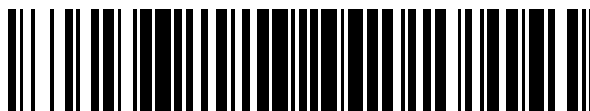


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 899**

51 Int. Cl.:

A61K 35/42 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2009 E 09720311 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2257301**

54 Título: **Inmunoterapia basada en células cancerosas alógenas**

30 Prioridad:

03.03.2008 US 33425 P

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

14.05.2014

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
1600 NW 10th Avenue
Miami, FL 33156, US**

72 Inventor/es:

**PODACK, ECKHARD R.;
ROSENBLATT, JOSEPH D. y
YAMAZAKI, KOICHI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 460 899 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

Inmunoterapia basada en células cancerosas alógenas

5 **INVESTIGACIÓN O DESARROLLO FEDERALMENTE PATROCINADO**

El gobierno de EE.UU. tiene ciertos derechos en la presente invención conforme a lo dispuesto en el contrato de NIH CA039201 del Departamento de Salud y Servicios Sociales.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a mejorar la inmunoterapia basada en células cancerosas (por ejemplo, inmunización o vacunación) que comprende la administración de células cancerosas alógenas que secretan una proteína de choque térmico modificada a un sujeto humano. Se mejora por la administración frecuente de células cancerosas alógenas al sujeto, agotamiento de linfocitos B en el sujeto antes y/o durante la primera o al menos una administración de células cancerosas alógenas, o ambos.

El documento WO 99/42121 desveló una vacuna basada en células, en la que se secreta la proteína de choque térmico modificada codificada por una construcción de expresión transfectada. La vacuna puede ser eficaz para tratar o prevenir cáncer o enfermedad infecciosa. Se describieron una inyección de células cancerosas recombinantes y dos inyecciones de células cancerosas recombinantes separadas dos semanas. Se prefirieron células cancerosas autólogas. Por el contrario, la presente invención usa células cancerosas alógenas.

El documento WO 2005/030136 desveló inhibir un tumor administrando una célula de cáncer de pulmón genéticamente modificada para expresar CD80 y HLA. La célula cancerosa no secreta una proteína de choque térmico modificada.

El cáncer se trata normalmente por resección quirúrgica del tumor, radiación o fármacos para destruir células cancerosas, o una combinación de los mismos. El sistema inmunitario puede inhibir la multiplicación y diseminación de células cancerosas. Sin embargo, pueden escapar de la supervisión inmunológica por ser no inmunogénicas (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas), que bloquea la sensibilización de la respuesta inmunitaria para generar una respuesta eficaz, o por ser inmunogénicas (por ejemplo, melanoma) pero bloqueando la fase efectora de la respuesta inmunitaria. Alternativamente, el bloqueo de la sensibilización podría ser debido al tumor que secreta mediadores inmunosupresores o que tolera quimiocinas y/o la estimulación de células reguladoras, células presentadoras de antígeno tolerogénicas, o células mielosupresoras. La inmunoterapia activa administrando células cancerosas alógenas podría evitar el bloqueo, y sensibilizar la respuesta inmunitaria innata y/o adaptativa. La inducción y amplificación de una respuesta de linfocitos T CD8⁺ específica para tumor sería especialmente deseable como se evalúa por citólisis de células cancerosas o secreción de interferón gamma estimulado por células cancerosas.

Raez y col. (J. Clin. Oncol. 22:2800-2807, 2004) describieron un ensayo de fase I de una vacuna basada en células cancerosas alógenas para cáncer de pulmón de células no pequeñas en pacientes con enfermedad metastásica avanzada. La línea celular de adenocarcinoma AD100 se transfectó para expresar CD80 y HLA-A1 o A2. Los pacientes se inmunizaron intradérmicamente con 5×10^7 células una vez cada dos semanas. Tres inmunizaciones representaron un ciclo de tratamiento. A menos que un paciente no tuviera respuesta a la inmunización inicial, se administraron hasta tres ciclos de tratamiento durante un total de nueve inmunizaciones. Los prometedores resultados obtenidos usando esta vacuna basada en células podrían mejorarse aumentando la frecuencia de inmunización y agotando los linfocitos B antes y/o durante al menos una inmunización.

Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar inmunoterapia mejorada (por ejemplo, inmunización o vacunación), que comprende administrar células cancerosas alógenas que secretan una proteína de choque térmico modificada a un sujeto humano, por administración frecuente, agotamiento de linfocitos B antes y/o durante la administración inicial o al menos una administración, o ambos. Otras ventajas y mejoras se describen más adelante o serían evidentes de la divulgación en el presente documento.

55 **RESUMEN DE LA INVENCION**

La invención proporciona una mejora en la inmunoterapia basada en células cancerosas alógenas para inmunización y vacunación. El "tratamiento" puede ser terapéutico, profiláctico, o simplemente paliativo.

Un sujeto humano se trata administrando células cancerosas alógenas que secretan una gp96 como se expone en la reivindicación 1. Aquí, "alógeno" significa que las células administradas y el sujeto tratados se diferencian por una o más moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC). La proteína de choque térmico puede modificarse eliminando un dominio que contiene la señal de retención para retículo endoplásmico. Opcionalmente, el dominio puede sustituirse con una o más regiones constantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina IgG1 o

IgG2 humana o de ratón (por ejemplo, dominio Fc). La proteína de choque térmico modificada se expresa a partir de un ácido nucleico dentro de la célula cancerosa que se transfectó por un vector de expresión o infectó por un vector viral. El vector puede basarse en una o más señales reguladoras (por ejemplo, inicio y parada de la transcripción, donante y aceptor de corte y empalme, poliadenilación, origen de replicación) del virus del papiloma bovino (VPB). El vector preferentemente no contiene los genes E5, E6 y E7 de VPB. Así, las células cancerosas pueden considerarse "recombinantes" debido a la tecnología usada para producir las.

El antígeno (por ejemplo, un epítipo derivado de neoantígeno o antígeno de tumor de una célula cancerosa alógena o singénica) puede inducir una respuesta inmunitaria innata o adaptativa en el sujeto. En particular, se desea la inducción y amplificación de una respuesta de linfocitos T CD8⁺. La célula CD8⁺ puede destruir células cancerosas o secretar interferón gamma específicamente.

Opcionalmente, una célula cancerosa puede hacerse alógena expresando al menos una molécula de MHC, que no es expresada por el sujeto, de un ácido nucleico dentro de la célula cancerosa que se transfectó por un vector de expresión o infectó por un vector viral. La proteína de choque térmico modificada y la molécula de HLa pueden estar al menos parcialmente codificadas por el mismo vector o vectores diferentes.

Un sujeto humano puede inmunizarse varias veces con células cancerosas alógenas. El intervalo entre dos administraciones consecutivas de la composición inmunogénica basada en células es inferior a dos semanas. Otra mejora puede ser agotamiento de linfocitos B del sujeto antes y/o durante al menos una administración de la composición inmunogénica basada en células.

Otros aspectos de objetivos y ventajas de la invención serán evidentes para un experto en la materia a partir de la siguiente descripción de realizaciones específicas y las reivindicaciones, y generalizaciones a la misma.

DESCRIPCIÓN DE REALIZACIONES ESPECÍFICAS DE LA INVENCIÓN

A un sujeto puede administrársele una composición inmunogénica que comprende células cancerosas alógenas, que secretan una proteína de choque térmico modificada (por ejemplo, una proteína de choque térmico que carece de una secuencia de retención nativa para retículo endoplásmico) al menos parcialmente codificada por un vector de expresión transfectado o vector viral infectado en las células. Como cadena de polipéptidos naciente, la proteína de choque térmico modificada puede tener su propia secuencia señal de proteína u otra secuencia señal de proteína para elegir como diana la ruta secretora. Y opuesto a un extremo N la secuencia señal puede ser una marca de péptido que comprende una o más regiones constantes de la cadena pesada de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgG1 o IgG2). Opcionalmente, las células cancerosas expresan una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) alógeno (por ejemplo, al menos parcialmente codificado por el mismo vector o vector diferente). Pueden o pueden no expresan CD80 (por ejemplo, al menos parcialmente codificado por el mismo vector o vector diferente). Más detalles de la expresión de la proteína de choque térmico modificada, HLA-A, y CD80 en diversas líneas de células cancerosas se proporcionan en los documentos WO 99/42121 y WO 2005/030136.

Un sujeto puede administrarse en un intervalo de 1×10^7 a 10×10^7 células cancerosas alógenas por dosificación. Un número total de células de 1 a 10×10^8 puede administrarse al sujeto. Las células cancerosas alógenas pueden administrarse al menos dos veces al día, diariamente, cada dos días, dos veces a la semana, semanalmente, cada dos semanas, o mensualmente entre dos administraciones cualesquiera. Pueden administrarse al menos un total de nueve, 18 ó 27 dosificaciones de células cancerosas alógenas. Las dosificaciones pueden administrarse a intervalos de una semana o menos, al menos dos veces a la semana, al menos cada dos días, al menos diariamente, o al menos dos veces al día. El tratamiento continúa durante seis semanas. Pueden inyectarse por al menos una vía intradérmica, intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. Cada dosificación puede fraccionarse en alícuotas para las inyecciones separadas que comprenden una única administración. El tratamiento puede mejorarse por vacunación frecuente, agotamiento de linfocitos B, o ambos.

El antígeno (por ejemplo, un epítipo derivado de neoantígeno o antígeno de tumor de una célula cancerosa alógena o singénica) puede inducir una respuesta inmunitaria específica en el sujeto. Por ejemplo, el epítipo unido en un complejo inmunogénico con la proteína de choque térmico secretada puede obtenerse de células cancerosas alógenas que coexpresan tanto gp96 secretada como antígeno, o de células cancerosas singénicas del sujeto que expresan solo antígeno. Lo último requeriría supuestamente que la proteína de choque térmico modificada fuera captada por una célula cancerosa diferente a partir de la cual se sintetizó gp96, y el complejo formado en la célula cancerosa en el que el antígeno se sintetizó. La inmunización puede no requerir que tenga linfocitos T CD4⁺ funcionales o ganglios linfáticos. Por tanto, después de todas las modificaciones de gp96, que incluyen eliminación de la señal de retención de RE, la gp96 modificada todavía debe unirse a epítipo en un complejo inmunogénico. Modificaciones opcionales incluyen adiciones o deleciones del extremo N, adiciones del extremo C, mutaciones puntuales de 1 a 3 aminoácidos contiguos, o adiciones o deleciones internas de 1 a 10 aminoácidos.

El sujeto puede ser un sujeto humano. Las células cancerosas pueden obtenerse de un sujeto humano. El inmunogén o vacuna puede administrarse al mismo sujeto que donó las células cancerosas o un sujeto diferente.

Las células cancerosas alógenas pueden haberse obtenido de un sujeto que se diferencia en el (los) antígeno(s) de trasplante con respecto al sujeto que recibe las células. Opcionalmente, una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor (por ejemplo, una o más moléculas de MHC clase I tales como HLA-A1, HLA-A2, HLA-A3, HLA-A27) pueden expresarse en las células cancerosas por transfección de un vector de expresión o infección de un vector viral. El ácido nucleico del vector necesita codificar al menos parcialmente la proteína de choque térmico modificada o molécula de MHC alógena debido a que la modificación o tipo histo, respectivamente, puede introducirse en un gen endógeno de la célula cancerosa por recombinación homóloga.

Los linfocitos B pueden agotarse por técnicas conocidas en la técnica, tales como aféresis *ex vivo* o administración de anticuerpo específico para un receptor de linfocitos B (por ejemplo, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-BLyS), ligando dimerizado para reticular un receptor de linfocitos B (por ejemplo, dímero de aptámero), o puede usarse fármaco inmunosupresor (por ejemplo, ciclofosfamida o prednisolona). Pero a diferencia del uso de rituximab para tratar linfoma o enfermedad autoinmunitaria, el agotamiento de linfocitos B en asociación con inmunoterapia según la presente invención ahorraría a otras partes del sistema inmunitario efectuar inmunoterapia basada en células del cáncer. Por ejemplo, rituximab a una dosificación de 100 mg/m² a 500 mg/m² (o de 200 mg/m² a 300 mg/m² o de 350 mg/m² a 400 mg/m²) puede administrarse a un paciente a una tasa de 50 mg/hora a 400 mg/hora una o más veces (por ejemplo, una vez a la semana durante de dos semanas a dos meses). Rituximab puede complementarse con ciclofosfamida y prednisolona. Los linfocitos B pueden agotarse entonces seguido de inmunoterapia (por ejemplo, inmunización o vacunación). El nivel de linfocitos B puede monitorizarse durante la inmunoterapia y agotamiento repetido cuando se encuentra por encima del 1 %, 5 % o 10 % de niveles normales (es decir, no agotados).

Las células cancerosas de un sujeto que experimenta proliferación anormal pueden ser una neoplasia o tumor (por ejemplo, carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma), especialmente cáncer de pulmón. Los cánceres incluyen aquellos que se originan a partir de los sistemas de órganos gastrointestinales (por ejemplo, esófago, colon, intestino, ileon, recto, ano, hígado, páncreas, estómago), genitourinarios (por ejemplo, vejiga, riñón, próstata), musculoesqueléticos, pulmonares (por ejemplo, pulmón) o reproductores (por ejemplo, cuello uterino, ovario, folículo). Por ejemplo, el cáncer de pulmón puede ser cáncer de pulmón de células no pequeñas (por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células grandes), cáncer de pulmón de células pequeñas y carcinoides. La célula cancerosa puede derivarse del sujeto que recibe el tratamiento o de otro individuo distinto del sujeto. Para el primer caso, la alogenicidad puede conferirse expresando una molécula de clase I no relacionada del complejo de histocompatibilidad mayor de un vector de expresión transfectado o un vector viral infectado. Las células cancerosas pueden ser no inmunogénicas o tener baja inmunogenicidad mientras que se manipulan para secretar la proteína de choque térmico modificada. Pueden ser de un carcinoma. Una célula de cáncer de pulmón a modo de ejemplo es el adenocarcinoma AD100, que es alógeno para todos los sujetos, excepto para el paciente del que se derivó la línea celular y cualquier individuo raro que comparta ese haplotipo de MHC del paciente. Su derivación se describe en el documento WO 2005/030136. AD100 no expresa HLA-A1, HLA-A2 o CD80. El carcinoma pancreático puede tratarse con MIA PaCa-2 que secreta gp96-Ig de ATCC CRL1420; el carcinoma de ovario puede tratarse con OVCAR-3 que secreta gp96-Ig de ICLC HTL97004.

La eficacia del tratamiento puede evaluarse mediante la reducción en síntomas, progresión retardada o regresión de la enfermedad, o prolongación de la supervivencia. O el ensayo de citólisis de linfocitos T CD8⁺ de células cancerosas o interferón gamma estimulado por ellos puede medirse *in vitro*. Puede usarse mejora en la inmunoterapia activa para tratar cáncer en combinación con cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. El refuerzo puede producirse administrando el complejo inmunogénico al menos mensualmente durante de uno a dos años.

Las composiciones inmunogénicas comprenden células cancerosas alógenas y un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, el vehículo puede ser alginato o perlas de PLGA o partículas virales, y el vehículo puede ser agua para inyección o solución salina tamponada. Antes de formular la composición, el excipiente o vehículo puede confirmarse libre de patógeno y pirógeno. Las células pueden irradiarse y suspenderse en solución salina tamponada que contiene 0,5 % de albúmina de suero humano. La composición es preferentemente adecuada para administración sistémica o local mediante inyección o depósito. Se prefiere que la composición se pruebe para la ausencia de contaminación bacteriana y viral antes de la administración. Para evitar posibles fuentes de contaminación, se preferiría cultivar las células cancerosas alógenas en medio definido sin suero. Las células pueden almacenarse en el mismo medio complementado con 20 % de sulfoxido de dimetilo como crioconservante.

EJEMPLOS

La vacunación antitumoral es bastante eficaz cuando se administra a ratones sin tumor sin tratamiento previo produciendo protección del crecimiento tumoral tras la posterior exposición. La protección generalmente es de larga duración y específica de tumor que indica la participación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Este cuadro cambia radicalmente cuando las vacunas se usan para el tratamiento terapéutico de tumor ya establecido. La misma dosis de vacuna que puede establecer eficazmente inmunidad protectora generalmente es incapaz de proporcionar beneficio terapéutico. Se cree que el motivo para esta falta de eficacia de la vacunación terapéutica procede de la inducción de células supresoras inducidas por tumor, la generación de células reguladoras, la inducción de anergia o

tolerancia de linfocitos T, o una combinación de los mismos. Cualquiera que sean los mecanismos precisos de supresión tumoral inducida por tumor, el éxito de la terapia con vacuna para la terapia contra el cáncer dependerá de vencer o neutralizar estos efectos supresores inducidos por tumor.

5 Basándose en el trabajo pionero de los laboratorios de Srivastava y Rammensee que mostraron que los péptidos asociados a la proteína de choque térmico gp96 se presentan cruzados con células CD8⁺ por células dendríticas, los presentes inventores han desarrollado un sistema de vacunación adecuado para terapia antitumoral. El transfectar una proteína de fusión gp96-IgG1-Fc en células tumorales produce la secreción de gp96-Ig en el complejo con péptidos de tumor chaperonados. La administración parenteral de tumores que secretan gp96-Ig desencadena la
 10 robusta expansión de CTL CD8⁺ específica para antígeno con activación del sistema inmunitario innato. gp96 secretada por tumor produce el reclutamiento de células DC y NK al sitio de secreción de gp96 y media en la activación de DC mediante la unión a CD91 y TLR2 y TLR4. La captación endocítica de gp96 y sus péptidos chaperonados desencadena la presentación cruzada de péptidos mediante MHC clase I y activación de CD8 relacionada fuerte independiente de células CD4⁺. En este sistema modelo, la expansión de CTL CD8⁺ puede
 15 cuantificarse con precisión en el plazo de 4 a 5 días desde la vacunación usando linfocitos T CD8⁺ marcados con gfp transgénicos de TCR adoptivamente transferidos. Usando este sistema de prueba los presentes inventores muestran ahora que en el sistema modelo la inmunosupresión inducida por tumor es no específica de antígeno y puede vencerse por inmunización frecuente o por la ausencia de linfocitos B.

20 *Sujetos, líneas celulares y anticuerpos*

Se compraron ratones C57BL/6J (B6) de The Jackson Laboratory o Charles River Laboratories. Ratones deficientes en la cadena μ de Ig que tienen un antecedente B6 (DCBM) se compraron de The Jackson Laboratory.

25 Ratones de gfp (proteína verde fluorescente) se obtuvieron de sus productores. Los ratones C57BL/6J OT-I transgénicos (obtenidos de Dr. M. Bevan) expresan un TCR (V α 2V β 5.1.2) específico para el péptido 257-264 derivado de albúmina de huevo de pollo limitado a H-2K^b (SIINFEKL). Los ratones de Gfp se cruzaron con ratones OT-I para generar ratones gfp-OT-I en el animalario en la Universidad de Miami según pautas institucionales. Los ratones de progenie se criaron para la expresión del gen albúmina de huevo-TCR y por fluorescencia para gfp.
 30 Todos los ratones se usaron a 6-12 semanas de edad.

La línea celular EG7 (obtenida de M. Bevan) se transfectó con el vector pCMG-His que contenía gp96-Ig. Las células de control se transfectaron con vector solo. Se obtuvieron células de carcinoma de pulmón de Lewis (CPL) de la Colección Americana de Cultivos de Tejido y se transfectaron con albúmina de huevo en pAC-neo-albúmina de
 35 huevo o con tanto el vector de albúmina de huevo como pCMG-His que contenía gp96-Ig. Todas las células se cultivaron en medio IMDM (GIBCO) con 10 % de suero bovino fetal (SBF) y gentamicina (GIBCO). Para mantener células transfectadas se añadieron antibióticos para la selección (G418 o L-histidinol, Sigma, St. Louis, MO) al cultivo.

40 Los siguientes anticuerpos se usaron para la tinción: anti-CD16/32 (2.4G2), CyCromo-anti-CD3 ϵ (145-2C11), -anti-CD5 (UCHT2), -antiCD8a (53-6,7), PE-CD19 (4G7) PE o FITC-anti-NK1.1 (PK136), y PE o FITC-anti-CD11c (HL3) se compraron de BD PharMingen.

45 *Purificación y transferencia adoptiva de células gfp-OT-I y linfocitos B CD19⁺*

Suspensiones de una célula de esplenocitos y células de ganglio linfático (GL) se obtuvieron de ratones gfp-OT-I y se reunieron. Se agotaron en glóbulos rojos por lisis con cloruro de amonio. Las células Gfp-OT-I se clasificaron por selección en columna positiva usando microperlas magnéticas anti-CD8 α y una columna MACS (Miltenyi Biotec) según las instrucciones del fabricante. La pureza de células OT-I aisladas fue superior al 95 % como se ha
 50 determinado por análisis de citometría de flujo. La expresión de V α 2 y V β 5.1.2 sobre células purificadas se cuantificó por citometría de flujo. Para la purificación de linfocitos B, células CD19⁺ se purificaron con microperlas anti-CD19 (Miltenyi Biotec). Para reconstituir linfocitos B en ratones RDLB, 10⁷ células purificadas se transfirieron adoptivamente a través de las venas de la cola dos días antes del trasplante de células tumorales.

55 *Análisis de la expansión de CTL CD8⁺ in vivo*

Para medir la expansión de CTL CD8⁺, ratones se transfirieron adoptivamente con 10⁶ gfp-OT-I, se inmunizaron dos días después por inyección intraperitoneal (i.p.) de 1-4x10⁶ células EG7-gp96-Ig no irradiadas. Tras la inmunización, las células se recogieron de la cavidad peritoneal, mesentérica, ganglios linfáticos para-aórticos (dLN) y sangre
 60 periférica en intervalos cronometrados. Los glóbulos rojos se eliminaron de las muestras por lisis con cloruro de amonio. Se incubaron un millón de células durante 10 min a 4 °C con mAb anti-CD16/32 en PBS que contenía 0,5 % de BSA (PBA) para bloquear la unión de FcR. Entonces, las células se incubaron con los anticuerpos indicados durante 30 min. Las muestras se analizaron en un FACScan (Becton Dickinson) con el software CELL Quest (BD Bioscience). El número total de las células inmunitarias indicadas por cada tejido se calculó a partir del porcentaje de
 65 células elegidas como diana y el número total de células en cada tejido.

Inoculación del tumor y protocolo de tratamiento

5 Células EG7, de CPL o de CPL-albúmina de huevo no irradiadas se inyectaron subcutáneamente (s.c.) en 200 µl de
 PBS en los flancos de ratones. Cinco días después de la inoculación de las células de CPL-albúmina de huevo (día
 5), 10^6 gfp-OT-I purificadas en un volumen de 0,3 ml de PBS se inyectaron a través de las venas de la cola. Dos días
 después, los ratones se inmunizaron por inyección i.p. de 10^6 células de CPL-albúmina de huevo-gp96-Ig o EG7-
 gp96-Ig no irradiadas en un volumen de 0,5 ml de PBS según el programa indicado en las gráficas. Los ratones de
 10 control se trataron con PBS, EG7 o CPL-albúmina de huevo. El tamaño de tumores en el flanco se midió en dos
 dimensiones dos veces por semana durante al menos 20 días.

Análisis estadístico

15 La significancia se evaluó por pruebas de la t. Un valor calculado de $p < 0,05$ se consideró que indicaba significancia
 estadística.

Tumores establecidos suprimen la expansión de CTL CD8 mediada por gp96 independiente de la especificidad de TCR

20 La transfección de proteína de fusión de choque térmico gp96-Ig en células tumorales produce la secreción de gp96-
 Ig junto con péptidos chaperonados con gp96. Gp96-Ig es una proteína modificada generada por la sustitución de la
 señal de retención del retículo endoplásmico (KDEL) de gp96 con la porción Fc de IgG1. La inyección de ratones
 con células tumorales que secretan gp96-Ig produce la inducción de inmunidad específica de tumor y memoria y
 25 protección de la posterior exposición al mismo tumor, pero no transfectado. La inmunidad tumoral generada por
 gp96-Ig secretada es específica para péptidos chaperonados con gp96 que incluyen péptidos derivados de
 antígenos endógenos de tumor, tales como antígenos específicos para EL4, y para antígenos sustitutos tales como
 albúmina de huevo transfectada en EL4 (EG7) o CPL (CPL-albúmina de huevo). El antígeno sustituto de albúmina
 de huevo ofrece un procedimiento para determinar con exactitud la expansión de CTL $CD8^+$ *in vivo* mediante
 30 transferencia adoptiva de células $CD8^+$ transgénicas de OT-I TCR específicas para albúmina de huevo.

Los tumores establecidos son conocidos por ser supresores de la expansión de CTL. Para medir respuestas de CTL
 en presencia y ausencia de tumores establecidos, los presentes inventores usaron el sistema de OT-I transgénico de
 TCR en el que CTL $CD8^+$ transgénicos responden a tumores singénicos o alógenos transfectados con albúmina de
 35 huevo que secretan gp96-Ig-albúmina de huevo. Como modelos de tumor trasplantables los presentes inventores
 usaron EG7, derivada de EL4 por transfección con albúmina de huevo, que se clasifica como inmunogénica y
 altamente tumorigénica. Además, los presentes inventores también usaron el carcinoma de pulmón de Lewis (CPL y
 CPL-albúmina de huevo) que se considera menos inmunogénico y altamente tumorigénico. La tasa de división de
 ambas líneas celulares es muy rápida con un tiempo de duplicación de 8-12 horas en cultivo.

40 Después de una única inmunización i.p. con un millón de células EG7-gp96-Ig, que secretan 60-80 ng de gp96-Ig
 por 10^6 células en 24 horas, OT-I se expanden de niveles preinmunes bajos en la puerta de $CD8^+$ (~0,2 %) a altas
 frecuencias (15-40%) en ratones sin tumor. La administración de EG7 irradiadas que no secretan gp96-Ig no puede
 producir expansión de OT-I significativa. Pero tumores EG7 subcutáneamente establecidos presentes en un sitio
 45 distante en el flanco inhiben significativamente la expansión inducida por la vacuna de gp96 de OT-I en la cavidad
 peritoneal y sistémicamente en bazo y ganglios linfáticos. Tumores EG7 secretan albúmina de huevo y expresan K^b -
 albúmina de huevo. Por tanto, es posible que OT-I adoptivamente transferidas tras la recirculación mediante el lecho
 tumoral o ganglios linfáticos de drenaje de tumor sean anérgicas debido a que reciben señales mediante sus TCR
 50 específicos de K^b -albúmina de huevo mientras que no reciben señal coestimulante. Para evaluar esta hipótesis, los
 tumores singénicos EL4 y CPL, ninguno de los cuales expresa albúmina de huevo, se establecieron
 subcutáneamente en sitios distantes. Posteriormente, OT-I se transfirieron adoptivamente intravenosamente (i.v.) y
 los ratones se inmunizaron i.p. con EG7-gp96-Ig. EL4 y CPL establecidos fueron tan eficaces en suprimir la
 expansión de OT-I por gp96-albúmina de huevo secretada como EG7 establecidas que indica que la supresión no
 depende del antígeno de TCR apropiado, K^b -albúmina de huevo, en el tumor. Mientras que la expansión de OT-I en
 55 la cavidad peritoneal y sistémicamente se suprimió por la presencia de CPL y EL4 en sitios distantes, el
 reclutamiento de células totales en la cavidad peritoneal tras la inmunización con EG7-gp96-Ig i.p. aumentó en
 realidad cuando se comparó con ratones sin tumor.

Como también se ha informado por otros, los datos indican que tumores establecidos pueden inducir supresión no
 60 específica de antígeno de expansión de CTL. Esta inducción de la supresión se correlaciona con elevado
 reclutamiento celular al sitio de vacuna en la cavidad peritoneal. La transferencia de células peritoneales inducida
 por vacuna de ratones portadores de tumor a sin tumor suprimió la expansión de OT-I en ratones receptores que
 indica la presencia de células reguladoras o supresoras. Así, los linfocitos T $CD8^+$ son no reactivos debido a una
 respuesta supresora celular en ratones portadores de tumor independiente de antígeno.

Para vencer la inmunosupresión no específica de antígeno, los presentes inventores evaluaron si la estimulación específica de antígeno frecuentemente repetida de CTL CD8⁺ por vacunación podría contrarrestar o no la actividad supresora encontrada en ratones portadores de tumor.

El rechazo de tumores establecidos requiere frecuentes inmunizaciones de gp96-Ig

Aunque muchas estrategias de vacunación, que incluyen gp96-Ig secretada, pueden establecer inmunidad protectora en ratones contra tumores y antígenos de tumor, es más difícil de rechazar tumores ya establecidos por vacunación terapéutica. Dada la observación de supresión no específica de antígeno de la expansión de CD8, los presentes inventores analizaron cómo afectaron programas de vacunación diferentes al rechazo de tumor y/o crecimiento tumoral.

Los presentes inventores analizaron inicialmente el efecto de la vacunación terapéutica empezando la vacunación el mismo día que el trasplante de tumor. Un millón de células tumorales EG7 se trasplantaron subcutáneamente en el flanco de ratones singénicos. En el mismo día (día 0), un millón de células de vacuna EG7 que secretan gp96-Ig (EG7-gp96-Ig), que secretan gp96-Ig a una tasa de 60-80 ng/10⁶ células x 24 h) se administraron i.p. como vacuna y la vacunación se repitió en el día 3, 7, 10 y 14. En comparación con ratones que no reciben terapia, el crecimiento tumoral se reduce por cuatro vacunaciones de EG7-gp96-Ig empezando en el mismo día que el trasplante de tumor. El efecto terapéutico es gp96 y dependiente de antígeno. EG7 irradiadas, que no secretan gp96-Ig, o CPL-gp96-Ig, que no expresan antígenos de EG7, pero que secretan gp96-Ig a la misma tasa que EG7-gp96-Ig, son incapaces de retardar el crecimiento tumoral cuando se administran i.p. como vacuna a la dosis indicada y programa como EG7-gp96-Ig. Cuando la vacunación con EG7-gp96-Ig empieza dos días o después después de la inoculación de EG7, el efecto terapéutico usando el mismo programa de vacunación se reduce sustancialmente. Estos datos demuestran que incluso después de dos días los tumores establecidos son más difíciles de controlar por vacunación que los tumores que están recientemente trasplantados.

Los presentes inventores evaluaron a continuación si los tumores establecidos podrían o no controlarse por programas de vacunación más frecuentes. Se trasplantaron un millón de células tumorales EG7 subcutáneamente en el flanco y se dejaron establecerse durante tres a siete días, dejando al menos siete o más duplicados de células tumorales. Durante este periodo se produce la vascularización del nódulo tumoral que es detectable visualmente. Entonces, los ratones se vacunaron diariamente i.p. con un millón de células EG7-gp96-Ig o, en controles de especificidad, con el mismo programa y dosis de células CPL-gp96-Ig, o células EG7 irradiadas, o se dejaron sin vacunar. La vacunación diaria con EG7-gp96-Ig controló eficazmente el crecimiento de EG7 que se habían establecido durante tres días, mientras que la vacunación diaria con EG7 irradiadas o con CPL-gp96-Ig no tuvo efecto sobre crecimiento de EG7 establecidas. En otros estudios los presentes inventores dejaron que los tumores EG7 trasplantados se establecieran durante 5 y 7 días antes de empezar la vacunación con EG7-gp96-Ig. Se requirieron dos vacunaciones cada día para retardar el crecimiento tumoral en esta etapa posterior del establecimiento tumoral. Los datos muestran que la inmunización frecuente puede comprobar el crecimiento tumoral durante un periodo de 24 días en ratones. Se necesitarán otros estudios para determinar si los programas de vacunación a largo plazo continuados pueden erradicar o no completamente los tumores.

Para validar datos obtenidos con el linfoma EG7 inmunogénico, los experimentos se repitieron con CPL establecido menos inmunogénico. Las inmunizaciones i.p. repetidas (día 3, 7, 10, 14) con CPL-gp96-Ig que empiezan el tercer día después del trasplante del tumor produjeron retardo de la progresión tumoral de CPL. Las inmunizaciones diarias para CPL no fueron más eficaces en el retardo tumoral. El efecto de la inmunización fue específico para tumor ya que la vacunación de EG7-gp96-Ig fue incapaz de controlar el crecimiento tumoral de CPL. El control del crecimiento tumoral tampoco pudo lograrse por CPL irradiado, pero dependió de la secreción de gp96-Ig.

Estos datos sugieren que la frecuente activación de DC y NK combinada con la presentación cruzada de antígeno por gp96-Ig secretada y sus péptidos chaperonados puede vencer la inmunosupresión no específica de antígeno inducida por tumor establecido.

El reclutamiento de DC y NK y la expansión de CTL CD8 mediados por gp96 se potencia en ratones deficientes en linfocitos B

Se ha informado por varios grupos que las respuestas antitumorales Th1 se potencian en ratones deficientes en linfocitos B (RDLB) cuando se compara con ratones naturales. Por tanto, los presentes inventores estudiaron la función de linfocitos B en la expansión de CTL mediada por gp96 e inmunidad antitumoral. La cavidad peritoneal está poblada por linfocitos B CD5-CD19⁺ y por linfocitos B1-B CD5⁺CD19⁺, produciendo los últimos anticuerpo IgM y no experimentando conmutación de isotipo tras la activación. Tras la inmunización i.p. con EG7-gp96-Ig, la población CD5-CD19⁺ aumenta aproximadamente cinco veces en el día 4 después de la inmunización, mientras que los linfocitos B1-B CD5⁺ aumentan solo moderadamente. La expansión de OT-I mediada por gp96 es máxima en el día 4 y 5 después de la inmunización. Va precedida del reclutamiento y activación de células DC y NK en la cavidad peritoneal, el sitio de vacunación. En ratones deficientes en linfocitos B, el reclutamiento de células DC y especialmente NK aumentó en tres experimentos separados y las células reclutadas permanecieron más tiempo en la cavidad peritoneal. La diferencia no alcanzó significancia, pero fue reproducible. La transferencia adoptiva de

linfocitos B naturales a RDLB abolió el elevado reclutamiento de células DC y NK. El hallazgo sugiere que los linfocitos B influyen en el reclutamiento inducido por gp96 de células inmunitarias innatas y sugieren que los linfocitos B también pueden participar en la regulación o supresión de la expansión de CTL CD8⁺.

5 Por tanto, los presentes inventores evaluaron si la expansión de OT-I marcado con gfp aumentó o no en RDLB. La expansión de OT-I después de la inmunización con gp96 en RDLB fue aproximadamente dos veces tan fuerte como la observada en ratones naturales en el día 4. Y, lo que es más importante, OT-I persistió a frecuencias significativamente mayores en el día 7 y 12 después de la inmunización en la cavidad peritoneal y en ganglios linfáticos drenantes. La transferencia adoptiva de linfocitos B naturales a RDLB antes de la inmunización redujo la expansión de OT-I a niveles o por debajo de aquellos observados en ratones naturales. La supresión de la expansión de OT-I por la presencia de linfocitos B no está mediada por la producción de IL-10 ya que ratones deficientes en IL-10 presentan expansión de OT-I similar a ratones naturales en vez de expansión potenciada como se observa en RDLB.

15 *El rechazo mediado por gp96 de tumores establecidos se potencia en ausencia de linfocitos B*

Como se muestra anteriormente, el control del crecimiento de EG7 establecidas en ratones naturales requiere mínimamente inmunización de gp96 diaria. Similarmente, la progresión de CPL puede retardarse por inmunizaciones frecuentes. Las células EG7 y EL4 son rechazadas en RDLB y no establecen tumores; sin embargo, CPL y CPL-albúmina de huevo pueden establecerse en RDLB aunque crecen a una tasa más lenta que en ratones naturales. CPL-albúmina de huevo se estableció subcutáneamente en el flanco durante 7 días en RDLB y en ratones naturales. OT-I se transfirió adoptivamente i.v. y dos días después se administró CPL-albúmina de huevo-gp96-Ig como dosis única i.p. y se monitorizó el crecimiento tumoral. En RDLB, una única inmunización produjo rechazo completo de tumores de CPL-albúmina de huevo de siete días establecidos en tres ratones y encogimiento del tumor significativo en dos. En ausencia de tratamiento, CPL-albúmina de huevo continuó creciendo progresivamente en RDLB, no obstante a una tasa más lenta que en ratones naturales. La reconstitución de linfocitos B de RDLB proveyó el efecto de vacunación similar al observado en ratones naturales, concretamente retardo de la progresión.

El control de tumores opcional de CPL establecido en RDLB por una única inmunización está soportado tanto por números suficientemente altos de precursores de CTL específicos de tumor (OT-I) como por inmunización específica de antígeno (CPL-albúmina de huevo-gp96-Ig). En RDLB, la presencia de un millón de OT-I adoptivamente transferidos sin inmunización con gp96 no produce rechazo de tumor en la mayoría de los ratones. Asimismo, la inmunización con gp96 sola sin transferencia de OT-1 es menos eficaz que la combinación.

35 *Ensayo clínico de vacuna para cáncer alógeno en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) para referencia solo.*

La línea de células de cáncer de pulmón alógenas AD100 se transfecta con gp96-Ig y HLA-A1. Al menos el 70 % de las células expresan más de 60 ng de gp96-Ig cada 24 horas a partir de un millón células. Las células cancerosas recombinantes se irradian y luego se inyectan intradérmicamente en pacientes que padecen CPCNP avanzado, recidivante o metastásico (estadio IIIB/IV). No se requiere coincidencia de HLA. Si no se producen cuestiones sobre la toxicidad, los pacientes se vacunarán con 5×10^7 células cancerosas alógenas una vez cada semana o cada dos semanas durante 17 semanas. Alternativamente, un total de $4,5 \times 10^8$ células cancerosas alógenas pueden administrarse por (a) nueve inyecciones durante 18 semanas, (b) 18 inyecciones durante 18 semanas, o (c) 36 inyecciones durante 18 semanas.

DISCUSIÓN

Es muy apreciado que los tumores establecidos supriman la inmunidad antitumoral. Los linfocitos T específicos de tumor se vuelven anérgicos en presencia de tumores establecidos. La anergia para el linfoma de linfocitos B usado en ese estudio fue específica de antígeno, limitada a MHC y dependiente de la presencia de células presentadoras de antígeno derivadas de la médula ósea coincidentes con MHC. En otros estudios, células supresoras de mieloides no específicas para antígeno y linfocitos T reguladores participan en la supresión de inmunidad antitumoral. Los estudios de los presentes inventores muestran que la supresión de respuestas de CTL *in vivo* puede lograrse por tumores establecidos mediante rutas independientes de antígeno. La expansión de OT-I en respuesta a vacunación con gp96-albúmina de huevo se inhibe por tumores establecidos independiente de la expresión de albúmina de huevo por los tumores. Este tipo de supresión puede lograrse por linfocitos T reguladores o por otras células supresoras tales como células supresoras de mieloides o macrófagos M2. De acuerdo con esta hipótesis, la actividad supresora es transferible a ratones sin tumor por la transferencia de células peritoneales provocadas en ratones portadores de tumor por vacunación con gp96.

Mientras que la respuesta de OT-I a inmunización con gp96-albúmina de huevo se inhibió fuertemente en presencia de tumores establecidos, no se bloquea totalmente, sugiriendo que hay equilibrio entre inmunosupresión por el tumor establecido y activación de CD8-CTL mediante presentación cruzada de antígeno por DC activadas estimuladas por gp96-albúmina de huevo secretada. Los presentes inventores han mostrado previamente que en

ratones sin tratamiento previo para el tumor gp96-albúmina de huevo produce el reclutamiento y activación de NK y DC seguido de expansión de OT-I. Los tumores establecidos, aunque en realidad potencian el reclutamiento de células en la cavidad peritoneal por vacunación con CPL-gp96-Ig, inhiben la expansión de OT-I y sugieren que en presencia de tumores establecidos es probable que muchas de las células reclutadas sean células supresoras. Esta hipótesis predice que las frecuentes inmunizaciones con gp96-albúmina de huevo pueden vencer la actividad supresora desplazando el equilibrio de supresión a elevada activación inmune mediante estimulación de DC y NK mediada por gp96 repetida, elevada presentación cruzada de antígenos y sensibilización de CTL. De hecho, las frecuentes inmunizaciones tienen efectos significativos sobre el retardo de la progresión tumoral. En el caso de EG7 establecido, vacunaciones diarias o dos veces al día fueron más eficaces en detener la progresión tumoral. Para CPL, la inmunización cada dos o tres días fue suficiente y la inmunización diaria no fue más eficaz. Estas diferencias específicas de tumores pueden relacionarse con la tasa a la que las células supresoras se generan por la presencia del tumor periférico. Alternativamente, puede depender del mecanismo por el que los tumores median en la inducción de células supresoras o la naturaleza de las células supresoras que se han inducido. Estas cuestiones están actualmente en estudio.

Estudiando la respuesta de OT-I a inmunización i.p. con gp96-albúmina de huevo secretada de tumor los presentes inventores notaron que números grandes de linfocitos B son reclutados en la cavidad peritoneal. Se ha informado que los linfocitos B son inhibidores para inmunidad antitumoral promoviendo la cuestión en cuanto a su función en la expansión de OT-I mediada por gp96. Usando ratones deficientes en linfocitos B fue evidente inmediatamente que los linfocitos B inhiben tanto el reclutamiento de NK y DC como la expansión de OT-I tras la inmunización con gp96-albúmina de huevo. Los RDLB reconstituidos en linfocitos B respondieron como ratones naturales a la expansión de OT-I mediada por gp96-albúmina de huevo, descartando la posibilidad de que la deficiencia de linfocitos B hubiera modificado la sensibilidad de RDLB a la inmunización con gp96-albúmina de huevo de un modo sin relacionar con la ausencia de linfocitos B. La deficiencia de linfocitos B produjo expansión de OT-I potenciada y rechazo de tumor fuertemente potenciado de tumores de CPL-albúmina de huevo establecidos de siete días incluso después de solo una única inmunización con gp96-Ig. Los datos sugieren que la inducción mediada por tumor de células supresoras disminuye enormemente en ausencia de linfocitos B o que los propios linfocitos B actúan de células supresoras. Si los linfocitos B participan o no en la inducción de células supresoras o si los linfocitos B por sí mismos son inmunosupresores o no para respuestas de CTL necesita estudio adicional; sin embargo, la IL-10 no parece participar en la supresión mediada por linfocitos B de inmunidad tumoral. En estudios en curso los presentes inventores han encontrado que linfocitos B deficientes en OX40-L muestran capacidad reducida para suprimir respuestas inmunitarias antitumorales. Queda por determinar cómo OX40-L expresado en linfocitos B media en la supresión de inmunidad antitumoral y expansión de CTL por gp96.

Los estudios de los presentes inventores proporcionan un modelo por el que la inmunosupresión independiente de antígeno puede estudiarse y definirse adicionalmente. La función de linfocitos B en particular en este procedimiento será de gran interés. Además, los estudios de los presentes inventores indican hacia formas en las que pueden prepararse vacunas antitumorales más eficaces. El agotamiento de linfocitos B con anticuerpos y la posterior vacunación frecuente, por ejemplo, con vacunas de gp96 secretada por tumor, puede producir control más eficiente del crecimiento tumoral que el observado con procedimientos de vacunación convencionales.

En el establecimiento de un intervalo numérico debe entenderse que también se describen todos los valores dentro del intervalo (por ejemplo, uno a diez también incluye cada valor entero numérico entre uno y diez además de todos los intervalos intermedios tales como dos a diez, uno a cinco y tres a ocho). El término "aproximadamente" puede referirse a la incertidumbre estadística asociada a una medida o la variabilidad en una cantidad numérica que un experto en la materia entendería que no afecta la operación de la invención o su patentabilidad.

Todas las modificaciones y sustituciones que están dentro del significado de las reivindicaciones y el intervalo de sus equivalentes legales deben englobarse dentro de su alcance. Una reivindicación que cita "que comprende" permite la inclusión de que otros elementos estén dentro del alcance de la reivindicación; la invención también se describe por tales reivindicaciones que citan las frases de transición "que consiste esencialmente en" (es decir, que permite la inclusión de que otros elementos estén dentro del alcance de la reivindicación si no afectan materialmente la operación de la invención) o "que consiste en" (es decir, que permite solo los elementos enumerados en la reivindicación distintos de impurezas o actividades intrascendentes que están generalmente asociados a la invención) en lugar de citar el término "que comprende". Cualquiera de estas tres transiciones puede usarse para reivindicar la invención.

Debe entenderse que un elemento descrito en esta memoria descriptiva no deben interpretarse como una limitación de la invención reivindicada a menos que se cite explícitamente en las reivindicaciones. Así, las reivindicaciones concedidas son la base para determinar el alcance de protección legal en lugar de una limitación de la memoria descriptiva que se lee en las reivindicaciones.

Las realizaciones descritas deben considerarse solo como ilustrativas, no restrictivas, debido a que el alcance de la protección legal proporcionada para la invención se indicará por las reivindicaciones adjuntas en vez de por esta memoria descriptiva.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición farmacéutica que comprende células que secretan gp96 para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto, en la que las células son alógenas para el sujeto y se administran al sujeto en al menos nueve dosificaciones durante un periodo de seis semanas.
- 2.- La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que cada una de las dosificaciones comprende entre diez millones y cien millones de las células.
- 10 3.- La composición para su uso según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que cada una de las dosificaciones se fracciona en una pluralidad de alícuotas que se administran al sujeto en diferentes sitios.
- 4.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que las dosificaciones se administran al sujeto intradérmicamente.
- 15 5.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que las dosificaciones se administran al sujeto subcutáneamente.
- 6.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que las dosificaciones se administran al sujeto intraperitonealmente.
- 20 7.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que al menos 18 dosificaciones se administran al sujeto.
- 25 8.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que al menos 27 dosificaciones se administran al sujeto.
- 9.- La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que las células se han transfectado con al menos un primer vector que comprende un primer ácido nucleico que codifica una primera proteína.
- 30 10.- La composición para su uso según la reivindicación 9, en la que la primera proteína es una forma secretada de un polipéptido gp96.
- 35 11.- La composición para su uso según la reivindicación 9, en la que las células también se han transfectado con al menos un segundo vector que comprende un segundo ácido nucleico que codifica una molécula del complejo de histocompatibilidad mayor.