemplo, IFN- β . Se conocen en la técnica secuencias de IFN- β de mamífero tales como humanas (Gray y Goeddel (1982). *Nature*, 298:859); de rata (Yokoyama, *et al.*, (1997). *Biochem Biophys Res Commun.*, 232:698); caninas (Iwata, *et al.*, (1996). *J Interferon Cytokine Res.*, 10:765); porcinas (*J Interferon Res.*, (1992). 12:153). Otro ejemplo de agonista de IFN es anticuerpo anti-idiotípico anti-IFN (Osheroff *et al.* (1985). *J Immunol*, 135:306).

Los ejemplos no limitativos de anticuerpos contra el receptor de IFN- β incluyen formas de mamífero, humanas, humanizadas o primatizadas de moléculas de inmunoglobulina (Ig) de cadena pesada o ligera, V_H y V_L, respectivamente. “Anticuerpo” se refiere a cualquier molécula de inmunoglobulina monoclonal o policlonal, tal como IgM, IgG, IgA, IgE, IgD, y cualquier subclase de las mismas. El término “anticuerpo” también incluye fragmentos funcionales de inmunoglobulinas, tales como Fab, Fab', (Fab')₂, Fv, Fd, scFv y sdFv, a menos que se indique expresamente de otro modo.

El término “anticuerpo contra el receptor de IFN- β ” o “anticuerpo contra AAT” significa un anticuerpo que se une específicamente al receptor de IFN- β y un anticuerpo contra AAT, respectivamente. La unión específica es la que es selectiva para un epítipo presente en el receptor de IFN- β o un AAT. Se puede distinguir la unión selectiva de la unión no selectiva usando ensayos conocidos en la técnica (por ejemplo, inmunoprecipitación, ELISA, inmunotransferencia de tipo Western).

El término “humano” cuando se usa en referencia a un anticuerpo, significa que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo es completamente humana, es decir, regiones variables y constantes de las cadenas pesada y ligera humanas. Todos los aminoácidos del anticuerpo están codificados en las secuencias de anticuerpo de ADN humano o existen en un anticuerpo humano. Un anticuerpo que no es humano puede hacerse que sea completamente humano sustituyendo los residuos de aminoácidos no humanos por residuos de aminoácidos que existen en un anticuerpo humano. Se conocen en la técnica residuos de aminoácido presentes en anticuerpos humanos, mapas de regiones CDR y residuos consenso de anticuerpos humanos (véanse, por ejemplo, Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 4^a Ed. US Department of Health and Human Services. Public Health Service (1987); Chothia y Lesk (1987). *J. Mol. Biol.* 186:651; Padlan (1994). *Mol. Immunol.* 31:169; y Padlan (1991). *Mol. Immunol.* 28:489). Se conocen en la técnica métodos de producción de anticuerpos humanos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 02/43478 y WO 02/092812).

El término “humanizado” cuando se usa en referencia a un anticuerpo, significa que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo tiene residuos de aminoácidos no humanos (por ejemplo, de ratón, rata, cabra, conejo, etc.) de una o más regiones determinantes (CDR) que se unen específicamente al antígeno deseado en una molécula de inmunoglobulina humana aceptora, y uno o más residuos de aminoácidos humanos en la región de entramado (FR) de Fv, que son residuos de aminoácidos que flanquean los CDR. Los residuos de región de entramado humana de la inmunoglobulina pueden sustituirse por los residuos no humanos correspondientes. Por tanto, los residuos en las regiones de entramado humanas pueden sustituirse, por tanto, por un residuo correspondiente del anticuerpo donador de CDR no humano. Un anticuerpo humanizado puede incluir residuos, que no se encuentran ni en el anticuerpo humano ni en las secuencias de entramado o en CDR donadoras. Se conocen en la técnica métodos de producción de anticuerpos humanizados (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.225.539; 5.530.101, 5.565.332 y 5.585.089; Riechmann, *et al.*, (1988). *Nature* 332:323; los documentos EP 239.400; W091/09967; EP 592.106; EP 519.596; Padlan (1991). *Molecular Immunol.* 28:489; Studnicka *et al.*, (1994). *Protein Engineering* 7:805; y Roguska. *et al.*, (1994). *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 91:969).

Los anticuerpos denominados “primatizados” en la técnica están dentro del significado de “humanizado” tal como se usa en el presente documento, excepto porque los residuos de aminoácidos de la región de entramado y la molécula

de inmunoglobulina humana aceptora pueden ser cualquier residuo de primate, además de cualquier residuo humano.

La memoria descriptiva describe péptidos y compuestos miméticos de IFN- β , péptidos y compuestos miméticos del agonista del receptor de IFN- β , y formas modificadas (variantes), siempre que la forma modificada conserve, la actividad o función al menos parcial del péptido o compuesto mimético no modificado o de referencia. Por ejemplo, un péptido o compuesto mimético de IFN- β modificado conservará al menos una parte de una actividad de inducción de AAT. Los péptidos modificados (variantes) pueden tener uno o más residuos de aminoácidos sustituidos por otro residuo, añadidos a la secuencia o deletados de la secuencia. Los ejemplos específicos incluyen una o más sustituciones, adiciones o deletaciones de aminoácidos (por ejemplo, 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, o más). Un péptido modificado (variante) puede tener una secuencia con una identidad del 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o más con respecto a una secuencia de referencia (por ejemplo, IFN- β). La estructura cristalina del interferón-beta (IFN-beta) recombinante también puede emplearse para predecir el efecto de modificaciones de IFN- β (Senda, *et al.*, (1992). EMBO J. 11:3193).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "compuesto mimético" y "mimético" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales que la molécula de referencia. El compuesto mimético puede componerse totalmente de análogos de aminoácidos no naturales, sintéticos, o puede ser una molécula química que incluye uno o más aminoácidos peptídicos naturales y uno o más análogos de aminoácidos no naturales. El compuesto mimético también puede incorporar cualquier número de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales siempre que tales sustituciones no destruyan la actividad. Como con polipéptidos que son variantes conservativas, pueden usarse pruebas rutinarias para determinar si un compuesto mimético tiene actividad de inducción de AAT detectable.

Las composiciones de compuestos peptidomiméticos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales, que normalmente son de tres grupos estructurales: a) grupos de unión de residuos distintos de las uniones de enlace amida naturales ("enlace peptídico"); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos que se producen de manera natural; o c) residuos que inducen mimetismo estructural secundario, es decir, inducen o estabilizan una estructura secundaria, por ejemplo, una conformación de giro beta, giro gamma, lámina beta, hélice alfa, y similares. Por ejemplo, un polipéptido puede caracterizarse como un compuesto mimético cuando uno o más de los residuos están unidos por medios químicos distintos de un enlace amida. Los residuos peptidomiméticos individuales pueden unirse mediante enlaces amida, enlaces químicos no naturales y distintos de amida, incluyendo otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, por ejemplo, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos de unión alternativos al enlace amida incluyen, por ejemplo, cetometileno (por ejemplo, -C(=O)-CH₂- para -C(=O)-NH-), aminometileno (CH₂-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄-), tiazol, retroamida, tioamida o éster (véase, por ejemplo, Spatola (1983) en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, págs. 267-357, "Peptide and Backbone Modifications," Marcel Decker, NY).

Una "sustitución conservativa" es la sustitución de un aminoácido por un residuo biológica, química o estructuralmente similar. Biológicamente similar significa que la sustitución es compatible con la actividad biológica, por ejemplo, una actividad de inducción de AAT. Estructuralmente similar significa que los aminoácidos tienen cadenas laterales de longitud similar, tales como alanina, glicina y serina, o que tienen tamaño similar. La similitud química significa que los residuos tienen la misma carga o que ambos son hidrófilos o hidrófobos. Los ejemplos particulares incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o la sustitución de un residuo polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácidos glutámico por aspártico, o glutamina por asparagina, serina por treonina, y similares.

Un ejemplo específico de una variante de IFN- β es Betaseron, un análogo de beta-interferón humano en el que está sustituida serina por cisteína en la posición 17. Un ejemplo específico de un compuesto mimético de IFN- β es SYR6 (Sato y Sone, (2003). Biochem J., 371(Pt 2):603). Se describen candidatos de secuencia de IFN- β modificada, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 6.514.729 (recombinant interferon-beta muteins); 4.793.995 (modified (1-56) beta interferons); 4.753.795 (modified (80-113) beta interferons); y 4.738.845 (modified (115-145) beta interferons).

Pueden producirse y aislarse péptidos y péptidomiméticos usando cualquier método conocido en la técnica. Pueden sintetizarse péptidos, completos o en parte, usando métodos químicos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Caruthers (1980). Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215; Horn (1980). Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225; y Banga, A.K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA). Puede realizarse la síntesis peptídica usando diversas técnicas en fase sólida (véanse, por ejemplo, Roberge (1995) Science 269:202; Merrifield (1997). Methods Enzymol. 289:3) y puede conseguirse la síntesis automática por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 431 A (Perkin Elmer) según las instrucciones del fabricante.

Pueden sintetizarse residuos sintéticos individuales y polipéptidos que incorporan compuestos miméticos usando una variedad de procedimientos y metodologías conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, *Organic Syntheses Collective Volumes*, Gilman, *et al.* (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY). También pueden sintetizarse péptidos y peptidomiméticos usando metodologías combinatorias. Se conoce bien técnicas para generar bibliotecas de péptidos y péptidomiméticos, e incluyen, por ejemplo, técnicas Multipin, de bolsa de té y Split-couple-mix (véanse, por ejemplo, al-Obeidi (1998). *Mol. Biotechnol.* 9:205; Hruby (1997). *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:114; Ostergaard (1997). *Mol. Divers.* 3:17; y Ostresh (1996). *Methods Enzymol.* 267:220). Pueden producirse además péptidos modificados mediante métodos de modificación química (véanse, por ejemplo, Belousov (1997). *Nucleic Acids Res.* 25:3440; Frenkel (1995). *Free Radic. Biol. Med.* 19:373; y Blommers (1994). *Biochemistry* 33:7886).

También pueden sintetizarse péptidos y expresarse como proteínas de fusión con uno o más dominios adicionales unidos a los mismos para producir un péptido más inmunogénico, o para aislar más fácilmente un péptido sintetizado de manera recombinante. Los dominios que facilitan el aislamiento incluyen, por ejemplo, péptidos quelantes de metales tales como tramos de polihistidina y módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados; dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada; y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). Puede usarse la inclusión de una secuencia de unión escindible tal como factor Xa o enterocinasa (Invitrogen, San Diego CA) entre un dominio de purificación y el péptido para facilitar la purificación del péptido. Por ejemplo, un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica para péptido unida a seis residuos de histidina seguidos por una tiorredoxina y un sitio de escisión de enterocinasa (véanse por ejemplo, William (1995). *Biochemistry* 34:1787; y Dobeli (1998). *Protein Expr. Purif.* 12: 404). Los residuos de histidina facilitan la detección y purificación de la proteína de fusión mientras que el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para purificar el péptido de la parte restante de la proteína de fusión. Se conoce en la técnica tecnología perteneciente a vectores que codifican para proteínas de fusión y la aplicación de proteínas de fusión (véase por ejemplo, Kroll (1993). *DNA Cell. Biol.*, 12:441).

La memoria descriptiva describe cualquier tumor metastásico o no metastásico, cáncer, malignidad o neoplasia de cualquier origen celular o tisular. El tumor puede estar en cualquier estadio, por ejemplo, un tumor en estadio I, II, III, IV o V, o en remisión.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tumor," "cáncer," "malignidad," y "neoplasia" se usan de manera intercambiable y se refieren a una célula o población de células cuyo crecimiento, proliferación o supervivencia sea mayor que el crecimiento, la proliferación o la supervivencia de una célula homóloga normal, por ejemplo, un trastorno celular proliferativo o de diferenciación. Tales trastornos pueden afectar prácticamente a cualquier tipo celular o tisular, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, melanoma, trastornos neoplásicos neurales y reticuloendoteliales o hematopoyéticos (por ejemplo, mieloma, linfoma o leucemia). Un tumor puede surgir a partir de una multitud de tipos de tumores primarios, incluyendo pero sin limitarse a, de mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, de cerebro, linfoide, gastrointestinal (boca, esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto), del aparato genitourinario (útero, ovario, cuello uterino, vejiga, testículos, pene, próstata), riñón, páncreas, hígado, hueso, músculo, piel, y metastatizar a otros sitios secundarios.

Las células que comprenden un tumor pueden estar agregadas en una masa celular o estar dispersas. Un "tumor sólido" se refiere a una neoplasia o metástasis que normalmente se agrega junta y forma una masa. Los ejemplos específicos incluyen tumores de vísceras tales como melanomas, cánceres de mama, de páncreas, de útero y de ovarios, cáncer de testículos, incluyendo seminomas, cáncer gástrico o de colon, hepatomas, carcinomas suprarrenales, renales y de vejiga, cánceres de pulmón, cabeza y cuello y tumores/cánceres de cerebro.

Carcinomas se refiere a malignidades del tejido epitelial o endocrino, e incluyen carcinomas del sistema respiratorio, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas de testículos, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas del sistema endocrino, y melanomas. Melanoma se refiere a tumores malignos de melanocitos y otras células derivadas de origen celular pigmentario que pueden surgir en la piel, el ojo (incluyendo la retina), u otras regiones del organismo, incluyendo las células derivadas de la cresta neural que también dan lugar al linaje de melanocitos. Una forma premaligna de melanoma, conocida como nevo displásico o síndrome de nevo displásico, está asociada con el desarrollo de melanoma.

Los carcinomas a modo de ejemplo incluyen aquellos que se forman a partir del cuello uterino, pulmón, próstata, mama, cabeza y cuello, colon, páncreas, testículo, glándula suprarrenal, riñón, esófago, estómago, hígado y ovario. El término también incluye carcinosarcomas, por ejemplo, que incluyen tumores malignos compuestos por tejidos carcinomatosos y sarcomatosos. Adenocarcinoma incluye un carcinoma de un tejido glandular, o en el que el tumor forma una estructura similar a una glándula.

Sarcomas se refiere a tumores malignos de origen celular mesenquimatoso. Los sarcomas a modo de ejemplo incluyen por ejemplo, linfosarcoma, liposarcoma, osteosarcoma, condrosarcoma, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma y fibrosarcoma.

Las neoplasias neurales incluyen glioma, glioblastoma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, oligodendrocitoma

5 Un “tumor líquido” se refiere a una neoplasia del sistema reticuloendotelial o hematopoyético, tal como un linfoma, mieloma y leucemia, o una neoplasia que es de naturaleza difusa, ya que no forman normalmente una masa sólida. Los ejemplos particulares de leucemias incluyen linfoblástica aguda y crónica, mieloblástica y mieloma múltiple. Normalmente, tales enfermedades surgen a partir de leucemias agudas escasamente diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides específicos incluyen, pero no se limitan a, leucemia promieloide aguda (APML), leucemia miélogena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica
10 (CML); las malignidades linfoides incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), que incluye ALL de linaje B y ALL de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Los linfomas malignos específicos incluyen, linfoma no Hodgkin y variantes, linfomas de células T periféricas, leucemia/linfoma de células T del adulto (ATL), linfoma de células T cutáneas (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de
15 Reed-Stenberg.

Tal como se usa en el presente documento, un tratamiento, terapia, actividad o efecto “antitumoral”, “anticanceroso” o “antineoplásico” significa un compuesto, agente, terapia o régimen de tratamiento o protocolo que inhibe, disminuye, retarda, ralentiza, reduce o previene un crecimiento, metástasis, proliferación o supervivencia de un tumor, cáncer o neoplásicos, *in vitro* o *in vivo*. Los ejemplos no limitativos particulares de terapia antitumoral incluyen quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia (ionizante o química), terapia térmica local (hipertermia) y resección quirúrgica. Puede usarse cualquier compuesto, agente, terapia o régimen de tratamiento o protocolo que tiene una actividad o un efecto contra la proliferación celular en combinación con un agonista del receptor de IFN-β o un compuesto o agente que tiene actividad de IFN-β según la invención.
20
25

Los compuestos, agentes, terapias o tratamientos antiproliferativos o antitumorales pueden funcionar mediante mecanismos biológicos que alteran, interrumpen, inhiben o retrasan la progresión del ciclo celular o la proliferación celular; estimulan o potencian la apoptosis o muerte celular, inhiben la síntesis o el metabolismo de ácidos nucleicos o proteínas, inhiben la división celular, o disminuyen, reducen o inhiben la supervivencia celular, o la producción o utilización de un factor de supervivencia celular, un factor de crecimiento o una ruta de señalización necesarios (extracelular o intracelular). Los ejemplos no limitativos de clases de agentes químicos que tienen actividades contra la proliferación celular y antitumorales incluyen agentes de alquilación, antimetabolitos, extractos vegetales, alcaloides vegetales, nitrosoureas, hormonas, análogos de nucleósidos y nucleótidos. Los ejemplos específicos de fármacos incluyen ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina A, prednisolona, melfalán, clorambucilo, mecloretamina, busulfano, metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina, AZT, 5-azacitidina (5-AZC) y compuestos relacionados con 5-azacitidina tales como decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina), citarabina, 1-β-D-arabinofuranosil-5-azacitosina y dihidro-5-azacitidina (Goffin *et al.* (2002). *Ann Oncol.* 13:1699; Gaubert (2000). *Eur J Med Chem.* 35:1011), bleomicina, actinomomicina D, mitramicina, mitomicina C, carmustina, lomustina, semustina, estreptozotocina, hidroxiaurea, cisplatino, mitotano, procarbazona, dacarbazina, taxol, vinblastina, vincristina, doxorubicina y dibromomanitol.
30
35
40

Se conocen en la técnica agentes quimioterápicos y bioterápicos y pueden emplearse tal como se indica en las reivindicaciones. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales que se unen a células tumorales o productos oncogénicos, tales como Rituxan® y Herceptin (trastuzumab) (anticuerpo anti-Her-2neu), bevacizumab (Avastin), Zevalin, Bexxar, Oncolym, 17-1A (edrecolomab), 3F8 (anticuerpo anti-neuroblastoma), MDX-CTLA4, Campath®, Mylotarg, IMC-C225 (cetuximab), conjugados con aurinstatina de cBR96 y cAC10 (Doronina *et al.* (2003). *Nat Biotechnol* 21:778) en combinación con un agonista del receptor de IFN-β o un compuesto o agente que tiene actividad de IFN-β según la invención.
45

Los compuestos o agentes que tienen actividad similar a IFN-β (una actividad de inducción de AAT) pueden actuar o no a través del receptor de IFN-β. Por ejemplo, es más probable que las regiones reguladoras de AAT incluyan uno o más elementos reguladores genéticos de manera que la expresión de AAT responda a otras moléculas inductoras y supresoras (es decir, distintas de los agonistas de IFN-β o IFN-β). Por tanto, la invención reivindicada puede ponerse en práctica con compuestos o agentes que inducen o suprimen la expresión de un AAT mediante uno o más elementos reguladores genéticos (es decir, cualquier elemento de ácido nucleico con acción en cis que puede alterar directa o indirectamente la expresión de un AAT).
50
55

Un ejemplo de una molécula de este tipo es el factor nuclear de células T activadas (también denominado proteína de unión a motivos NFAT, por ejemplo, NFATc1, c2 c3 y c4), que es una familia de factores de transcripción que participan en la mediación de la transducción de señales. Es probable que la modulación (aumento o disminución) de una actividad o función de una proteína de unión a motivos NFAT module la expresión de AAT. Tal como se usa en el presente documento, los términos “actividad” o “función” cuando se usan para modificar “proteína de unión a motivos NFAT”, significan que la proteína de unión a motivos NFAT se altera de modo que altera la expresión de AAT. Por ejemplo, el aumento o la disminución de la unión de una proteína de unión a NFAT a una región
60

reguladora de AAT es un mecanismo mediante el cual una proteína de unión a motivos NFAT podría regular la expresión de AAT.

5 Por tanto, la memoria descriptiva describe métodos de modulación de la expresión de AAT, aumento de una respuesta inmunitaria frente a una célula tumoral, aumento de la efectividad de una terapia antitumoral, tratamiento de un sujeto que tiene o corre el riesgo de tener un tumor, tratamiento de un tumor e inhibición del silenciamiento de un antígeno asociado a tumor (AAT), con un agente o compuesto que modula una actividad o función de una proteína de unión a motivos NFAT. Un método incluye poner en contacto una célula que puede expresar un AAT con un compuesto que modula una actividad de una proteína de unión a motivos NFAT en una cantidad suficiente para
10 aumentar la expresión de un antígeno asociado a tumor (AAT) de la célula; aumentar una respuesta inmunitaria frente a las células tumorales; aumentar la efectividad de la terapia antitumoral; tratar al sujeto, tratar el tumor; e inhibir el silenciamiento de un antígeno asociado a tumor (AAT).

15 Los ejemplos no limitativos específicos de compuestos que modulan una actividad de una proteína de unión a motivos NFAT incluyen un modulador del flujo de calcio (por ejemplo, ionomicina o verapamilo), VIVIT (Pu, *et al.* (2003). *Circ Res* 92:725), gopipol (Baumgrass, *et al.* (2001). *J Biol Chem* 276:47914), benzamidas N-sustituidas (Lindgren, *et al.* (2001). *Mol Immunol* 38:267), rapamicina (Marx, *et al.* (1995). *Circ Res* 76:412), quinazolin-2,4-dionas, 1-3, y pirrolo[3,4-d]pirimidin-2,4-dionas, 4-8 (Michne, *et al.* (1995). *J Med Chem* 38:2557), 1-alfa,25-dihidroxivitamina D3 (Takeuchi, *et al.* (1998). *J Immunol* 160:209), FK506 (Rovira, *et al.* (2000). *Curr Med Chem* 7:673), FK520 (Marx, *et al.* (1995). *Circ Res* 76:412), ciclosporina (Rovira, *et al.* (2000). *Curr Med Chem* 7:673), 3,5-bis(trifluorometil)pirazoles (Djuric, *et al.* (2000). *J Med Chem* 43:2975), ditiocarbamatos (Martinez-Martinez, *et al.* (1997). *Mol Cell Biol* 17:6437), péptido intestinal vasoactivo (VIP) y polipéptido de activación de adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) (Ganea y Delgado (2002). *Crit Rev Oral Biol Med* 13:229), carboxiamidotriazol (Faehling *et al.* (2002). *Faseb J* 16:1805), morfina (Wang, *et al.* (2003). *J Biol Chem* Jul 3 [publicación electrónica previa a la impresión]), derivados de C32-O-arietil éter de ascomicina (Armstrong, *et al.* (1999). *Bioorg Med Chem Lett* 9:2089), derivado de macrolactama de ascomicina SDZ ASM 981 (Hultsch, *et al.* (1998). *Arch Dermatol Res* 290:501), y MCIP1 (Vega, *et al.* (2002). *J Biol Chem* 277:30401).

25 Los ejemplos adicionales de compuestos que modulan una actividad de una proteína de unión a motivos NFAT incluyen ARNi o un ácido nucleico antisentido de NFAT, proteína de unión a NFAT (por ejemplo, un anticuerpo; véase, por ejemplo, Lyakh *et al.*, *Mol Cell Biol.* (1997). 17:2475) o un polipéptido de NFAT negativo dominante (véanse, por ejemplo, Schubert *et al.* (2003). *J Cell Biol* 161:861; van Rooij *et al.* (2002). *J Biol Chem* 277:48617).

30 Puede diseñarse una secuencia antisentido basándose en secuencias de ácido nucleico de NFAT disponibles en la base de datos. La secuencia antisentido incluye ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y polinucleótidos monocatenarios, bicatenarios y tricatenarios que se unen a transcrito de ARN o ADN. Por ejemplo, un ácido nucleico monocatenario puede seleccionar como diana un transcrito de proteína de unión a NFAT (por ejemplo, ARNm). Los oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción del gen, por ejemplo, entre las posiciones -10 y +10 desde el sitio de inicio, son un ejemplo particular. Pueden unirse secuencias antisentido de formación de triplex a ADN de cadena doble inhibiendo de ese modo la transcripción del gen. Se conoce en la técnica el uso de secuencias de ARN de bicatenarias (conocidas como "ARNi") para la inhibición de la expresión génica (véanse, por ejemplo, Kennerdell *et al.*, (1998). *Cell* 95:1017; Fire *et al.*, (1998). *Nature*, 391:806). Por tanto, pueden usarse secuencias de ARN bicatenarias desde una región codificante de la proteína de unión a NFAT para inhibir la expresión.
45

Los compuestos y agentes que tienen actividad de IFN- β (incluyendo agonistas del receptor de IFN- β) pueden ser más o menos potentes que IFN- β . Por tanto, un compuesto puede tener significativamente menos (por ejemplo, el 10% de la potencia o actividad) o más (por ejemplo, el 150-500%, o más, potencia o actividad) de IFN- β .

50 Pueden usarse compuestos o agentes que tienen actividad de IFN- β (por ejemplo, aumentan o inducen la expresión de un antígeno asociado a tumor) solos o en combinación con IFN- β , agonista del receptor de IFN- β , u otros compuestos, agentes, tratamiento o terapias que tienen un efecto o actividad antitumoral. Por ejemplo, la administración de uno o más AAT expresados por un tumor en combinación con el compuesto o agente que tiene actividad de IFN- β puede aumentar la respuesta inmunitaria hacia un tumor que expresa o que se induce que exprese el AAT, aumentando de ese modo la efectividad de la terapia antitumoral.
55

La invención radica en el uso de un AAT con un agonista del receptor de IFN- β tal como se define en las reivindicaciones, no siendo necesario que se administren los dos componentes sustancialmente de manera contemporánea entre sí. En otras palabras, puede administrarse un AAT a un sujeto en el plazo de una o más horas (por ejemplo, 1-3, 3-6, 6-12, 12-24, 24-48, 24-72 horas), días (por ejemplo, 1-3, 3-5, 5-7, 7-10, 10-14 días, 14-30 días) o meses (1-6) antes o después de la administración de IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β . Por consiguiente, pueden administrarse uno o más AAT antes de, sustancialmente de manera contemporánea a o después de la administración de IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad similar a IFN- β en cualquier orden deseado.
60
65

Si a un sujeto se le administra en primer lugar AAT (una vez o múltiples veces), puede administrarse al sujeto posteriormente IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β , múltiples veces. Asimismo, si a un sujeto se le administra en primer lugar IFN- β , puede administrarse al sujeto posteriormente un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β una vez o múltiples veces, AAT múltiples veces.

A un sujeto puede administrársele en primer lugar un AAT, y posteriormente administrarle IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β . Alternativamente, a un sujeto puede administrársele en primer lugar IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β , y posteriormente administrarle un AAT. A un sujeto también pueden proporcionársele múltiples administraciones de AAT e IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β , en cualquier secuencia.

Puede usarse cualquier compuesto, agente, terapia o tratamiento que tiene una actividad o efecto de estimulación o de potenciación inmunitaria en combinación con un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β , según la invención. Tal como se usa en el presente documento, el término "potenciación inmunitaria", cuando se usa en referencia a un compuesto, agente, terapia o tratamiento de este tipo, significa que el compuesto proporciona un aumento, estimulación, inducción o promoción de una respuesta inmunitaria, humoral o mediada por células. Tales terapias pueden potenciar la respuesta inmunitaria de manera general, o potenciar la respuesta inmunitaria con respecto al tumor específico. Los ejemplos no limitativos específicos de agentes de potenciación inmunitaria incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales y mezclas de los mismos (por ejemplo, que se unen específicamente a un AAT).

Las células inmunitarias que interactúan con una célula tumoral incluyen linfocitos, células plasmáticas, células B que expresan anticuerpos frente a AAT, células NK, células LAK y macrófagos. Las células inmunitarias incluyen células que potencian o estimulan una respuesta inmunitaria frente a AAT (por ejemplo, células dendríticas o células presentadoras de antígenos) se consideran "de potenciación inmunitaria". Además, puede usarse una célula de mamífero o que no es de mamífero que expresa un anticuerpo (por ejemplo, célula plasmática, célula B o una célula de un mamífero o de no mamífero transfectada con un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo) que se une específicamente a un AAT, según la invención. Puede usarse una célula inmunitaria que selecciona como diana una célula tumoral de melanoma según la invención reivindicada. Por ejemplo, inmunoterapia adaptativa, en la que pueden infundirse linfocitos infiltrantes tumoral o de sangre periférica a un paciente con tumor, después de estimulación opcional con una citocina.

Moléculas de estimulación inmunitaria (Dredge *et al.* (2002) *Cancer Immunol Immunother* 51:521), tales como ligando Flt3 (Disis *et al.* (2002) *Blood* 99:2845) y citocinas (por ejemplo, factores de crecimiento celular, proliferación, quimiotácticos y de supervivencia) que potencian o estimulan la inmunogenicidad de AAT se consideran "de potenciación inmunitaria," y pueden administrarse antes de, sustancialmente de manera contemporánea a o después de la administración de agonista del receptor de IFN- β , o un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β (Nohria *et al.* (1994). *Biotherapy* 7:261; Pardoll (1995). *Annu Rev Immunol* 13: 399; y Ahlers *et al.* (1997) *J Immunol* 158:3947). Los ejemplos no limitativos específicos de citocinas incluyen IL-2, IL-1 α , IL- β , IL-3, IL-7, factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IFN- γ , IL-12, y TNF- α (Riker *et al.* (1999). *Surgery* 126:112; Scheibenbogen *et al.* (2002). *Int J Cancer* 98:409; Disis *et al.* (2002). *Blood* 99:2845; Schiller *et al.* (1990). *J Clin Invest* 86:1211; Chen *et al.* (2001). *Gene Ther* 8:316; Elzey *et al.* (2001). *Int J Cancer* 94:842). Puede usarse GM-CSF que estimula las células de presentación de antígenos y muestra actividad antitumoral, incluyendo frente a leucemia, melanoma, carcinoma de mama, carcinoma de próstata y carcinoma de células renales, según la invención.

Las moléculas que regulan por disminución los efectos de los inhibidores de la respuesta inmunitaria TH1 también se consideran "de potenciación inmunitaria." Los ejemplos no limitativos específicos incluyen anticuerpos contra IL-10 o receptor de IL-10 (Murray *et al.* (2003) *Infect Dis* 188:458), IL-4 e IL-5, regulando por incremento de ese modo la respuesta inmunitaria TH1.

Los inhibidores de cinasas que potencian o estimulan la expresión de AAT incluyen Gleevec (STI571) e inhibidores de proteínas cinasas (por ejemplo, inhibidor de AKT, H-89, PD98059, PD184352, U0126, HA1077, forskolina e Y27632). Tales inhibidores de cinasas pueden actuar de manera sinérgica con otros compuestos (por ejemplo, IFN- β) que estimulan, potencian o aumentan la expresión de AAT.

"Inhibidores del silenciamiento génico" incluyendo inhibidores de ADN metiltransferasa tales como 5-azacitidina e inhibidores de histona desacetilasa tales como tricostatina A se consideran "de potenciación inmunitaria." IFN- β también puede actuar de manera sinérgica con tales inhibidores.

Los adyuvantes se refieren a una clase de sustancias que cuando se añaden a un antígeno mejoran la respuesta inmunitaria. Los ejemplos incluyen compuestos que promueven la captación por células auxiliares (por ejemplo,

macrófagos y células dendríticas) que procesan antígenos, tales como alumbre (hidróxido de aluminio), adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, Ribí, Montanide ISA™51, adyuvante de vacuna GERBU, adyuvante de vacuna CAP, SLN (nanopartículas lipídicas sólidas), ADN de CpG y adyuvante RC529.

5 Por tanto, la invención también proporciona medios para tratar un tumor tal como se define en las reivindicaciones. En las realizaciones respectivas, se usa un agonista del receptor de IFN-β tal como se define en las reivindicaciones y un anticuerpo o una célula que produce un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor (AAT) para tratar el tumor tal como se define en las reivindicaciones. En diversos aspectos, la célula que produce un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor (AAT) se selecciona de una célula plasmática, célula B o célula de mamífero o que no es de mamífero transfectada con un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo.

10 Por tanto, la invención proporciona además medios para tratar un tumor tal como se define en las reivindicaciones. En las realizaciones respectivas, se usa un agonista del receptor de IFN-β tal como se define en las reivindicaciones y una célula inmunitaria que interacciona con una célula tumoral para tratar el tumor tal como se define en las reivindicaciones. En diversos aspectos, la célula se selecciona de una célula T, una célula NK, célula LAK, monocito o macrófago. En un aspecto adicional, la célula se ha preseleccionado para que se una a un antígeno (por ejemplo, un AAT) expresado por el tumor (por ejemplo, linfocitos T seleccionados por su fuerte avidéz por AAT tal como se presentan en moléculas de HLA, Dudley *et al.* (2002). *Science* 298:850; Yee *et al.* (2002). *PNAS* 99:16168).

15 Los medios de la invención incluyen proporcionar un beneficio terapéutico detectable o medible a un sujeto. Un beneficio terapéutico es cualquier mejora objetiva o subjetiva, transitoria o temporal, o a más largo plazo en el estado. Por tanto, se logra un criterio de valoración clínico satisfactorio cuando hay una mejora incremental en el estado de los sujetos o una reducción parcial en la gravedad o duración de uno o más síntomas adversos o complicaciones asociados o la inhibición o reversión de una o más de las manifestaciones o características fisiológicas, bioquímicas o celulares de la enfermedad. Por tanto, no es necesario que un beneficio terapéutico o mejora (se usa "paliar" como sinónimo) sea la eliminación completa del tumor o de todos y cada uno de los síntomas adversos o complicaciones asociados con el tumor. Por ejemplo, la inhibición de un aumento de la masa de células tumorales (estabilización de una enfermedad) puede aumentar la duración de vida de los sujetos (reducir la mortalidad) incluso aunque sólo sea durante unos pocos días, semanas o meses, incluso aunque no haya resultado la eliminación completa del tumor.

20 Los ejemplos particulares de beneficio terapéutico o mejora incluyen una reducción en el volumen tumoral (tamaño o masa de células), una inhibición de un aumento en el volumen tumoral, una ralentización o inhibición del empeoramiento o la progresión tumoral, la estimulación de la lisis o apoptosis de células tumorales, la reducción o inhibición de metástasis tumoral, reducción de la mortalidad, prolongación de la duración de vida. Las complicaciones y síntomas adversos asociados con tumor, neoplasia, y cáncer que pueden reducirse o disminuirse incluyen, por ejemplo, náuseas, falta de apetito y letargo. Por tanto, una reducción en la intensidad o frecuencia de los síntomas, una mejora en la sensación subjetiva de los sujetos, tal como un aumento de energía, apetito, bienestar psicológico, son ejemplos de beneficio terapéutico.

25 Las dosis o "cantidad suficiente" del tratamiento para lograr un beneficio terapéutico o mejora son efectivos para mejorar uno, varios o todos los síntomas adversos o complicaciones del estado, en un grado medible, aunque la reducción o inhibición de una progresión o empeoramiento del estado o un síntoma adverso, es un desenlace satisfactorio. La dosis puede aumentarse o reducirse proporcionalmente tal como se indique por el estado de la enfermedad que esté tratándose o los efectos secundarios del tratamiento. Las dosis que también se consideran suficientes son aquellas que dan como resultado una reducción del uso de otro régimen terapéutico o protocolo. Por ejemplo, se considera que un agonista del receptor de IFN-β y uno o más AAT tienen un efecto terapéutico si la administración da como resultado menos fármaco quimioterápico, radiación o inmunoterapia requeridos para el tratamiento de tumores.

30 Como es habitual para protocolos de tratamiento, algunos sujetos mostrarán mayor o menor respuesta al tratamiento. Por tanto, las cantidades apropiadas dependerán del estado que deba tratarse (por ejemplo, el tipo o estadio del tumor), del efecto terapéutico deseado, así como del sujeto individual (por ejemplo, la biodisponibilidad dentro del sujeto, sexo, edad, etc.).

35 Los sujetos adecuados para el tratamiento incluyen aquellos que tienen una célula tumoral, aquellos que estén sometidos así como aquellos que se han sometido a terapia antitumoral, incluyendo sujetos en los que el tumor está en remisión. Por tanto, la invención puede aplicarse al tratamiento de un sujeto que corre el riesgo de presentar una complicación asociada con un tumor.

40 En el presente documento se describen sujetos que tienen factores de riesgo asociados con el desarrollo tumoral. Por ejemplo, sujetos que corren el riesgo de desarrollar melanoma incluyen los de piel clara, altos números de nevos (nevo displásico), exposición solar (radiación ultravioleta), fenotipo del paciente, historial familiar e historial de un melanoma previo. Pueden identificarse los sujetos que corren el riesgo de desarrollar cáncer con exámenes genéticos para detectar genes asociados a tumor, deleciones génicas o mutaciones génicas. Los sujetos que corren

el riesgo de desarrollar cáncer de mama carecen de *Brcal*, por ejemplo. Los sujetos que corren el riesgo de desarrollar cáncer de colon tienen genes supresores de tumores deletados o mutados, tales como poliposis adenomatosa coli (APC), por ejemplo.

5 El término "sujeto" se refiere a animales, normalmente animales mamíferos, tales como un primate no humano (simios, gibones, chimpancés, orangutanes, macacos), un animal doméstico (perros y gatos), un animal de granja (caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos), animal de experimentación (ratón, rata, conejo, cobaya) y seres humanos. Los sujetos incluyen modelos de enfermedades de animales, por ejemplo, un modelo de roedor para someter a prueba la eficacia *in vivo* del agonista del receptor de IFN- β y uno o más AAT (por ejemplo, un modelo animal de tumor).
10

El agonista del receptor de IFN- β , los compuestos y agentes que tienen una actividad de inducción de AAT como IFN- β pueden administrarse en una forma farmacéutica convencional preparada combinando el agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene actividad de inducción de AAT como IFN- β con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable convencional según técnicas conocidas. El portador o diluyente farmacéuticamente aceptable está dictado por la cantidad de principio activo con el que debe combinarse, la vía de administración y otras variables conocidas.
15

Las composiciones farmacéuticas incluyen portadores, diluyentes o excipientes "farmacéuticamente aceptables" y "fisiológicamente aceptables". Tal como se usa en el presente documento, el término "farmacéuticamente aceptables" y "fisiológicamente aceptables," cuando se refieren a portadores, diluyentes o excipientes incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), detergentes, disoluciones, emulsiones, medios de dispersión, recubrimientos, agentes que promueven o retrasan la absorción e isotónicos, compatibles con la administración farmacéutica y con los demás componentes de la formulación. Tales formulaciones pueden estar contenidas en un comprimido (recubierto o no recubierto), cápsula (dura o blanda), microperla, emulsión, polvo, gránulo, cristal, suspensión, jarabe o elixir.
20
25

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para ser compatibles con una vía de administración particular. Las composiciones para la administración parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir un diluyente estéril, tal como agua, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos. La preparación puede contener uno o más conservantes para impedir el crecimiento de microorganismos (por ejemplo, agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa).
30
35

Las composiciones farmacéuticas para inyección incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, o mediante el uso de tensioactivos. Los agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. La inclusión de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina puede prolongar la absorción de composiciones inyectables.
40
45

Para la administración transmucosa o transdérmica, se usan penetrantes apropiados para la barrera que debe penetrarse en la formulación. Se conocen en la técnica tales penetrantes, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fusídico; para la administración transdérmica, pomadas, ungüentos, geles o cremas.
50

Se conocen en la técnica formulaciones farmacéuticas y sistemas de administración adicionales y pueden aplicarse en los métodos de la invención (véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12ª ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993); y Poznansky, *et al.*, Drug Delivery Systems, R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y. (1980), págs. 253-315)
55

También se describen métodos de identificación de un agente que aumenta la expresión de un antígeno asociado a un tumor (AAT) de melanoma. Un método incluye poner en contacto una célula que puede expresar un AAT de melanoma con un agente de prueba (por ejemplo, una célula de melanoma); medir la cantidad de AAT expresado en presencia del agente de prueba; y determinar si la cantidad de AAT expresado es mayor en presencia que en ausencia del agente de prueba, en el que el aumento de la expresión de AAT identifica al agente de prueba como un agente que aumenta la expresión de un AAT de melanoma. En un aspecto, el AAT es un antígeno de diferenciación, por ejemplo, Melan-A/MART-1, tirosinasa, gp100/pmel 17, TRP-1, TRP-2 o MITF-M, o un fragmento antigénico de los mismos.
60
65

En el presente documento se describen kits que incluyen uno o más de IFN- β y agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene una actividad de inducción de AAT como IFN- β envasados en material de acondicionamiento adecuado. Un kit incluye normalmente una etiqueta o prospecto que incluye una descripción de los componentes o instrucciones para su uso *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*, de los componentes en el mismo. Un kit puede contener una colección de tales componentes, por ejemplo, IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene una actividad de inducción de AAT como IFN- β , y uno o más AAT.

Un kit incluye IFN- β , un agonista del receptor de IFN- β o un compuesto o agente que tiene una actividad de inducción de AAT como IFN- β , e instrucciones para tratar (profilaxis o terapéutica), un tumor de un sujeto. El envase incluye uno o más AAT. El kit o el envase incluye un agente antitumoral (por ejemplo, un fármaco o anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-AAT).

El término "material de acondicionamiento" se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de acondicionamiento puede mantener los componentes de manera estéril, y puede estar compuesto por material usado comúnmente para tales propósitos (por ejemplo, papel, fibra corrugada, vidrio, plástico, lámina de aluminio, ampollas, etc.). La etiqueta o el prospecto pueden incluir instrucciones por escrito apropiadas.

Los kits descritos en el presente documento pueden incluir adicionalmente etiquetas o instrucciones para usar los componentes del kit en un método de la invención. Las instrucciones pueden incluir instrucciones para poner en práctica cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento incluyendo métodos de tratamiento. Por tanto, por ejemplo, un kit puede incluir IFN- β y uno o más AAT, junto con instrucciones para la administración a un sujeto en un tratamiento.

Las instrucciones pueden estar sobre "materia impresa", por ejemplo, sobre papel o cartón dentro o fijado al kit, o sobre una etiqueta fijada al kit o al material de acondicionamiento, o unidas a un vial o tubo que contiene un componente del kit. Las instrucciones pueden incluirse adicionalmente en un medio legible por ordenador, tal como un disco (disquete o disco duro), CD óptico tal como CD- o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medios de almacenamiento eléctricos tal como RAM y ROM e híbridos de éstos tales como medios de almacenamiento magnéticos/ópticos.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o las pruebas de la presente invención, en el presente documento se describen métodos y materiales adecuados.

Ejemplos

EJEMPLO I

Este ejemplo describe materiales, métodos y procedimientos a modo de ejemplo.

Líneas celulares: Todas las líneas celulares se han descrito previamente. Se establecieron las líneas celulares tumorales de melanona, MU, MU-X, EW, en el Hospital General de Massachusetts (Ramírez-Montagut, *et al.* (2000). Clin. Exp. Immunol. 119:11). Se adquirió A375 de La Colección Americana de Cultivos Tipo, (Manassas, VA). IGR-39D, 453A y 136.2 los proporcionó el Dr. Peter Schrier, Universidad de Leiden, Leiden, Países Bajos. MM96L lo proporcionó el Dr. P.G. Parsons, Instituto Queensland de Investigación Médica, Herston, Australia; se derivaron variedades (+) y (-) (es decir, elementos de alta y baja expresión del antígeno Melan-A/MART-1) por el Dr. James Kurnick. Se aisló la línea celular mielomonocítica U937 por el Dr. Kenneth Nilsson, Universidad de Uppsala, Uppsala, Suecia. U2-OS, una línea celular humana de osteosarcoma tal como se describe por Nelissen (Nelissen *et al.* (2000). Exp Hematol 28:422.).

Reactivos: Se adquirieron anticuerpos frente a Melan-A/MART-1 (clon A103) (Chen, *et al.* (1996) Proc Natl Acad Sci U S A 93:5915) de Vector Laboratories/NoivoCastra Laboratories (Burlingame, CA). Se obtuvieron anticuerpos anti-gp100 (clon HMB45) de Lab Vision Corp. (Fremont, CA). Se obtuvo oncostatina M recombinante humana (rhOSM) de R&D Systems, (Mineápolis MN). Los productos químicos y otros reactivos eran de calidad analítica y se obtuvieron de Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO). El beta-interferón-1a (Avonex ®) y el interferón-1b (Betaseron ®) humanos recombinantes eran productos de Biogen (Cambridge, MA) y Berlex Laboratories Inc. (Montville, NJ), respectivamente.

Medio condicionado: Se generó medio condicionado a partir de líneas celulares tumorales de melanoma deficientes en Melan-A/MART-1 cultivando las células a una concentración inicial de 5×10^5 células/ml en medio DMEM complementado con entre el 1 y el 10% de FBS. Se recogieron los sobrenadantes tras 72 horas mediante centrifugación de los cultivos celulares y filtración del medio a través de un filtro de 0,2 micrómetros (Millipore, Bedford, MA). Se concentró el medio condicionado que contenía el 1% de FBS entre 10 y 20 veces recogiendo el

material retenido de una membrana YM de 30 kD nominal (Centriprep, Millipore, Bedford, MA). Además de las líneas celulares tumorales MU-X, EW e IGR39D, también se usaron tres líneas celulares distintas a melanoma para generar medio condicionado en condiciones similares. Estas líneas celulares tumorales humanas fueron: Daudi (linfoma de células B); Jurkat (linfoma de células T); MCF-7 (carcinoma de mama), que se obtuvieron de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo, Bethesda, MD).

Determinación de antígeno de proteína en células tumorales mediante análisis de citometría de flujo: Para evaluar la expresión del antígeno Melan-A/MART-1 citoplasmático en líneas celulares tumorales de melanoma, en primer lugar se fijaron las células durante 10' en paraformaldehído al 1%; se sedimentan las células y se incuban durante 5' en saponina al 0,1% antes del lavado y la adición de anticuerpo monoclonal específico para Melan-A/MART-1, A-103 (Ramirez-Montagut, *et al.*, citado anteriormente) durante 45' a 22°C. Tras dos lavados, se tiñeron las células durante 30' con anticuerpo Ig de cabra anti-ratón conjugado con FITC (DAKO, Carpintería, CA) antes de la fijación en paraformaldehído al 1% y análisis mediante citometría de flujo (FACSscan, Becton-Dickinson, Mt. View, CA). Se generaron histogramas de tinción por fluorescencia para la comparación de la tinción con anti-Melan-A/MART-1 de diversas poblaciones celulares. Se calculó la fluorescencia de canal media usando el software "LYSIS" proporcionado por el fabricante. Se determinó la expresión de Gp100 de manera similar usando el anticuerpo monoclonal HMB45.

Ensayos de citotoxicidad: Se sometieron a ensayo TIL para determinar la capacidad para lisar células diana de melanoma en 4 horas mediante un ensayo de liberación de ⁵¹Cr, tal como se describió previamente (Ramirez-Montagut, *et al.*, citado anteriormente). Se generaron células diana de melanoma con alta expresión constitutiva de Melan-A/MART-1 mediante cultivo de baja densidad (1-2 x 10⁵/ml). Se compararon estas células que expresan Melan-A/MART-1 con respecto a su susceptibilidad a la citólisis para las mismas células cultivadas durante de 3 a 6 días en presencia de medio condicionado de la variante negativa de Melan-A/MART-1, MU-X, para derivar células diana con baja expresión de Melan-A/MART-1. Se sometieron a ensayo adicionalmente células con baja expresión de Melan-A/MART-1 tras pulsado con los aminoácidos 27-35 del péptido de Melan-A/MART-1 (AAGIGILTV; SEQ ID NO:1); (Zhai, *et al.* (1996). *J Immunol.* 156:700; Stevens, *et al.* (1995). *J Immunol.* 154:762; Rivoltini, *et al.* (1995). *J Immunol.* 154:2257; Kawakami, Y. y S. A. Rosenberg. (1997). *Int Rev Immunol.* 14:173, cultivando estas células diana a 37°C durante 2 horas en 1 ml de medio que contiene 5 mg de péptido antes del marcaje con ⁵¹Cr para su uso en ensayos citotóxicos para demostrar el reconocimiento renovado a de susceptibilidad a células T específicas.

En casos adicionales, también se sometieron a ensayo progenie de TIL en masa y clonada frente a melanomas tumorales autólogos (MU), alogénicos, así como dianas de linfocitos B transformados con VEB, NK (K562) y LAK (Daudi): EBV-3 (HLA-A1, B8, DR3), EBV-19 (HLA-A2, B18, DR5), usando el ensayo de liberación de ⁵¹Cr anterior. El pulsado incluyó los siguientes péptidos derivados del linaje de melanocitos: tirosinasa (Rivoltini, *et al.*, citado anteriormente): MLLAVLYCL (SEQ ID NO:2) o YMNGTMSQV (SEQ ID NO:3), MAGE-3 (Gaugler, *et al.* (1994). *J Exp Med* 179:921); EBDPIGHLY (SEQ ID NO:4). Se examinaron los clones para determinar actividad citotóxica a razones de efector con respecto a diana de 50:1 e inferiores.

Análisis de PCR: Se sometieron cantidades iguales de ARN sometidos a transcripción inversa con oligo-dT18 a análisis de RT-PCR, tal como se describió previamente (Kurnick, *et al.* (2001) *J Immunol* 167:1204), usando diluciones múltiples para establecer condiciones en las que las cantidades iniciales de ARNm de control daban como resultado cantidades inferiores a las de saturación de los productos, mostrándose concentraciones de molde representativas. Se diseñaron los cebadores a partir de entradas genómicas y de ARNm de GenBank apropiadas y se diseñaron para abarcar intrones para impedir la amplificación simultánea de trazas de ADN genómicos. Cuando esto no fue posible, se trataron los ARN con ADNasa I libre de ADNasa y volvieron a purificarse.

Secuencias de cebadores: (Pares directo {sentido}/inverso{anti-sentido}) (SEQ ID NO:5-22)

Melan-A/MART-1: CAAGATGCCAAGAGAAGATGCTCACT/GCTTGCATTTTTCTACACCATTCCTCA;

β-Actina: GAGATCACTGCCCTGGCACCCA/GCTCCAACCGACTGCTGTACCTTCAC;

gp100/Pmel17:CTGATTGGTGCAAATGCCTCCTTCT/AGGAAGTGCTTGTTCCCTCCATCCA;

Tirosinasa: CAGCCCAGCATCATTCTTCTCCTCT/GCAGTGAGGACGGCCCCTACCA;

TRP-1: TGTTGCCAGACCTGTCCCCT/GCAACATTTCTGCATGTCTTTCTCCA;

TRP-2: CCTAGTGAACAAGGAGTGCTGCCC/CGCTGGAGATCTCTTTCCAGACACAAC;

MITF-M: TCTCTCACTGGATTGGTGCCACCT/CATGCCTGGGCACTCGCTCTCT

MITF-A: CCAAGCCTCCGAAATGCTCCTCCA/CATGCCTGGGCACTCGCTCTCT

GAPDH: TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT/CTGCAAATGAGCCCCAGCCTTCT

MITF-M y MITF-A comparten un cebador inverso común que pertenece a sus regiones en 3' de ARNm compartidas. Se confirmaron las identidades de los productos de PCR mediante secuenciación automática.

5 EJEMPLO II

Este ejemplo describe datos de expresión de factores de transcripción y antígenos asociados a melanocitos.

10 Las células deficientes en Melan-A/MART-1, tales como MU-X y EW, producen factores solubles que modulan por disminución la expresión de antígenos en células positivas de manera constitutiva en otro caso (Kurnick, *et al.*, citado anteriormente); Ramirez-Montagut, *et al.*, citado anteriormente). Para determinar el repertorio natural de expresión génica de proteínas relacionadas en una serie de líneas celulares deficientes y positivas para antígeno, se estudiaron cuatro líneas celulares de melanoma que expresan Melan-A/MART-1, 136.2, 453A, MM96L (una variante que expresa antígeno, designada como MM96L+, y una variante deficiente en Melan-A/MART-1 designada como MM96L-) y MU (una variante que expresa antígeno, designada como MU, y una variante deficiente en Melan-A/MART-1 designada como MU-X), y cinco líneas celulares adicionales que tienen una expresión de Melan-A/MART-1 débil o deficiente, MU-X, EW, IGR-39D, MM976L- y A375, así como la línea celular RAMOS derivada de linfoma de Burkitt (tabla 1). Se evaluó la expresión de antígenos de Melan-A/MART-1 (MA/M1), gp100 y tirosinasa mediante tinción citoplasmática con anticuerpos monoclonales apropiados. Además, se realizó la evaluación de diferencias importantes en los niveles en estado estacionario de ARNm relativo para estos marcadores entre diferentes líneas celulares después de la amplificación por PCR.

25 Tal como se muestra en la tabla 1A, a continuación, la baja expresión de Melan-A/MART-1 está asociada generalmente con baja expresión de gp100 y tirosinasa. Entre los melanomas, sólo EW secreta cantidades medibles de proteína (tal como se determina en ELISA), pero 5 líneas celulares adicionales muestran niveles detectables de ARNm de OSM, aunque más débiles que EW (y RAMOS distinto de melanoma). Sólo MM96 y A375 parecen ser deficientes para ARNm de OSM. Las proteínas relacionadas con tirosina TRP-1 y TRP-2 son análogas en la expresión de los demás marcadores de melanocitos.

30 También se examinó una serie de factores de transcripción relacionados con la diferenciación de melanocitos. Tal como se muestra en la tabla 1B, el alelo asociado a melanocitos de MITF, concretamente MITF-M, se expresó fuertemente en los tumores que expresan Melan-A/MART-1, pero no en las líneas celulares deficientes en antígeno, excepto por A375. En cambio, la isoforma MITF-A se expresó en todas las líneas celulares excepto en la RAMOS. Sox 10 mostró un patrón similar a MITF-M, aunque era detectable en MU-X así como A375. Pax 3, bm2 y tbx2 se expresaron ampliamente entre todos los melanomas, aunque tbx2 sólo se expresó débilmente en EW.

Tabla 1. Niveles de ARNm de factores de transcripción y antígenos en líneas celulares de melanoma. La designación (++++) indica la formación de productos fácilmente detectable (nivel relativamente alto). Cuando se asigna la designación de +/-, los niveles de productos eran bajos de manera reproducible, requiriendo a menudo una segunda tanda de PCR anidada para la detección inequívoca. (La comparación de los niveles relativos entre marcadores independientes no es factible con estos ensayos).

1A. Expresión de antígenos del linaje de melanocitos (proteína y ARNm)

TUMOR	136.2	453A	MM96L	MU-89	MU-X	EW	IGR-39D	A375	RAMOS
OSM	++++	++++	++++	++++	+/+	++++	++++	++++	++++
MA/ M1	++++	++++	++++	++++	+/+	+/+	+/+	+/+	+
gp100	++++	++++	++++	++++	+	+	+	+	+
tirosinasa	++++	++++	++++	++++	+	+	+/+	+/+	+
TRP-1	++++	++++	++++	++++	+/+	+	+	+	+
TRP-2	++++	++++	++++	++++	+/+	+	+	+	+

* A375 tienen ARNm detectable para Melan-A/MART-1, pero son relativamente deficientes en la expresión de proteínas citoplasmáticas.

1B. Expresión de factores de transcripción (ARNm)

TUMOR	136.2	453A	MM96L	MU-89	MU-X	EW	IGR-39D	A375	RAMOS
MITF-M	++++	++++	++++	++++	+/+	+/+	+/+	+	+
MITF-A	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
BRN2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
STAT3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Pax3	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
SOX 10	++++	++++	++++	++++	+	+	+/+	+/+	+
Tbx2	++++	++++	++++	++++	+/+	+	+/+	+/+	+

EJEMPLO III

5 Este ejemplo describe la regulación por disminución de los antígenos asociados a melanocitos Melan-A/MART-1 y gp100. Este ejemplo también describe datos que indican que IFN-beta regula por incremento los antígenos asociados a melanocitos Melan-A/MART-1 y gp100.

10 La expresión de Melan-A/MART-1 puede regularse por disminución mediante cultivo con sobrenadantes de tumores negativos para Melan-A/MART-1 tales como EW y A375 (Ramirez-Montagut, *et al.*, citado anteriormente). Brevemente, se cultivaron células tumorales MU durante 3 días en medio de control o en 20 ng/ml de OSM (figura 1A y 1D), o en sobrenadantes de células tumorales EW (contiene OSM) (figura 1B) o A375 (no contiene OSM) (figura 1C). Se tiñeron las células para determinar la expresión citoplasmática de la proteína Melan-A/MART-1 (figuras 1A-1C) o gp100 (figura 1D) y se sometieron a ensayo mediante citometría de flujo.

15 Los datos indican que la actividad de silenciamiento de antígeno de melanoma (MASA) producida por las células EW incluye OSM y al menos un factor soluble adicional, designado como MASA2, que está presente en sobrenadantes de EW después de la eliminación de OSM, y también está presente en células A375 que no producen OSM.

20 La pérdida de Melan-A/MART-1 está asociada con una notable disminución en la capacidad de las células T para lisar células tumorales que se han tratado con sobrenadantes que contienen MASA (Ramirez-Montagut, *et al.*, citado anteriormente). La pérdida de lisis mediada por células T puede superarse mediante la adición del péptido derivado de Melan-A/MART-1, AAGIGILTV (SEQ ID NO:1), que restaura la susceptibilidad citolítica. La pérdida de Melan-A/MART-1 está acompañada generalmente por una disminución de gp100 y tirosinasa, así como otras proteínas del linaje de melanocitos, indicando que existe un cambio "global" en las células tumorales. Sin embargo, la modulación por disminución de la expresión de antígenos parece ser algo selectiva ya que el antígeno HLA de clase I necesario para la presentación del péptido de melanoma no está modulado por disminución (Kurnick, *et al.*, citado anteriormente). Cuando se retiró el medio condicionado que contenía MASA de las células tumorales que expresan Melan-A/MART-1, hubo una expresión renovada de este antígeno. Estas células positivas para antígeno se lisan de nuevo por células T citotóxicas específicas de Melan-A/MART-1.

30 La oncostatina M y otros factores derivados de líneas celulares de melanoma pueden modular por disminución la expresión de antígenos del linaje de melanocitos en diversas líneas celulares de melanoma (Kurnick, *et al.*, citado anteriormente). Se evaluaron varias citocinas para determinar la actividad de modulación por incremento y disminución de antígenos del linaje de melanocitos.

35 Sorprendentemente, el interferón-beta tenía actividad de modulación por incremento en todas las líneas celulares de melanoma, tanto elementos de alta como de baja expresión de Melan-A/MART-1 (figura 2). Además, el interferón-beta podía revertir el efecto de modulación por disminución de oncostatina M sobre gp100 (figura 3, tinción de HMB 45), y se aumentó el efecto del interferón-beta tratando las células con un inhibidor de ADN metilasa tal como 5-azadesoxicidina (figura 4, tinción de gp100 (HMB)).

45 En resumen, los datos anteriores indican que el interferón-beta puede inhibir el efecto de modulación por disminución por el antígeno de oncostatina M, una citocina conocida que puede mediar el silenciamiento de antígeno en el sistema de melanoma, así como la modulación por disminución inducida por una molécula o moléculas adicionales producidas por células de melanoma (MASA) que manifiestan silenciamiento de antígeno. El interferón-beta puede regular por incremento la expresión del antígeno Melan-A/MART-1 en todas las líneas celulares de melanoma estudiadas hasta la fecha, independientemente del mecanismo que controle la modulación por disminución de la expresión de antígenos.

50 IFN- β también potencia la expresión de antígenos del CMH de clase I (HLA-A, B y C), y IFN- γ potencia antígenos del CMH tanto de clase I y como de clase II, aumentando por tanto la producción de moléculas presentadoras de antígeno en células tumorales. La expresión de nuevo AAT y nuevo HLA es por tanto un tratamiento doblemente efectivo para potenciar el reconocimiento por células T de células tumorales, haciendo que sea más probable que un linfocito T citotóxico (CTL) se una y destruya células tumorales tratadas con IFN- β .

EJEMPLO IV

60 Este ejemplo describe la regulación por disminución de los antígenos asociados a melanocitos MITF, tirosinasa, TRP-1 y TRP-2. Este ejemplo también describe datos que indican que la transfección de MITF-M reguló por incremento la expresión del antígeno Melan-A/MART-1.

65 Los tumores con Melan-A/MART-1 bajo o ausente también son relativamente deficientes en tirosinasa y gp100; 3 de 4 melanomas con Melan-A/MART-1 bajo tienen MITF-M bajo, incluyendo la línea MU-X derivada de células MU Melan-A/MART-1+. El regulador sox10 de la expresión de MITF-M es deficiente en 2 de los 4 de melanomas con Melan-A/MART-1 bajo, mientras que otro factor de transcripción del linaje de melanocitos, tbx2, era deficiente en el nivel de ARNm sólo en la línea celular EW con Melan-A/MART-1 bajo (tabla 1).

OSM induce la modulación por disminución de diversos genes relacionados con melanocitos, incluyendo Melan-A/MART-1, tirosinasa, gp100, TRP-1 y TRP-2 (figura 5). Aunque OSM también modula por disminución la expresión de MITF-M, la isoforma de MITF-A no responde de manera detectable a OSM. La expresión de las variantes del gen de la microftalmia depende de diferentes promotores y con diferentes extremos N-terminales en sus proteínas traducidas respectivas (Udono, *et al.* (2000). *Biochim Biophys Acta* 1491:205). La acción diferencial puede proporcionar pistas en cuanto a los elementos promotores que responden a OSM; por ejemplo, sólo el promotor de isoforma MITF-M tiene un sitio de CRE perfecto.

Las cuatro líneas celulares de melanoma deficientes en Melan-A/MART-1 estudiadas producen una fuerte actividad de silenciamiento de antígeno. Esto sugiere una correlación entre la expresión de antígenos y la producción de un factor de silenciamiento de antígeno. Los melanocitos, que expresan normalmente este antígeno, deben estar regulados por disminución para inactivar la transcripción de esta proteína. Si un mutante tumoral ha perdido el gen Melan-A/MART-1, o su promotor, no habría una ventaja selectiva en que la célula continúe produciendo un factor de "silenciamiento de antígeno". La pérdida simultánea de tirosinasa y gp100 sugiere que cualquier mutación en estas células seleccionaría como diana alguna molécula de regulación génica, ya que sería menos probable que todos estos genes cromosómicamente distintos se deleccionaran o mutaran simultáneamente en varias líneas tumorales diferentes. Si un gen de este tipo está implicado en la diferenciación del linaje de melanocitos, o quizá el mantenimiento de un fenotipo menos maduro, la producción activa de MASA parece ser característica de melanomas negativas para antígenos.

Para expresar MITF-M en líneas celulares que expresan bajos niveles de Melan-A/MART-1, se amplificó la secuencia codificante de MITF-M a partir de células positivas para MITF-M y se clonó en un vector de expresión de promotor de SV40 (pSV2link); la traducción del inserto de MITF-M usa señales de iniciación Kozak óptimas (Kozak (1999). *Gene* 234:187). Se transfectaron los constructos en melanoma de baja expresión de Melan-A/MART-1 (MU-X y A375). En todos los estudios, los controles comprendían vector vacío, reactivos de transfección en ausencia de ADN añadido, y células no transfectadas correspondientes. Los datos mostrados en la figura 6 para células tumorales A375 y MUX transfectadas con MITF-M durante 24 horas en presencia (10 μ M) o ausencia de U0126 antes de la amplificación por PCR de Melan-A/MART-1.

Las líneas celulares MUX y A375 mostraron regulación por incremento de Melan-A/MART-1 endógeno tras transfección con el constructo de expresión MITF-M (figura 6). Entonces se añadió un inhibidor de MEK (U0126) para determinar si podría actuar de manera sinérgica con MITF-M introducido de forma ectópica. A este respecto, el gen MITF-M codificado por plásmido no está sujeto a los controles transcripcionales de MITF-M normales, puesto que U0126 modula por disminución el mensaje de MITF-M nativo.

La adición de U0126 aumentó la potenciación de la expresión de Melan-A/MART-1 en ambas líneas celulares tumorales A375 y MU-X transfectadas con MITF-M. Estos resultados indican que el control de la expresión de MITF-M también controlaría la expresión de Melan-A/MART-1.

EJEMPLO V

Este ejemplo describe datos que indican que la regulación por incremento de IFN- β de la expresión de antígenos asociados con melanocitos aumenta la destrucción por células T de células de melanoma.

Brevemente, se trataron células A375 con 100.000 unidades de IFN- β durante tres días. Posteriormente se marcaron las células con ^{51}Cr y se sometieron a prueba como dianas en un ensayo de citotoxicidad usando linfocitos T anti-melanoma en masa como las células efectoras (ejemplo I).

Tal como se muestra en la figura 7, la regulación por incremento de la expresión de antígenos inducida por IFN- β da como resultado células de melanoma que pueden destruirse por linfocitos T. Estos resultados demuestran que IFN- β puede aumentar la selección como diana de células tumorales por el sistema inmunitario.

EJEMPLO VI

Este ejemplo describe constructos recombinantes usados para examinar compuestos que efectúan la expresión de antígenos tumorales.

Para identificar otros compuestos que tienen el mismo efecto que el interferón-beta, pueden construirse constructos de ADN recombinantes que contienen una etiqueta de secuencia (por ejemplo, luciferasa, o proteína fluorescente verde (GFP) o una actividad enzimática) unida a un elemento regulador de Melan-A/MART-1 (por ejemplo, promotor) e insertarse en células de melanoma Melan-A/MART-1 (por ejemplo, una línea celular de baja expresión). Entonces pueden usarse líneas celulares transfectadas para examinar pequeños compuestos orgánicos y compuestos más grandes que tienen actividad biológica, por ejemplo, compuestos que regulan por incremento la expresión de Melan-A/MART-1, y otros antígenos.

Para la identificación de agentes moduladores de AAT, se construyó un indicador que incorpora la región promotora del antígeno de diferenciación del linaje de melanocitos Melan-A/MART-1 y la secuencia de etiqueta. El constructo a modo de ejemplo que incluye proteína fluorescente verde (GFP) se ilustra en la figura 8. Se han descrito previamente sistemas indicadores de GFP (Haseloff, (1999). *Methods Cell Biol* 58:139; Tsien (1998). *Annu Rev Biochem* 67:509; Chiesa *et al.* (2001). *Biochem J* 355:1; Belmont (2001). *Trends Cell Biol* 11:250).

Se han transfectado varias células de melanoma con constructos linealizados que expresan GFP a partir de un promotor de Melan-A/MART-1 extendido (1176 pb) y por separado con un constructo que expresa GFP por medio del promotor de SV40 (representado en la figura 8). Se seleccionaron transfectantes estables mediante cotransfección con un plásmido que confiere resistencia a Geneticin (G418). Los resultados de expresión de tales constructos se muestran en la figura 9.

Promotor de Melan-A/MART-1 (SEQ ID NO:26)

AGATCCTGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGTGAGTCTCCATCTC
 AGAAAAAAAAAATGTGTTTGGACCTAGTTATAATGATTTAAAATTCATGG
 TCCGACACCGCAATTACTTTTGCACCAACCTAATTGATGTCTAAGTAGGTC
 ATATTCTACCTGCAAAAAGAAAATTTTCATCTATCCCTTTCACATAGATGGA
 AACCCACTATCTCCAGTGGACAGTTAACACCAAAGGCATCACAGAGAAT
 CATGGAGCTCAGCTGAGGAGTTTCAGGGATTTTTCTATTTCCTTTTCTTG
 ATTATGAGAGTCTGGGACTAGATGCTCTCCAGACCTGTGCCTAAAGACTCT
 TCAACCCTTTGAGATGGAGATGAGGGAGGGAATAGGGAACCCAGTTTGT
 TTGGATTTGAGATCCTTTTGTGGGTCATAAGCGTGATGATTGGGTTTCCAT
 GTTCACGTGTGAGATATGCCTCCCTCAAACCTTGTACAATGACATGGGCA
 CCTTACCTATCTGACATGAGAAAAACAAATGTGGATTTTCAGATAAACAAA
 AAATAACTCTTTTAGTGTATATGTCCCATAGAATATGTGGACATATTTATC
 CTAAAAATATTGTATGGGACATAGTTGTATTAAGAAAACCTGTTTCATTGTTA
 TCTGAAGTTCAAATTTAACTGGGCATCCTCCTCAGCTGAGCTCCATGAGTT
 CTCTGTGATGCCTTTGGTGTAACTGTCCACTGGAGATAGTGGGTTTCCAT
 CTATGTGAAAGGGATAGATGAAATTTTCTTTTGCAGGTAGAATATGACCT
 ACTTAGACATCAATTAGGTTGGTGCAAAAGTAATTGTGGTGTCCGACCAT
 GAATTTTAAATCATTATAACTAGGCTCATGTCATATTTTATGTGACATGGC
 AATCCTATGGAGGGAGGGACCAAATTTAAAATAAATGGCTTCCCTAGGAT
 AGAGCACTGGGACTGGGAAAACAGAGGCCACAGTCAGCTGTGACTTTTT
 GAAGGAAGGAATAAAGTTGGTTTCTTTTCATGCCAATTTAGCAATTACAGA
 CGACCCCGTCAGAAATCTAAACCCGTGACTATCATGGGACTCAAACCCAG
 GAAAAAAAAATAAGTCAAAACGATTAAGAGCCAGAGAAGCAGTCTTCATA
 CACGCGGCCAGCCA

Secuencia codificante de GFP (SEQ ID NO:27)

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACGGGGTGGTGCCCATCCTGGT
 CGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAG
 GGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCAC
 CACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCT
 ACGGCGTGCAGTGCTTACGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAGC
 TTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC
 TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGG
 GCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
 GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACA
 ACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTC
 AAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTA
 CCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCCCCGACAACC
 ACTACCTGAGCACCTGCTCCGCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCG
 GATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGATCACTCTCGG
 CATGGACGAGCTGTACAAGTAA

Señal de poliA tardía de SV40 (SEQ ID NO:28)

CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAGTGAATG
 CAGTGAATAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTT
 GTAACCATATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCA
 TTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGTTTTTTAAAGCAAGTA
 AAACCTCTACAAATGTGGTA

Las secuencias anteriores son las partes funcionales relevantes del indicador transfectado en las líneas celulares apropiadas de manera que GFP puede expresarse a partir del promotor de Melan-A/MART-1 (en células con el aparato transcripcional correcto; es decir, células Melan-A/MART-1 "altas"). Se derivó un promotor MART "extendido" (1176 pb) a partir de la amplificación de ADN genómico humano con cebadores correspondientes a los extremos en 5' y 3' de la secuencia tal como se muestra. La secuencia de GFP ("EGFP") procede de un vector de Clontech. Está subrayado el codón de iniciación; el codón de terminación AAT al final de este segmento. Señal de poliA tardía de SV40: se usan ampliamente secuencias de SV40 y se conocen en la técnica. No están presentes secuencias intrónicas en el constructo.

10 Brevemente, se transfectaron células tanto con alta como baja expresión de antígenos, MM96L y A375, respectivamente, con el indicador de constructo recombinante Melan-A/MART-1-GFP a modo de ejemplo (figura 8). Tras la clonación de células que contienen el constructo, se estudió el efecto del interferón- β .

15 Las células indicadoras MM96L-Melan-A/MART-1-GFP tratadas con IFN- β durante 72 horas mostraron un aumento de fluorescencia de GFP (se muestra la emisión de GFP en la figura 9), en común con su gen Melan-A/MART-1 endógeno. Las células indicadoras A375 tratadas con IFN- β también mostraron un aumento de la fluorescencia de GFP. En cambio, la GFP dirigida por el promotor SV40 no presentó tal respuesta. Estos datos demostraron por tanto que los sistemas indicadores de GFP recapitulaban la regulación del gen Melan-A/MART-1 nativo. Un indicador dirigido por el sistema celular de la región reguladora de Melan-A/MART-1 es útil, por tanto, para examinar e
20 identificar compuestos, agentes y fármacos que regulan por incremento la expresión de antígenos.

Estos constructos indicadores pueden emplearse *in vivo*. Por ejemplo, pueden propagarse células tumorales por vía subcutánea en ratones inmunodeficientes, e inducirse con IFN- β *in vivo*. Los tumores pueden inyectarse directamente con reguladores por incremento de antígeno (por ejemplo, IFN- β , garantizando que existe fármaco local disponible. También pueden tratarse los ratones con IFN- β por vía subcutánea después del establecimiento de
25 células tumorales negativas para antígeno (tales como MU-X y A375). Realizando biopsias de sitios tumorales subcutáneos a intervalos regulares después de la terapia con IFN- β , puede desarrollarse un transcurso temporal para la inducción de antígeno. También puede estudiarse cualquier reversión de células tumorales a un estado negativo para antígeno después de la terminación de la terapia farmacológica. Además, puesto que están disponibles células T humanas que pueden reconocer y lisar tumores positivos para antígeno, las biopsias tumorales teñidas con anticuerpo contra CD3 humano pueden demostrar la infiltración alterada de CTL humanos transferidos de manera adoptiva después de la terapia de inducción de antígeno. En particular, observando el reclutamiento de células T en tumores que están expresando GFP, en oposición a los que son negativos para GFP, como demostración de antígeno tumoral inducido (Melan-A/MART-1). Los estudios que usan células tumorales transfectadas con GFP serán análogos a aquellos para las células no transfectadas descritas a continuación.
30
35

EJEMPLO VII

40 Este ejemplo describe aplicaciones *in vivo* de IFN- β y antígenos asociados a tumores (AAT). Este ejemplo también describe ensayos a modo de ejemplo para monitorizar el efecto de IFN- β solo y en combinación con AAT.

IFN- β es seguro y se tolera bien en pacientes ambulatorios, proporcionando por tanto un agente con tolerancias y toxicidades *in vivo* relativamente bien descritas. Combinando la terapia con IFN- β con antígenos asociados a tumores, se esperan tanto una inmunidad potenciada como una expresión de antígenos tumorales potenciada que conduce a una destrucción tumoral más efectiva *in vivo*. Se analizarán la inmunidad de células T y la expresión de antígenos tumorales durante la administración *in vivo*, y la correlación de respuestas clínicas con la inducción de células T específicas para antígenos tumorales, así como con la expresión de antígenos por los tumores, antes, durante y después de haberse instituido la terapia.
45

50 Xenoinjertos de tumores humanos en ratones permitirán la evaluación de la inducción *in vivo* de antígenos tumorales (por ejemplo, melanocito). Pueden coexistir células tumorales tanto positivas para antígeno como negativas para antígeno en tumores humanos que se han desarrollado espontáneamente a lo largo de un periodo de meses a años. La heterogeneidad tumoral no es fácilmente demostrable en modelos de trasplantes de tumores en los que los animales a los que se inyectan tumores tienen inherentemente una vida corta, y generalmente los tumores son clonalmente homogéneos durante el transcurso de los estudios. Por tanto, aunque los tumores en modelos animales pueden no reflejar de manera absoluta tumores en seres humanos, existen motivos convincentes para desarrollar modelos animales que emplean xenoinjertos de baja expresión de antígenos. Por ejemplo, el pronóstico para un paciente con melanoma con enfermedad metastásica establecida es bastante malo incluso con las agresivas terapias actuales, y el uso de inmunoterapias solas ha mostrado un éxito limitado incluso cuando se han empleado
55
60 regímenes de tratamiento bastante innovadores.

Los tratamientos de animales incluyen la combinación de antígeno tumoral multiepitópico (por ejemplo, melanocito) con terapia con IFN- β para inducir inmunidad potenciada del huésped frente a los tumores, o para mantener y aumentar la expresión de antígenos tumorales para potenciar el reconocimiento de células tumorales que podrían escapar de otro modo a la destrucción inmunitaria. Los criterios de valoración clínicos incluyen la evaluación tanto de
65

- la inmunidad del huésped como la expresión de antígenos tumorales, logrando una inmunidad mejorada del huésped (inmunidad celular y humoral sistémica e intratumoral; células T CD8⁺ específicas de Melan-A, MAGE-10 y NY-ESO-1b - medidas mediante el método de tetrámeros, células T CD8⁺ activadas específicas de Melan-A, MAGE-10 y NY-ESO-1b (que liberan interferón gamma) – medidas mediante ELISPOT; secuencia líder de DTH a tirosinasa, péptido de Melan-A, MAGE-10 y NY-ESO-1b; anticuerpos reactivos con NY-ESO-1, etc.) o inhibición del crecimiento tumoral o la destrucción tumoral (medición del tamaño tumoral) en pacientes con tumores, tales como melanoma; y toxicidades y acontecimientos adversos (tal como se definen por la Escala de Criterios de Toxicidad Comunes (CTC) del Instituto Nacional del Cáncer).
- 10 Los AAT usados son componentes de proteínas reconocidas por el sistema inmunitario autólogo en tumores tales como melanomas. Podría expresarse uno o más AAT en el tumor. Puede someterse a prueba la expresión de tirosinasa, Melan-A, NY-ESO-1, MAGE-10 y MAGE-10 en tejido tumoral mediante análisis por transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o inmunohistoquímica. Como todos los péptidos del estudio se presentan por HLA-A2, los pacientes que expresan HLA-A2 son candidatos al tratamiento.
- 15 Se ha observado inmunidad potenciada al antígeno Melan-A cuando se usa Montanide ISATM51 como adyuvante con péptido de Melan-A. Es probable que la adición de Montanide ISATM51 a AAT facilitados con o sin IFN-β conduzca a efectos beneficiosos clínicamente inmunológicos en pacientes con melanoma.
- 20 AAT, formulaciones y vías de administración a modo de ejemplo son los siguientes:
- Secuencia líder de tirosinasa: péptido de unión a HLA-A2 codificado por el gen de la tirosinasa; secuencia MLLAVLYCL (SEQ ID NO:2); posición 1-9
- 25 Formulación: secuencia líder de tirosinasa 333 µg/ml DMSO al 100%
- Dosis pretendida: 100 µg
- Tamaño de vial: vial de 1 ml con 0,45 ml de disolución de péptido
- 30 Vía de administración: intradérmica
- Fuente: LICR
- 35 ELA de Melan-A: análogo del péptido de unión a HLA-A2 codificado por el gen Melan-A; secuencia ELAGIGILTV (SEQ ID NO:23); posición 26-35 (E27L)
- Formulación: péptido 333 µg/ml en DMSO al 30% en solución salina tamponada con fosfato
- 40 Dosis pretendida: 100 µg
- Tamaño de vial: vial de 1 ml con 0,45 ml de disolución de péptido
- Vía de administración: intradérmica
- 45 Fuente: LICR
- MAGE-10.A: péptido de unión a HLA-A2 codificado por el gen MAGE; secuencia GLYDGMEHL (SEQ ID NO:24); posición 254-262
- 50 Formulación: polvo liofilizado
- Dosis pretendida: 300 µg
- 55 Tamaño de vial: vial de 1 ml con 400 µg de péptido
- Vía de administración: intradérmica
- Fuente: LICR
- 60 NY-ESO-1b: péptido de unión a HLA-A2 codificado por el gen NY-ESO-1; secuencia SLLMWITQC (SEQ ID NO:25); posición 157-165
- 65 Formulación: NY-ESO-1b 2 mg/ml en DMSO al 100%

Dosis pretendida: 100 µg

Tamaño de vial: vial de 1 ml con 0,3 ml de disolución de péptido

5 Vía de administración: intradérmica

Fuente: LICR

Montanide ISA-51

10 Formulación: oleato de montanide (Montanide 80) en disolución en aceite mineral (Drakeol 6VR)

Dosis pretendida: 1,0 ml

15 Tamaño de vial: 3 ml

Vía de administración: subcutánea

Fuente: SEPPIC, París, Francia

20

Interferón β

Rebit® 22 ug (6 x 106 U.I.)/vial Serono, Rockland, MA

25 Los criterios de inclusión de pacientes a modo de ejemplo incluyen uno o más de los siguientes, por ejemplo, confirmación de melanoma metastásico; positivo para HLA-A2; melanoma de estadio IV con recidiva, con lesiones que pueden researse o son accesibles para biopsia; al menos 4 semanas desde la cirugía antes de iniciar el protocolo; al menos 4 semanas desde la última quimioterapia, terapia biológica o inmunoterapia; sin terapia biológica o inmunoterapia concurrente; estado funcional >70 (escala de Kamofsky); y esperanza de vida ≥ 4 meses.

30

Los valores de laboratorio a modo de ejemplo de pacientes candidatos pueden estar dentro de los siguientes límites:

Hemoglobina	≥ 9,0 g/dl
	≥ 10,0 g/dl (si < 50 kg)
Recuento de neutrófilos	≥ 1,5 x 10 ⁹ /l
Recuento de leucocitos	≥ 0,5 x 10 ⁹ /l
Recuento de plaquetas	≥ 100 x 10 ⁹ /l
Creatinina sérica	≤ 1,8 mg/dl
Bilirrubina sérica	≤ 2 mg/dl

35 Los criterios de exclusión de pacientes a modo de ejemplo opcionales incluyen uno o más de los siguientes, por ejemplo, enfermedad cardíaca clínicamente significativa (clase III o IV de la NYHA); dolencias graves, por ejemplo, infecciones graves que requieren antibióticos, trastornos hemorrágicos; trasplante previo de médula ósea o células madre; historia de enfermedad de inmunodeficiencia o enfermedad autoinmunitaria; enfermedad metastásica en el sistema nervioso central, excepto tratada y estable; positivo para VIH; quimioterapia, radioterapia o inmunoterapia en el plazo de 4 semanas antes de la entrada al estudio (6 semanas para nitrosoureas); tratamiento concomitante con esteroides, fármacos antihistamínicos o fármacos antiinflamatorios no esteroideos (excepto que se usen en dosis bajas para la prevención de un acontecimiento cardiovascular agudo o para el control del dolor) – se permiten esteroides tópicos o mediante inhalación; participación en otro ensayo clínico en el plazo de 4 semanas antes del reclutamiento; embarazo o lactancia; mujeres en edad de procrear que no usan un medio de anticoncepción médicamente aceptable; la no disponibilidad del paciente para la evaluación de seguimiento inmunológica y clínica.

45

Para melanoma, un protocolo a modo de ejemplo emplea uno o más de cuatro péptidos AAT (vacuna peptídica para melanoma) que comprende una secuencia líder de tirosinasa, Melan-A ELA, MAGE-10.A2 y NY-ESO-1b. Se administrará(n) péptido(s) mediante inyección subcutánea cada 3 semanas para seis vacunaciones. Se mezclarán los péptidos junto con Montanide ISA-51 y se administrarán en sitios de inyección separados. Además, se aleatorizarán los pacientes para recibir o no recibir IFN-β mediante inyección subcutánea, 3 veces a la semana (L, X V) (6 millones de unidades por inyección de IFN-β) durante cada una de las tres semanas entre los refuerzos de vacuna, comenzando en la semana 7 (es decir, con la tercera inyección de vacuna). Este protocolo permitirá que se inicien respuestas inmunitarias primaria y secundaria temprana antes de introducir un agente que es improbable que altere las respuestas inmunitarias de fase efectora, pero que podría alterar el repertorio de citocinas durante la inducción por la vacuna inicial de inmunidad antitumoral. Esperar a que se desarrolle una respuesta inmunitaria

50

55

temprana minimiza el tiempo que ha de seleccionarse para tumores resistentes a IFN antes de que la respuesta inmunitaria se haya potenciado lo suficiente como para destruir tumores que tienen una expresión de antígenos regulada por incremento.

- 5 Pueden monitorizarse los pacientes para determinar la toxicidad después de cada vacuna e inyección de IFN- β . Puede someterse a ensayo la inmunidad sistémica usando muestras de sangre que han de obtenerse en el nivel inicial y en puntos de tiempo especificados, para la evaluación de anticuerpos específicos de péptido mediante ELISA, así como células T CD8⁺ específicas de péptido mediante el análisis de tetrámeros y ELISPOT. Se medirá la
10 reacción cutánea de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) específica de péptido en el nivel inicial y tras el tercer y el sexto conjunto de inyecciones de péptido. Si se producen reacciones de DTH en otros puntos de tiempo, se medirán. Se obtendrán muestras de tejido de una lesión metastásica en el nivel inicial y al menos una vez tras dos ciclos de tratamiento con interferón β para la evaluación de la expresión de antígenos. Se realizarán pruebas adicionales para determinar la inmunidad celular y humoral específica de péptido dos semanas después del sexto conjunto de inyecciones de péptido. Se tomarán mediciones de bioquímica y hematología clínica en el nivel inicial, y
15 tal como se especifica en el esquema del protocolo. Se evaluará el estado de enfermedad en el nivel inicial y dos semanas después del sexto conjunto de inyecciones de péptido.

Siempre que estén disponibles depósitos tumorales accesibles, y puedan realizarse biopsias, o extirparse con un mínimo riesgo para los pacientes que estén tratándose, se investigarán tanto la histología e inmunidad
20 intratumorales como la expresión de antígenos en células tumorales. Se realizarán 3 tipos de pruebas siempre que esté disponible suficiente tejido para permitir los siguientes ensayos:

Histología y expresión de antígenos en células tumorales: Se realizará una histología rutinaria para evaluar la necrosis tumoral y el estado de linfocitos infiltrantes. También se teñirán secciones de tejido tumoral para detectar la
25 expresión de los antígenos para determinar tanto la intensidad como la heterogeneidad en la expresión de antígenos, particularmente con respecto a cualquier lesión en regresión o progresión. Además de la evaluación de las respuestas inmunitarias del tumor y el huésped, se llevará a cabo el análisis mediante imágenes de la expresión de antígenos tumorales y muestras de microdissección para la amplificación de ARNm para el análisis de PCR cuantitativo en tumores antes y después de la terapia.
30

Análisis de imágenes: Para evaluar la expresión potenciada de antígeno de melanocitos y CMH, se teñirán biopsias con anticuerpos contra antígenos HLA de clase I y II, ya que debe haber un aumento en la expresión del CMH si las células tumorales responden a IFN- β . En paralelo, se teñirán los tejidos con anticuerpos contra los antígenos
35 asociados a tumor (Melan-A, tirosinasa, NY-ESO y MAGE-10). Tanto la tinción con inmunoperoxidasa como la tinción con anticuerpos con etiqueta fluorescente de FITC se realizarán para adquirir datos cuantitativos sobre los niveles de expresión de antígenos en el tejido en su totalidad, y las células tumorales individualmente.

Análisis molecular de células tumorales individuales presentes en biopsias tras la terapia: Además de técnicas histológicas convencionales, usando tecnología de microdissección con captura láser, se evaluarán células tumorales
40 individuales para determinar la expresión de una mayor serie de antígenos asociados a melanocitos y factores de transcripción para determinar no sólo qué antígenos de vacuna se expresan, sino también para determinar si existe una expresión más sistemática de antígenos de linaje de melanocitos adicionales que es más propicia para la selección como diana en tratamientos posteriores. La inclusión de los siguientes genes (tabla 2) permitirá la evaluación de protocolos de inmunoterapia mejorados si antígenos adicionales demuestran ser más propicios para
45 la expresión homogénea o bien con o bien sin la inducción adicional por IFN- β . Además de la elección de genes que codifican para los antígenos de vacuna y HLA-A2, se realiza la selección de los genes del panel basándose en su relevancia con respecto al linaje melanocítico, el papel conocido en el control de la expresión génica melanocítica, la relevancia con respecto a la respuesta de IFN- β , y como marcadores de control.

A nivel de la célula individual, pueden evaluarse correlaciones entre niveles de ARNm expresados a partir de genes de antígenos y los expresados a partir de genes de factores de transcripción elegidos durante el transcurso del
50 tratamiento. MITF-M está fuertemente asociado con el control de la expresión de varios antígenos melanocíticos incluyendo tirosinasa y Melan-A/MART-1. SOX10 es un factor de transcripción que regula a su vez MITF-M, y que no se expresa en algunas de las líneas celulares con baja expresión de antígenos. Los interferones de tipo I (incluyendo IFN- α y IFN- β) usan un receptor común compuesto por dos subunidades. Se realizará el examen de la expresión de
55 otros genes de antígenos además de los incluidos en la preparación de vacuna ya que la expresión de los antígenos melanocíticos está regulada de manera coordinada. La regulación por incremento o disminución de Melan-A/MART-1, por ejemplo, está correlacionada a menudo con un cambio correspondiente en la expresión de TRP-1, TRP-2 y gp100.
60

La evaluación de material de biopsia de pacientes tratados para determinar qué antígenos se expresan todavía, y cuáles están potenciados por IFN- β ayudará a evaluar la heterogeneidad tumoral, y de manera más importante, la homogeneidad de la expresión de antígenos que puede utilizarse para la identificación de dianas que harán que la
65 inmunoterapia sea un enfoque más satisfactorio.

Tabla 2. Genes a modo de ejemplo que van a evaluarse para determinar la expresión en células tumorales.

Clasificación del gen	Nombre del gen
Antígenos en la vacuna	Melan-A, tirosinasa, MAGE1-A2, NY-ESO-1b
HLA	HLA-A2
Otros antígenos asociados a melanoma	TRP1, TRP2, gp100 (pmel 17)
Factores de transcripción asociados a melanoma	MITF-M, SOX10
Receptor de IFN de tipo I	IFNAR-1, IFNAR-2
Otros marcadores	MITF-A, β -actina

La química TaqMan y la instrumentación apropiada permiten el análisis de PCR cuantitativo riguroso de los niveles de ARNm de dianas moleculares deseadas, y se ha aplicado a análisis de células individuales. Para obtener información referente a la expresión de un panel de marcadores, algunos de los cuales pueden estar en un bajo número de copias por célula individual, se realizará una etapa de amplificación de cada fuente de ARNm de células individuales, en la que es crítico que una etapa de este tipo conserve de manera fiel la abundancia relativa de cada especie dentro del transcriptoma de ARNm. Con células individuales o en número bajo, la amplificación mediada por ARN polimerasa de T7 mediante la generación de transcritos de ARN complementarios (ARNc) (Eberwine. (1996). *Biotechniques*, 20: 584; Luo, *et al.*, (1999). *Nat Med*, 5:117; y Abe, *et al.*, (2003). *J Hum Genet*, 48:142) puede generar transcritos largos *in vitro* (Riechmann, *et al.*, (1990). *Virology*, 177:710; Puurand, *et al.*, *Virus Res*, 40:135,1996; y Shi, *et al.*, (2002). *J Virol*, 76:5847), bastante en exceso con respecto a los ARNm de MITF. Después de la amplificación mediada por polimerasa de T7, los ARNc resultantes se someten a transcripción inversa con hexámeros aleatorios para el posterior análisis de TaqMan Q-PCR.

Los genes “de mantenimiento” usados comúnmente para fines de normalización en una variedad de estudios basados en expresión (β -actina, GAPDH) se han indicado como problemáticos para los estudios basados en tejidos y de células individuales. Por tanto, se añadirá un patrón interno en adiciones conocidas sintetizado previamente en los ensayos, en forma de un ARNm que no es de mamífero sustituto (luciferasa) generado mediante transcripción *in vitro*. Esto se logra clonando la secuencia codificante de la luciferasa en el vector de Promega Corp. pSP64polyA, y preparando transcritos de transcripción *in vitro* (run-off) de poliA+ con polimerasa SP6. Se digiere el molde de plásmido con ADNasa libre de ARNasa, se purifican los transcritos de ARN mediante tres ciclos de precipitación con acetato de amonio, se cuantifican espectrofotométricamente y se someten a prueba en gel para determinar la integridad de longitud completa. Si es necesario, se purificarán las especies de longitud completa mediante escisión de la banda de gel correcta y extracción de agarosa. Se añadirá una cantidad equivalente a 100 copias de ARN de luciferasa poliA+ a cada lisado celular antes de la transcripción inversa inicial, síntesis de ADNc de segunda hebra y posterior amplificación mediante polimerasa de T7 de ARNc. En consecuencia, la detección del patrón interno introducido (con su propio sistema Taqman de sonda / cebador específico) tendrá requisitos enzimáticos idénticos que para los propios ARNm celulares. Entonces se expresarán los niveles de cada gen diana en el panel anterior como razones con respecto a los niveles del patrón introducido. Se incluye β -actina (ARNm de alta abundancia) y MITF-A (ARNm de abundancia moderada a baja) en el panel de genes para el análisis de células individuales (tabla 2) como controles ampliamente expresados para confirmar que los propios ARNm endógenos para cada aislado celular están intactos. La normalización usará de manera más precisa el patrón de ARNm sustituto introducido.

Además de analizar la inmunidad representada en los linfocitos circulantes en la sangre, se teñirán los linfocitos intratumorales con tetrámeros para determinar la frecuencia de células T CD8+ específicas de péptido presentes dentro del tejido tumoral. Además, cultivando pequeños fragmentos de tumor en presencia de interleucina 2, pueden estudiarse adicionalmente grandes números de linfocitos de infiltración tumoral activados *in vivo* para determinar la actividad citotóxica frente a dianas tumorales (Hishii, *et al.*, (1997). *Proc. Natl. Acad Sci (USA)*, 94:1378; Ramirez-Montagut, *et al.*, (2000). 119:11; Kradin, *et al.*, (1989). *Lancet*, 1:577; Hishii, *et al.*, (1999). *Clin Exp Immunol*, 116:388; y Pandolfi, *et al.*, (1991). *Cancer Res.*, 51:3164) del mismo paciente cuando estén disponibles, y de líneas celulares con HLA-A2 coincidente si no está disponible una diana tumoral autóloga. La evaluación funcional de la actividad citotóxica complementará los ensayos de tetrámeros, lo que proporcionará una indicación de la frecuencia de células positivas para receptor de células T con especificidad por los antígenos de vacuna tumorales. Estos estudios indicarán si los AAT administrados con IFN- β , aumentan la inmunidad tumoral local para una inmunoterapia tumoral satisfactoria.

Aunque se anticipa que habrá una cantidad de heterogeneidad de antígenos tumorales en las biopsias tumorales, tanto células tumorales positivas para antígeno como deficientes en antígeno pueden mostrar una expresión de antígenos tumorales potenciada después del tratamiento con IFN- β . La evaluación de la capacidad del tumor para regular por incremento tanto antígenos de linaje de melanocitos como antígenos HLA revelará si depósitos tumorales individuales contienen células tumorales que responden a IFN. En el caso en que las células tumorales no muestran inducción de antígeno, se esperaría que la posibilidad de que se pierdan receptores de IFN, o se pierdan elementos de respuesta a IFN limite la eficacia de la terapia de regulación por incremento de antígenos.

La terapia combinada (por ejemplo, IFN-beta y AAT) potenciará las respuestas clínicas en pacientes con tumor (por ejemplo, melanoma) mediante la expresión de antígenos potenciada, inmunidad mediada por células mejorada y destrucción de células tumorales con expresión de antígenos. En la medida en que el tumor permanece tras la
 5 terapia, la evaluación de la expresión de antígenos tumorales y la respuesta inmunitaria del huésped *in situ* permitirá refinamientos en el protocolo de tratamiento. Por ejemplo, si existe una pérdida de expresión de AAT que está presente en la vacuna, pero la retención de otros AAT en las células tumorales, puede realizarse una administración de seguimiento usando diferentes AAT que pueden seleccionar como diana las células T. Además, si AAT no representados en la vacuna original se regulan por incremento con IFN- β , las administraciones futuras pueden incluir
 10 tales AAT que responden a la regulación por incremento.

Procesamiento y análisis de tejidos: Para el procesamiento de muestras tisulares, la microdissección por captura láser (MCL) ha surgido como una técnica revolucionaria para el análisis genético, que combina microscopía precisa con obtención de perfiles de expresión molecular a nivel de células individuales (Emmert-Buck, *et al.*, (1996).
 15 Science, 274:921; Schutze y Lahr, (1998). Nat Biotechnol, 16:737; Sgroi, *et al.*, (1999). Cancer Res, 59:5656; Miura, *et al.*, (2002). Cancer Res, 62:3244; De Preter, *et al.*, (2003). Cancer Lett, 197:53; y Fend y Raffeld, (2000). J Clin Pathol, 53:666). Se aplicará el mismo esquema de procesamiento al análisis de células individuales de muestras archivadas de muestras de tumores resecados primarios de cada uno de los pacientes en el estudio. Pueden usarse materiales incluidos en parafina conservados como fuentes de tal material por medio de microdissección por captura
 20 láser.

Para cada paciente, se obtendrán 20 aislados de células individuales mediante MCL de muestras de biopsia con características morfológicas de células tumorales de melanoma. Posteriormente, con el procedimiento descrito anteriormente, se realizará PCR fluorogénica cuantitativa con la química TaqMan tal como se ha descrito (Xiang, *et al.*, (2001). Immunol Cell Biol, 79:472) usando determinaciones por triplicado en cada caso. Para mejorar la
 25 velocidad de selección y por motivos de economía, se empleará el formato de placa de 384 pocillos ahora disponible con la instrumentación TaqMan. Se diseñarán los cebadores y las sondas con el software PrimerExpress, con los cebadores situados de manera que abarquen intrones grandes si es posible (esto es factible en todos los casos). En cualquier caso, debido a la etapa de amplificación de ARNc, es improbable que la cantidad mínima de ADN genómico a la que contribuye la célula diana original sea un factor de confusión para el análisis de la expresión. Los estudios preliminares definirán concentraciones de sonda óptimas para cada combinación de cebador/sonda. Además, se realizará el trabajo preliminar para determinar la sensibilidad del ensayo que puede lograrse con la amplificación de ARNc en esas condiciones. En términos prácticos, esto significa la cantidad de ARNc sometido a
 30 transcripción inversa total necesario para una Q-PCR precisa. Puesto que puede lograrse fácilmente una amplificación de >1000 veces con la ARN polimerasa de T7 incluso en una sola tanda (Eberwine, (1996), citado anteriormente), es improbable que haya limitaciones con respecto a las cantidades de ARNc diana amplificado.

Modelos de ratón: Los modelos de tumores murinos, desarrollados en un ratón inmunodeficiente, proporcionarán un sistema para desarrollar o evaluar ensayos para monitorizar el ensayo clínico humano así como pruebas de la
 40 eficacia de IFN- β para regular por incremento la expresión de antígenos *in vivo*. Este trabajo proporcionará una oportunidad para la comparación de las respuestas tanto en el ensayo clínico con seres humanos como en el modelo de ratón *in vivo*.

Se propagarán líneas celulares tumorales humanas en cultivo y se implantarán en ratones deficientes en *rag 2* (*rag-2^{-/-}*). Cuando se exponen ratones *rag2^{-/-}* a 1×10^6 células de melanoma, son aparentes tumores palpables en el plazo de 2 semanas y estos tumores alcanzan un área aproximada de 200 mm² en el plazo de 4 semanas. Brevemente, se
 45 inyectará a ratones *rag^{-/-}* en el espacio s.c 1×10^6 células de melanoma. Cuando los tumores alcanzan un tamaño de 100 mm², se asignarán aleatoriamente los ratones a grupos de 5 para el tratamiento. Se tratarán los animales "control" con una inyección de diluyente de compuesto. Se tratarán los animales "del protocolo" con compuestos usando dosis ampliables a escala que reflejan los informes previos (Clemons, *et al.*, (2002). Pancreas, 25:251) (se monitorizarán los niveles séricos de IFN- β mediante ELISA). Se continuará con los tratamientos cada dos días durante una semana. Cada dos días durante 7 días, se sacrificarán ratones y se extirparán y se analizarán los tumores. Se disociará cada tumor usando disoluciones de colagenasa y dispasa. Se usarán la suspensión de célula individual resultante para análisis mediante citometría de flujo o PCR de la expresión de antígenos como con las
 50 células cultivadas *in vitro*. Cada conjunto de estudios se repetirá dos veces.

Se someterán células tumorales con alta y baja expresión de antígenos, MU y MU-X, cultivadas en ratones individuales, a biopsias con aguja fina para proporcionar células para experimentación inmunohistoquímica y PCR de células individuales. Se evaluará la expresión de ARNm para los genes enumerados en la tabla 2 mediante el
 60 procedimiento de Q-PCR de células individuales tal como se describió anteriormente.

Se usarán modelos de ratón inmunodeficiente para evaluar la capacidad de agentes potenciadores de antígeno para regular por incremento la expresión de antígenos tumorales *in vivo*. Se evaluará *in vivo* la inducción de múltiples antígenos observada en células de melanoma humanas *in vitro*. Se determinará la biodisponibilidad de IFN- β en
 65 modelos de tumores de animales, usando dosis de agentes reguladores por incremento de antígenos que serán inferiores a la dosis letal para el ratón. Pueden hacerse crecer ambas células tumorales MU y MU-X en ratones

inmunodeficientes en sitios subcutáneos (Fukumura, *et al.*, (1995). Cancer Res, 55:4824). Estos estudios permitirán refinamientos en el ensayo clínico con seres humanos descrito anteriormente, en cuanto a la inmunohistoquímica y la evaluación mediante rtPCR de células individuales de la expresión de antígenos.

5 Se describe a continuación un protocolo de eficacia de dosificación típico para comparar la respuesta de células tumorales positivas para antígeno (MU) y negativas para antígeno (MU-X). En cada caso, se teñirán los tumores con anticuerpos contra Melan-A/MART-1 (A103), gp100/pme117 (HMB45) y antígeno HLA de clase I (W6/32). Además, se extraerá el ARN para la evaluación mediante PCR de la inducción de ARNm para estos y otros antígenos de linaje de melanocitos.

10 120 animales en total por estudio:

15 animales que sólo reciben tumor MU-X y a los que se les inyecta solución salina sólo en el día 0. Se extirpará el tumor diariamente de 5 animales para el ensayo *in vitro* de la expresión de antígenos en los días 1, 3 y 7.

15 *45 animales que reciben tumor MU-X seguido por inyección intravenosa de IFN-β en el día 0 a 3 niveles de dosificación (10, 100, y 1000 U.I./g de peso del animal). Se extirpará el tumor de 5 animales en cada grupo de dosificación para el ensayo *in vitro* de la expresión de antígenos en los días 1, 3 y 7.

20 15 animales que reciben sólo tumor MU y a los que se les inyecta solución salina sólo en el día 0. Se extirpará el tumor diariamente de 5 animales para el ensayo *in vitro* de la expresión de antígenos en los días 1, 3 y 7.

25 *45 animales que reciben tumor MU seguido por inyección intralesional de IFN-β humano en el día 0 a 3 niveles de dosificación (10, 100, y 1000 U.I./g de peso del animal). Se extirpará el tumor de 5 animales en cada grupo de dosificación para el ensayo *in vitro* de la expresión de antígenos en los días 1, 3 y 7.

Lista de secuencias

30 <110> CytoCure, LLC
DURDA, PAUL
KURNICK, JAMES T.

<120> MÉTODOS PARA LA REGULACIÓN POR INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS EN TUMORES

35 <130> 027823-0305802

<140> TBA
<141> Con el presente documento

40 <150> Documento 60/407.492
<151> 29-08-2002

45 <160> 28
<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 9
50 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> MISC_FEATURE
55 <223> aminoácidos del péptido de Melan-A/MART-1

<400> 1

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5

60 <210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> péptido de unión a HLA-A2 codificado por el gen de la tirosinasa
 5
 <400> 2

Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu
1 5
 10 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Péptido derivado de tirosinasa
 <400> 3
 20 **Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val**
1 5
 <210> 4
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <223> Péptido derivado de MAGE-3
 <400> 4

Glu Asx Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
1 5
 35 <210> 5
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador sentido directo
 45 <400> 5

 caagatgccca agagaagatg ctact 26
 50 <210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <223> Cebador antisentido inverso
 <400> 6
 60 gcttgcatTT ttctacacc attcca 26
 <210> 7

<211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador sentido directo
 <400> 7
 10 gagatcactg cctggcacc ca 22
 <210> 8
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <223> Cebador antisentido inverso
 <400> 8
 gctccaaccg actgctgtca cttcac 27
 25 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador sentido directo
 35 <400> 9
 ctgattggtg caaatgcctc cttct 25
 <210> 10
 40 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 45 <221> misc_feature
 <223> Cebador antisentido inverso
 <400> 10
 50 aggaagtgct tgttcctcc atcca 25
 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 55 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador sentido directo
 60 <400> 11
 cagcccagca tcattttct cctct 25
 65 <210> 12
 <211> 22

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 5 <221> misc_feature
 <223> Antisentido inverso

 <400> 12

 10 gcagtgagga cggcccctac ca 22

 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cebador sentido directo
 20
 <400> 13

 tgttgcccag acctgtcccc t 21

 25 <210> 14
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Cebador antisentido inverso

 <400> 14
 35
 gcaacatttc ctgcatgtct ttctcca 27

 <210> 15
 <211> 24
 40 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> misc_feature
 45 <223> Cebador sentido directo

 <400> 15

 cctagtgaac aaggagtgct gcc 24
 50
 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador antisentido inverso

 <400> 16
 60
 cgctggagat ctcttccag acacaac 27

 <210> 17
 65 <211> 24
 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <223> Cebador sentido directo
 <400> 17
 tctctcactg gattggtgcc acct 24
 10
 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador antisentido inverso
 20 <400> 18
 catgcctggg cactcgctct ct 22
 <210> 19
 25 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <223> Cebador sentido directo
 <400> 19
 35 ccaagcctcc gataagctcc tcca 24
 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> misc_feature
 <-223> Cebador antisentido inverso
 45 <400> 20
 catgcctggg cactcgctct ct 22
 50 <210> 21
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador sentido directo
 <400> 21
 60 tgaaggtcgg agtcaacgga ttggt 26
 <210> 22
 <211> 23
 65 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador antisentido inverso
 5
 <400> 22

 ctgcaaatga gccccagcct tct 23
 10 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptidos artificiales de *Homo sapiens*

 <400> 23

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
 20 1 5 10

 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptidos artificiales de *Homo sapiens*
 30 <400> 24

Gly Leu Tyr Asp Gly Met Glu His Leu
 1 5

 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptidos artificiales de *Homo sapiens*
 40 <400> 25

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5
 45
 <210> 26
 <211> 1175
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Promotor de Melan-A/MART-1
 55 <400> 26

ES 2 399 749 T3

```

agatcctgcc actgcactcc agcctgggcg acagagtgag tctccatctc agaaaaaaaa 60
aatgtgtttg agcctagtta taatgattta aaattcatgg tccgacaccg caattacttt 120
tgcaccaacc taattgatgt ctaagtaggt catattctac ctgcaaaaag aaaatttcat 180
ctatcccttt cacatagatg gaaaccact atctccagtg gacagttaac accaaaggca 240
tcacagagaa ctcatggagc tcagctgagg aggtttcagg gatttttcta tttccttttc 300
ttgattatga gagtctggga ctagatgctc tccagacctg tgcctaaaga ctottcaacc 360
ctttgagatg gagatgaggg agggaatagg gaaccacagt tagtttggat ttcagatcct 420
tttgtgggtc ataagcgtga tgattgggtt tccatgttca cgtgtgagat atgcctcctc 480
caaaccttgt tacaatgaca tgggcacctt acctatctga catgagaaaa acaaattgtg 540
atctcagata acaaaaaat aactctttta gtgtatatgt cccatagaat atgtggacat 600
atctatccta aaaatattgt atgggacata gttgtattaa gaaactgttc attgtttatc 660
tgaagttcaa atttaactgg gcatcctcct cagctgagct ccatgagttc tctgtgatgc 720
ctttggtgtt aactgtccac tggagatagt gggtttccat ctatgtgaaa gggatagatg 780
aaattttctt tttgcaggta gaatatgacc tacttagaca tcaattaggt tggtgcaaaa 840
gtaattgtgg tgtcggacca tgaattttaa atcattataa ctaggctcat gtcataatct 900
atgtgacatg gcaatcctat ggaggagggg ccaacattta aaataaatgg cttccctagg 960
atagagcact gggactgggg aaaacagagg ccacagtcag ctgtgacttt ttgaaggaag 1020
gaataaagt ggtttctttc atgccaattt agcaattaca gacgaccccg tcagaaatct 1080
aaaccctgta ctatcatggg actcaaaacc aggaaaaaaaa ataagtcaaa acgattaaga 1140
gccagagaag cagtcttcat acacgcggcc agcca 1175

```

<210> 27

<211> 720

5 <212> ADN

<213> Bacterias

<220>

<221> misc_feature

10 <223> Secuencia codificante de GFP

<400> 27

ES 2 399 749 T3

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctcgtgacca cctgaecta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcagcact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcacaaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca ccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720

<210> 28
 <211> 222
 5 <212> ADN
 <213> Viral

<220>
 <221> misc_feature
 10 <223> Señal de poliA tardía de SV40

<400> 28

cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120
 ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatggt tcaggttcag ggggaggtgt 180
 gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg ta 222

REIVINDICACIONES

- 5 1. Agonista del receptor de interferón-β (IFN-β) y antígeno asociado a tumor (AAT) para su uso en el tratamiento de un melanoma en un sujeto, siendo el agonista del receptor de IFN-β un polipéptido, y consistiendo el polipéptido en beta-interferón-1a humano recombinante o beta-interferón-1b humano recombinante.
- 10 2. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según la reivindicación 1, en el que el sujeto experimenta, tras el tratamiento, un aumento de la respuesta inmunitaria frente al melanoma que está mediado por células o es humoral.
- 15 3. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo el AAT un antígeno cuya expresión cambia durante el desarrollo, la diferenciación o en respuesta a un estímulo.
- 20 4. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, debiendo administrarse el AAT antes de, sustancialmente de manera contemporánea a o después de la administración del agonista del receptor de IFN-β.
- 25 5. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según la reivindicación 4, debiendo administrarse el AAT una vez o múltiples veces al sujeto hasta seis meses antes de administrar el agonista del receptor de IFN-β.
- 30 6. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según la reivindicación 5, debiendo administrarse el AAT al sujeto 1-3 horas, 3-6 horas, 6-12 horas, 12-24 horas, 24-48 horas, 1-3 días, 3-5 días, 5-7 días, 7-10 días, 10-14 días, 14-30 días o 1-6 meses antes de administrar el agonista del receptor de IFN-β.
- 35 7. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, comprendiendo el AAT un AAT de melanoma.
- 40 8. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, formulándose el agonista del receptor de IFN-β y el AAT en una composición farmacéutica.
- 45 9. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprenden además el uso de una terapia antitumoral.
- 50 10. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según la reivindicación 9, comprendiendo la terapia antitumoral resección quirúrgica, radioterapia o quimioterapia.
- 55 11. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según la reivindicación 1 a 10, estando el AAT presente sobre o en una célula.
- 60 12. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el melanoma comprende un melanoma en estadio I, II, III o IV.
13. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprenden además el uso de un anticuerpo o una célula que produce un anticuerpo que se une específicamente al AAT.
14. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprenden además el uso de una célula inmunitaria que interacciona con una célula de melanoma del melanoma.
15. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según la reivindicación 13, comprendiendo la célula que tiene que administrarse que produce un anticuerpo que se une específicamente al AAT una célula plasmática, célula B o una célula de mamífero o que no es de mamífero transfectada con un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo que se une específicamente al AAT.
16. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según la reivindicación 14, comprendiendo la célula inmunitaria una célula T, una célula NK, una célula LAK, un monocito o un macrófago.
17. Agonista del receptor de IFN-β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprenden además un agente de potenciación inmunitaria que debe administrarse.
18. Agonista del receptor de interferón-β (IFN-β) y anticuerpo o célula que produce un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno asociado a tumor (AAT) para su uso en el tratamiento de un melanoma en un sujeto, siendo el agonista del receptor de IFN-β un polipéptido, y consistiendo el polipéptido en beta-interferón-1a humano recombinante o beta-interferón-1b humano recombinante.

19. Agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula para su uso según la reivindicación 18, comprendiendo la célula que produce un anticuerpo que se une específicamente a un AAT una célula plasmática, célula B o célula de mamífero o que no es de mamífero transfectada con un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo.
- 5 20. Agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula para su uso según la reivindicación 18 ó 19, debiendo administrarse el anticuerpo o la célula antes de, sustancialmente de manera contemporánea a, o después de la administración del agonista del receptor de IFN- β .
- 10 21. Agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula para su uso según la reivindicación 18 ó 19, formulándose el agonista del receptor de IFN- β y el anticuerpo o la célula en una composición farmacéutica.
22. Agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso en el tratamiento de un melanoma en un sujeto, siendo el agonista del receptor de IFN- β un polipéptido; consistiendo el polipéptido en beta-interferón-1a humano recombinante o beta-interferón-1b humano recombinante; e interactuando la célula inmunitaria con una célula de melanoma del melanoma.
- 15 23. Agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según la reivindicación 22, comprendiendo la célula inmunitaria una célula T, una célula NK, una célula LAK, un monocito o un macrófago.
- 20 24. Agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según la reivindicación 22 ó 23, habiéndose preseleccionado la célula inmunitaria para unirse a un antígeno expresado por el melanoma.
- 25 25. Agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, debiendo administrarse la célula inmunitaria antes de, sustancialmente de manera contemporánea a, o después de la administración del agonista del receptor de IFN- β .
- 30 26. Agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, formulándose el agonista del receptor de IFN- β y la célula inmunitaria en una composición farmacéutica.
- 35 27. Agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, seleccionándose el AAT del grupo que consiste en: Melan-A/MART-1, tirosinasa, gp100/pmel 17, TRP-1, TRP-2, un MITF, MITF-A, MITF-M, GP75 de melanoma, anexina I, anexina II, proteína de unión a adenosina desaminasa (ADAAbp), PGP 9.5, antígeno asociado a cáncer colorrectal (CRC)--C017-1A/GA733, Ab2 BR3E4, CI17-1A/GA733, Hsp70, Hsp90, Hsp96, Hsp105, Hsp110, HSPPC-96, proteína de estrés gp96 (un antígeno de rechazo de tumor de cáncer colorrectal humano), péptido celular asociado a gp96, G250, dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), mamoglobina, tiroglobulina, STn, antígeno carcinoembrionario (CEA), epítipo CAP-1 del antígeno carcinoembrionario (CEA), epítipo CAP-2 del antígeno carcinoembrionario (CEA), etv6, am11, antígeno específico de próstata (PSA), epítipo de PSA PSA-1, epítipo de PSA PSA-2, epítipo de PSA PSA-3, Ad5-PSA, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), fosfatasa ácida prostática (PAP), factor de transcripción Ets derivado de epitelio de próstata (PDEF), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTH-rP), EGFR, PLU1, receptor de laminina inmadura del antígeno oncofetal (OFA-iLR), MN/CA IX (CA9), HP59, citocromo oxidasa 1, sp100, msa, proteína de activación de Ran GTPasa, una proteína Rab-GAP (de activación de Rab GTPasa), PARIS-1, receptor de células T/cadena zeta de CD3, cTAGE-1, SCP-1, antígeno de glicolípido-GM2, GD2 o GD3, GM3, fucosil-GM1, antígenos de glicoproteína (mucina)-Tn, sialil-Tn, TF y mucina-1, CA125 (MUC-16), un antígeno de la familia MAGE, GAGE-1,2, BAGE, RAGE, LAGE-1, GnT-V, EP-CAM/KSA, CDK4, un antígeno de la familia MUC, HER2/neu, ErbB-2/neu, p21ras, RCAS1, α -fetoproteína, E-cadherina, α -catenina, β -catenina y γ -catenina, NeuGcGM3, antígeno relacionado con Fos, ciclofilina B, RCAS1, S2, L10a, péptido rt de telomerasa, cdc27, fodrina, p120ctn, PRAME, GA733/EoCam, NY-BR-1, NY-BR-2, NY-BR-3, NY-BR-4, NY-BR-5, NY-BR-6, NY-BR-7, NY-ESO-1, L19H1, MAZ, PINCH, Prp1p/Zer1p, WT1, proteína de poliposis adenomatosa coli (APC), PHF3, LAGE-1, SART3, SCP-1, SSX-1, SSX-2, SSX-4, TAG-72, TRAG-3, MBAAT, un antígeno tumoral de Smad, Imp-1, HPV-16 E7, c-erbB-2, antígeno nuclear codificado por VEB (EBNA)-1, timidina cinasa del herpes simple (HSVtk), isoforma de corte y empalme alternativo de XAGE-1 (L552S), mutación del marco de lectura de TGF-beta-R11, mutación del marco de lectura de BAX, SOX-10, y un fragmento antigénico de los mismos.
- 40 45 50 55 60 28. Agonista del receptor de IFN- β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 27, agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 ó 27, o agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, siendo el melanoma metastásico o no metastásico.
29. Agonista del receptor de IFN- β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, 27 ó 28, agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a

21, 27 ó 28, o agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26 ó 28, que comprenden además el uso de una terapia antitumoral.

5 30. Agonista del receptor de IFN- β y AAT, agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula, o agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según la reivindicación 29, en los que la terapia antitumoral comprende resección quirúrgica, radioterapia o quimioterapia.

10 31. Agonista del receptor de IFN- β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 27 a 30, agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 ó 27 a 30, o agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26 ó 28 a 30, en los que el polipéptido consiste en beta-interferón-1a humano recombinante.

15 32. Agonista del receptor de IFN- β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 27 a 30, agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 ó 27 a 30, o agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26 ó 28 a 30, en los que el polipéptido consiste en beta-interferón-1b humano recombinante.

20 33. Agonista del receptor de IFN- β y AAT para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 ó 27 a 32, agonista del receptor de IFN- β y anticuerpo o célula para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21 ó 27 a 32, o agonista del receptor de interferón- β (IFN- β) y célula inmunitaria para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26 ó 28 a 32, en los que el sujeto un ser humano.

Figura 1

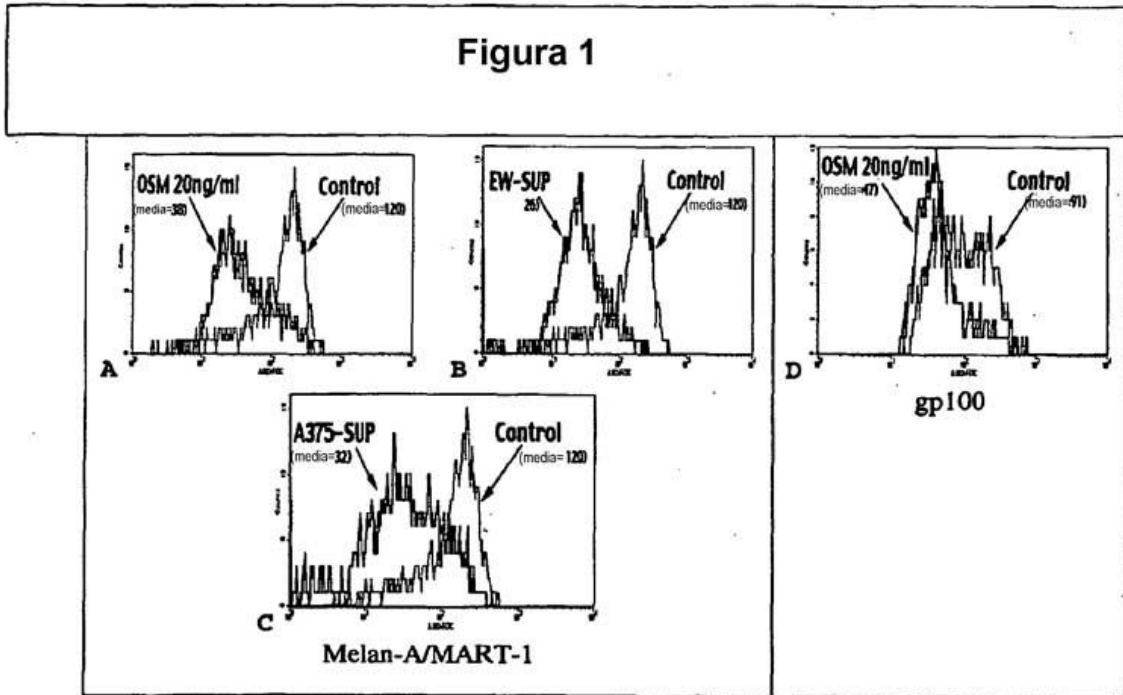


Figura 2

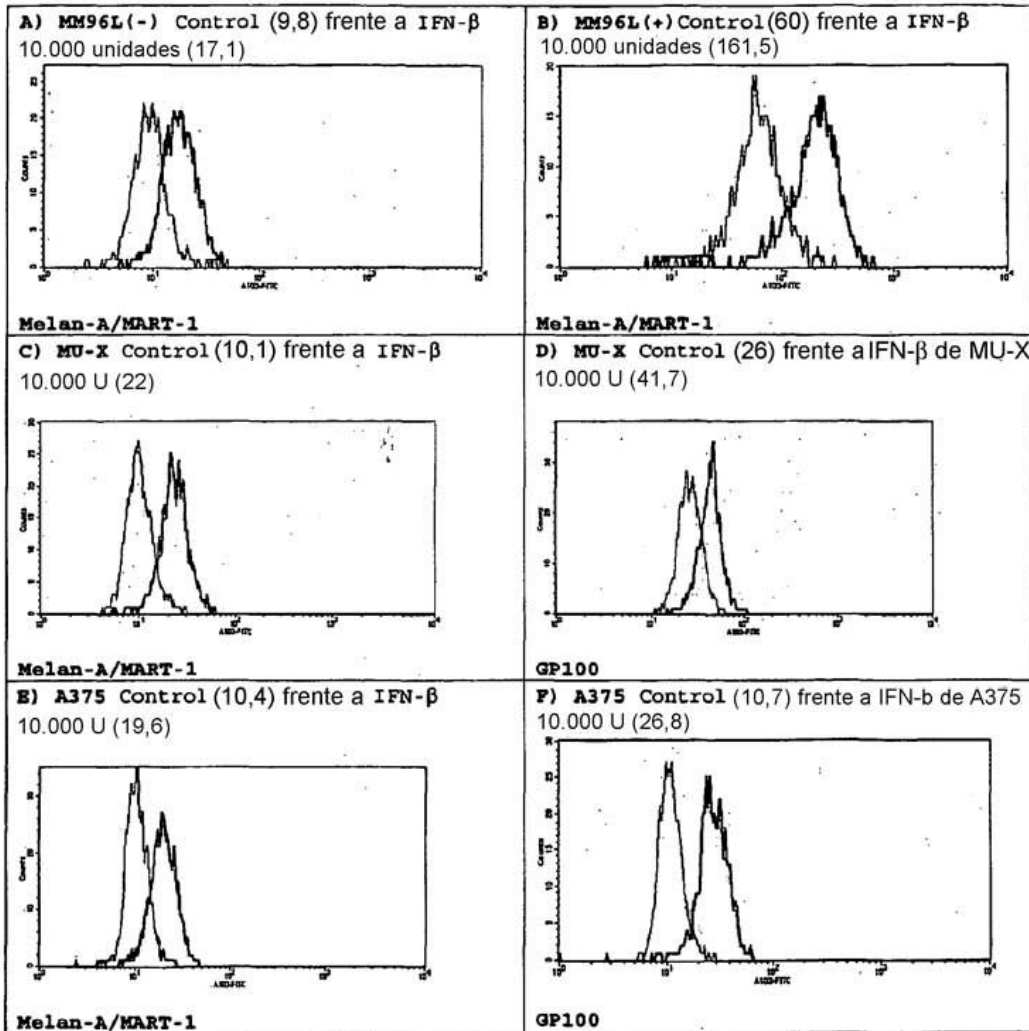


Figura 2, continuación

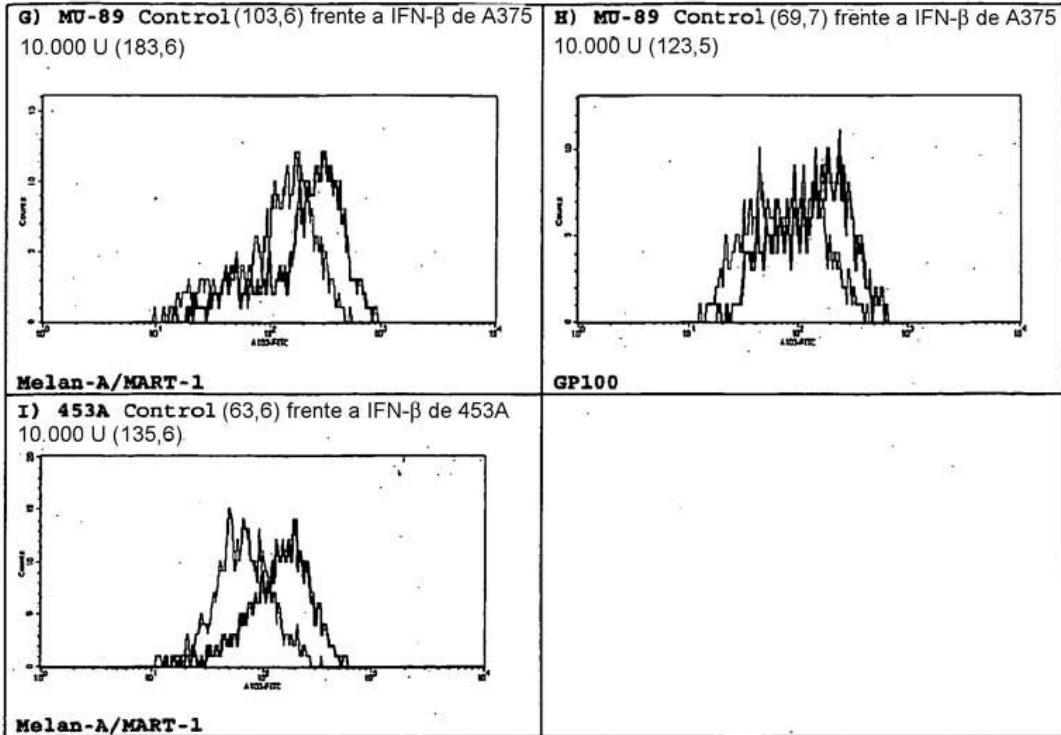


Figura 3

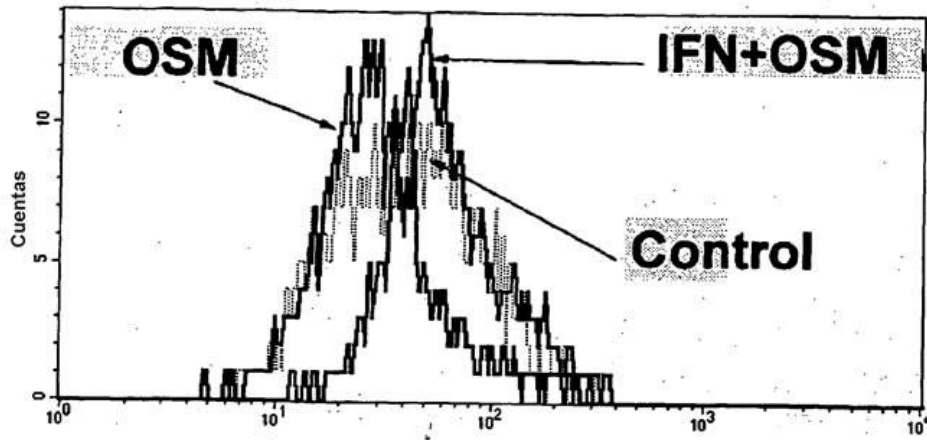


Figura 4

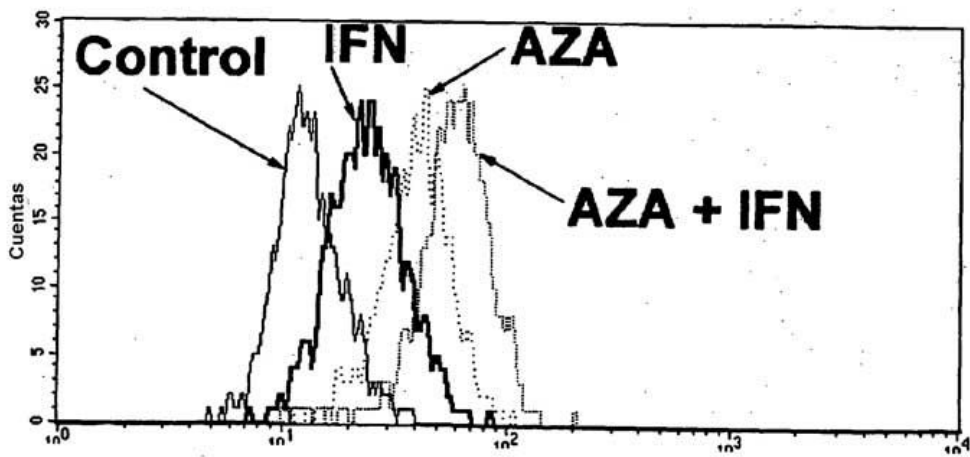


Figura 5

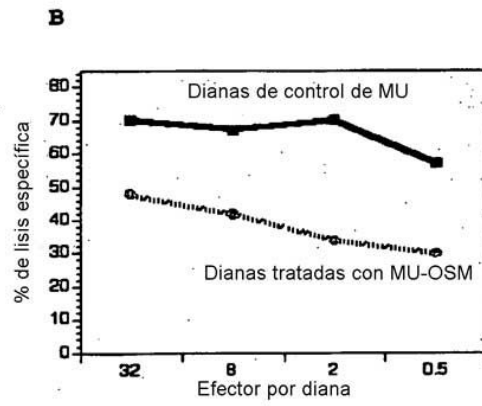
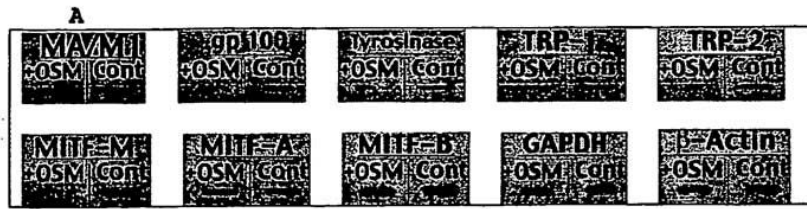
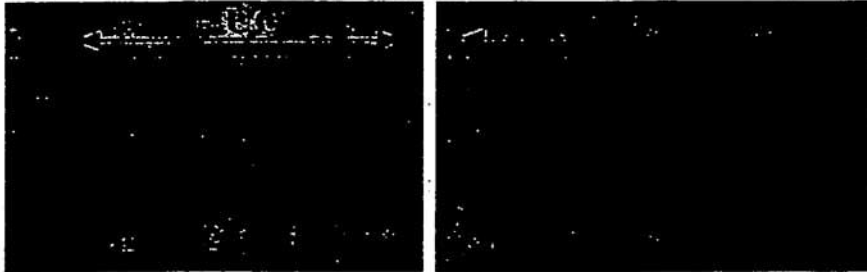


Figura 6

A375



MU-X

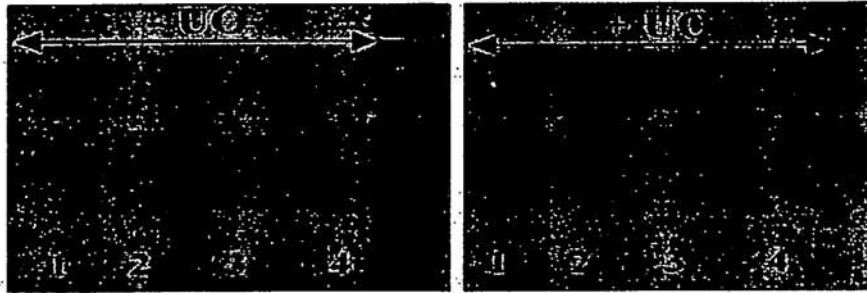


Figura 7

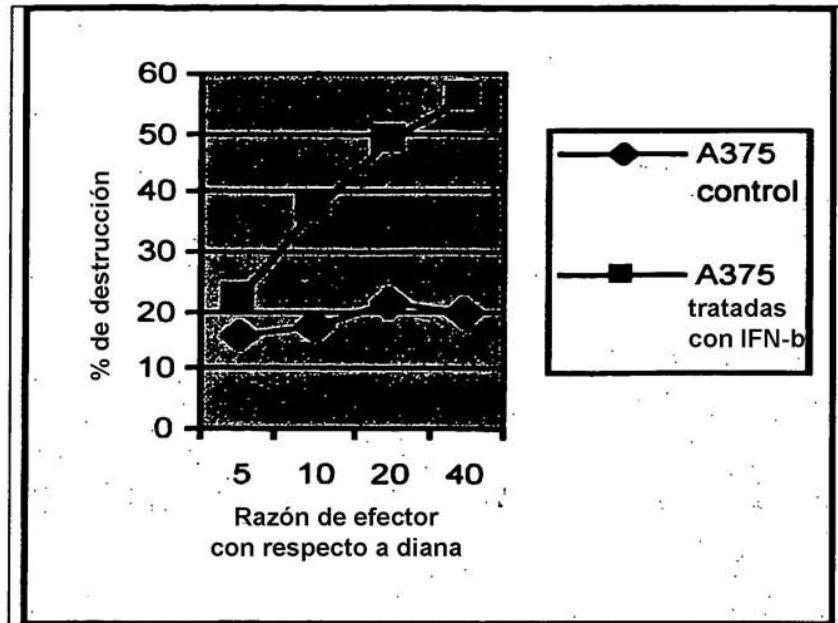


Figura 8

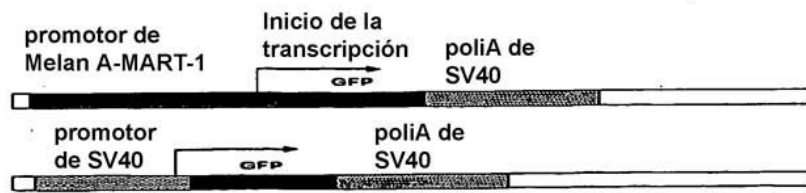


Figura 9

