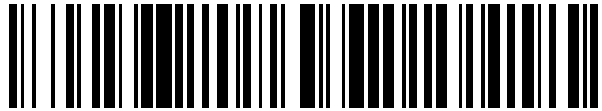


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 979**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2001 E 10180857 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2363139**

54 Título: **Procedimiento para aumentar la presentación de clase I de antígenos exógenos por células dendríticas humanas**

30 Prioridad:

**12.05.2000 US 203758 P**

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

**27.05.2016**

73 Titular/es:

**NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
4800 Montgomery Lane, Suite 800  
Bethesda, MD 20814, US**

72 Inventor/es:

**SALGALLER, MICHAEL L. y  
BOYNTON, ALTON L.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 571 979 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

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

**Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas**

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

**Antecedentes de la invención**

10 Está bien establecido que el sistema inmunitario puede actuar destruyendo células tumorales, incluyendo células cancerosas tanto primarias como metastásicas. De hecho, las pruebas de que el sistema inmunitario reconoce la presencia de células cancerosas neoplásicas están confirmadas por la existencia de linfocitos de infiltración en tejidos tumorales (Haskill y col., *Contemp. Top. Immunobiol.* 8: 107-170 (1978); Vose y Moore, *Semin. Hematol.* 22: 27-40 (1985)). A pesar de la presencia de células inmunitarias, los tumores con frecuencia prevalecen y no solamente sobreviven sino que se metastatizan hasta sitios distantes con crecimiento no restringido.

15 Los avances recientes en el entendimiento de la activación de linfocitos T y reconocimiento de células diana han permitido algún progreso en el desarrollo de inmunoterapia de cáncer mediada por linfocitos T (Schwartz, *Cell* 71: 1065-1068 (1992); Pardoll, *Curr. Opin. Immunol.* 4: 619-623 (1992)).

El sistema inmunitario se desarrolla a partir de una única célula progenitora multi-potencial a los subgrupos principales de células linfoides y mieloides. Las células linfoides están comprendidas por linfocitos B y linfocitos T. Las células mieloides incluyen macrófagos, monocitos y neutrófilos. Las células inmunitarias son capaces de circular y buscar antígenos ajenos y eliminarlos.

20 En el subgrupo linfoide, la respuesta inmunitaria conduce a la activación de linfocitos T auxiliares ( $T_H$ ) que son positivos para la expresión de la molécula de superficie  $CD4^+$  y de linfocitos T citotóxicos ( $T_C$ ) que son positivos en superficie para la molécula  $CD8^+$ . Los linfocitos T se activan mediante interacción con células presentadoras de antígenos (APC) que expresan moléculas mayores de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II asociadas con fragmentos antigénicos. Las secuencias de aminoácidos antigénicas asociadas derivan específicamente del antígeno procesado.

25 Las APC usan dos procedimientos alternativos para presentar antígenos dependiendo de la fuente del antígeno. Se endocita antígeno soluble, exógeno, a vacuolas y se degrada por pH bajo. Los fragmentos peptídicos que resultan se dirigen después a proteínas de MHC de clase II y se presentan en la superficie celular. La presentación en MHC de clase I requiere que los antígenos se degraden en el citosol y se transporten por el sistema transportador de TAP al retículo endoplásmico. Típicamente esto requiere que el antígeno esté en el citosol, por ejemplo en el caso de una infección viral o por traslación celular, y los péptidos resultantes se asocian después con MHC de clase I.

30 El complejo de antígeno-MHC se reconoce por el receptor de linfocitos T específicos que reconoce el antígeno, y las moléculas de superficie  $CD4$  y  $CD8$ .  $CD4$  y  $CD8$  interactúan con regiones conservadas de solamente una clase de MHC cada una. Aunque MHC de clase II se reconoce por linfocitos  $T_H$  debido a interacción con  $CD4$ , la presentación de MHC de clase I se restringe a activación de linfocitos  $T_C$  mediante interacción con  $CD8$ .

35 La activación de linfocitos T no tratados previamente o sensibilizados sigue un mecanismo definido. El antígeno endógeno se presenta en MHC de clase I y antígeno exógeno soluble se presenta en MHC de clase II por APC. Los complejos de antígenos de MHC de clase I o MHC de clase II interactúan con  $CD8$  o  $CD4$  respectivamente y también interactúan con el receptor de linfocitos T específico para el antígeno. Tras esta interacción específica, moléculas secundarias tales como  $\beta$ -microglobulina y  $CD8$  desencadenan la activación de los linfocitos T que después ejercen la respuesta inmunitaria apropiada.

40 Los linfocitos T  $CD4^+$  sensibilizados o "estimulados" producen quimiocinas que participan en la activación y el reclutamiento de linfocitos B así como diversos subconjuntos de linfocitos T. Los linfocitos T  $CD8^+$  sensibilizados aumentan en número en respuesta a linfocinas y son capaces de destruir cualquier célula que exprese los fragmentos antigénicos específicos asociados con moléculas de MHC de clase I coincidentes (Jondal y col., *Immunity* 5: 295-302 (1996)).

45 Los linfocitos de infiltración tumoral son prueba de que los tumores cancerosos inducen CTL  $CD8^+$  capaces de erradicar células que expresan antígenos asociados con cáncer o específicos de cáncer, limitando de este modo la progresión de la propagación tumoral y el desarrollo de enfermedad. Sin embargo, los tumores crecen con frecuencia y se metastatizan, superando esta inmunidad natural. Se han sugerido diversos métodos para inmunoterapia dirigida a varios cánceres particulares para potenciar esta respuesta inmunitaria natural, sin embargo, la dificultad principal ha sido inducir APC para presentar antígenos asociados a tumores o específicos de tejido humanos solubles mediante MHC de clase I. Experimentos recientes han demostrado en sistemas murinos, que la activación de CTL *in vitro* puede conferir una protección potente del crecimiento de tumores singénicos *in vivo* (Fields y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9482-9487 (1998)). Sin embargo, los experimentos en el sistema

inmunitario murino no son completamente predictivos de respuestas inmunitarias humanas. Hasta la fecha no hay ningún procedimiento terapéutico que induzca con éxito una respuesta inmunoterapéutica CTL humana eficaz contra cáncer metastásico o primario usando APC incubadas con una proteína soluble o antígeno proteico.

5 Las células presentadoras de antígenos (APC) son particularmente importantes en la inducción de una respuesta inmunitaria eficaz. Por definición, las APC no solamente presentan antígenos a linfocitos T con receptores de linfocitos T específicos de antígenos, sino que proporcionan todas las señales necesarias para activación de linfocitos T. Las señales necesarias para activación de linfocitos T se definen de forma incompleta, pero probablemente impliquen una diversidad de moléculas de superficie celular, así como citocinas o factores de crecimiento. Además, los factores necesarios para la activación de linfocitos T no tratados previamente o no sensibilizados pueden ser diferentes de los necesarios para la reactivación de linfocitos T de memoria previamente sensibilizados. La capacidad de las APC para presentar antígenos y suministrar señal para la activación de linfocitos T se denomina habitualmente función celular accesoria. Aunque se ha mostrado que los monocitos y los linfocitos B son APC competentes, sus capacidades de presentación de antígenos *in vitro* parecen estar limitadas a la reactivación de linfocitos T previamente sensibilizados. Por lo tanto, no son capaces de activar directamente poblaciones de linfocitos T no tratadas previamente o no sensibilizadas funcionalmente.

20 La expresión "células dendríticas" se refiere a una población diversa de tipos celulares morfológicamente similares hallados en una diversidad de tejidos linfoides y no linfoides (Steinman, Ann. Rev. Immunol. 9: 271-296 (1991)). Estas células incluyen células dendríticas linfoides del bazo, células de Langerhans de la epidermis, y células veladas en la circulación sanguínea. Aunque se clasifican de forma colectiva como un grupo basándose en su morfología, los altos niveles de expresión de MHC de clase II en superficie, y ausencia de ciertos otros marcadores de superficie expresados en linfocitos T, linfocitos B, monocitos y linfocitos citotóxicos naturales, no se sabe en la actualidad si las células dendríticas derivan de un precursor común o pueden todas actuar como APC de la misma manera. Las células dendríticas son las APC más potentes del sistema inmunitario, capaces de estimular respuestas de linfocitos T y B primarias. (Banchereau y col., Nature 392: 245-252 (1998)).

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

35 Se han iniciado ensayos clínicos relacionados con el uso de células dendríticas pulsadas con un antígeno relevante contra melanoma (Nestle, F.O., y col., Nat. Med. 4: 328-332 (1998)); contra linfoma de linfocitos B (Hsu, F.J., y col., Nat. Med. 2: 52-58 (1996)); y contra cáncer de próstata (Patente de Estados Unidos n.º 5.788.963 y documento WO-A-97/04802; Murphy y col., Prostate 29: 371-380 (1996); Salgaller, y col., Prostate 35: 144-151 (1998)).

40 El procesamiento de antígenos exógenos da como resultado presentación de antígenos en MHC de clase II, mientras que la ruta de procesamiento endógena utiliza MHC de clase I (Jondal y col., Immunity, 5: 295-302 (1996)). La activación de linfocitos T<sub>H</sub> por la presentación del MHC de clase II de antígeno ha tenido éxito terapéutico, pero los experimentos en modelos murinos sugieren que resultaría una protección contra el cáncer significativamente más potente si la presentación fuera por MHC de clase I. Sin embargo, el éxito en un modelo murino no siempre es predictivo del éxito usando células humana y no ha habido informes de presentación en MHC de clase I de antígenos exógenos solubles por APC humanas.

45 Aunque hay un pequeño subgrupo de antígenos solubles que se presentan en MHC de clase I, incluyendo algunos antígenos bacterianos y virales, no se ha presentado un procedimiento para inducir de forma fiable presentación en el MHC de clase I de muchos antígenos, incluyendo, por ejemplo, antígenos específicos de tejido o asociados con tumor humano soluble exógenos. Se han desarrollado técnicas para crear proteínas de fusión de antígenos solubles que se presentan en MHC de clase I y antígenos de interés, sin embargo este proceso requiere tiempo y manipulaciones moleculares significativas para implementar eficazmente. El procesamiento por MHC de clase I de un antígeno exógeno podría representar potencialmente una mejora significativa en inmunoterapias actuales. El cáncer de próstata es la forma más común de cáncer actualmente diagnosticado en hombres americanos. Solamente es superado por el cáncer de pulmón como la causa principal de muertes por cáncer entre hombres adultos. Casi un tercio de todos los pacientes de cáncer de próstata de nuevo diagnóstico presentan enfermedad metastásica o localmente avanzada. En la actualidad, las terapias disponibles para enfermedad metastásica, incluyendo enfoques hormonales, quimioterapéuticos y de radiación, no han conseguido potencial curativo en un porcentaje significativo de pacientes. Para los que tienen carcinoma localizado, la prostatectomía y radioterapia, los patrones de tratamiento actuales dan como resultado tasas de fracaso de entre el 20 y el 50 %. Las opciones para estos fracasos de tratamiento primario, como con los que tienen enfermedad avanzada, son escasas en número y tienen un beneficio clínico limitado.

60

Con la dilucidación de los mecanismos implicados en el reconocimiento inmunitario, se han puesto a disposición nuevas y excitantes estrategias en productos terapéuticos antineoplásicos. Son particularmente prometedoras las vacunas de cáncer que utilizan presentación de antígenos por células dendríticas (CD) para elevar la respuesta antitumoral. Sin embargo, trabajos recientes han mostrado que es importante potenciar el suministro de antígenos solubles, exógenos, asociados a tumor en el compartimento de procesamiento de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I de CD para maximizar la respuesta inmunitaria celular. La presente invención aborda estas y otras necesidades de la técnica.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones y proporciona procedimientos, y composiciones, para activación de células dendríticas de linfocitos T en respuestas inmunoterapéuticas contra cáncer primario o metastásico. Las CD obtenidas de donantes humanos se administran a un paciente con cáncer que lo necesite, después de exposición a un antígeno asociado a tejido soluble, específico de tejido, asociado a tumor o específico de tumor en combinación con un adyuvante que aumenta la respuesta de linfocitos T citotóxicos asociada a MHC de clase I *in vivo* en comparación con la respuesta inducida por antígenos solamente. Como alternativa, el antígeno usado para la exposición a las CD puede ser un fragmento del antígeno asociado a tejido, específico de tejido o asociado a tumor. Las CD pueden exponerse simultáneamente al adyuvante y al antígeno asociado a tejido soluble, específico de tejido o tumoral, o fragmentos antigénicos de los mismos. Esta respuesta incluye activación de linfocitos T auxiliares (T<sub>H</sub>) y linfocitos T citotóxicos (T<sub>C</sub>). Como alternativa, se cultivan linfocitos T humanos *in vitro* con las CD anteriores y los linfocitos T activados *in vitro* se administran posteriormente a un paciente con cáncer que lo necesite.

En la invención como se define en las reivindicaciones, se usa bacilo de Calmette Guerin (BCG), *Mycobacteria bovis*, como un adyuvante con un antígeno como se define en las reivindicaciones o fragmento antigénico del mismo para obtener procesamiento por MHC de clase I. El antígeno exógeno se procesa normalmente por el compartimento de MHC de clase I en células presentadoras de antígenos (APC) y se procesan antígenos endógenos por el compartimento de MHC de clase I. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que cuando las CD se pulsan con un antígeno soluble, incluyendo antígeno tumoral humano o antígenos específicos de tejido con un adyuvante, tal como BCG, se produce potenciación de la presentación de MHC de clase I. Por lo tanto, la presencia de un adyuvante tal como BCG típicamente aumenta el procesamiento de antígenos de tumores solubles de CD en el compartimento de MHC de clase I y, de forma correspondiente, activa un mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en comparación con individuos a los que se administra el antígeno solamente.

Las CD pueden exponerse al antígeno soluble, incluyendo antígeno viral, bacteriano, tisular, específico de tejido, asociado a tumor o específico de tumor en presencia de una combinación de BCG y una exotoxina bacteriana, tal como lipopolisacárido (LPS). De acuerdo con una realización un lisado celular tumoral de próstata recuperado de una muestra de ensayo quirúrgica puede usarse como antígeno. Por ejemplo, una muestra de un tumor propio de un paciente de cáncer de próstata, obtenido en biopsia o en resección quirúrgica, puede usarse para proporcionar un lisado celular para antígeno. Además, el antígeno de membrana específico de próstata purificado (PSMA, también conocido como antígeno PSM), que reacciona específicamente con el anticuerpo monoclonal 7E11-C.5 puede usarse como un antígeno. Los antígenos adicionales incluyen fragmentos antigénicos de un antígeno asociado a tejido, específico de tejido, asociado a tumor o proteico específico de tumor, es decir, tal como PSMA, antígeno de mucina de próstata, antígeno específico de próstata, fosfatasa ácida de próstata (PAP), antígeno PD41, y similares. De acuerdo con una realización como péptido antigénico que tiene la secuencia de aminoácidos Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val (SEQ ID NO: 1) (designado PSM-1) que corresponde a los restos de aminoácidos 4-12 de PSMA puede usarse como antígeno. Adicionalmente, un péptido antigénico que tiene una secuencia de aminoácidos Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val (SEQ ID NO: 2) (designado PSM-2), que corresponde a los restos de aminoácidos 711-719 de PSMA puede usarse como antígeno.

Un péptido antigénico seleccionado de fragmentos peptídicos antigénicos de PSM puede emparejarse con un motivo de unión de un haplotipo específico. Los péptidos pueden seleccionarse para presentarse por CD para activar linfocitos T de un paciente que coincidía con el haplotipo indicado para cada péptido de PSA y que se había emparejado con un motivo de unión de un haplotipo específico.

Las CD cargadas con antígenos de MHC de clase I, descritas anteriormente, pueden incubarse *in vitro* con linfocitos T sensibilizados o no sensibilizados para activar las respuestas de linfocitos T relevantes. Los linfocitos T activados pueden administrarse posteriormente a un paciente, es decir, un cáncer para inmunoterapia. En cualquier caso, las CD se usan provechosamente para inducir una respuesta inhibitoria de crecimiento inmunoterapéutico contra, por ejemplo, una infección o un cáncer humano primario o metastásico. En particular, el cáncer humano es cáncer de próstata.

La invención como se define en las reivindicaciones es útil en un procedimiento para producir una respuesta inhibitoria de crecimiento de proliferación celular tumoral, que comprende administrar, a un paciente con cáncer que lo necesite, una cantidad eficaz de linfocitos T activados, en los que los linfocitos T se activaron *in vitro*. La activación *in vitro* incluye exposición de células dendríticas humanas a un antígeno asociado a tejido, asociado a tumor, específico de tumor o fragmentos antigénicos del mismo en combinación con BCG, bien en combinación con

o sin LPS, para potenciar el procesamiento por MHC de clase I. La invención se refiere a un procedimiento para producir una respuesta inhibitoria de crecimiento tumoral o proliferación de células cancerosas, que comprende administrar a un paciente con cáncer que lo necesite, una cantidad eficaz de células dendríticas humanas, expuestas *in vitro* a un antígeno asociado a tejido, específico de tejido, asociado a tumor o específico de tumor o un fragmento antigénico del mismo en combinación con BCG, en combinación con o sin LPS, de modo que después de la administración, las CD humanas induzcan una respuesta inmunitaria predominantemente de linfocitos T CD8<sup>+</sup> o aumenten una respuesta inmunitaria existente contra las células tumorales o cancerosas.

Los antígenos útiles para los procedimientos de la invención incluyen pero sin limitación: extractos solubles de células tumorales de una biopsia de paciente, extractos solubles de células tumorales obtenidas durante la resección quirúrgica, antígenos específicos de tumor, antígenos asociados a tejido o específicos de tejido relevantes para el tipo tumoral, antígenos tumorales purificados recombinantes, antígenos asociados a tejido o específicos de tejido purificados recombinantes y similares, como se expone en el presente documento.

### **Breve descripción de las figuras**

La presente invención puede entenderse más completamente por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención, ejemplos ilustrados de realizaciones específicas de la invención y las figuras adjuntas.

La Fig. 1A a Fig. 1C representan la activación de linfocitos T de pacientes con cáncer de próstata por células dendríticas autólogas (Fig. 1A) o alogénicas (Fig. 1B y Fig. 1C) previamente cargadas por pulsos con antígeno de membrana específico de próstata derivado de LNCaP (PSMA) y BCG, o BCG y LPS, o los linfocitos T se pulsaron con células dendríticas cargadas de forma osmótica con PSMA solamente. El día 18 se lavaron linfocitos T cultivados del Paciente 92 y se añadieron a placas de 96 pocillos a  $5 \times 10^4$  células por pocillo por duplicado. Se añadieron CD autólogas (Fig. 1A) o CD alogénicas del Paciente 105 (Fig. 1B) y paciente I.T. (Fig. 1C), cargadas de forma osmóticas con PSMA (barras abiertas) u ovoalbúmina (OVA; barras sombreadas) (o sin tratar; barras cruzadas) a los linfocitos T a  $5 \times 10^4$  células por pocillo para ensayar con respecto a activación como se mide por producción de citocinas. Después de 24 horas de incubación, se retiraron 150  $\mu$ l de sobrenadante de cada pocillo de cultivo y la cantidad de IFN $\gamma$  presente se midió por ELISA y se presentó frente al eje  $\gamma$ .

La Fig. 2A a la Fig. 2C representan la sensibilidad específica de linfocitos T activados *in vitro*, incluyendo grupos de linfocitos T tanto CD8<sup>+</sup> como CD4<sup>+</sup>. El día 25 se lavaron linfocitos T cultivados del paciente 105 y se añadieron a placas de 96 pocillos a  $5 \times 10^4$  células por pocillo por duplicado. Las CD se pulsaron con antígeno (PSMA u OVA) y (Fig. 2A) BCG, (Fig. 2B) BCG + LPS. Como alternativa, se cargaron de forma osmótica PSMA u OVA (Fig. 2C). Se añadieron CD autólogas pulsadas con PSMA (CD +PSMA), OVA (CD +OVA) o no pulsadas (CD solamente) a linfocitos T del Paciente 105 a  $5 \times 10^4$  CD por pocillo. Las células efectoras se incubaron con solución salina (sin mAb; barras abiertas) o mAb anti-CD8 1  $\mu$ g/ml (barras sombreadas) o mAb anti-CD4 1  $\mu$ g/ml (barras cruzadas), en pocillos por duplicado. La producción de IFN $\gamma$  se midió como en la Fig. 1.

La Fig. 3A a la Fig. 3C representan efectos dependientes de dosis de células dendríticas activadas *in vitro* con PSMA soluble combinado con BCG, o con BCG y LPS en linfocitos T. Se activaron linfocitos T de paciente de cáncer de próstata 105 por células dendríticas autólogas previamente cargadas con diluciones en serie de PSMA derivada de células LNCaP. Se realizaron ensayos ELISA para evaluar la secreción de IFN $\gamma$ . El día 32 o 39 (Fig. 3C) se lavaron células cultivadas y se añadieron a placas de 96 pocillos a  $5 \times 10^4$  células por pocillo por duplicado. Se añadieron CD autólogas pulsadas con PSMA (barras abiertas), OVA (barras sombreadas) o no pulsadas (barras cruzadas) a los linfocitos T a  $5 \times 10^4$  células por pocillo con o sin BCG o BCG más LPS. BCG, día 32 de cultivo (Fig. 3A); BCG + LPS, día 32 de cultivo (Fig. 3B); BCG, día 39 de cultivo (Fig. 3C). Después de 24 horas de incubación, se retiraron 150  $\mu$ l de sobrenadante de cada cultivo y se midió la cantidad de IFN $\gamma$  presente por ELISA.

La Fig. 4A y Fig. 4B demuestran la estimulación de la actividad lítica para dianas específicas de antígeno de linfocitos T de pacientes con cáncer de próstata estimulados *in vitro* con CD que expresan PSMA. Se incubaron diferentes relacionados de efector (E) (es decir, linfocitos T) con respecto a diana (T) (es decir, células dendríticas autólogas) (E:T) durante cuatro horas. Las CD autólogas, cargadas osmóticamente con PSMA (●) u OVA (■), o no tratadas (▲), se radiomarcaron con <sup>111</sup>In. Se calculó el porcentaje de lisis usando la siguiente fórmula: [(liberación experimental – liberación espontánea)/(liberación máxima – liberación espontánea)] x 100. Paciente I.T., día 32 de cultivo (Fig. 4A). Paciente 92, día 39 de cultivo (Fig. 4B).

La Fig. 5A y Fig. 5B representan reactividad específica a PSMA de linfocitos T de Paciente de cáncer de próstata 105 activada por CD autólogas nuevas o crioconservadas, cargadas con PSMA parcialmente purificado de células LNCaP (aproximadamente 80 % puras). El día 39 se lavaron linfocitos T cultivados y se añadieron a placas de 96 pocillos a  $5 \times 10^4$  células por pocillo por duplicado. Se pulsaron dianas de CD autólogas con PSMA, OVA o no se pulsaron y se añadieron a los linfocitos T a  $5 \times 10^4$  células por pocillo. Se observó reactividad específica de PSMA contra dianas CD tanto nuevas (barras abiertas) como crioconservadas (barras sombreadas). Se produjo reactividad específica de PSMA si los efectores se habían estimulado con BCD cargadas de forma osmótica o CD cargadas con BCG. La producción de IFN $\gamma$  se midió como en la Fig. 1.

La Fig. 6 demuestra que los linfocitos T del Paciente de cáncer de próstata 92 pueden activarse por la línea celular presentadora de antígenos, T2, cargada de forma exógena con 25  $\mu$ g de péptido bien con PSM-P1 (barras abiertas), la proteína de matriz de gripe M1 (barras sombreadas) o ninguna (barras cruzadas). Se realizaron ELISA convencionales para evaluar la secreción de IFN $\gamma$ . Día 46 de cultivo (Fig. 6A) o Día 53 de

cultivo (Fig. 6B).

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a procedimientos y composiciones para su uso en células dendríticas (CD) para activar linfocitos T para una respuesta inmunoterapéutica contra un antígeno. El antígeno puede ser cualquier antígeno, incluyendo un antígeno viral o bacteriano, un antígeno tisular, un antígeno asociado a tumor u otro antígeno asociado con, por ejemplo, un cáncer primario o metastático. Las CD obtenidas de donantes humanos se administran a un paciente para activar las respuestas de linfocitos T relevantes *in vivo* después de exposición a un virus, una bacteria o a un antígeno asociado a tejido, específico de tejido, asociado a tumor o cáncer, o específico de tumor en combinación con un factor o agente que promueve el procesamiento por Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I. El antígeno puede ser un fragmento de uno de los antígenos proporcionados anteriormente. Además, y opcionalmente los procedimientos y composiciones inducen maduración de CD. El factor o agente que actúa por lo tanto para promover la activación por CD de linfocitos T de modo que al menos 25 %, e incluso más del 50 % de los linfocitos T, en comparación con antígeno proporcionado solo, son CD8<sup>+</sup>. Como alternativa, las CD se exponen a un antígeno específico de tejido, un antígeno de cáncer o un fragmento antigénico de uno de los antígenos con el factor promotor de procesamiento por MHC de clase I y maduración de CD *in vitro* y posteriormente se incuban con linfocitos T sensibilizados o no sensibilizados para activar las respuestas de linfocitos T relevantes *in vitro*. Los linfocitos T activados se administran después a un paciente con cáncer que lo necesite. En cualquier caso, las CD se usan provechosamente para inducir una respuesta inhibitoria de crecimiento inmunoterapéutico contra un tumor de cáncer primario o metastático.

Solamente para facilitar la explicación, la descripción de la invención se divide en las siguientes secciones: (1) fuentes de antígeno, (2) procedimientos para obtener o aislar células dendríticas, incluyendo CD con vida útil prolongada o CD criopreservadas; y (3) aplicaciones o procedimientos de uso de CD para estimular linfocitos T citotóxicos y auxiliares contra un virus, bacteria o cáncer *in vitro* e *in vivo*.

Los linfocitos T reactivos a antígeno son células efectoras específicas de antígeno que son importantes en la resistencia a enfermedad, incluyendo cáncer. Los linfocitos T reactivos a antígeno que son CD8<sup>+</sup>, reconocen el antígeno presentado por moléculas de MHC de clase I. Las moléculas de MHC de clase I se expresan por casi todos los tipos celulares. Los linfocitos T reactivos a antígeno que son CD4<sup>+</sup>, reconocen antígeno presentado por moléculas de MHC de clase II. Se expresan moléculas de MHC de clase II en una diversidad de tipos celulares incluyendo células dendríticas, células endoteliales, monocitos, macrófagos y linfocitos. La capacidad de los linfocitos T reactivos a antígeno para destruir células diana está restringida por factores antigénicos y genéticos. Para lisis de células diana, las células diana deben portar el mismo antígeno que indujo originalmente la estimulación de los linfocitos T, y la molécula de MHC de la misma clase que los linfocitos T.

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a procedimientos para generar linfocitos T reactivos a un antígeno que puede usarse en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como una infección viral o bacteriana, o cáncer. La presente invención se hizo posible por el sorprendente descubrimiento de que el bacilo de Calmette Guerin (BCG) estimula procesamiento por MHC de clase I de antígeno soluble exógeno y posteriormente aumenta la activación preferente de linfocitos T CD8<sup>+</sup> hasta al menos 25 %, e incluso más del 50 % de la población de linfocitos T activados, en comparación con individuos a los que se administró antígeno solamente. La proporción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> puede aumentar hasta 25 %, 50 %, o más, y puede incluso ser mayor de 75 % de la respuesta de linfocitos T total.

Puede añadirse BCG con un antígeno viral, bacteriano, asociado a tejido, específico de tejido, asociado a tumor o específico de tumor, o un fragmento antigénico del mismo, múltiples veces a los cultivos *in vitro* para reestimar la proliferación de linfocitos T reactivos al antígeno. Los linfocitos T reactivos al antígeno generados por los procedimientos de la invención son capaces de dirigirse específicamente, destruir, o provocar la lisis de las células infectadas o células cancerosas, u otras células diana según pueda ser el caso, o cualquier célula que porte los mismos antígenos y moléculas de MHC similares con los que se preparan los linfocitos T. Los linfocitos T reactivos al antígeno de la invención también pueden secretar una o más citocinas medibles, tales como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-3 y/o GM-CSF. La producción de estas citocinas puede usarse para supervisar la activación de linfocitos T específicos *in vitro*.

Previamente, se ha usado BCG como un constituyente de diversas composiciones de vacuna para actuar como un adyuvante para aumentar una respuesta inmunitaria serológica o de anticuerpo al inmunógeno diana. Además, se ha mostrado que células dendríticas internalizan partículas, incluyendo micobacterias BCG. (Inaba, y col. J. Exp. Med. 178: 479-488 (1993)). Se ha mostrado que las células dendríticas cargadas de micobacterias son más potentes en la presentación de antígenos a linfocitos T sensibilizados que los cultivos correspondientes de células dendríticas maduras que se exponen a un pulso de BCG. (Inaba y col., mencionado anteriormente (1993)).

La activación de células dendríticas por BCG se ha caracterizado como incluyente de agregación homotípica, regulación positiva de antígenos de superficie, modulación negativa de actividad endocítica y la liberación del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (Thurnher, y col., Int. J. Cancer 70: 128-134 (1997)). La expresión potenciada se ha documentado para el antígeno de maduración de células dendríticas CD83 y el co-estimulador de linfocitos T CD86

(B7-2). Se ha sugerido que la inducción de secreción de TNF- $\alpha$  era al menos parcialmente responsable de los cambios fenotípicos y funcionales observados en células dendríticas después de la captación de BCG. La estimulación de la expresión de ARNm de IL-8 y secreción de la proteína de IL-8 también se ha asociado con los efectos de linfocitos T de BCG. (Ramoner y col., J. Urology 159: 1488-1492 (1998)).

- 5 Hasta la fecha, aunque se ha administrado BCG junto con diversos antígenos, incluyendo células cancerosas y antígenos asociados con cáncer, aparentemente no ha habido ninguna demostración o reconocimiento de una activación preferente de linfocitos T CD8<sup>+</sup> cuando se exponen a células dendríticas que se han activado con antígeno específico de tejido combinado con BCG o con BCG y LPS que inducen una respuesta del MHC de clase I.

10 Los linfocitos T reactivos a antígeno pueden administrarse *in vivo* de forma autóloga (es decir, al mismo individuo del que se obtuvieron originalmente los linfocitos T (o células parentales de los linfocitos T)) o de forma singénica (es decir, a un gemelo idéntico del individuo del que se obtuvieron inicialmente las células cancerosas o infectadas); o alogénicamente a un individuo que comparte al menos un alelo del MHC común con el individuo del que se obtuvieron originalmente las células antigénicas y los linfocitos T.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "células antigénicas" se refiere a cualquier célula, típicamente células infectadas o células cancerosas, y en particular, células de cáncer de próstata, que pueden inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. Las fuentes de células antigénicas, y procedimientos de preparación de células antigénicas para uso en los presentes procedimientos se analizan en esta sección.

20 El término "pulsado" como se usa en el presente documento incluye el proceso de inmunización *in vitro*. El proceso de inmunización *in vitro* puede realizarse por una diversidad de procedimientos incluyendo pero sin limitación las células dendríticas pulsadas con antígenos (Steel y Nutman, J. Immunol. 160: 351-360 (1998); Tao y col., J. Immunol. 158: 4237-4244 (1997); Dozmorov y Miller, Cell Immunol. 178: 187-196 (1997); Inaba y col., J Exp Med. 166: 182-194 (1987); Macatonia y col., J Exp Med. 169: 1255-1264 (1989); De Bruijn y col., Eur. J. Immunol. 22: 3013-3020 (1992)), células RMA-S (células mutantes que expresan altos números de moléculas de MHC de clase I de superficie celular "vacías") cargadas con péptido (De Bruijn y col., Eur. J. Immunol. 21: 2963-2970 (1991); De Bruijn y col., Eur. J. Immunol. 22: 3013-3020 (1992); Houbiers y col., Eur. J. Immunol. 26: 2072-2077 (1993)) y perlas cargadas con péptido fagocitado por macrófago (De Bruijn y col., Eur. J. Immunol. 25: 1274-1285 (1995)), y células antigénicas con tensión osmótica (publicación de PCT WO 98/15616)). La sensibilización, por lo tanto, da como resultado la primera exposición de células inmunitarias no tratadas previamente con una molécula antigénica.

30 El término "pulsación" como se usa en el presente documento se refiere al proceso de exponer células inmunitarias sensibilizadas *in vitro* a BCG, y como alternativa a BCG y LPS, y un antígeno viral, antígeno bacteriano, antígeno específico de tejido, un antígeno tumoral, o un fragmento antigénico del antígeno. El BCG y antígeno viral, antígeno bacteriano, antígeno específico de tejido o asociado a tumor, como se usa en el presente documento, comprende una mezcla no covalente de BCG y una molécula antigénica.

35 La expresión "antígeno" y "molécula antigénica" como se usan en el presente documento comprende antígenos virales, bacterianos, asociados a tejido o específicos de tejido y asociados a tumor o proteicos específicos de tumor útiles para la presentación por las células dendríticas para activar linfocitos T para inmunoterapia. En particular, para desarrollar una respuesta inmunitaria al virus o bacteria infecciosos o a células prostáticas o antígenos asociados a próstata, es decir, PSMA en vasculatura de tumor prostático.

40 De acuerdo con una realización, un lisado de células tumorales de próstata recuperado de muestras de ensayo quirúrgicas puede usarse como antígeno. Por ejemplo, puede usarse una muestra del propio tumor de un paciente de cáncer, obtenido en biopsia o en resección quirúrgica, para proporcionar un lisado celular para antígeno. Como alternativa, puede usarse una preparación de membrana de células tumorales de un paciente de cáncer de próstata.

45 De acuerdo con otra realización más, puede usarse como antígeno antígeno de membrana específico de próstata purificado (PSMA, también conocido como antígeno PSM), que reacciona específicamente con anticuerpo monoclonal 7E11-C.5 (véase en general Horoszewicz y col., Prog. Clin. Biol. Res. 37: 115-132 (1983), Patente de Estados Unidos n.º 5.162.504, Patente de Estados Unidos n.º 5.788.963, Feng y col., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 32: (Abs. 1418)238 (1991)). La clonación del gen que codifica el antígeno PSMA se ha descrito por Israeli y col., Cancer Res. 54: 1807-1811. La expresión del gen clonado, por ejemplo, en células de levadura, puede proporcionar una fuente lista del antígeno PSMA para su uso de acuerdo con la presente invención.

50 En otra realización más, un péptido antigénico que tiene la secuencia de restos de aminoácidos Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val (SEQ ID NO: 1) (designada PSM-P1) que corresponde a los restos de aminoácidos 4-12 de PSMA puede usarse como antígeno. De acuerdo con otra realización, un péptido antigénico que tiene la secuencia de restos de aminoácidos Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val (SEQ ID NO: 2) (designada PSM-P2) que corresponde a los restos de aminoácidos 711-719 de PSMA puede usarse como antígeno.

55 De acuerdo con otra realización, un péptido antigénico que tiene una secuencia de restos de aminoácidos Xaa Leu (o Met) Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val (o Leu) (designada PSM-PX) en la que Xaa representa cualquier resto de aminoácidos puede usarse como antígeno. Este péptido se asemeja al motivo de unión de HLA-A0201, es decir, un motivo de unión de 9-10 restos de aminoácidos con "restos de anclaje", leucina (Leu) y valina (Val) hallados en

pacientes de HLA-A2 (Grey y col., Cancer Surveys 22: 37-49 (1995)). Este péptido se usa típicamente como antígeno para pacientes HLA-A2<sup>+</sup>. (Véase, Central Data Analysis Committee "Allele Frequencies", Sección 6.3, Tsuji, K. y col., (eds.), Tokyo University Press, pp. 1066-1077).

- 5 En otra realización más, un péptido antigénico seleccionado de los péptidos enumerados en la Tabla 1A (posterior) puede usarse como antígeno. Los péptidos enumerados en la Tabla 1A tienen secuencias de restos de aminoácidos correspondientes a fragmentos de PSM y se han emparejado con un motivo de unión de un haplotipo específico. De acuerdo con una realización, los péptidos se seleccionan para presentarse por células dendríticas para activar linfocitos T de un paciente que coinciden con el haplotipo indicado para cada péptido en la Tabla 1A.

**Tabla 1A**

<b>Péptidos PSM*</b>				
<b>ID n.º</b>	<b>Haplotipo</b>	<b>Resto de aminoácido inicial**</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
PSM-P3	A2	20	Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu	3
PSM-P4	A2	27	Val Leu Ala Gly Gly Phe Phe Leu Leu	4
PSM-P5	A2	109	Glu Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu	5
PSM-P6	A2	260	Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu	6
PSM-P7	A2	461	Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu	7
PSM-P8	A2	660	Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu	8
PSM-P9	A2	568	Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val	9
PSM-P10	A2	57	Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu Leu	10
PSM-P11	A2	469	Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu	11
PSM-P12	A2	663	Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu	12
PSM-P16	A1	171	Glu Gly Asp Leu Val Tyr Val Asn Tyr	13
PSM-P17	A1	264	Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr	14
PSM-P18	A1	463	Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr	15
PSM-P19	A1	143	Leu Phe Glu Pro Pro Pro Gly Tyr	16
PSM-P20	A1	558	Thr Tyr Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr	17
PSM-P21	A1	701	Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr	18
PSM-P22	A1	725	Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr	9
PSM-P26	A11	398	Ile Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu	20
PSM-P27	A11	63	Asp Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe	21
PSM-P28	A11	491	Lys Ser Leu Tyr Glu Ser Trp Thr Lys Lys Ser	22
PSM-P36	A24	448	Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile	23
PSM-P37	A24	606	Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile	24
PSM-P38	A24	298	Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys Leu Leu	25
PSM-P39	A24	624	Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu	26
PSM-P40	A24	178	Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe	27
PSM-P41	A24	227	Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe	28
PSM-P46	B3501	289	Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile	29
PSM-P47	B3501	501	Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met	30

\* "Péptidos PSM" se refiere a péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a un fragmento de PSMA (también conocido como PSM).

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

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



De acuerdo con otra realización, un péptido antigénico seleccionado de los péptidos enumerados en la Tabla 1B (posterior) puede usarse como antígeno. Los péptidos en la Tabla 1B tienen secuencias de restos de aminoácidos correspondientes a fragmentos de PSA y se han emparejado con un motivo de unión de un haplotipo específico como se indica en la Tabla 1B. De acuerdo con una realización, el péptido se presenta por células dendríticas para activar linfocitos T de pacientes que coinciden con el haplotipo indicado para cada péptido en la Tabla 1B.

Tabla 1B

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

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

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

De acuerdo con otra realización más, un antígeno de mucina de próstata, reconocido por el anticuerpo monoclonal PD41, descrito por Wright (Patente de Estados Unidos n.º 5.227.471 y n.º 5.314.996; Beckett y col. Cancer Res. 51: 1326-1222 (1991)) puede usarse como antígeno. Como alternativa, un lisado en bruto de células de tumor de próstata que comprenden antígeno que se une con el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma ATCC HB 11094 y que expresan el antígeno de mucina PD41 puede usarse como antígeno.

Los antígenos de próstata adicionales que pueden usarse en los procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata (STEAP; Hubert y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14523-14528 (1999)), antígeno de tumor de carcinoma de próstata (PCTA-1; Su y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252-7257 (1996)); antígeno de células madre de próstata (PSCA; Reiter, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735-1740 (1998)). También se considera que los fragmentos antigénicos de cada antígeno están abarcados por el alcance de la presente invención.

Los antígenos adicionales incluyen, pero sin limitación, antígenos de neutralización viral o péptidos antigénicos. Además, proteínas bacterianas, glucoproteínas, glucolípidos o carbohidratos y fragmentos antigénicos de los mismos, se consideran parte de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, se desarrolla inmunoterapia celular obteniendo células antigénicas y células inmunitarias de uno o más individuos, más típicamente del mismo sujeto, y estimulando linfocitos T dentro de la población de células inmunitarias por los procedimientos de la invención. Esta estimulación *in vitro* de linfocitos T, seguida de expansión clonal en cultivo celular de linfocitos CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> sensibles al antígeno, y administración de los linfocitos T reactivos a antígeno al sujeto, constituyen una estrategia terapéutica y profiláctica útil. Cuando se infunde al sujeto, los linfocitos T reactivos a antígeno de la invención pueden dirigirse específicamente y/o destruir directamente células diana *in vivo* que portan el mismo antígeno que las células antigénicas, inhibiendo de este modo el desarrollo del cáncer y/o la proliferación de células tumorales, o previniendo o limitando la propagación de un patógeno en el receptor.

Las células antigénicas, los linfocitos T para activar, y el receptor de los linfocitos T reactivos a antígeno pueden tener el mismo haplotipo de MHC (HLA). La invención se refiere al uso de linfocitos T autólogos estimulados *in vitro* con un antígeno derivado de forma autóloga para el tratamiento del cáncer, inhibición de la proliferación de células tumorales, o la prevención del desarrollo de cáncer en el mismo sujeto del que derivaron originalmente los linfocitos T (o más típicamente todas las células inmunitarias) y antígeno. En un aspecto particular, las células inmunitarias y células antigénicas se aíslan de un sujeto humano que necesite inmunoterapia celular.

Los linfocitos T y el receptor pueden tener el mismo haplotipo mientras que las células antigénicas son alogénicas de los linfocitos T y el receptor, pero coincidieron con al menos un alelo de MHC, es decir, se usan células antigénicas para activar linfocitos T, pudiendo después administrarse dichos linfocitos T a un receptor del que se obtuvieron originalmente los linfocitos T, y en el que las células antigénicas y los linfocitos T comparten al menos uno pero no todos los alelos de MHC. En una realización menos típica de la invención, las células antigénicas, los linfocitos T y el

receptor son todos alogénicos entre sí, pero todos tienen al menos un alelo de MHC común compartido entre las células antigénicas, los linfocitos T y el receptor.

Los procedimientos para generar linfocitos T reactivos a antígeno pueden comprender sensibilizar células inmunitarias vivas, pulsar las células inmunitarias sensibilizadas con BCG y un antígeno asociado a tejido, específico de tejido, asociado a tumor o específico de tumor (con o sin LPS), mientras que las células inmunitarias comprenden APC, por ejemplo, pero sin limitación, células dendríticas, y células co-cultivadas, pulsadas con linfocitos T sensibilizados. Las células inmunitarias sensibilizadas pueden enriquecerse con respecto a APC antes de la pulsación. Las células inmunitarias sensibilizadas pueden separarse para generar poblaciones enriquecidas o purificadas de linfocitos T o APC. Las células inmunitarias sensibilizadas pueden separarse para generar poblaciones enriquecidas o purificadas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> antes de la pulsación. El co-cultivo de células pulsadas con linfocitos T conduce a la estimulación de linfocitos T específicos que maduran a linfocitos T CD4<sup>+</sup> reactivos a antígeno o linfocitos T CD8<sup>+</sup> reactivos a antígeno respectivamente.

Sin limitación de la presente invención a ningún modelo o mecanismo científico particular, los resultados descritos en el presente documento sugieren que BCG con células inmunitarias pulsadas (las células pulsadas con un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno asociado a tejido o específico de tejido, un antígeno asociado a tumor o específico de tumor, o fragmentos antigénicos de los mismos como se ha expuesto anteriormente) que comprenden APC tienen una capacidad única de inducir una activación específica de linfocitos T CD8<sup>+</sup> *in vitro* dirigidas contra virus, bacterias, células infectadas o tumorales. Los resultados descritos en el presente documento sugieren además que puede añadirse un factor promotor de la maduración para potenciar la duración de la respuesta inmunitaria. BCG actúa para aumentar la expresión de CD de los marcadores de maduración en superficie CD83 y CD86, junto con exclusión de antígenos de endocitosis. Además, el lipopolisacárido (LPS) también regula negativamente la actividad endocítica y promueve la maduración de CD, aumentando potencialmente la duración de la respuesta inmunitaria.

Los procedimientos también pueden comprender reestimulación de los linfocitos T reactivos a antígeno *in vitro*, cultivando las células con células alimentadoras y células antigénicas irradiadas, opcionalmente en presencia de una composición que comprende una o más citocinas (por ejemplo, IL-2 purificada, sobrenadante celular de bazo estimulado con Concanavalina A). Puede usarse reestimulación *in vitro* de linfocitos T mediante la adición de APC y BCG con antígeno exógeno soluble, es decir, un antígeno viral, bacteriano, asociado a tumor o antígeno específico de tejido o un fragmento antigénico de uno de los antígenos al cultivo para promover la expansión de las poblaciones de linfocitos T.

Los linfocitos T pueden estimularse con células del bazo irradiadas o APC purificadas a partir de sangre periférica como células alimentadoras en presencia de BCG y antígeno viral, bacteriano, específico de tejido o tumoral o un fragmento antigénico de uno de los antígenos (con o sin LPS). De esta manera, mediante reestimulación de vez en cuando, puede mantenerse un cultivo o línea celular de linfocitos T específicos de antígeno estables *in vitro* durante periodos de tiempo largos. El cultivo o la línea celular de linfocitos T creado de este modo pueden almacenarse y, si se conserva (por ejemplo, por formulación con un crioprotector y congelación), usarse para reabastecer linfocitos T reactivos a antígeno a intervalos deseados para uso a largo plazo.

Pueden generarse linfocitos T CD8<sup>+</sup> reactivos a antígeno y usarse de forma profiláctica para prevenir la progresión (proliferación de virus, bacterias o células tumorales) o desarrollo de un tumor, o para inducir la remisión de un cáncer. También pueden generarse linfocitos T CD4<sup>+</sup> reactivos a antígeno y usarse de forma profiláctica para prevenir la progresión o el desarrollo de un tumor (proliferación de células tumorales) o para inducir remisión de cáncer. Los linfocitos T pueden usarse de forma terapéutica para tratar un cáncer. Típicamente, las células antigénicas usadas para generar los linfocitos T reactivos a antígeno son singénicas del sujeto con el que van a administrarse, por ejemplo, se obtienen del sujeto. Sin embargo, si no están disponibles para su uso células antigénicas que son singénicas del sujeto, los procedimientos de la invención permiten que células antigénicas tales que tienen el mismo haplotipo de HLA como el receptor pretendido de las células puedan prepararse *in vitro* usando células no cancerosas (por ejemplo, células normales) recogidas del receptor. Los lisados o preparaciones de células tumorales pueden usarse para reestimulación de linfocitos T reactivos a antígeno de la invención.

Pueden inducirse células normales para que se vuelvan cancerosas o se transformen, por ejemplo, mediante el tratamiento con carcinógenos, tales como productos químicos y/o radiación o infección con un virus transformante, y después usarse para pulsar directamente o usarse para preparar un lisado para pulsar células dendríticas en combinación con BCG o BCG combinado con LPS.

Los lisados o preparaciones de dicho asociado a tejido o específico de tejido; células cancerosas o transformadas, y similares, pueden usarse para pulsar células inmunitarias o APC *in vitro*. Los lisados o preparaciones de dichas células, pueden usarse para reestimulación de los linfocitos T sensibles al antígeno de la invención.

Si el gen clonado de un antígeno de interés está disponible, pueden transformarse o transfectarse con el gen células normales del sujeto, de modo que el antígeno de interés se expresa de forma recombinante en las células, y después dichas células pueden usarse en las reacciones de sensibilización, pulsación y/o reestimulación. En un aspecto menos típico, pueden prepararse células antigénicas para su uso de células que no son singénicas pero que

tienen al menos un alelo del MHC en común con el receptor pretendido.

En una respuesta inmunitaria, el proceso de activación de linfocitos T inducida por antígeno sucede *in vivo* típicamente en tejidos linfoides secundarios, tales como los ganglios linfáticos y el bazo. Siguiendo los presentes procedimientos, puede usarse cualquier célula antigénica de interés para sensibilizar linfocitos T *in vitro*, incluso células cancerosas o células infectadas que se consideran poco seguras para su uso en inmunización activa. Dichos linfocitos T sensibilizados se exponen después a APC pulsadas con antígeno viral, bacteriano, específico de tejido, antígeno tumoral o fragmentos antigénicos de uno de los antígenos y BCG. Pueden expandirse linfocitos T reactivos a antígeno CD8<sup>+</sup> *in vitro* como una fuente de células para inmunoterapia. Por lo tanto, una ventaja de los presentes procedimientos es que los linfocitos T específicos de antígeno pueden expandirse *in vitro* para crear una fuente de células para inmunoterapia que puede usarse para el tratamiento o prevención de enfermedad.

Existen muchas ventajas de la inmunoterapia como se proporciona por la presente invención. El volumen tumoral es mínimo después de la cirugía y la inmunoterapia es más eficaz en esta situación. Los procedimientos de la invención se dirigen a potenciar la inmunocompetencia de un paciente de cáncer bien antes de la cirugía o bien después de la cirugía, y potenciar la inmunidad específica de tumor mediada por células contra células cancerosas, siendo el objetivo la inhibición de la proliferación de células cancerosas, y la erradicación total de células cancerosas residuales en el cuerpo. En otro aspecto, pueden usarse linfocitos T reactivos a antígeno reactivos contra células cancerosas humanas, solos o juntos con cirugía, quimioterapia, radiación u otras terapias antineoplásicas, para erradicar metástasis o micrometástasis, o para purgar la médula ósea de células cancerosas durante el trasplante de médula ósea. Por ejemplo, para erradicar o inhibir el crecimiento de metástasis o micrometástasis, los linfocitos T reactivos a antígeno proporcionados por la invención, típicamente linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> o CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, se administran *in vivo*, al sujeto que tiene o se sospecha que tiene metástasis o micrometástasis.

Como ilustración, para purgar la médula ósea de células cancerosas durante el trasplante de médula ósea, la médula ósea del donante se pone en contacto *in vitro* con los linfocitos T reactivos a antígeno proporcionados por la invención, de modo que los linfocitos T reactivos a antígeno lisan cualquier célula cancerosa residual en la médula ósea, antes de administrar la médula ósea al sujeto para fines de reconstitución hematopoyética. El trasplante de médula ósea es típicamente autólogo. En una realización, los linfocitos T reactivos a antígeno son linfocitos T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> o CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. Como alternativa, la administración de los linfocitos T reactivos a antígeno implica tanto linfocitos T CD4<sup>+</sup> como linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Además, si los pacientes de cáncer se someten a cirugía con anestesia, y posterior quimioterapia, la inmunosupresión resultante experimentada por el paciente puede reducirse por inmunoterapia celular en el periodo preoperatorio, reduciendo de este modo la incidencia de complicaciones infecciosas. También existe la posibilidad de que se desprendan células tumorales a la circulación en cirugía y, por lo tanto, la inmunoterapia eficaz aplicada en este momento puede eliminar estas células *in vivo*. La invención se refiere por lo tanto a un procedimiento de profilaxis o tratamiento que comprende administrar a un paciente de cáncer los linfocitos T reactivos a antígeno proporcionados por la presente invención, reactivos contra un antígeno de las células de cáncer del paciente, antes de, durante y/o después de cirugía y/o quimioterapia experimentada por el paciente de cáncer.

Varios antígenos o composiciones antigénicas son útiles, de acuerdo con la presente invención, para la presentación por las CD para activar linfocitos T para inmunoterapia. En una realización, un lisado celular de tumor de cáncer de próstata recuperado de muestras de ensayo quirúrgicas se usa como un antígeno. Por ejemplo, una muestra del propio tumor de un paciente de cáncer, obtenida en biopsia o en resección quirúrgica, puede usarse para proporcionar un lisado celular para antígeno. Como alternativa, una preparación de membrana de células tumorales de un paciente de cáncer, por ejemplo, un paciente de cáncer de próstata, o líneas celulares establecidas puede usarse como un antígeno. Se han analizado en detalle anteriormente antígenos adicionales útiles en los presentes procedimientos incluyendo antígenos virales y bacterianos.

Pueden exponerse CD a un antígeno viral, bacteriano, asociado a tejido o específico de tejido, antígeno asociado a cáncer de próstata deseado, o un fragmento antigénico de los antígenos incubando las CD con el antígeno en medio de cultivo *in vitro*. El antígeno en forma soluble acuosa o de suspensión acuosa en combinación con BCG solo o en combinación con BCG y LPS se añade al medio de cultivo celular. Como se demuestra en el presente documento, las CD captan provechosamente antígeno para presentación exitosa a linfocitos T en el contexto de MHC de clase I.

Pueden introducirse antígenos al citosol de las CD por procedimientos alternativos, incluyendo, pero sin limitación, lisis osmótica de vesículas pinocíticas y el uso de liposomas sensibles a pH, y similares. Véase, en general, (Okada y col., Cell 29: 33 (1982); Poste y col., Methods Cell Biol. 14: 33 (1976); Reddy y col., J. Immunol. Methods 141: 157 (1991)).

#### Aislamiento de células dendríticas

Se obtienen células dendríticas (CD) humanas de cualquier tejido en el que residan incluyendo tejidos no linfoides tales como la epidermis de la piel (células de Langerhans) y tejidos linfoides tales como el bazo, la médula ósea, ganglios linfáticos y timo. Las CD también pueden aislarse del sistema circulatorio incluyendo sangre (CD de sangre) y linfa (células veladas). La sangre periférica humana es una fuente fácilmente accesible de CD humanas y se usa

como una fuente de acuerdo con una realización específica de la invención. La sangre de cordón umbilical es otra fuente de CD humana y en casos en los que un niño nace en una familia que se sabe que tiene alto riesgo de cáncer de próstata, la sangre de cordón puede usarse como una fuente de CD que pueden criopreservarse para uso posterior, si es necesario.

- 5 Debido a que las CD aparecen en números bajos en cualquier tejido en el que residan, incluyendo sangre periférica humana, las CD deben enriquecerse o aislarse para su uso. Puede usarse cualquiera de varios procedimientos que impliquen separación de gradiente de densidad repetitivo, selección positiva, selección negativa o una combinación de los mismos para obtener poblaciones enriquecidas o CD aisladas. Los ejemplos de dichos procedimientos para aislar CD de sangre periférica humana incluyen: (O'Doherty y col., J. Exp. Med. 178: 1067-1078 (1993); Young y Steinman, J. Exp. Med. 171: 1315-1332 (1990); Freudenthal y Steinman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7698-7702 (1990); Macatonia y col., Immunol. 67: 285-289 (1989) y Markowicz y Engleman, J. Clin. Invest. 85: 955-961 (1990)). Se describe un procedimiento para aislar CD de sangre periférica humana que evite la exposición de las células a glóbulos rojos de oveja y/o solo de ternera fetal en la Publicación de PCT WO94/02156. Se describe un ejemplo de un procedimiento para aislar CD de tejido linfóide en (Macatonia y col., J. Exp. Med. 169: 1255-1264 (1989)).
- 10
- 15 Una vez que se han obtenido las CD, se cultivan en medio de cultivo apropiado para expandir la población celular y/o para mantener las CD en un estado de captación, procesamiento y presentación de antígenos óptimos.

De acuerdo con una realización, que también proporciona mantenimiento del estado apropiado de "madurez" de CD en cultivo *in vitro*, es para cultivar las CD en presencia de factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4). En un ejemplo, una combinación de GM-CSF e IL-4 a una concentración de aproximadamente 500 unidades/ml de cada uno. Un estudio reciente revela presentación de antígenos óptima por CD "inmaduras" frente a maduras (Koch y col., J. Immunol. 155: 93-100 (1995)). Las CD inmaduras pueden usarse de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención. Los experimentos recientes han mostrado que las CD pulsadas maduras conservan la capacidad de estimular una respuesta de linfocitos T hasta diez veces más larga que las CD pulsadas inmaduras.

20

25 Como se ilustra en los ejemplos posteriores, se aislaron CD humanas de sangre periférica de pacientes de cáncer de próstata, y después de aproximadamente 5 días en cultivo *in vitro*, se recuperaron CD competentes y capaces de activar linfocitos T específicos de cáncer de próstata. De acuerdo con una realización de la invención, se obtienen CD de un paciente de cáncer para tratar. Las CD se pulsan con uno de los diversos antígenos proporcionados en el presente documento en presencia de BCG con o sin LPS, y después se usan para activar linfocitos T autólogos del paciente bien *in vitro* o *in vivo*, para inmunoterapia de cáncer y/o inhibición del crecimiento tumoral.

30

De acuerdo con una realización alternativa, se obtienen CD de un individuo sano que se sabe que no padece cáncer. Los antígenos de HLA relevantes (tanto MCH de clase I como de clase II, por ejemplo, HLA-A, B, C y DR) en las células mononucleares de sangre periférica del individuo (PBMC) se identifican y CD que proporcionan una coincidencia de HLA con el paciente de cáncer se aíslan y expanden como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, en ciertos casos, pacientes de cáncer de próstata de estadio tardío que se han tratado con radiación y/o agentes quimioterapéuticos con frecuencia no son capaces de proporcionar CD suficientes o eficaces. Por lo tanto, pueden obtenerse CD de individuos de HLA coincidentes sanos, tales como hermanos, y expandirse usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente e incubarse *in vitro* con un antígeno relevante en presencia de BCG para formar CD naturales activadas que a su vez pueden usarse para inducir linfocitos T activados para inmunoterapia y/o para inhibir el crecimiento tumoral en el paciente con cáncer de próstata con HLA coincidente.

35

40

De acuerdo con otra realización de la invención, se usan "células dendríticas de vida útil prolongada". Las células humanas tienen una vida útil finita *in vitro* habitualmente limitada a aproximadamente 50-70 duplicaciones de población antes de experimentar apoptosis. Como se usan en el presente documento, se pretende que la expresión "células dendríticas de vida útil prolongada" signifique CD que se han modificado genéticamente de modo que puedan expandirse en medio de cultivo celular *in vitro* durante un periodo de tiempo extendido, incluyendo pero sin limitación al menos aproximadamente 100 duplicaciones de población adicionales. Se obtienen CD de vida útil prolongada, por ejemplo, mediante transformación por VEB de CD obtenidas de sangre periférica de pacientes de cáncer de próstata, o mediante inserción en CD, usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, de un gen regulador de ciclo celular específico incluyendo pero sin limitación un gen que codifica ciclina A, B, D o E, o proteína de retinoblastoma.

45

50

Como se ilustra en los ejemplos presentados en la Patente de Estados Unidos n.º 5.788.963 se han obtenido CD de vida útil prolongada por transformación por VEB de una población de CD aisladas. Dichas CD de vida útil prolongada son útiles de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

Pueden conservarse CD, por ejemplo, mediante criopreservación bien antes de la exposición o bien después de la exposición a un antígeno relevante. Los agentes de criopreservación que pueden usarse incluyen pero sin limitación dimetil sulfoxido (DMSO) Lovelock y Bishop, Nature 183: 1394-1395 (1959); Ashwood-Smith, Nature 190: 1204-1205 (1961)), glicerol, polivinilpirrolidona (Rinfret, N.Y. Acad. Sci. 85: 576 (1960)), polietilenglicol (Sloviter y Ravdin, Nature 196: 548 (1962)), albúmina, dextrano, sacarosa, etilenglicol, i-eritritol, D-ribitol, D-manitol (Rowe y col., Fed. Proc. 21: 157 (1962)), D-sorbitol, i-inositol, D-lactosa, cloruro de colina (Bender y col., J. Appl. Physiol. 15: 520 (1960)),

55

aminoácidos (Phan y Bender, Exp. Cell Res. 20: 651 (1960)), metanol, acetamida, glicerol monoacetato (Lovelock, Biochem. J. 56: 265 (1954)), y sales inorgánicas (Phan y Bender, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104: 388 (1960); Phan y Bender, en Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology, Ilbery, P.L.T., ed., Butterworth, Londres, p. 59 (1961)).

- 5 Una velocidad de enfriamiento lenta controlada es crítica. Diferentes agentes crioprotectores (Rapatz y col., Cryobiology 5: 18-25 (1968)) y diferentes tipos celulares tienen diferentes velocidades de enfriamiento óptimas (véase, por ejemplo, Rowe y Rinfret, Blood 20: 636 (1962); Rowe, Cryobiology 3: 12-18 (1966); Lewis y col., Transfusion 7: 17-32 (1967); y Mazur, Science 168: 939-949 (1970)), para los efectos de velocidad de enfriamiento sobre supervivencia de células de la médula ósea y sobre su potencial de trasplante). El calor de la fase de fusión en la que el agua se convierte en hielo debería ser mínimo. El procedimiento de enfriamiento puede llevarse a cabo mediante el uso de, por ejemplo, un dispositivo de congelación programable o un procedimiento de baño en metanol. Los aparatos de congelación programables permiten la determinación de las velocidades de enfriamiento óptimas y facilitan el enfriamiento reproducible convencional. Congeladores de velocidad controlada programables tales como Cryomed o Planar permiten el ajuste del régimen de congelación a la curva de velocidad de enfriamiento deseada.
- 10
- 15 Después de una congelación exhaustiva, las células pueden transferirse rápidamente a un recipiente de almacenamiento criogénico a largo plazo. En una realización particular, las muestras pueden almacenarse de forma criogénica en nitrógeno líquido (-196 °C) o su vapor (-165 °C). Dicho almacenamiento se facilita en gran medida por la disponibilidad de refrigeradores de nitrógeno líquido altamente eficaces.

- Las consideraciones y los procedimientos para la manipulación, crioconservación y almacenamiento a largo plazo de células madre hematopoyéticas, particularmente de médula ósea o sangre periférica, son en gran medida aplicables a las CD. Dicho análisis puede encontrarse, por ejemplo, en las siguientes referencias: Gorin, Clinics in Haematology 15: 19-48 (1986); Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscú, 22-26 de julio de 1968, International Atomic Energy Agency, Viena, pp.107-186). Otros procedimientos de crioconservación de células viables, o modificaciones de los mismos, están disponibles y se prevén para su uso (por ejemplo, técnicas de espejo metálico frío; Livesey y Linner, Nature 327: 255 (1987); Linner y col., J. Histochem. Cytochem. 34: 1123-1135 (1986); véase también Patente de Estados Unidos n.º 4.199.022 de Senken y col., Patente de Estados Unidos n.º 3.753.357 de Schwartz, Patente de Estados Unidos n.º 4.559.298 de Fahy, y Patente de Estados Unidos n.º 5.364.756 de Livesey, y col.
- 20
- 25

- Las células congeladas típicamente se descongelan rápidamente (por ejemplo, en un baño de agua mantenido a 37-41 °C) y se enfrían inmediatamente tras la descongelación. Puede ser deseable tratar las células para evitar la acumulación de celular tras la descongelación. Para evitar la acumulación, pueden usarse diversos procedimientos, incluyendo pero sin limitación, la adición antes y/o después de la congelación de DNasa (Spitzer y col., Cancer 45: 3075-3085 (1980)), dextrano y citrano de bajo peso molecular, almidón de hidroxietilo (Stiff y col., Cryobiology 20: 17-24 (1983)), y similares. El agente crioprotector, si es tóxico en seres humanos, debería retirarse antes de la administración de las CD congeladas a un individuo. Un modo de retirar el agente crioprotector es mediante dilución hasta una concentración insignificante. Una vez que las CD congeladas se han descongelado y recuperado, se usan para activar linfocitos T como se ha descrito anteriormente con respecto a CD no congeladas.
- 30
- 35

#### Aplicaciones o procedimientos de uso

- Solamente para facilitar la presentación, el siguiente análisis es ilustrativo de usos particulares de los procedimientos de la invención como se entenderían habitualmente por los expertos en la materia relevantes.
- 40

- Como se ha analizado anteriormente, de acuerdo con una realización de la invención, CD humanas aisladas, expuestas a un antígeno específico de próstata exógeno soluble y BCG por cualquiera de los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para activar linfocitos T *in vitro* contra cáncer de próstata. En particular, la respuesta de linfocitos T es una respuesta dirigida por MHC de clase I que proporciona una población de linfocitos T activados que comprenden más de 25 % de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Las CD pueden usarse inmediatamente después de la exposición a antígeno para estimular linfocitos T. Como alternativa, las CD pueden mantenerse en presencia de una combinación de GM-CSF e IL-4 antes de la exposición simultánea a antígeno y linfocitos T.
- 45

- Pueden obtenerse linfocitos T o un subconjunto de linfocitos T de diversos tejidos linfoides para su uso como células de respuesta. Dichos tejidos incluyen pero sin limitación bazo, ganglios linfáticos, y sangre periférica y del cordón umbilical. Las células pueden cultivarse con CD expuestas a antígeno como una población de linfocitos T mixta o como un subconjunto de linfocitos T purificados. Por ejemplo, puede desearse cultivar linfocitos T CD8<sup>+</sup> purificados con CD expuestas a antígeno para inducir linfocitos T citotóxicos específicos de próstata (CTL). Además, la eliminación temprana de linfocitos T CD4<sup>+</sup> durante el cultivo celular *in vitro* puede evitar el crecimiento de linfocitos CD4<sup>+</sup> en un cultivo mixto linfocitos T tanto CD8<sup>+</sup> como CD4<sup>+</sup>. Puede conseguirse purificación de linfocitos T mediante selección positiva y/o negativa, incluyendo, pero sin limitación, el uso de anticuerpos dirigidos a CD2, CD3, CD4, CD8 y similares.
- 50
- 55

De acuerdo con una realización, los linfocitos T se obtienen del mismo paciente de cáncer de próstata del que se obtuvieron las CD. Después de estimulación o activación *in vitro*, los linfocitos T autólogos se administran al paciente

para provocar y/o aumentar una respuesta inmunitaria existente que ralentiza o inhibe el crecimiento tumoral de cáncer de próstata. Por ejemplo, pueden administrarse linfocitos T, por infusión intravenosa, a dosis de aproximadamente  $10^8$ - $10^9$  células/m<sup>2</sup> de área de superficie corporal (véase, Ridell y col., Science 257: 238-241 (1992)). La infusión puede repetirse a intervalos deseados, por ejemplo, mensualmente. Se controlan los receptores durante y después de infusiones de linfocitos T con respecto a cualquier prueba de efectos adversos.

De acuerdo con otra realización, los linfocitos T se obtienen de un paciente de cáncer de próstata y las CD que se usan para estimular los linfocitos T se obtienen de donante sano de HLA coincidente. De acuerdo con otra realización más, tanto los linfocitos T como las CD se obtienen de un donante sano de HLA coincidente, por ejemplo, un hermano del paciente de cáncer de próstata. Esta realización puede ser ventajosa, por ejemplo, cuando el paciente es un paciente de cáncer de próstata en estadio tardío que se ha tratado con radiación y/o agentes quimioterapéuticos y puede no ser capaz de proporcionar CD suficientes o eficaces. Los linfocitos T después de estimulación se administran como se ha descrito anteriormente.

En un ejemplo específico de los procedimientos de la presente invención, PSMA cargado en células dendríticas (CD) usando diversas metodologías produjo células presentadoras de antígenos que pueden estimular linfocitos T autólogos y alogénicos de una manera específica de antígeno. Estas metodologías incluyen: 1) tratamiento durante una noche de aproximadamente 6 CD con proteína PSMA y micobacterias de bacilo de Calmette-Guérin (BCG) con o sin lipopolisacárido (LPS), y 2) carga osmótica de aproximadamente día 7 CD usando medio hipertónico. Las CD estimuladas por BCG demuestran expresión de CD83 y CD86 elevada mientras que LPS potencia adicionalmente la maduración de CD. Se consiguió carga osmótica usando medio hipertónico para aumentar la fagocitosis y macropinocitosis.

Después de estimulaciones de dos semanas *in vitro* con CD cargadas con PSMA (preparadas usando BCG ± LPS o carga osmótica) y una o más reestimulaciones semanales con PBMC pulsadas de forma exógena con PSMA, se demostró reactividad específica al inmunógeno (Fig. 1-6).

De acuerdo con otra realización de la invención, se cultivan CD aisladas de un paciente de cáncer de próstata *in vitro*, después se exponen a un antígeno específico de tejido de próstata, un antígeno de cáncer de próstata, o un fragmento antigénico de uno de los antígenos de una manera suficiente para obtener presentación de antígenos de MHC de clase I y que aumenta el número relativo de CTL CD8<sup>+</sup>. Después de expansión o crioconservación, las CD se administran de nuevo al paciente para estimular una respuesta inmunitaria, incluyendo activación de linfocitos T, contra las células cancerosas del paciente *in vivo*. Usando este enfoque con las células dendríticas propias del paciente, se proporcionan las siguientes ventajas: (1) no se utiliza ningún ADN ajeno; (2) se elimina infección de células para fines de expresión de ADNc usando vectores virales; (3) se presenta antígeno a células dendríticas en forma de proteína soluble que puede introducirse en las células dendríticas y procesarse con respecto a presentación de MHC/péptido de la superficie celular; (4) células dendríticas expresan B7 en su superficie aliviando la necesidad de transfectar este ADNc a células dendríticas; (5) el uso de B7 endógeno (B7.1 y/o B7.2) en la superficie de células dendríticas elimina la necesidad de proporcionar linfocitos T con IL-2 u otras citocinas bien en forma de la citocina en sí misma o transfección del ADNc a células específicas; (6) todos los procedimiento se llevan a cabo usando las células propias del paciente.

Se exponen CD obtenidas como se ha descrito anteriormente, *in vitro* a un antígeno específico de próstata, un antígeno de cáncer de próstata o un fragmento antigénico de uno de los antígenos (por ejemplo, PSMA a aproximadamente 0,1 µg hasta aproximadamente 1000 µg) en combinación con BCG (aproximadamente  $2 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$  unidades/ml de concentración final) o BCG en combinación con LPS (40 unidades/ml), se lavan y se administran a un paciente para inducir una respuesta inmunitaria o para aumentar una respuesta inmunitaria existente. Como tales, las CD constituyen una vacuna y/o un agente inmunoterapéutico anti cáncer de próstata. Se administran a un paciente CD que presentan un antígeno específico de próstata, mediante infusión intravenosa, a una dosis de aproximadamente  $10^6$ - $10^8$  células. Puede supervisarse la respuesta inmunitaria del paciente. La infusión puede repetirse a intervalos deseados basándose en la respuesta inmunitaria medida del paciente.

Los siguientes ejemplos demuestran que las células dendríticas humanas, obtenidas de pacientes de cáncer de próstata, pulsadas con antígeno, por ejemplo, en forma de lisado tumoral autólogo o péptido en presencia de una combinación de BCG y LPS o con BCG solamente, estimulan las respuestas inmunitarias humorales y de linfocitos T citotóxicos específicas de antígeno a antígenos de cáncer de próstata humana.

### Ejemplo 1

El siguiente ejemplo describe el aislamiento y el cultivo de células dendríticas humanas. Las células dendríticas aisladas se pusieron en contacto con lisado de células tumorales y lisado celular tumoral parcialmente purificado en combinación con BCG para demostrar la estimulación de la respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno.

Cultivo de células dendríticas del paciente

Se establecieron cultivos de CD humanas como se ha descrito previamente en el presente documento y en la

Patente de Estados Unidos n.º 5.788.963. Brevemente, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de "capas leucocíticas" enriquecidas con leucocitos por centrifugación convencional en Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se cultivaron PBMC adherentes a plástico (aproximadamente 1 hora a 37 °C) durante 6 a 7 días en AIM-V bien complementado o no con suero autólogo 2 %, penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y piruvato 1 mM (denominado "medio de cultivo"; todos de Boehringer Ingelheim, Biowhittaker, Verviers, Bélgica) en presencia de 1000 U/ml o 500 U/ml de cada factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) Leucomax™ 1,11 x 10<sup>7</sup> U/mg de Novartis, Basilea, Suiza) e Interleucina-4 500 U/ml (IL-4) (Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ).

#### Fenotipificación de CD del paciente

- 10 Para determinar la expresión de antígeno de superficie (Ag), se marcaron células (10<sup>5</sup> CD en 50 µl) con anticuerpo monoclonal primario (mAb) en medio completo seguido de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> conjugados con FITC de Ig de cabra anti-ratón (Dako, Glostrup, Dinamarca). Pueden usarse los siguientes anticuerpos monoclonales aunque se conocen bien muchos otros que tienen la misma especificidad: G46-2.6 (IgG<sub>1</sub>, anti-HLA-ABC), L243 (IgG<sub>2a</sub>, anti-HLA-DR), HB-15a (IgG<sub>2b</sub>, anti-CD83), BU63 (IgG<sub>1</sub>, anti-CD86). Los lavados fueron en HBSS que contenía albúmina 0,2 %.
- 15 Después del último lavado, las células se almacenaron en HBSS que contenía albúmina 0,2 % y formaldehído 2 %. Las muestras se analizaron en una FACScan® (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Los datos se analizaron y se presentaron usando software CellQuest® de Becton-Dickinson.

#### Preparación de lisados de células tumorales

- 20 Se usaron BCG y LPS para estimular la carga por MHC de clase I de CD de la siguiente manera: 1-100 µg de PSMA derivado de LNCaP o PSMA recombinante parcialmente purificado (rPSMA) se añadieron al medio de cultivo de CD del día 6 pipeteando con una micropunta estéril. Al mismo tiempo, se añadió BCG (0,2 – 1,6 x 10<sup>6</sup> U/ml de concentración final; Tice-BCG, Organon Teknika, Durham, NC) y, en un matraz de repetición, LPS (40 U/ml de concentración final) al medio de cultivo usando el mismo procedimiento. El medio de cultivo se mezcló después suavemente antes de devolverse a un incubador de CO<sub>2</sub>).

- 25 Se realizó carga osmótica de la siguiente manera: se recogieron CD del día 7 por pipeteo vigoroso con solución salina tamponada con fosfato (PBS), después se incubaron con PBS antes del desprendimiento mecánico. Se centrifugaron CD a velocidad baja, y todo el sobrenadante se retiró usando aspiración. Los sedimentos celulares se resuspendieron en la cantidad deseada de PSMA y PBS hasta un volumen final de 100 µl. Posteriormente, se añadieron 100 µl de medio hipertónico (sacarosa 1 M y glicerol 20 %), y la suspensión celular se mezcló con una micropunta de pipeta. Las células se colocaron después en un baño de agua a 37 °C durante 10 minutos, en un tubo de centrifuga de 15 ml. Después de la incubación, las condiciones isotónicas se restauraron llenando el tubo con DMEM o AIM-V, devolviendo después el tubo al baño de agua de 37 °C durante 3 minutos adicionales. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio de cultivo a la concentración deseada.

- 35 Después de dos estimulaciones semanales *in vitro* con CD cargadas con PSMA y una o más reestimulaciones semanales con PBMC pulsadas de forma exógena con PSMA, se demostró la reactividad específica al inmunógeno (Fig. 1-5). El día 18 de cultivo, las células efectoras del Paciente 92 reconocían específicamente CD autólogas que presentaban PSMA pero no la proteína irrelevante ovoalbúmina (OVA) o CD no tratadas (Fig. 1A). Las células efectoras del Paciente 92 también reconocían específicamente CD alogénicas del Paciente 105 e I.T. (Fig. 1B y Fig. 1C). Las células efectoras tanto del Paciente 105 como del I.T. secretaron citocinas de una manera específica después del cocultivo con CD tanto autólogas como alogénicas que presentan PSMA.

- 45 La actividad restringida a PSMA observada contiene un componente de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Fig. 2A – Fig. 2C). Como se ilustra, cuando las células efectoras del paciente 105 se estimularon usando CD en las que se había cargado PSMA en presencia de BCG, la secreción de citocinas estuvo mediada por CD8 significativamente, independientemente de si LPS se incluyó durante las estimulaciones (Fig. 2A y Fig. 2B). Cuando las células efectoras se estimularon usando CD que expresaban PSMA después de carga osmótica, no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa en la contribución relativa de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> a la reactividad observada (Fig. 2C). Se obtuvieron hallazgos similares usando efectos estimulados de forma idéntica de pacientes 92 e I.T. (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que el uso de BCG, con o sin LPS, como se enseña en la actualidad, produce una respuesta inmunitaria desviada hacia linfocitos T citotóxicos (es decir, más del 50 % de linfocitos T fueron CD8<sup>+</sup>).

- 50 Después de reestimulaciones adicionales con PBMC cargadas con PSMA (usando carga osmótica), se evaluaron efectores específicos del paciente 105 para determinar si estos efectores tenían la capacidad de secretar citocinas de una manera dependiente de dosis (Fig. 3). Para las estimulaciones iniciales los días 0 y 10, si estaba presente BCG o BCG + LPS durante la carga de PSMA a CD, la cantidad de citocina secretada por los efectores se asoció directamente con la cantidad de PSMA cargado de forma osmótica en dianas CD autólogas (Fig. 3A y 3B). La mayor cantidad de secreción de IFN<sub>γ</sub> se observó cuando la mayor concentración de PSMA ensayado se cargó en CD, sin alcanzarse un máximo. Todas las estimulaciones *in vitro* se realizaron usando CD o PBMC cargadas con 10 µg de PSMA. Esta cantidad de proteína fue suficiente para fuerte estimulación y activación de linfocitos T. Cuando el experimento se repitió con la concentración máxima de PSMA aumentada hasta 30 µg, se consiguió una meseta

(Fig. 3C).

Puede detectarse un nivel moderado de citólisis específica de PSMA (Fig. 4A y 4B). A los 32 días de cultivo, las células efectoras del Paciente I.T. presentaron 37 % de lisis de CD autólogas que presentaban PSMA en una relación de efector: diana de 40: 1, en comparación con 23 % frente a CD autólogas que presentaban OVA o 19 % frente a dianas no tratadas (Fig. 4A). A los 39 días de cultivo, las células efectoras del Paciente 92 presentaban 23 % de lisis de CD autólogas que presentaban PSMA a una relación de efector: diana de 36: 1, en comparación con 14 % frente a CD autólogas que presentaban OVA o 10 % frente a dianas no tratadas (Fig. 4B).

También se determinó la especificidad de péptidos derivados de PSMA reconocidos por linfocitos T estimulados *in vitro* con CD cargados de manera osmótica con proteína soluble, intacta. Usando células efectoras del Paciente 92 que eran específicas de PSMA después de estimulación *in vitro*, se midió la secreción de citocinas después de cocultivar con la línea celular presentadora de antígeno T2 pulsada de forma exógena con uno de los péptidos HLA-A2<sup>+</sup> de PSMA: PSM-P1 o proteína M1 de la gripe (Fig. 6A y Fig. 6B).

En un experimento adicional se demostró que las células dendríticas cargadas de forma osmótica o directamente con proteína o péptido M1 de la gripe, que comprende un fragmento de antígeno y madurado en presencia de BCG solo o en combinación con interferón gamma son capaces de estimular una actividad mediana por linfocitos T como se mide por la producción de interferón gamma por el subconjunto de linfocitos T V<sub>β</sub>17.

## Ejemplo 2

El presente ejemplo examina si las células dendríticas conservan su función después de la crioconservación. Esta característica es particularmente importante porque los enfoques de inmunoterapia implican múltiples tratamientos y es preferible que todas las CD para cada paciente se preparen y carguen con antígeno durante una única preparación, después se separan en alícuotas y se crioconservan para infusión posterior. Era posible que la congelación y descongelación de las CD puedan limitar su eficacia como activadores de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Se aislaron células dendríticas de PBMC de un paciente de cáncer de próstata y se cultivaron, como se ha descrito anteriormente, durante 7 días en presencia de GM-CSF 50 U/ml e IL-4 500 U/ml. El día 7, las CD aisladas se recogieron y se crioconservaron usando suero de ternero fetal 90 % y dimetilsulfóxido 10 %. Las CD crioconservadas se almacenaron posteriormente congeladas durante un periodo de tiempo, se descongelaron en un baño de agua a 37 °C y se transfirieron a un tubo de polipropileno de 15 ml y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. Las CD descongeladas se resuspendieron después en medio que contenía suero humano inactivado por calor al 10 % y se contaron y usaron como se describe posteriormente.

El día 7 las CD del Paciente 105 se cargaron de forma osmótica con PSMA u OVA (o se dejaron sin tratar). Las CD tratadas se congelaron después en un medio de congelación convencional de suero humano 90 % y DMSO 10 % como se ha descrito anteriormente. El mismo día, se estableció un segundo conjunto de cultivos de CD. Una semana después se recogieron CD de día 7 nuevas y se cargaron de forma osmótica con PSMA u OVA (o se dejaron sin tratar). Además, las CD que se habían crioconservado la semana antes, se descongelaron mediante técnicas convencionales y se usaron inmediatamente en un ELISA. Las células efectoras restringidas a PSMA del Paciente 105 presentaron fuerte reactividad tanto a dianas nuevas como crioconservadas (Fig. 5). Como se enseña en este ejemplo específico, la crioconservación no disminuye la eficacia de CD para actuar como células presentadoras de antígenos.

La incitación de una potente respuesta antitumoral usando inmunoterapia ha estado limitada en eficacia parcialmente debido a la dificultad para estimular una respuesta de linfocitos T citotóxicos. La presente invención describe procedimiento y composiciones para superar esta limitación. La invención implica exponer células dendríticas a antígeno específico de tejido soluble en presencia de Bacilo Calmette Guerin (BCG), de modo que el BCG ayuda a dirigir el antígeno a la ruta de procesamiento de MHC de clase I induciendo una respuesta predominantemente de linfocitos T citotóxicos. Trabajos recientes de Cella y colaboradores (Cella y col., Nature 388: 782-787 (1997)), también han demostrado la importancia de proceso de maduración para presentación de antígenos. En ausencia de estímulos inflamatorios, la semivida de un antígeno presentado en moléculas de MHC de clase I en CD fue de 10 horas. En contraste; la pulsación de CD con antígeno en presencia de factores inflamatorios aumentó la semivida del antígeno hasta 100 horas. La mayor semivida permite que las CD se dirijan a órganos linfoides secundarios y activen linfocitos T específicos de antígeno.

## Ejemplo 3

En este ejemplo se aislaron células dendríticas de un paciente de cáncer y se trataron con diversas concentraciones de BCG. Después de varios días de cultivo, las CD se ensayaron con respecto a 1) la capacidad para captar partículas por pinocitosis, y 2) la expresión en superficie de ciertos marcadores de maduración de células dendríticas, incluyendo HLA-DR, CD86, CD40, CD83, CD80 y HLA de clase I.

Se aislaron células dendríticas del paciente 57 como se ha descrito anteriormente. Las células aisladas (1-5 x 10<sup>6</sup>) se cultivaron durante aproximadamente 6 días en ocho matraces T-75. Se añadió BCG (1 x 10<sup>6</sup> unidades/ml) para duplicar los matraces para conseguir una dilución de 1: 250, 1: 2.500, o 1: 25.000. No se añadió BCG a los dos



matraces de cultivo restantes. Se recogió un primer conjunto de matraces de cultivo que comprendían CD sin BCG, o con 1: 250, 1: 2.500 o 1: 25.000 de dilución de BCG después de una incubación de 48 o 72 horas. El conjunto duplicado de matraces de cultivo se recogió después de un total de 72 horas en cultivo. Cada cultivo de CD se analizó con respecto a: (1) la capacidad para captar FITC/Dextrano por pinocitosis y (2) el nivel de expresión en superficie de marcadores de maduración de CD particulares, incluyendo HLA-DR, CD86, CD40, CD83, CD80 y HLA de clase I.

La capacidad para captar partículas de dextrano marcados por pinocitosis se ensayó de la siguiente manera: los contenidos de cada matraz de cultivo de CD se separaron en alícuotas en tubos duplicados y se incubaron en medio AIM-V en hielo durante 30 minutos. Después de incubación en hielo, se añadió FITC/Dextrano a cada tubo para conseguir una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml. Un conjunto de tubos se incubó a 37 °C, en CO<sub>2</sub> 5 %, durante 1 hora, mientras que el conjunto de tubos duplicado se incubó en hielo (0 °C) durante aproximadamente 1 hora. Las CD se lavaron 3 veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes del análisis por citometría de flujo. La cantidad relativa de pinocitosis por CD se comparó después de restar la captación de fondo a 0 °C (Tabla 2).

Para análisis de marcadores de maduración de CD cada cultivo de CD se incubó con los siguientes pares de anticuerpos monoclonales: FITC-anti HLA-DR/PE-anti-CD86; FITC-anti CD40/PE - anti-CD83; FITC-anti-CD80/PE-anti-HLA de clase I; o controles de anticuerpo de isotipo FITC-/PE usando procedimientos convencionales. Se analizó la expresión en superficie de cada marcador de CD por citometría de flujo (Tabla 3).

Tabla 2

Captación de Dextrano – FITC (Fluorescencia media 37 °C – Fluorescencia media 0 °C)					
N.º de Exp.	Concentración de BCG	Duración (h)	Media	Media GEO	Mediana
1	0	48	51	36,3	39,15
2	1: 250	48	28,09	20,76	22,03
3	1: 2500	48	37,02	27,11	29,28
4	1: 25000	48	40,44	34,12	38,04
5	0	72	63,8	43,2	47,3
6	1: 250	72	34,76	22,85	22,6
7	1: 2500	72	49,79	36,24	39,6
8	1: 25000	72	55,62	38,27	41,41

20

Tabla 3

Diferencia de FL media								
N.º de Exp.	Concentración de BCG	Duración (h)	HLA-DR FTIC	CD86 PE	CD40 FITC	CD83 PE	CD80 FITC	HLA de Clase I PE
1	0	48	250	613,07	19,64	15,14	-1,1	140,28
2	1: 250	48	276,54	957,38	24,78	62,58	-1,27	173,69
3	1: 2500	48	267,94	734,1	21,9	21,4	-0,94	135,45
4	1: 25000	48	277,1	632	18,2	17,59	-1,62	148,97
5	0	72	337,13	705,75	20,89	22,42	-1,26	193,06
6	1: 250	72	331,71	1106,12	33,39	127,65	-2,11	373,06
7	1: 2500	72	336,87	694,74	24,2	35,1	-1,41	177,6
8	1: 25000	72	298,96	646,95	19,81	24,25	-1,15	170,26

25

A una concentración de 1: 250 las CD mostraron un aumento significativo de CD86, CD40, CD83 y HLA de clase I en los cultivos tanto de 48 como de 72 horas. El efecto de BCG fue más pronunciado a las 72 horas. Por ejemplo, HLA de clase I aumentó en 24 % después de 48 horas en BCG 1: 250, pero aumentó 93 % después de 72 horas de BCG 1: 250. De forma similar, CD83 aumentó 40 veces a las 48 horas en BCG 1: 250 y 5,7 veces después de 72 horas en BCG 1: 250.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS, INC.

5 <120> PROCEDIMIENTO PARA AUMENTAR LA PRESENTACIÓN DE CLASE I DE ANTÍGENOS EXÓGENOS POR CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

<130> NORB021PEP02

10 <140> EP 10 180 857.4  
<141> 11-05-2001

<150> PCT/US01/15428  
<151> 11-05-2001

15 <150> 60/203.758  
<151> 12-05-2000

20 <150> 01 933 328.5  
<151> 11-05-2001

<160> 37

25 <170> PatentIn Ver. 2.1

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

30 <400> 1

Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val  
1 5

35 <210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 2

Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val  
1 5

45 <210> 3  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 3

Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu  
1 5

55 <210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

ES 2 571 979 T3

Val Leu Ala Gly Gly Phe Phe Leu Leu  
1 5

5 <210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 5

Glu Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu  
1 5

10 <210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
15 <400> 6

Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu  
1 5

20 <210> 7  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
25 <400> 7

Thr Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu  
1 5

30 <210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
35 <400> 8

Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu  
1 5

40 <210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 9

Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val  
1 5

45 <210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
50 <213> *Homo sapiens*

ES 2 571 979 T3

<400> 10

Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu Leu  
1 5

5 <210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 11

Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu  
1 5

15 <210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 12

Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu  
1 5

25 <210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 13

Glu Gly Asp Leu Val Tyr Val Asn Tyr  
1 5

35 <210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 14

Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr  
1 5

45 <210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 15

Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr  
1 5

55 <210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 16

ES 2 571 979 T3

Leu Phe Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr  
1 5

5  
<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 17

Thr Tyr Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr  
1 5

10  
  
15  
<210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 18

Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr  
1 5

20  
  
25  
<210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 19

Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr  
1 5

30  
  
35  
<210> 20  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 20

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

40  
  
45  
<210> 21  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 21

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

50  
<210> 22  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

ES 2 571 979 T3

<400> 22

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

5 <210> 23  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 23

Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile  
1 5

15 <210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 24

Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile  
1 5

25 <210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys Leu Leu  
1 5

30 <210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu  
1 5

40 <210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 27

Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe  
1 5

50 <210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

ES 2 571 979 T3

<400> 28

Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe  
 1 5

5

<210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 29

Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile  
 1 5

15

<210> 30  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 30

Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met  
 1 5

25

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 31

Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu  
 1 5

35

<210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 32

Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His Val  
 1 5

40

<210> 33  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45

<400> 33

Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser Leu Tyr  
 1 5

50

<210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT

ES 2 571 979 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 34

5

Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys  
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr Lys  
1 5

15

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 36

Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys  
1 5

25

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 37

Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile  
1 5



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para promover el procesamiento por Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I de un antígeno soluble por células dendríticas (CD) humanas, en el que dichas CD se exponen, *in vitro*, a un antígeno viral, a un antígeno bacteriano, a un antígeno específico de tejido o fragmentos antigénicos del mismo, en presencia de bacilo de Calmette Guerin (BCG) o BCG con lipopolisacárido (LPS) como un factor o agente que promueve el procesamiento por MHC de clase I del antígeno.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antígeno es un antígeno de neutralización viral, o un fragmento antigénico del mismo.
- 10 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 y reivindicación 2, en el que las CD humanas se obtuvieron de la epidermis de la piel, bazo, médula ósea, timo, ganglio linfático, sangre del cordón umbilical o sangre periférica.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células dendríticas son células dendríticas con vida prolongada.
5. Un procedimiento para producir un mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> activados *in vitro*
  - 15 (a) proporcionando CD aisladas que han sido expuestas a BCG o a BCG y LPS y a un antígeno soluble que comprende un antígeno viral, un antígeno bacteriano, un antígeno específico de tejido o fragmentos antigénicos de los mismos, e
  - (b) incubando linfocitos T no sensibilizados *in vitro* con dichas CD para producir un mayor porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que cuando se incuban linfocitos T no sensibilizados solo con CD expuestas a antígeno.

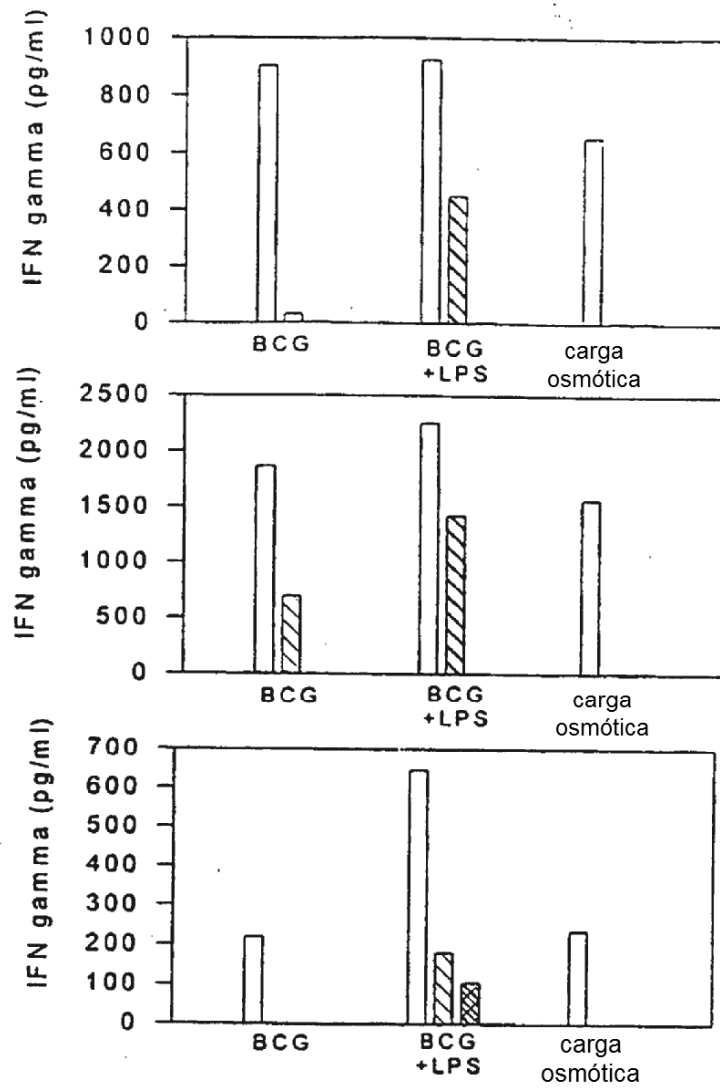


FIG. 1

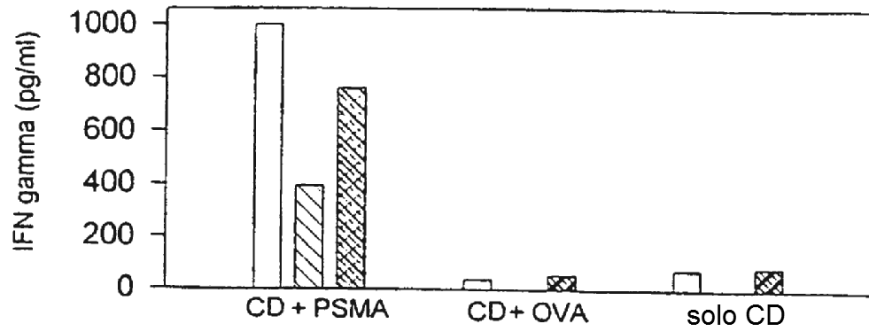


FIG. 2A

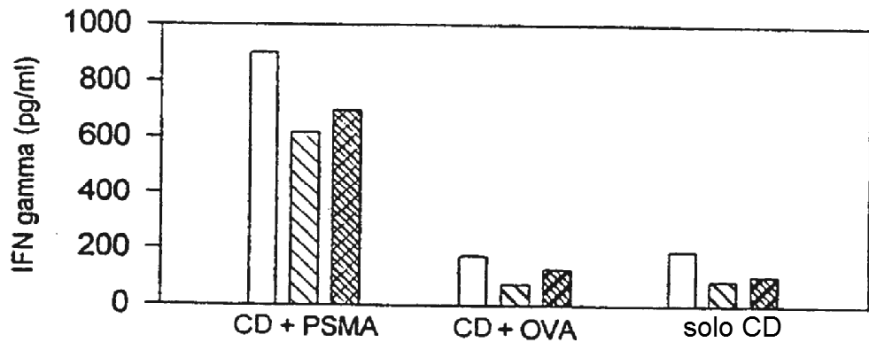


FIG. 2B

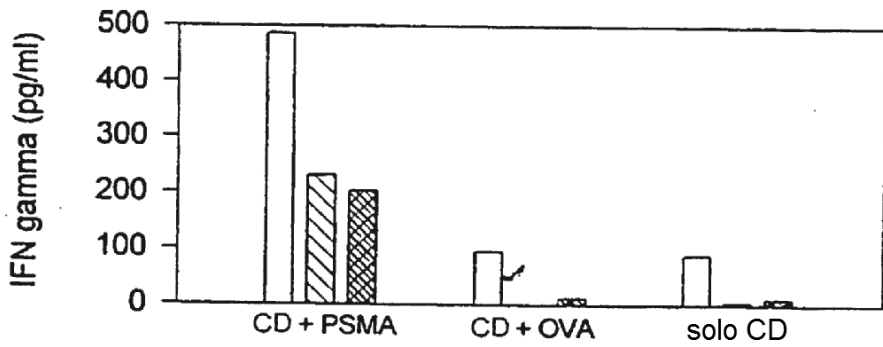


FIG. 2C

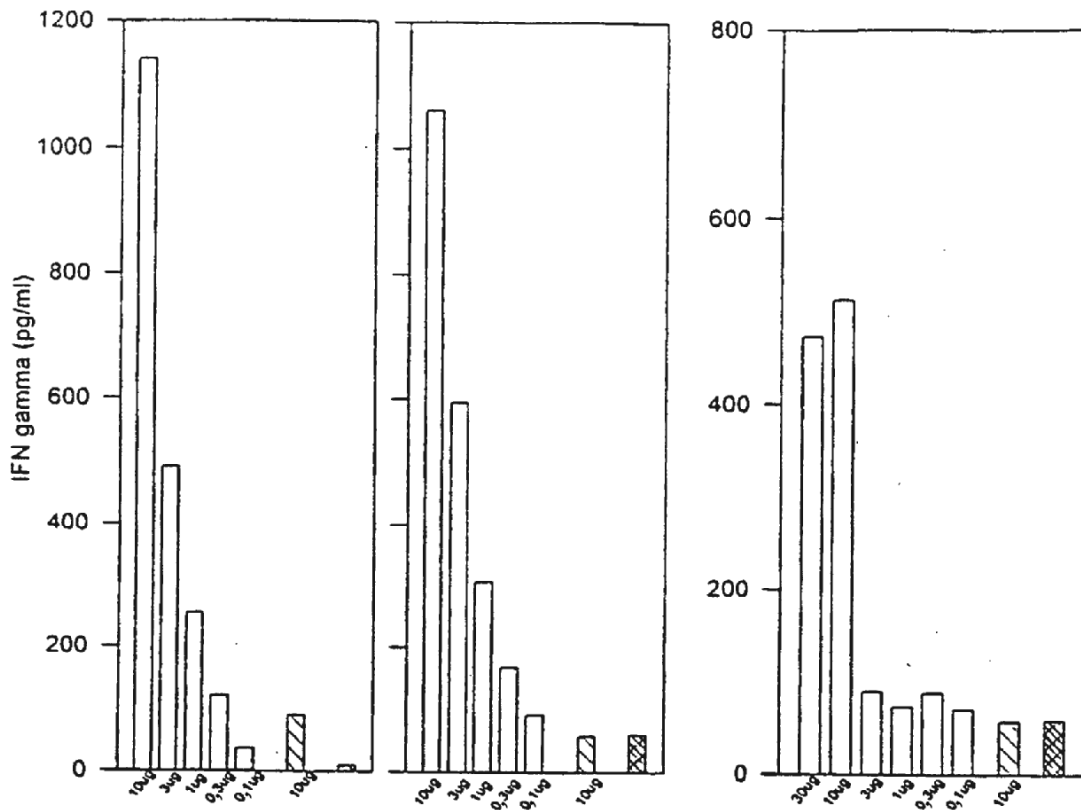


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

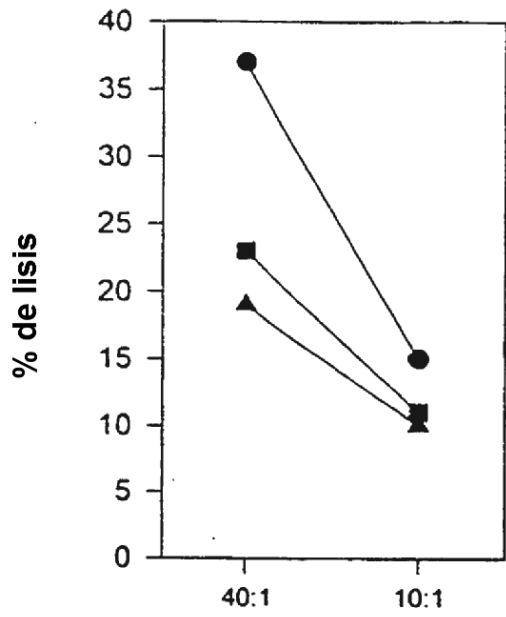


FIG. 4A

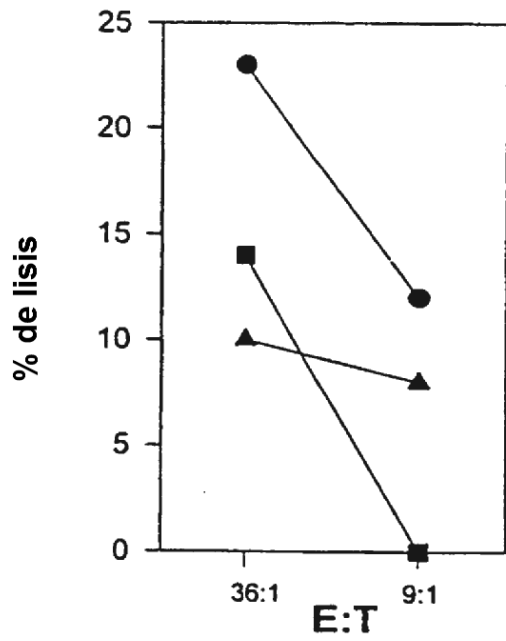


FIG. 4B

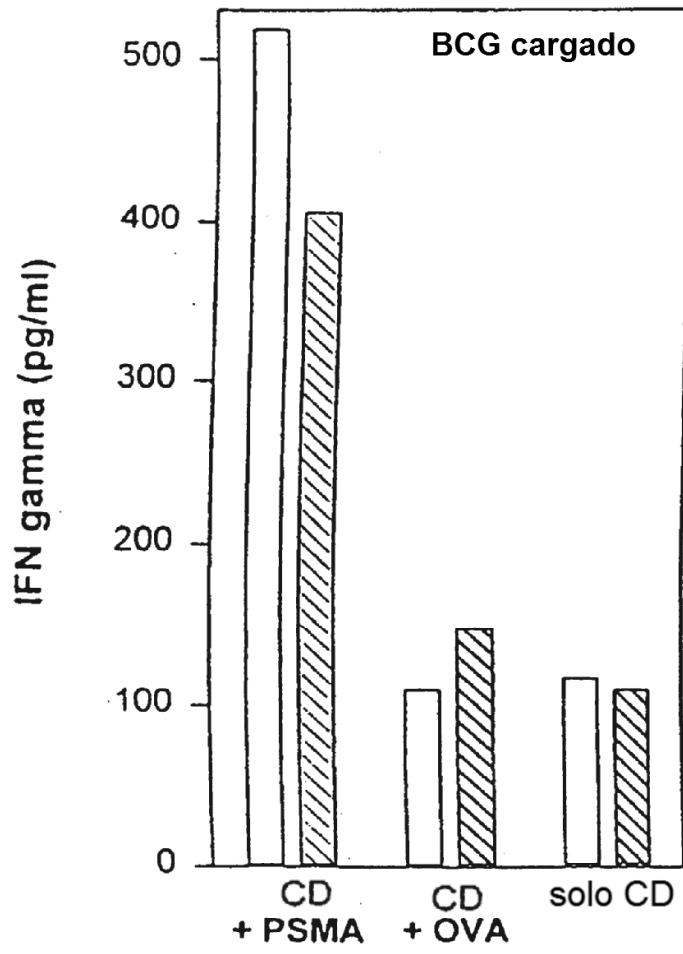


FIG. 5A

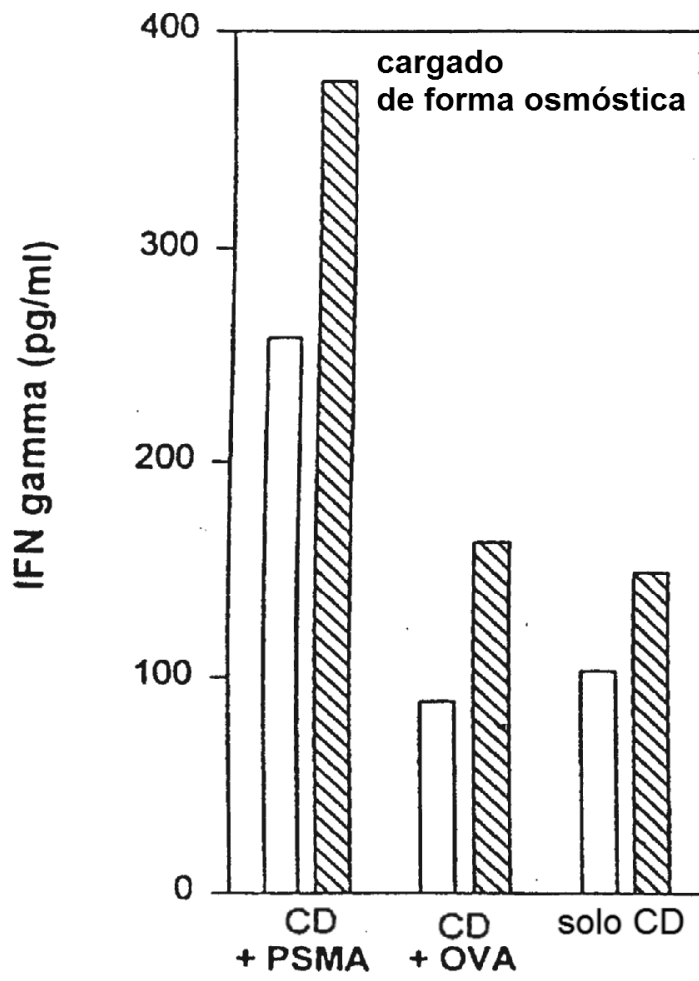


FIG. 5B

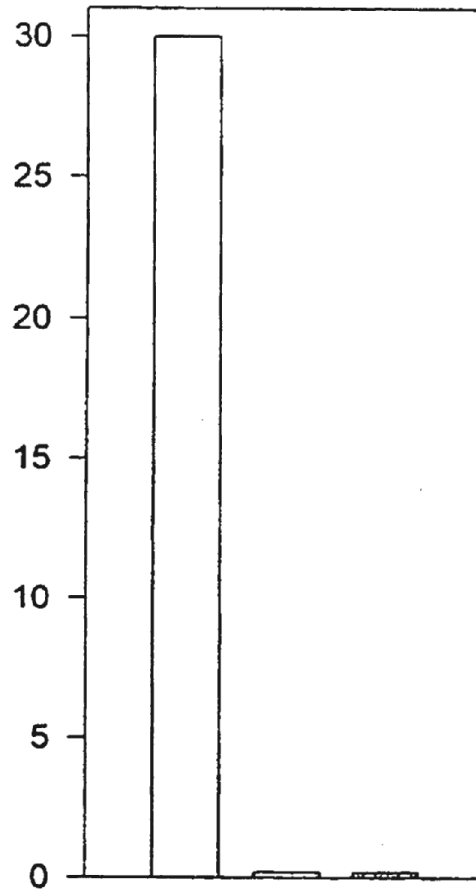


FIG. 6A



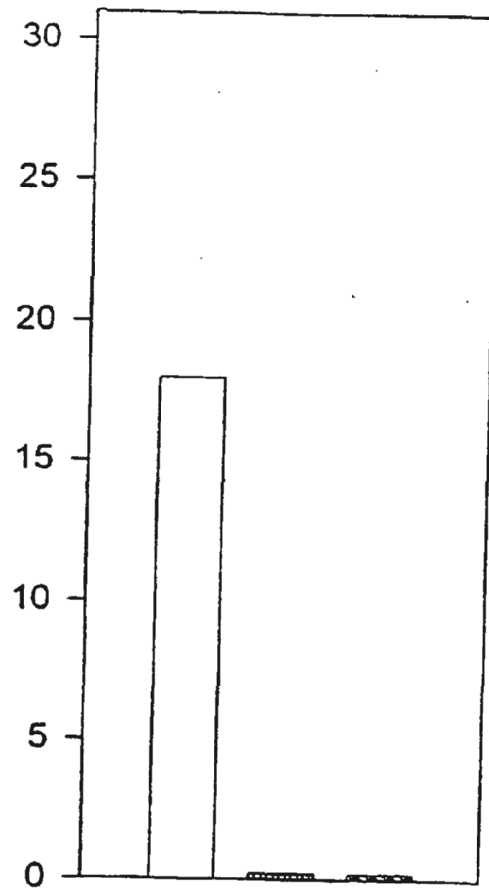


FIG. 6B