

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 872**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2007 E 07856294 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2121741**

54 Título: **Detección de patrones individuales de reacción de linfocitos T contra antígenos asociados a tumor (TAA) en pacientes con tumor como base para la vacunación terapéutica individual de pacientes**

30 Prioridad:

**21.12.2006 DE 102006060824**

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

**14.01.2014**

73 Titular/es:

**JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ  
(100.0%)  
SAARSTRASSE 21  
55122 MAINZ, DE**

72 Inventor/es:

**FATHO, MARTINA;  
WESARG, EMMANUELLE;  
LENNERZ, VOLKER;  
VAN DER BRUGGEN, PIERRE;  
WÖLFEL, THOMAS y  
DEBO, SERENA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 437 872 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

Detección de patrones individuales de reacción de linfocitos T contra antígenos asociados a tumor (TAA) en pacientes con tumor como base para la vacunación terapéutica individual de pacientes

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la identificación de antígenos diana preferentes de respuestas a linfocitos T antitumorales autólogos en pacientes con tumor individuales, que comprende: a) proporcionar linfocitos T aislados, que no son estimulados por contacto con una línea celular tumoral *in vitro*, de la sangre de un paciente con tumor, b) proporcionar células dendríticas (DC) autólogas y/o linfocitos B (BLC) para los pacientes con tumor, transfectando las DC y BLC previamente con una elección de ARNm que codifican TAA inmunógenos de linfocitos T cuya expresión en el tipo de tumor es conocida, y expresan estos, c) poner en contacto  
10 los linfocitos T con las DC y/o BLC y d) identificación de aquellos TAA de la elección de TAA transfectados que son reconocidos en la etapa c) por linfocitos T sobre DC y/o BLC transfectados mediante un ensayo de estimulación y reactividad. La presente invención se refiere además a un procedimiento para la preparación de una vacuna contra tumor individualizada o agente terapéutico tumoral individualizado, así como a procedimientos correspondientes para el tratamiento de una enfermedad tumoral con el uso de la vacuna contra tumor individualizada o agentes terapéuticos tumorales individualizados. Las células cancerígenas expresan una multiplicidad de antígenos asociados a tumor (TAA). En modelos *in vitro* de humanos se demostró que el reconocimiento de oligopéptidos de TAA mediante linfocitos T (CLT) citotóxicos reactivos frente a tumor conduce a la destrucción de las células tumorales. CLT reconocen oligopéptidos, que se derivan de proteínas de degradación citoplasmáticas y se presentan sobre moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (HLA clases I y II) sobre la superficie de la  
20 célula.

Un abordaje especial lo representa la inmunoterapia específica activa, que sensibiliza el sistema inmune del paciente frente a TAA sobre las células tumorales y debe producir una inmunidad a largo plazo. En el marco de la inmunoterapia se administran por tanto sustancias de inoculación (vacunas) a los pacientes, que contienen TAA correspondientes. Los preparados de inmunoterapia cancerígena hasta ahora se limitaban el uso de pocos TAA de las categorías de antígenos de diferenciación y cáncer/línea germinal (antígenos C/G), que se expresan frecuentemente en tejidos tumorales y de los que se presentan péptidos con los alelos de HLA que se originan más frecuentemente en la población. A este respecto no se comprobó si los pacientes de estudio se encontraban básicamente en la situación de desarrollar una respuesta inmune frente al antígeno de inoculación (Rosenberg y col., Nat. Med. 10: 909, 2004). Se investigó por parte de grupos de trabajo japoneses en pacientes con carcinoma de pulmón y pacientes con tumores gastrointestinales individualizar la inoculación con péptidos de TAA, ensayándose previamente los linfocitos sanguíneos periféricos en cuanto a reactividad frente a péptidos candidatos de TAA. Solo se usaron para una vacunación péptidos que pudieron demostrarse contra la reactividad (Mine y col., Cancer Sei. 94: 548, 2003; Sato y col., Cancer Sei. 94: 802, 2003). La elección de péptidos candidatos de TAA se limitó a péptidos unidos a HLA-A2 y HLA-A24. Concretamente estos son los alelos de HLA más frecuentemente habituales en grupos de población asiáticos, de hecho el procedimiento a tal efecto son se lleva a cabo para pacientes HLA-A2- y -A24-positivos. Las respuestas de linfocitos T contra péptidos del mismo TAA que se presentan por otros alelos de HLA no se pueden registrar con los procedimientos. Adicionalmente el procedimiento se basó en la estimulación de linfocitos T periféricos de pacientes con los péptidos candidatos. Entre tanto varios estudios han demostrado que tales procedimientos conducen concretamente a la expansión de linfocitos T específicos de péptido, pero los linfocitos T frecuentemente no reconocen las células tumorales. Esto se basa en que las células tumorales no procesan y presentan el péptido del TAA o los linfocitos T solo reaccionan a altas concentraciones de péptido, que se usaron para las estimulaciones, pero no a las concentraciones claramente inferiores del péptido mostrado naturalmente sobre las células tumorales.

Otros grupos compararon en pacientes con carcinoma de riñón tras nefrectomía el tejido renal normal con el tejido tumoral en lo que se refiere a diferencias en la expresión global de genes y diferencias en la presentación de péptidos de MHC clase I. El análisis de "perfil génico" condujo a la identificación de genes expresados o sobreexpresados específicos de tumor. Los ensayos por espectrometría de masas de péptidos de HLA bioquímicamente purificados aislaron los ligandos de HLA naturales de proteínas específicas de tumor o sobreexpresadas (Weinschenk y col., Cancer Res. 62: 5818, 2002). Para el "perfil génico" de comparación y el análisis comparativo de ligandos de péptido HLA natural de tejidos tumorales y normales se consumen grandes cantidades de ambos tejidos. Por tanto, este procedimiento es adecuado para algunos tipos de tumor y también aplicable en enfermedad tumoral progresiva. Los autores del trabajo citado anteriormente aprecian en un artículo de revista actual que la sensibilidad de su procedimiento les permite identificar de una muestra de tejido como máximo el 4% de los ligandos de HLA naturales (Rammensee, Immunology and Cell Biology 84: 290,2006). Se tiene en cuenta que solo la menor parte de los péptidos identificados de este modo presentan realmente una especificidad tumoral suficientemente apreciable, y que no es clara si estos péptidos pueden desencadenar respuestas a células T. Otra posibilidad de la inmunoterapia de cáncer específica del individuo es la inoculación de pacientes con sus propias células tumorales o productos de células tumorales como, por ejemplo, proteína de choque térmico / complejos peptídicos (Srivastava, Curr. Opin Immunol. 18: 201, 2006). Las células tumorales se pueden inyectar solas o en mezcla con células dendríticas (O'Rourke y col., Cancer Immunol. Immunother. 52: 387, 2003). Además  
60

se da la posibilidad de hacer las células tumorales inmunógenas antes de la aplicación con procedimientos de terapia génica. La inmunización con células tumorales, solas o en mezcla, o bien fusionadas con células dendríticas, o proteínas de choque térmico tumorales a las que se unen péptidos de TAA, requiere grandes cantidades de material tumoral para la preparación de vacunas. No es raro en el día a día clínico un factor limitante para una estrategia de este tipo. Para muchos tipos de cáncer se demostró que expresan varios TAA al mismo tiempo. Por ejemplo, se encuentra en el 40% de tumores sanguíneos, 65% de melanomas malignos y de 35 a 37% de tumores de pulmón la expresión simultánea de varios antígenos C/G (Simpson y col., Nat. Rev. Cancer 5: 615, 2005). En el caso de melanoma maligno más del 90% de los tumores expresan antígenos de diferenciación adicionales (Boon y col., Ann. Rev. Immunol. 24: 175, 2006). En general pocos de los estudios de inoculación llevados a cabo hasta ahora expresan el carácter individual de interacciones de tumor-huésped en pacientes de cáncer.

El documento DE 102005041616 describe determinados oligopéptidos asociados a melanoma que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos DC8-positivos (CTL) como antígenos péptidos y que comportan una lisis inducida por CTL y/o apoptosis de células tumorales. Adicionalmente la presente invención se refiere al uso de estos oligopéptidos asociados con melanoma en la terapia de cáncer.

El documento DE 10 2005 013 846 describe una estrategia para una identificación y preparación de antígenos expresados asociados a tumor y de los ácidos nucleicos que codifican los mismos. Esta estrategia se basa en el aprovechamiento de bancos de datos de proteínas y ácido nucleico humanos en relación a antígenos potenciales, habituales en la superficie celular, específicos de cáncer. Mediante la búsqueda de datos se establece en primer lugar una lista lo más completa posible de todos los genes conocidos, en los que se estudia siguiendo el principio fundamental de gen a ARNm a proteína la presencia de una o varios dominios de transmembrana. A esto le sigue una búsqueda de homología, una clasificación del impacto en grupos específicos de tejido (entre otros tejidos tumorales) y un examen de la existencia real del ARNm. Finalmente se evalúan las proteínas así identificadas, por ejemplo, mediante análisis de expresión y procedimiento químicoproteico en cuanto a su activación aberrante en tumores.

El conocimiento de antígenos diana preferenciales del sistema inmune de un paciente podría conducir a la preparación de una sustancia de inoculación de TAA recortada en los pacientes, que se puede usar para una vacunación terapéutica efectiva. Por tanto es un objetivo de la invención proporcionar un procedimiento para la identificación de respuestas de linfocitos T específicas del tumor de la sangre periférica de pacientes individuales y sus antígenos diana. En base a este procedimiento se deben proporcionar también otras formas de realización ventajosas de la invención.

En un primer aspecto de la presente invención se consigue este objetivo mediante un procedimiento para la identificación de aquellos TAA de un paciente con tumor que son inmunógenos de linfocitos T, comprendiendo el procedimiento a) proporcionar linfocitos T aislados, que no estén estimulados *in vitro* por contacto con una línea celular tumoral, de la sangre de un paciente con tumor, b) proporcionar para los pacientes con tumor células dendríticas autólogas (DC) y/o linfocitos B (BLC), habiéndose transfectado previamente las DC y BLC con una elección de ARNm que codifican TAA inmunógenos de linfocitos T cuya expresión en el tipo de tumor es conocida, c) poner en contacto las linfocitos T con las DC y/o los BLC, y d) identificar aquellos TAA de la elección de TAA transfectados que son reconocidos en la etapa c) por linfocitos T sobre DC y/o BLC transfectados mediante un ensayo de estimulación y reactividad.

Mitchell y Nair (Mitchell und Nair, RNA-transfected dendritic cells in Cancer immunother-apy. J Clin Invest. Nov. de 2000; 106(9): 1065-9) y Nair y col. (Induction of tumor-specific cyto-toxic T lymphocytes in Cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. Ann Surg. Abr. de 2002; 235(4):540-9.) se preocuparon de la posibilidad de usar células dendríticas (DC) transfectadas con ARNm de tumor (total) ("ARNm que codifica el contenido antigénico de la célula tumoral") como surrogato de célula tumoral. Estos equivalentes de células tumorales se deben usar para vacunaciones, el control de las respuestas a linfocitos T que se generan y para la identificación de nuevos TAA. Aparte de que con las DC transfectadas con ARN se usan las mismas células de presentación de antígeno (APC) para estimular linfocitos T de un paciente con tumor *ex vivo*, la presente invención no tiene nada en común con la metodología publicada. A partir de una serie de modelos de paciente se sabe que pacientes con malignomas metastatizados presentan respuestas a linfocitos T antitumorales en sangre. Estos linfocitos T reconocen como máximo solo un segmento muy pequeño de TAA expresado por el tumor y en lo que se refiere al propio epítipo de péptido y a través de que alelos de HLA reconocen los péptidos, el reconocimiento es en gran medida específico del individuo.

Muchos procedimientos del estado de la técnica (también el descrito en Mitchell y Nair anteriormente descrito) consideran la identificación de genes expresados específicos del tumor, que deben servir luego como dianas potenciales para la inmunoterapia de cáncer. Pero la expresión de un antígeno de tumor no sólo significa que sea también inmunógeno. Su inmunogenidad depende de la expresión de forma decisiva de si procesa péptidos a partir de la proteína de TAA y se pueden unir en las moléculas de HLA individuales del paciente respectivo y de si el repertorio de linfocitos T del paciente puede reconocer el complejo HLA-péptido. De esto resulta que a partir de al

menos varias docenas (hoy conocidas) de TAA inmunogénicos potenciales en pacientes individuales sólo algunos péptidos de TAA individuales provocan realmente una respuesta a linfocitos T, pero que sólo es insuficientemente previsible. Para la solución de este problema la presente invención proporciona el procedimiento de estimulación y ensayo de acuerdo con la invención. Se debe identificar aquellas respuestas a linfocitos T que se generan y son  
 5 activables en pacientes mediante enfrentamiento con las células tumorales. La reactividad se confirma en ensayo ELISPOT subsiguiente mediante la liberación de citocinas en contacto con antígenos. Se pueden reforzar respuestas a linfocitos T detectables a continuación de forma intencionada mediante una vacunación.

Esto es la diferencia esencial con todos los estudios de vacunación que se llevaron a cabo hasta ahora. Estos tendían al refuerzo o a la generación de respuestas contra "antígenos deseados", cuya expresión en el tumor  
 10 respectivo vendría dada, pero para los que no se dio indicación alguna de que fueran principalmente inmunógenos en el paciente inoculado. Al contrario que en los procedimientos como los anteriores el presente procedimiento de acuerdo con la invención es independiente de la obtención de células tumorales de los pacientes.

Se prefiere un procedimiento según la presente invención que comprenda, además de la expansión de linfocitos T, reconocer los antígenos de DC y/o BLC. Además se prefiere un procedimiento según la presente invención que comprenda además un ensayo de control de la reactividad de los linfocitos T frente a los TAA. Son conocidos por el  
 15 especialista en la técnica procedimientos correspondientes y se ejemplifican en los ejemplos descritos a continuación (por ejemplo, ensayo con IFN-g-ELISPOT). Un procedimiento aún más preferido según la presente invención comprende además la determinación de los alelos de HLA de restricción por los que son presentados los TAA reconocidos. Alelos HLA preferidos se seleccionan de Cw16; Cw6; Cw7; Cw2; Cw3; DP4; DR1; DR2; DR3;  
 20 DR4; DR7; DR11; DR12; DR13; DR15; DR8; DR52; A1; A2; A3; A29; A24; A31 ; A34; B7; B13; B15; B35; B37; B51; B53; B57; B37; B18; B40; B44; B52; DQ6; DP4; DP1; DP10; y A68. Son conocidos por el especialista en la técnica procedimientos correspondientes y se ejemplifican en los ejemplos descritos a continuación. El procedimiento de la presente invención presenta varias ventajas: al contrario que lo precedente el procedimiento es independiente de la  
 25 generación de una línea de células tumorales estable, que era necesaria previamente para la expansión de linfocitos T específicos de tumor. Se estimulan linfocitos T de la sangre periférica de pacientes con tumor en lugar de sus células dendríticas (DC) –preferiblemente autólogas– o linfocitos B (BLC), que se transfectaron previamente con una elección ("panel") de ARNm que codifican antígenos asociados a tumor (TAA) inmunógenos de linfocitos T. El panel comprende antígenos de varias categorías, de forma particular antígenos del tipo de diferenciación y de tipo cáncer /  
 30 línea germinal. En el marco de la presente invención se expandieron linfocitos T de sangre periférica de pacientes con tumor en preparados individuales con hasta 35 TAA inmunógenos en un protocolo de estimulación a corto plazo. Como células de presentación de antígeno se usaron células dendríticas o linfocitos B del paciente respectivo, que se proporcionaron con ARNm que codifica el antígeno. Los linfocitos de respuesta de estos preparados de estimulación se ensayaron en el reconocimiento de estos TAA y se determinaron sus elementos de restricción de HLA.

El ensayo de estimulación y reactividad hace posible la identificación de un espectro individual de antígenos diana  
 35 de linfocitos T antitumorales independientemente de la disponibilidad de células tumorales autólogas. Hasta ahora serían posibles aquellos estudios solo en los pocos modelos de paciente en los que se podría establecer una línea celular creciente estable a partir de los respectivos tumores, que luego recurriese para la estimulación y expansión a linfocitos T reactivos frente al tumor. Los linfocitos T que reconocen antígenos correspondientes de este panel se  
 40 expanden preferiblemente y se pueden usar por ejemplo para otros procedimientos de acuerdo con la invención y/o productos farmacéuticos. El patrón de reconocimiento de linfocitos T es suficientemente específico de acuerdo con la invención para los pacientes individuales; el patrón de reacción individual se dicta mediante el patrón de expresión de antígeno del tumor individual, el fenotipo HLA individual y la capacidad del repertorio de linfocitos T individuales para generar una respuesta específica del antígeno frente al respectivo complejo de HLA-péptido. En un ensayo de  
 45 reacción subsiguiente, como se describe aquí, se puede confirmar la reactividad de linfocitos T contra el antígeno de estimulación, y se pueden determinar los alelos de HLA de restricción con los que se presentan los péptidos de TAA reconocidos.

En un aspecto adicional del procedimiento según la invención los linfocitos T se aíslan de la sangre periférica del  
 paciente con tumor. Se pueden usar sin embargo también otras fuentes habituales de linfocitos T.

Se prefiere un procedimiento según la presente invención en el que los ARNm transfectados en las DC o los BLC se  
 50 seleccionan de antígenos de varias categorías, a saber, antígenos de diferenciación, antígenos C/G, antígenos mutados y antígenos sobreexpresados. Los inventores seleccionaron como formato de antígeno el ARN mensajero (ARNm). El ARNm es adecuado para la transfección transitoria de una multiplicidad de tipos de células, codifica el antígeno en longitud completa e incluye por tanto la totalidad de epítopos planteables. En algunos trabajos previos se examinó la idoneidad de DC transfectadas con ARNm para la detección de respuestas de linfocitos T (Britten y col.,  
 55 J Immunol Methods 287:125, 2004; Britten y col., J Immunol Methods 299:165, 2005). Para el ensayo planificado se transfectaron *in vitro* ARNm de codificación de TAA transcrito (IVT) en DC de sangre periférica de los respectivos pacientes. Las DC transfectadas con ARN sirven luego como células estimuladoras para la expansión de linfocitos T reactivos frente a TAA.

Los antígenos asociados a tumor (TAA) se pueden dividir en función de su patrón de expresión en distintas categorías (para ello véase también; <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>):

- 5 a) Antígenos de diferenciación se expresan solo en tumores y células del tipo tejido del que se generan. Por ejemplo son antígenos de diferenciación del melanoma maligno (MM) proteínas específicas de melanocitos como tirosinasa, proteína-2 relacionada con tirosinasa (TRP-2), gp100 y Melan-A/MART-1.
- 10 b) Antígenos "cáncer/línea germinal" (antígenos C/G, "específicos de tumor shared") no se expresan aparte de en gametos y células de trofoblastos en ningún otro tejido diferenciado. Modificaciones epigenéticas debidas a transformación maligna conducen a expresión aberrante de antígenos C/G en células cancerígenas. La mayor parte expresan células de tumor de varios antígenos C/G al mismo tiempo y su expresión se obtiene en el transcurso de la progresión de tumor. Se expresan antígenos C/G
- 15 adicionalmente en una pluralidad de tumores de distintas histologías. c) En la categoría antígenos mutados se consideran antígenos que portan mutaciones puntuales "antisentido" y proteínas de fusión, que se generan a partir de translocaciones específicas de tumor de segmentos de genes. Con algunas excepciones los antígenos de mutación puntual conocidos hasta ahora son específicos para el tumor individual, en los que estos se descubrieron. Las proteínas de fusión específicas de malignoma como, por ejemplo, BCR/ABL (en leucemias mielóticas crónicas) aparecen por el contrario frecuentemente en enfermedades cancerígenas hematológicas. d) Como cuarta categoría de TAA aparecen antígenos sobreexpresados en tumores. A estos pertenecen proteínas que se expresan rigurosamente reguladas en
- 20 células de tejidos normales diferenciados, ya que muchas de ellas regulan propiamente funciones como crecimiento, ciclo celular, apoptosis y similares.

Se prefiere un procedimiento de acuerdo con la invención en el que los antígenos de diferenciación se seleccionan de proteínas específicas de melanocitos como tirosinasa, proteína-2 relacionada con tirosinasa (TRP-2), gp100 y melan-A/MART-1 o antígenos C/G como MAGE, GAGE, BAGE (véase para ello también la figura 1). Se prefiere

25 adicionalmente un procedimiento de acuerdo con la invención en el que el antígeno mutado se selecciona de una proteína de fusión, por ejemplo, de BCR/ABL y otras fusiones relevantes de cáncer conocidas. En un aspecto adicional del procedimiento según la invención se identifica en función del procedimiento anterior un modelo de reconocimiento de TAA individual con linfocitos T de un paciente con tumor. Este modelo de expresión de antígeno individual sirve de acuerdo con la invención como base esencial para la generación de vacunas de tumor específicas del paciente ("personalizadas"). Tal vacuna se puede preparar también para un modelo de expresión de antígeno,

30 que se identifica de acuerdo con la invención de un grupo de pacientes con tumor, que están enfermos de un determinado tumor. Con ello se pueden tratar de forma intencionada determinados tipos de tumor en un colectivo de pacientes. Grupos adecuados serían, por ejemplo, tumores en riñones, mama, páncreas, estómago, testículos, próstata, intestino y/o cáncer de piel.

En un aspecto adicional de la invención el ensayo de estimulación de linfocitos T predeterminado hace posible en un

35 colectivo amplio de pacientes la determinación de antígenos estructuralmente normales ("comunes"), que pueden ser reconocidos por linfocitos T antitumorales autólogos. A este respecto se ensaya frente a un amplio espectro de TAA definidos en consideración de la totalidad de alelos HLA individuales. Con esto ya se obtiene todo el potencial de estos antígenos. El conocimiento de antígenos diana preferentes del sistema inmune de un paciente podría conducir a la preparación de una sustancia de inoculación de TAA recortada en los pacientes, que se puede usar para la vacunación terapéutica. Es especialmente preferido por tanto un procedimiento según la invención, donde se

40 identifica el modelo de expresión de antígeno de un grupo en pacientes con tumor, cuyos tumores expresan TAA estructuralmente normales ("shared").

Con el término "antígenos shared" se engloban aquellos TAA cuya expresión se detectó en tumores distintos del mismo origen de tejido (por ejemplo, "antígenos de diferenciación" en melanomas) o en tumores de distintas

45 histologías. A los TAA que se expresan en tumores muy distintos, pertenecen "antígenos sobreexpresados" y los denominados "antígenos de cáncer/línea germinal" (estos últimos también designados como "específicos de tumor comunes"). Como se citó, el término "común", se refiere sólo a la expresión de antígenos impartida por distintos tumores pero no a su inmunogenidad. En distintos pacientes con melanoma se detectó que sus tumores expresaban múltiples antígenos de cuatro categorías (antígenos de cáncer/línea germinal, de diferenciación, de sobreexpresión y mutados). Pero sólo una parte de estos y TAA muy distintos serían inmunógenos de linfocitos T en los pacientes respectivos. Adicionalmente la especificidad de las respuestas de linfocitos T (que presentarían y reconocerían péptidos del TAA por el que presenta o reconoce la molécula de HLA) sería ampliamente específica para los respectivos pacientes. Por tanto son interesantes para los estudios previstos todos los antígenos "comunes", ya que son potencialmente inmunógenos.

55 Antígenos "shared" especialmente preferidos en el sentido de la presente invención son (posiciones en paréntesis) BAGE-1 ; GAGE-1, 2,8; GAGE-3,4,5,6,7; GnTV (intrón); HERV-K-MEL; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; MAGE-A1; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-AIO; MAGE-A12; MAGE-C2; mucina; NA-88; NY-ESO-1 / LAGE-2; SAGE; Sp17; SSX-2, SSX-4; y TRP2-INT2 (intrón 2).

Se describe además un procedimiento para la identificación de un tumor en un paciente que comprende en primer lugar un procedimiento como se citó anteriormente e identificación del tumor basándose en el patrón de expresión de antígeno determinado del paciente con tumor. Se describe además un procedimiento para la preparación de una vacuna contra tumor individualizada, que comprende un procedimiento como se citó anteriormente, y formulación de los TAA/TAA identificado(s) en forma de una vacuna contra tumor. Se describe además un procedimiento para la preparación de un agente terapéutico contra tumor individualizado, que comprende un procedimiento como se citó anteriormente y formulación de DC y/o BLC autólogos expandidos identificados en forma de un agente terapéutico contra tumor. A partir de una elección de antígenos tumorales inmunógenos principales se seleccionan de forma escogida los que son inmunógenos en pacientes dados. Estos antígenos se pueden usar luego preferiblemente en una vacuna multiepítipo para la inmunización terapéutica del paciente respectivo. Una vacunación terapéutica con estos antígenos promete claramente mejores resultados clínicos que la inoculación con antígenos en los que no está claro si es posible una respuesta inmune en el caso individual. Debido a que el ensayo procede sin células tumorales es por lo general de utilidad para todos los pacientes cuyos tumores expresan los antígenos de panel o una parte de los mismos. La independencia de células tumorales hace posible el uso del ensayo también en pacientes que se encuentran clínicamente libres de tumor, pero en los que se da el riesgo de una nueva progresión de enfermedad tumoral. Ya tales pacientes son contemplados como candidatos ideales para la inoculación terapéutica.

Las enfermedades tumorales que se van a tratar comprenden a este respecto, por ejemplo, cáncer de riñón, mama, páncreas, estómago, testículos y/o piel. La enumeración de enfermedades tumorales es a este respecto solo a modo de ejemplo y no debe limitar el ámbito de uso. Se conoce en el estado de la técnica que linfocitos T generados propiamente, que serían específicas para determinados péptidos, podrían matar de forma efectiva y selectiva células tumorales. Para un uso de antígenos asociados a tumor en una vacuna contra tumor son posibles básicamente varias formas de aplicación. Así Tighe y col. (Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint, Immunol. Today 19(2):89-97, 1998), describen que el antígeno puede ser administrado bien como proteína recombinante con adyuvantes adecuados o bien sistemas soporte o como ADNc que codifica el antígeno en vectores de plásmido. En estos casos se debe administrar y presentar el antígeno en el cuerpo del paciente de células de presentación de antígeno (APC), con lo que se desencadena una respuesta inmune. Melief y col. (Peptide-based Cancer vaccines, Curr. Opin. Immunol. 8:651-657, 1996) muestran una posibilidad adicional, a saber, el uso de péptidos sintéticos como vacunas. Se puede pensar también en la administración de ARN(s) de TAA reconocidos por linfocitos T como vacuna(s) (multiepítipo). Se puede usar ARN directamente o en forma de DC transfectado.

ARN de TAA o péptidos de TAA se pueden usar a este respecto en una forma de realización preferida con adición de adyuvantes, o bien también en solitario. Como adyuvantes se puede usar, por ejemplo, el factor de estimulación de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF). Otros ejemplos de tales adyuvantes son hidróxido de aluminio, emulsiones de aceites minerales como, por ejemplo, el adyuvante de Freund, saponina o compuestos de silicio. El uso con adyuvantes ofrece la ventaja de que se puede reforzar la respuesta inmune desencadenada y/o que se estabiliza la vacuna.

Se describe además una composición farmacéutica que contiene uno o varios de los ARN de TAA o péptidos de TAA determinados. Esta composición sirve, por ejemplo, para la administración por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intradérmica o intramuscular, o la administración por vía oral. A este respecto los ARN o péptidos están disueltos o suspendidos en un vehículo preferiblemente acuoso, farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente la composición puede contener coadyuvantes como, por ejemplo, tampones, aglutinantes, diluyentes, etc.

Se pueden administrar también ARN o péptidos conjuntamente con sustancias inmunoestimulantes, por ejemplo, citocinas. Una representación global de coadyuvantes como los que se pueden usar en una composición de este tipo se representa, por ejemplo, en A. Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, 2000, American Pharmaceutical Association and pharmaceutical press. Se puede usar el agente a este respecto para la prevención, profilaxis y/o terapia de enfermedades tumorales.

Las cantidades presentes en la composición farmacéutica del péptido o de los péptidos o de los ARN se encuentran a este respecto en una cantidad terapéuticamente efectiva. A este respecto se pueden unir los péptidos contenidos en la composición o bien los péptidos codificados por los ARN también en al menos dos tipos de HLA distintos.

La vacuna contra tumor o el agente terapéutico contra tumor puede ser una vacuna individual personalizada o – el agente terapéutico una vacuna multiepítipo o agente terapéutico multiepítipo. La vacuna contra tumor o agente terapéutico contra tumor contiene por tanto TAA o linfocitos T adaptados especialmente a los pacientes o el colectivo de pacientes, que tienen capacidad para combatir de forma efectiva el tumor o los tumores en los pacientes. Como en cualquier forma de individualización de terapia oncológica se aumentan las posibilidades de éxito de terapia en el caso particular.

Se describe adicionalmente un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad tumoral, que comprende un procedimiento como se citó anteriormente y tratamiento de enfermedad tumoral en base al patrón de expresión de antígeno identificado. Finalmente la descripción se refiere a un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad tumoral que comprende un procedimiento como se citó anteriormente y tratamiento de enfermedad tumoral en base a la vacuna contra tumor o agente terapéutico contra tumor preparados. Las enfermedades tumorales que se van a tratar comprenden a este respecto como anteriormente, por ejemplo, cáncer de riñón, mama, páncreas, estómago, testículos y/o de piel. Las cantidades efectivas necesarias para el tratamiento y el tipo de administración se pueden determinar por parte del facultativo responsable del tratamiento fácilmente en base a los parámetros específicos del paciente.

La invención se aclarará a continuación adicionalmente mediante los ejemplos acompañantes, sin que se limite la misma con ellos. Todas las referencias aquí citadas se recogen para los fines de la presente invención en su totalidad mediante referencias. En las figuras se muestra:

Figura 1: una visión general de los antígenos asociados a tumor identificados en el modelo de paciente MZ2. Datos de fuentes: MAGE A-1: Traversari C y col., J Exp Med 1992; 176: 1453-7, van der Bruggen P y col., Eur J Immunol 1994a; 24: 2134-40; MAGE A-3 Gaugier B y col., J Exp Med 1994; 179: 921-30; BAGE Boel P y col., Immunity 1995; 2: 167-75; GAGE 1,2,8 Van den Eynde B y col., J Exp Med 1995; 182: 689-98; GAGE 3,4,5,6,7 De Backer O y col., Cancer Res 1999; 59: 3157-65; Tyrosinase Brichard VG y col., Eur J Immunol 1996; 26: 224-230 y MAGE A-6 Vantomme V y col., Cancer Immun [serial online] 2003; 3: 17.

Figura 2: el ensayo de estimulación en la visión general esquemática

Figuras 3 a 5: los análisis de reacción de los linfocitos T DC8+ de pacientes MZ2 estimulados con células tumorales (figura 3), DC no transfectadas (figura 3) y con DC transfectadas con ARN de TAA (figura 4, 5); linfocitos T estimulados con células tumorales reconocieron solo transfectados de MAGE-A1/HLA-Cw16 (figura 3 parte superior); linfocitos T estimuladas con DC no transfectadas no reconocieron transfectado alguno (figura 3 parte inferior); los linfocitos T que se estimularon con DC transfectadas con MAGE-A1, reconocieron transfectados MAGE-A1 /HLA-A1- y MAGE-A1 /HLA-Cw16 en el ensayo de reacción (figura 4 arriba a la izquierda); los linfocitos T que se estimularon con DC transfectadas con BAGE reconocieron transfectados BAGE/HLA-B44- y BAGE/HLA-Cw16 (figura 4 arriba a la derecha); los linfocitos T que se estimularon con DC transfectadas con GAGE-1, reconocieron GAGE-1 /HLA-Cw6 (figura 4 inferior); los demás linfocitos T estimulados no reconocieron más transfectados de TAA/HLA en el ensayo de reacción (figura 5).

Figura 6: el resumen de reactividades de linfocitos T generados mediante distintos procedimientos frente a todos los TAA encontrados en este modelo.

## Ejemplos

En el transcurso de los últimos años los inventores han descubierto y caracterizado en varios modelos de tumor de pacientes con melanoma TAA reconocidos por linfocitos T. Los requerimientos para ello serían para cualquier paciente una línea celular tumoral en crecimiento estable y linfocitos aislados de la sangre periférica del paciente. Mediante estimulaciones de linfocitos T con la línea celular tumoral autóloga *in vitro* los inventores consiguieron la generación de poblaciones de linfocitos T reactivos frente a tumor y clones de linfocitos T. A estas se recurrieron para la identificación de TAA. A este respecto se demostró que de los linfocitos T antitumorales en cada uno de los pacientes estudiados se reconoció un espectro individual de combinaciones de TAA/HLA. En cualquier caso se reconocieron nuevos epítomos de péptidos de antígenos de diferenciación, antígenos C/G así como antígenos mutados. Solo a modo de excepción se confirmaron ya de la bibliografía complejos de péptido/HLA conocidos. Obviamente la combinación de modelo de expresión de TAA específico del tumor, conduce al tipo de HLA individual así como a la capacidad de repertorios de linfocitos T muy variables a reaccionar en combinaciones de antígeno dadas, dando modelos de reacción específicos individuales. La individualidad de esta interacción tumor-huésped puede ser analizada en la actualidad solo en determinados modelos de paciente, ya que resulta favorable solo en pocos pacientes generar líneas celulares tumorales para la estimulación de linfocitos T autólogos *in vitro*. Pero sin estimulación no se pueden detectar linfocitos T reactivos frente a tumor de sangre de pacientes con los procedimientos actuales, ya que sus frecuencias en la sangre periférica son demasiado bajas. Por tanto los inventores comenzaron a buscar un sustituto para líneas celulares tumorales para la estimulación de linfocitos T de la sangre periférica de pacientes con tumor con TAA. Se pueden preparar células dendríticas inmaduras (DCi) de monocitos de sangre periférica *in vitro* y diferenciarse de DC maduras (DCm). Las DCm son células de presentación de antígeno profesionales, que pueden estimular de forma efectiva linfocitos T. En dos modelos de melanoma en los que se identificaron 8 (modelo MZ2) y 13 (D05-GS) antígenos reconocidos por linfocitos T, los inventores transfectaron DCm de pacientes con los antígenos respectivos y antígenos de control adicionales (D05-GS) y linfocitos T estimuladas de la sangre periférica de pacientes con las DC transfectadas. Los inventores seleccionaron como formato de antígeno el ARN mensajero (ARNm). El ARNm es adecuado para la transfección transitoria de una

5 multiplicidad de tipos de células, codifica los antígenos en longitud completa e incluye por tanto la totalidad de epítopos planteables. En algunos trabajos previos se comprobó la idoneidad de DC transfectadas con ARNm para la detección de respuestas a linfocitos T (Britten y col., J Immunol Methods 287:125, 2004; Britten y col., J Immunol Methods 299:165, 2005). Para el ensayo planteado deberían transfectarse ARNm que codifican TAA transcritos *in vitro* (ITV) en DCm de sangre periférica de los pacientes respectivos. DC transfectadas con ARN deberían servir como células estimuladoras para la expresión de linfocitos T reactivas a TAA. Esto último debería comprobarse con ensayos de IFN- $\gamma$ -ELISPOT. Básicamente es posible, en cualquier paciente con un tipo de tumor para el que se conoce la expresión de una parte de este antígeno identificar con ayuda del ensayo de estimulación reactividades de linfocitos T contra TAA. Los antígenos reconocidos podrían usarse luego, por ejemplo, en forma de una vacuna multiepítipo para la inmunización terapéutica de pacientes.

#### *Generación y transfección de células dendríticas maduras de pacientes con ARNm que codifica TAA*

15 Para la estimulación de linfocitos T con DC transfectadas con ARN se usaron tanto DC maduras "convencionales" (DCm para DC maduras) como también las denominadas DC rápidas (DCmf; DC maduras rápidas). Se generaron DCm según el procedimiento de Jonuleit y col (Eur. J. Immunol. 1997; 27(12): 3125-42) y DCmf según el de Dauer y col. (J. Immunol. 2003; 170 (8): 4069-76) a partir de monocitos de PBMC de pacientes. Para la transfección con TAA-ARN se transfectaron por preparado  $2 \times 10^5$  DC con ayuda del reactivo de transfección ARN transmensajero (Qiagen, Hilden) con 0,8  $\mu$ g de ARN transcrito *in vitro*. Después se incubaron las células durante tres horas en una incubadora.

#### *Estimulación de linfocitos T de pacientes con las DC transfectadas*

20 Directamente a continuación de la incubación de tres horas en la incubadora se usaron las DC transfectadas para la estimulación de linfocitos T DC8<sup>+</sup> previamente aisladas de pacientes. A este respecto se estimularon por unidad de cultivo (UC) una placa de cultivo celular de 24 pocillos  $1-1,5 \times 10^6$  de linfocitos T DC8<sup>+</sup> con  $1 \times 10^5$  DC transfectadas y  $2 \times 10^5$  linfocitos DC8-negativas (las denominadas "linfocitos de alimentación", irradiadas con 100 gray). Como factor de crecimiento de linfocitos T se añadió interleuquina-2 recombinada humana (IL-2; 25 IU/ml). Como medio de cultivo se usó medio AIM-V (Invitrogen, Karlsruhe), al que se añadió 10% de suero humano (suero reunido de donantes sanos). Se estimularon en ensayos de control las linfocitos T con células de melanoma autólogas ( $1 \times 10^5$ ) así como DC no transfectadas. En el día 7 tras el lanzamiento del ensayo se re-estimularon las linfocitos T según el mismo protocolo y se comprobó otros 4 a 5 días después el reconocimiento de TAA.

#### *Detección de la reactividad de linfocitos T frente a los TAA usados para la estimulación.*

30 En el día 11 ó 12 del ensayo se ensayaron las linfocitos T DC8<sup>+</sup> en cuanto a su reactividad frente a las estimulaciones TAA y la restricción de HLA del reconocimiento. Para excluir la reactividad no específica, por ejemplo, de linfocitos T autoreactivas contra las DC, se usaron para el ensayo de reacción células 293T o células COS-7 como células de presentación del antígeno. Estas se transfectaron con vectores de expresión eucarióticos, que contenían ADNc que codifica TAA. Cada ADNc de TAA se co-transfectó en preparados individuales con el ADNc de cada alelo HLA del paciente y se comprobó el reconocimiento de los transfectos mediante las linfocitos T después de 24 horas en el ensayo IFN- $\gamma$ -ELISPOT. Para la transfección se usó lipo-lectamina 2000 (Invitrogen, Karlsruhe). La realización del ensayo se realizó según el protocolo descrito por Lennerz y col. (PNAS 2005; 102 (44): 16013-16018). El procedimiento preestablecido se ensayó en dos modelos de pacientes caracterizados.

#### *I: Modelo MZ2-MEL*

40 En el modelo MZ2 se identificaron previamente ocho combinaciones de TAA/HLA reconocidas por linfocitos T (figura 1): MAGE-A1 /HLA-A1 (Traversari C. y col., J. Exp. Med. 1992; 176: 1453-7), MAGE-A3/HLA-A1 (Gaugier B. y col., J. Exp. Med. 1994; 179: 921-30), MAGE-A1 /HLA-Cw16 (van der Bruggen P. y col., Eur. J. Immunol. 1994a; 24: 2134-4), BAGE-1 /HLA-Cw16 (Boel P. y col., Immunity 1995; 2: 167-75), GAGE-I, 2, 8/HLA-Cw6 (Van den Eynde B. y col., J. Exp. Med. 1995; 182: 689-98), tirosinasa/HLA-B44 (Brichard V.G. y col., Eur. J. Immunol. 1996; 26: 224-230), GAGE-3, 4, 5, 6, 7/HLA-A29 (De Backer O. y col., Cancer Res. 1999; 59: 3157-65) und MAGE-A6/HLA-Cw16 (Vantomme V. y col., Cancer Immun, [serie online] 2003; 3: 17). Se aislaron linfocitos T DC8<sup>+</sup> de PBMC del paciente y se estimularon según el procedimiento citado anteriormente con DC, que fueron transfectadas con cada uno de los ocho TAA (figura 2). En el ensayo de reacción subsiguiente pudieron detectarse especificidades de linfocitos 4/8 T (figuras 4-6). Adicionalmente se identificó un TAA que no había sido descubierto hasta ahora: BAGE- 1/HLAB44 (figuras 4, 6). Al mismo tiempo se estimularon los linfocitos T también con DC no transfectadas así como con las células de melanoma autólogas. Mientras que con la estimulación con DC no transfectadas no se expandió ninguna respuesta de linfocitos T específicas de TAA, la estimulación con las células de melanoma condujo al reconocimiento del mismo espectro de TAA que la estimulación con ARN-DC (tabla de la figura 6).



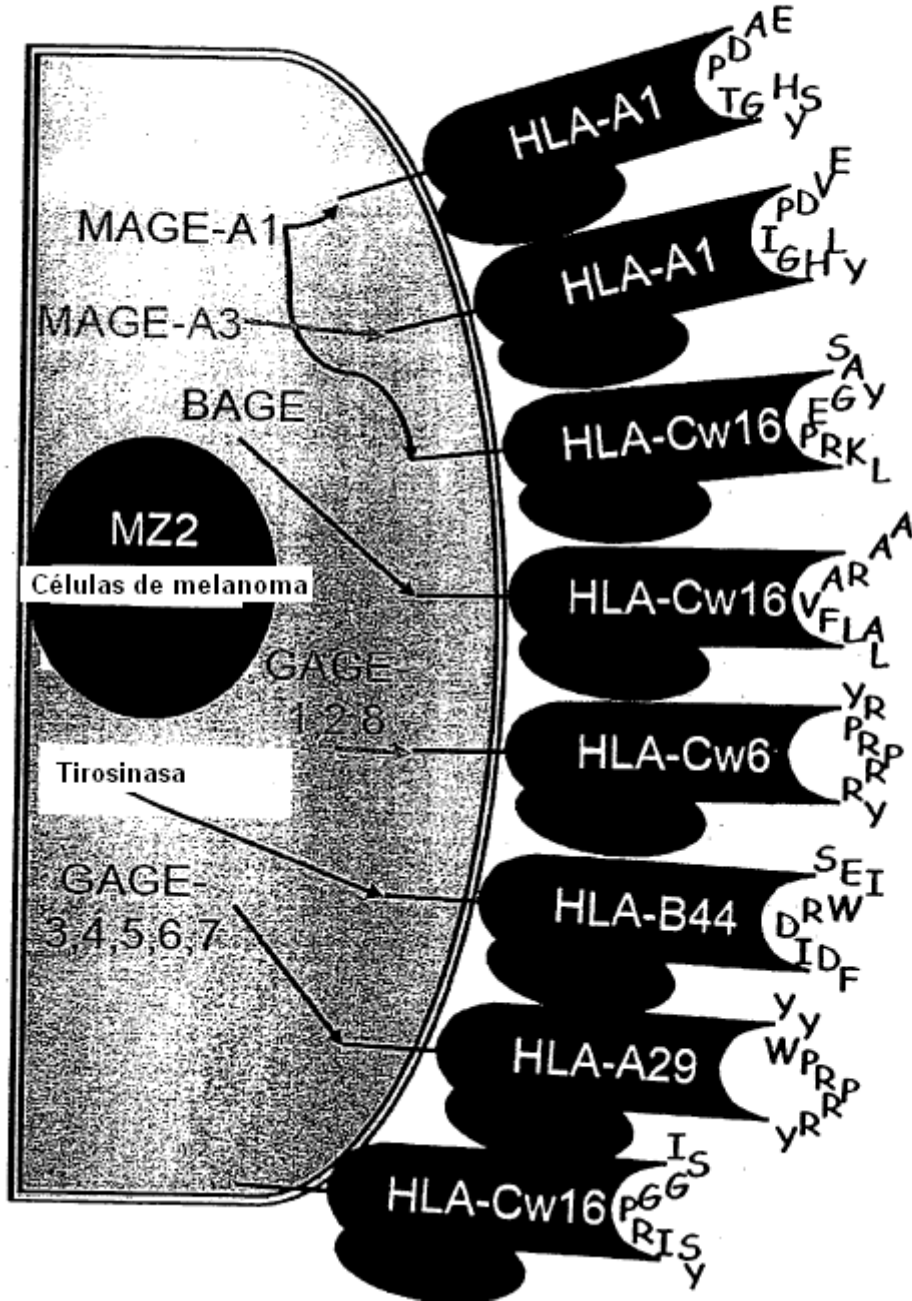
*II: Modelo D05-GS:*

5 En este modelo se identificaron hasta el momento del ensayo de estimulación 16 TAA reconocidos por linfocitos T. A diferencia del procedimiento citado anteriormente se usaron en el ensayo PBMC de linfocitos T DC8<sup>+</sup> preaisladas. Por lo demás se llevó a cabo el ensayo según el protocolo citado anteriormente: se estimularon alícuotas de PBMC (1,2 x 10<sup>6</sup>/preparado) con DC, que se transfectaron con cada uno de los TAA-ARN, así como con DC no transfectadas y con células de melanoma. Después de una reestimulación en el día 7 se usaron los linfocitos T en el día 12 en el ensayo de reacción. Los linfocitos T estimulados con células de melanoma reconocieron 11 de los 16 antígenos conocidos (figura 7 inferior y 10). Linfocitos T estimuladas con DC no transfectadas no reconocieron ninguno de los antígenos (figura 7 superior), lo que confirma que no se genera reactividad a TAA inespecífica. De los 10 linfocitos T estimulados con TAA-ARN se reconocieron de nuevo 4 de las reactividades conocidas (figuras 8-10). Adicionalmente se descubrió una especificidad (MAGE-C2/HLA-A2), que, como se puso de manifiesto en otros estudios, no fue descubierto por la estimulación con el clón de células tumorales (clon 6), que se usó para el preparado de estimulación de melanoma, ya que no expresa el clon tumoral MAGE-C2. Se expresó MAGE-C2 pero en la línea celular de melanoma aislada del clon 6 y se vacunó con el del paciente D05-GS durante años. De este 15 modo se puede aclarar la presencia de linfocitos T reactivos a MAGE-C2 en sangre periférica del paciente. Que estos linfocitos T se pudiesen detectar mediante la estimulación con DC transfectado con ARN de MAGE-C2, subraya la eficiencia y especificidad del ensayo de estimulación.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la identificación de antígenos asociados a tumor (TAA) reconocidos específicamente de linfocitos T antitumorales de un paciente con tumor que se encuentra enfermo de un determinado tipo de tumor; que comprende
- 5 a) proporcionar linfocitos T aislados, que no estén estimulados por contacto con una línea celular tumoral *in vitro*, de la sangre de un paciente con tumor
- b) proporcionar células dendríticas (DC) autólogas y/o linfocitos B (BLC) para los pacientes con tumor, habiéndose transfectado previamente las DC y los BLC con una elección de ARNm que codifican TAA inmunógenos de linfocitos T cuya expresión en el tipo de tumor es conocido y expresan estos,
- 10 c) poner en contacto los linfocitos T con las DC y/o los BLC e
- d) identificar aquellos TAA de la elección de TAA transfectados que son reconocidos en la etapa c) por linfocitos T sobre DC y/o BLC transfectados mediante un ensayo de estimulación y reactividad.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la expansión de los linfocitos T que reconocen los antígenos de DC y/o BLC.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la identificación de los antígenos diana reconocidos específicamente de linfocitos T antitumorales del al menos un paciente con tumor en base a los linfocitos T que reconocen los antígenos de las DC y los BLC.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un ensayo de control de la reactividad de los linfocitos T frente al TAA.
- 20 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además la determinación de los alelos de HLA por los que se presentan los TAA reconocidos.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los linfocitos T se aíslan de la sangre periférica del paciente con tumor.
- 25 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los ARNm se seleccionan de antígenos de varias categorías, seleccionados de antígenos de diferenciación, antígenos C/G, antígenos mutados y antígenos sobreexpresados.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que los antígenos se seleccionan de proteínas específicas de melanocitos o proteínas C/G, como tirosinasa, proteína-2 relacionada con tirosinasa (TRP-2), gp 100, MAGE, GAGE, BAGE y melan-NMART-1.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el antígeno mutado se selecciona de una proteína de fusión.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se identifica un patrón de expresión de antígeno individual de un paciente con tumor.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se identifica el patrón de expresión de antígeno de un grupo de pacientes con tumor que están enfermos con un determinado tumor.
- 35 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el tumor determinado es un melanoma maligno.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que se identifica el patrón de expresión de antígeno de un grupo de pacientes con tumor que expresan el TAA ("shared") estructuralmente normal.

Figura 1



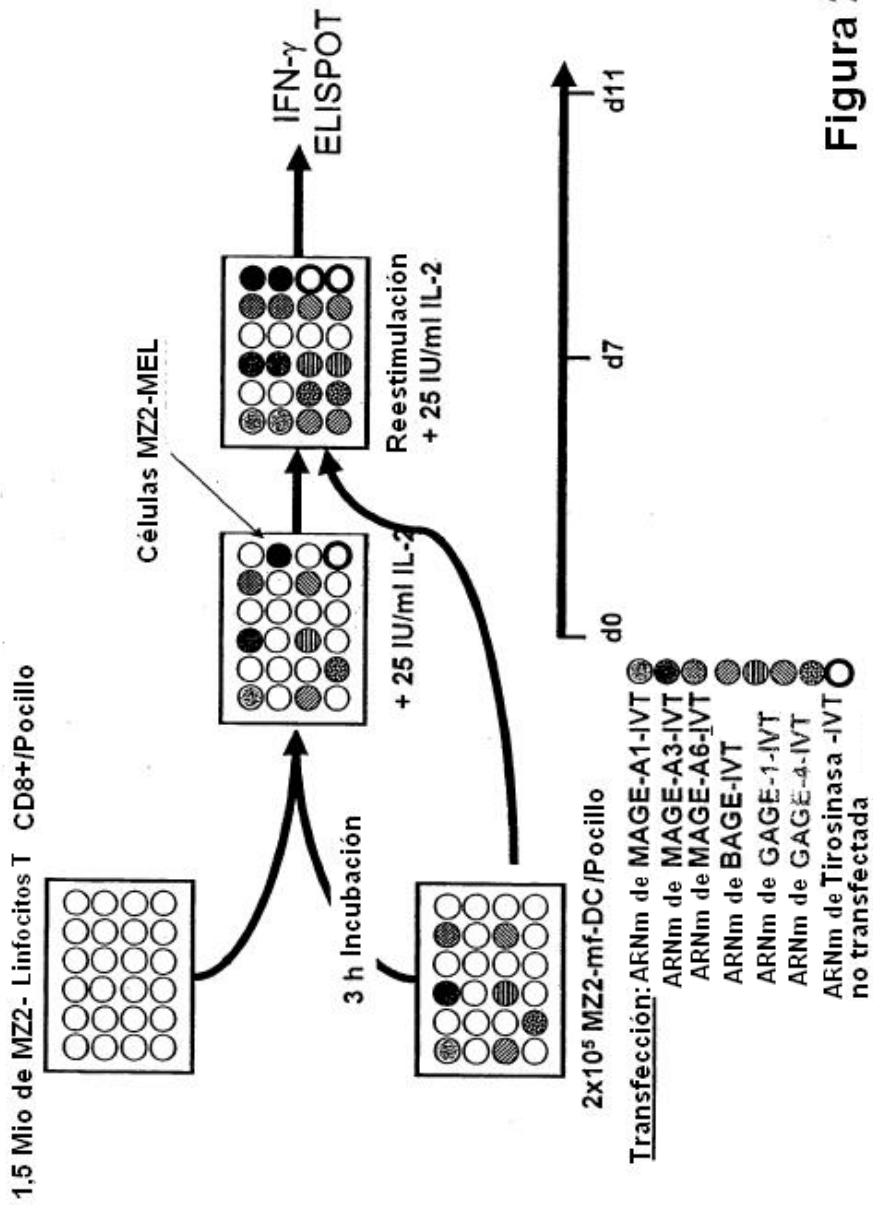


Figura 2

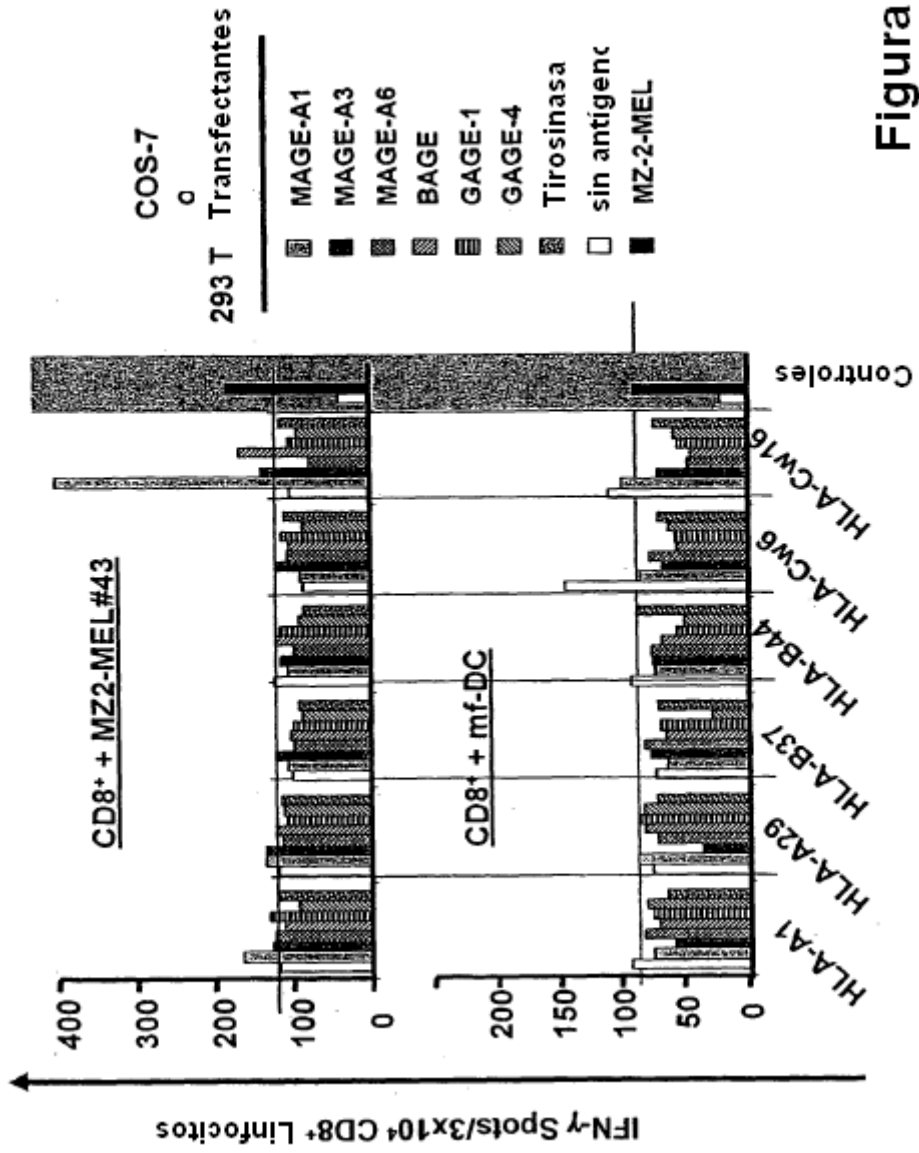


Figura 3

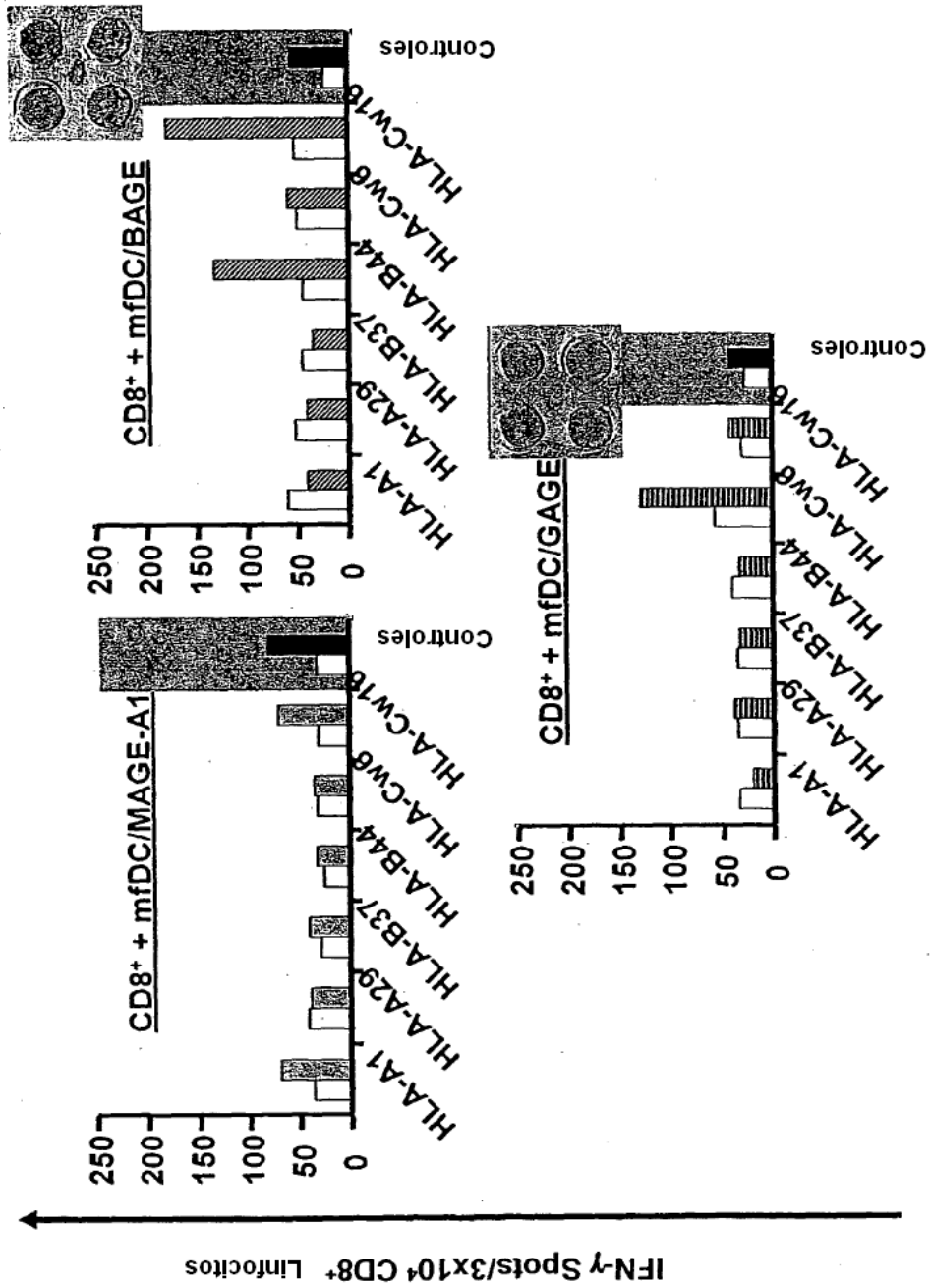


Figura 4

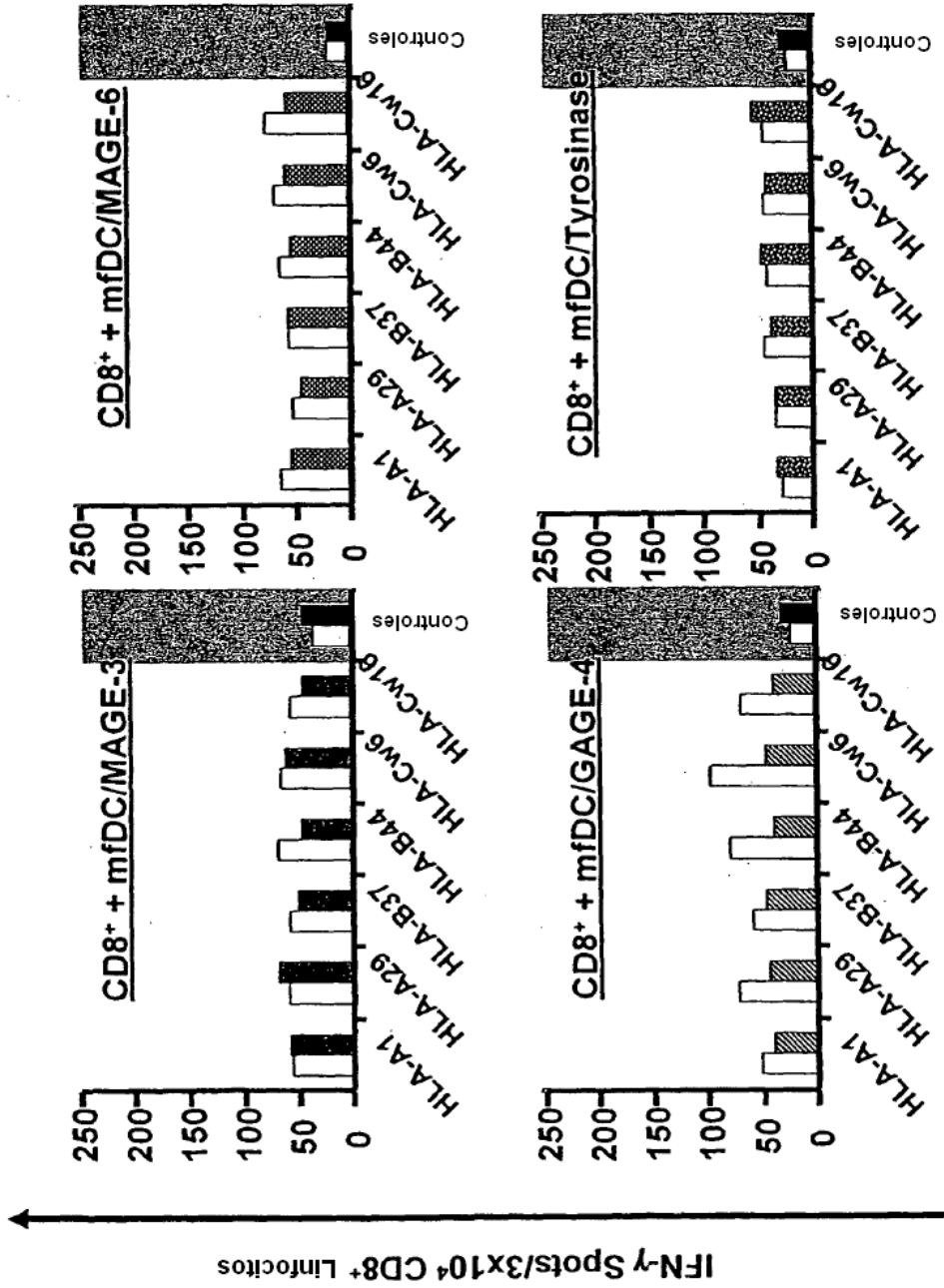


Figura 5