

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



CSA850346

PST



Organización y
Digitalización CSA Ltda

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-121156

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TÍTULO**

LINEAS CELULARES, COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE MELANOMAS

QUE LOS COMPRENDEN, PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR LAS COMPOSICIONES

Y METODOS DE TRATAMIENTO

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE**

CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y

TECNICAS (CONICET); FUNDACION SALES e INIS BIOTECH LLC

DOMICILIO

BUENOS AIRES, ARGENTINA y MILFORD, DELAWARE, U.S.A., Respectiv.

74. **APODERADO**

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-121156- -00000-0000

Fecha: 2009-10-28 10:01:12 Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 185

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.
- ☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TÉCNICAS (CONICET); FUNDACIÓN SALES e INIS BIOTECH LLC las dos primeras sociedades se encuentran constituidas y existentes bajo las leyes de Argentina y la tercera bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Direcciones: 1. Av. Rivadavia 1906 3 "F", Buenos Aires, C1033AAJ, Argentina; 2. Viamonte 2043 piso 6 A°, Buenos Aires C1056ABE, Argentina y 3. 203 NE Front Street, Suite 101, Milford, Kent County, Milford, Delaware 19963, Estados Unidos de América Domicilios: 1. Buenos Aires, Argentina; 2. Buenos Aires, Argentina y 3. Milford, Delaware, Estados Unidos de América	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro ☐ Cual Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50 E-mail: clientes@cavelier.com Domicilio: Bogotá, Colombia.	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ C.E. ☐ NIT ☐ Otro ☐ Cual Número 35.456.344 T. P. 23.555
4 INVENTOR (ES) (72)	1. José MORDOH José Hernández 1837, 9 piso, Buenos Aires, C1426EOE, Argentina	2. María Marcela BARRIO Pasaje Cook 55, Villa Ballester, Buenos Aires 1653, Argentina

3. Erika María VON EUW Av. Córdoba 2745 piso 12 depto 35, Buenos Aires, C1187AAB Argentina			
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/IB2008/051385</u> Fecha: <u>11 de abril de 2008</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2008/126039 A3</u> Fecha: <u>23 de octubre de 2008</u>		
6	Título (54) <u>LÍNEAS CELULARES, COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE</u> <u>MELANOMAS QUE LAS COMPRENDEN, PROCEDIMIENTOS PARA PREPARAR</u> <u>LAS COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE TRATAMIENTO</u>		
7	Clasificación Internacional (51) <u>A61K 039/000</u> <u>C12N 5/06</u>		
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>AR</u>	(32) Fecha <u>11 de abril de 2007</u>
		(31) Número de Solicitud <u>P20070101520</u>	
9	Comprobante de pago No.: <u>09-80.209</u> Fecha: <u>26 de octubre de 2009</u> Comprobante de pago No.: <u>09-78.678</u> Fecha: <u>19 de octubre de 2009</u> Comprobante de pago No.: <u>09-54.948</u> Fecha: <u>27 de julio de 2009</u> Comprobante de pago No.: <u>09-78.580</u> Fecha: <u>19 de octubre de 2009</u>		
10	Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo. ☒ Comprobante de pago por 62 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por \$1.550.000.oo. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. ☐ Poderes, si fuere el caso. ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. ☐ Declaraciones. ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso. ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas. ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico. ☒ Arte final 12x12 ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud. ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS		

11

FIGURA CARACTERISTICA:

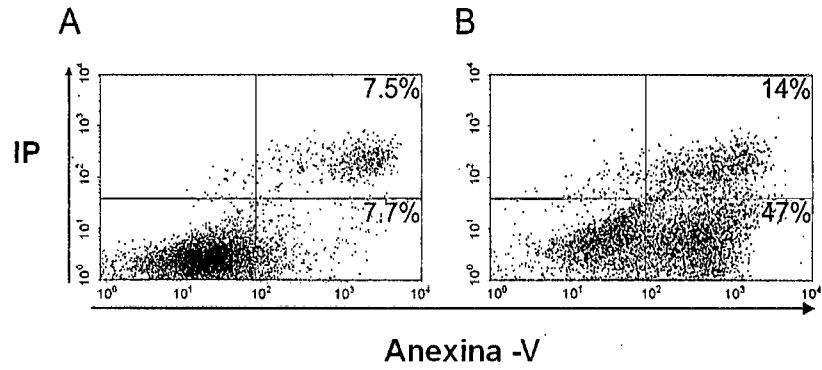


Figura 1

12

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

FIRMA:

*Luz Clemencia Sobrera*C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/126039 A3

Descripción:

Páginas 54 en el idioma original

Páginas 62 en español

Reivindicaciones: Número (s) 77

Figuras: Número (s) 10

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 October 2008 (23.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/126039 A3

- (51) International Patent Classification:
A61K 39/00 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/IB2008/051385
- (22) International Filing Date: 11 April 2008 (11.04.2008)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
P20070101520 11 April 2007 (11.04.2007) AR
- (71) Applicants (for all designated States except US): CON-
SEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIEN-
TIFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) [AR/AR]; Av. Ri-
vadavia 1906 3 "F", -, Buenos Aires, C1033AAJ (AR).
FUNDACION SALES [AR/AR]; Viamonte 2043 piso 6
A°, -, Buenos Aires, C1056ABE (AR). INIS BIOTECH
LLC [US/US]; 203 NE Front Street, Suite 101, Milford,
Kent County, -, Milford, Delaware 19963 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): MORDOH, José
[AR/AR]; José Hernández 1837, 9 piso, -, Buenos Aires,
C1426EOE (AR). BARRIO, María Marcela [AR/AR];
Pasaje Cook 55, -, Villa Ballester, Buenos Aires, 1653
(AR). VON EUW, Erika María [AR/AR]; Av. Córdoba
2745 piso 12 depto. 35, -, Buenos Aires, C1187AAB (AR).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

[Continued on next page]

(54) Title: CELL LINES, COMPOSITIONS COMPRISING THEM FOR THE TREATMENT OF MELANOMAS,
PROCEDURES TO PREPARE THE COMPOSITIONS, AND TREATMENT METHODS

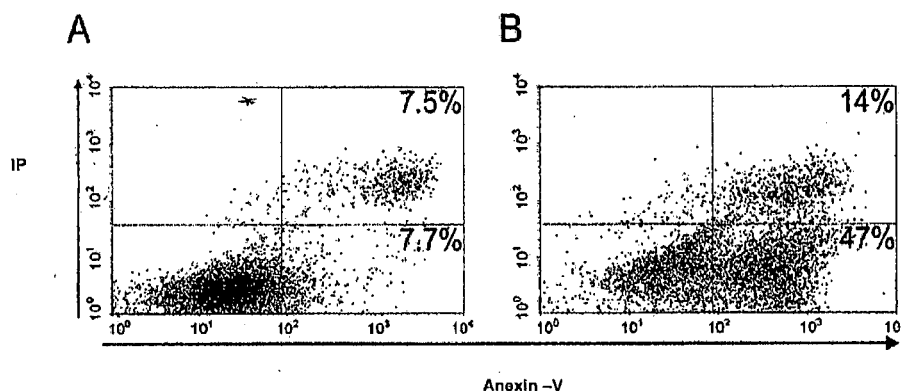


Fig. 1

(57) Abstract: Cell lines, compositions comprising them for the treatment of melanomas, procedures to prepare the compositions, and treatment methods. More particularly, the invention relates to diverse human melanoma cell lines for the treatment of malignant diseases, wherein the cell lines are: (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), or (e) sub-populations thereof. The cell lines may be irradiated, thus obtaining populations with apoptotic phenotype, and populations with necrotic phenotype of such lines. The compositions may comprise adjuvants and/or immuno-modifiers, and/or autologous dendritic cells.

WO 2008/126039 A3

6

WO 2008/126039 A3



(88) Date of publication of the international search report:
11 December 2008

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 October 2008 (23.10.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/126039 A2

(51) International Patent Classification:
C12N 15/11 (2006.01)

Pasaje Cook 55, -, Villa Ballester, Buenos Aires, 1653
(AR). VON EUW, Erika María [AR/AR]; Av. Córdoba
2745 piso 12 depto. 35, -, Buenos Aires, C1187AAB (AR).

(21) International Application Number:
PCT/IB2008/051385

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 11 April 2008 (11.04.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
P20070101520 11 April 2007 (11.04.2007) AR

(71) Applicants (for all designated States except US): CON-
SEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET) [AR/AR]; Av. Ri-
vadavia 1906 3 "F", -, Buenos Aires, C1033AAJ (AR). FUNDA-
CION SALES [AR/AR]; Viamonte 2043 piso 6
A°, -, Buenos Aires, C1056ABE (AR). INIS BIOTECH
LLC [US/US]; 203 NE Front Street, Suite 101, Milford,
Kent County, -, Milford, Delaware 19963 (US).

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MORDOH, José
[AR/AR]; José Hernández 1837, 9 piso, -, Buenos Aires,
C1426EOE (AR). BARRIO, María Marcela [AR/AR];

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(54) Title: CELL LINES, COMPOSITIONS COMPRISING THEM FOR THE TREATMENT OF MELANOMAS,
PROCEDURES TO PREPARE THE COMPOSITIONS, AND TREATMENT METHODS

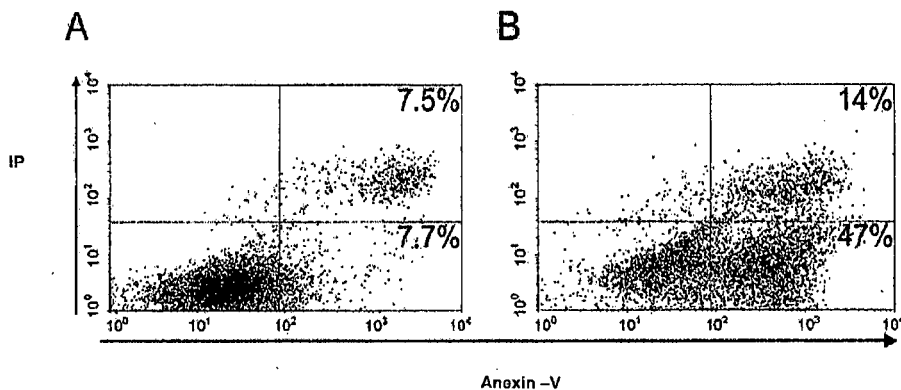


Fig. 1

(57) Abstract: Cell lines, compositions comprising them for the treatment of melanomas, procedures to prepare the compositions, and treatment methods. More particularly, the invention relates to diverse human melanoma cell lines for the treatment of malignant diseases, wherein the cell lines are: (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), or (e) sub-populations thereof. The cell lines may be irradiated, thus obtaining populations with apoptotic phenotype, and populations with necrotic phenotype of such lines. The compositions may comprise adjuvants and/or immuno-modifiers, and/or autologous dendritic cells.

WO 2008/126039 A2

SPECIFICATION

TITLE

Cell lines, compositions comprising them for the treatment of melanomas, procedures to prepare the compositions, and treatment methods

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to cell lines, compositions comprising them for treating melanomas, procedures for preparing compositions, and treatment methods. More particularly, the invention relates to diverse human melanoma cell lines for treatment of malignant diseases, where the cell lines are: (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B 38124 Braunschweig, Germany on March 23, 2007 under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B 38124 Braunschweig, Germany on March 23, 2007 under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B 38124 Braunschweig, Germany on March 23, 2007 under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Inhoffenstraße 7 B 38124 Braunschweig, Germany on March 23, 2007 under access number DSM ACC2829) or (e) subpopulations thereof. Cell lines may be irradiated, thus obtaining populations with apoptotic

phenotype, and populations with necrotic phenotype of such lines. The compositions may comprise adjuvants, and/or immuno-modifiers, and/or autologous dendritic cells.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Currently, many efforts are done, and many resources are used to research on the area of cancer immunotherapy. Important existing evidences indicate a central role of T lymphocytes in cancer effective immune responses (Oliver RT, Nouri AM. T; Cancer Surv 1992; 13:173-204). To such purpose, treatments with allogenic cells alone, with adjuvants, or in combination with some cytokines have been used.

On the other hand, it is known that dendritic cells (DC) are antigen presenting cells that may initiate a T cell response, due to their extraordinary ability to stimulate naïve T lymphocytes (Schuler G, Steinman RM. J Exp. Med 1997; 186:1183-7, and Banchereau J, Steinman RM. Nature 1998; 392:245-52).

Several authors have shown in mouse models, and in humans that DC incorporate apoptotic cells, and thus the antigens for the generation of Class I HLA complexes/peptides are presented, allowing the induction of cytotoxic T lymphocytes (Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. J Exp Med. 1998, 188: 1359-1368; Chen Z, Moyana T, Saxena A, Warrington R, Jia Z, Xiang J. Int J Cancer. 2001, 93: 539-548 and Shaif-Muthana M, McIntyre C, Sisley K, Rennie I, Murray A. Cancer Res. 2000, 60: 6441-6447). For this process it is fundamental that the apoptotic cells induce maturity of the dendritic cells (DC), however, many authors have informed that human apoptotic cells do not mature DC,

or induce loss of maturity of such DC (Pietra G, Mortarini R, Parmiani G, Anichini A. Cancer Res 2001, 61: 8218-8226; Labarriere N, Bretaudeau L, Gervois N, Bodinier M, Bougras G, Diez E, Lang F, Gregoire M, Jotereau F. Int J Cancer 2002, 101: 280-286 and Demaria S, Santori FR, Ng B, Liebes L, Formenti SC, Vukmanovic S. J Leukoc Biol. 2005, 77: 361-368).

US patent 6,187,306 by Pardoll et al. discloses a method of treating and protecting against melanoma, which comprises the use of at least one or more allogenic cell lines expressing melanoma immunodominant antigens, wherein the cell line has been modified in such a way that it expresses cytokines, and administering such transformed line to a patient carrying melanoma, or at risk of getting the disease. Although the importance of the cell line or the cell lines used, which expresses most of the immunodominant antigens, a new cell line or a combination of cell lines expressing most of such antigens have not been disclosed. The invention comprises essentially transformed cell lines expressing cytokines such as GM-CSF.

US patent 5,882,654, and US patent 5,840,317 disclose irradiated melanoma cell lines used as allogenic vaccines. The disclosed treatment reaches levels of NED patients below 50% (16/37), and shows an effective humoral-type anti-tumor activity.

US patent 2006/0034811 by Wallack et al. discloses vaccines comprising antigen presenting cells charged with lysed or ruptured tumor cells including cytosol and membranes. Tumor cells may be cells from the patient, cell lines, or cells infected with the recombinant vaccinia virus codifying IL-2. US patent 2006/0140983 by Palucka et al. discloses a composition inducing immunity in cancer

patients which comprises the isolation and purification of antigen presenting cells primed for exposition with one or more heat-shock proteins, and dead tumor cells. Antigen presenting cells are dendritic cells, and tumor cells may be syngenic or allogenic cells, for example cell lines. This document discloses the need of incorporating heat-shock proteins by rupture through heating of tumor cells. The shown assays do not necessarily disclose that the composition have immunity-inducing activity in melanoma patients.

US patent 6,602,709 by Albert et al., discloses the use of apoptotic cells to present antigens to dendritic cells for T cell induction. The method is useful to induce antigen-specific cytotoxic T lymphocyte helper cells. Dendritic cells are primed by apoptotic cells or fragments thereof, and are capable of processing and present processed antigens, and induce the activity of cytotoxic T lymphocytes, which may be used as therapeutic vaccines.

BRIEF DESCRIPTION*OF THE INVENTION

In one aspect of the present invention several human melanoma cell lines for the treatment of malignant diseases are provided, wherein the cell lines are (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), or (e) sub-populations thereof. The cell

lines may further be irradiated in order to obtain populations with apoptotic phenotype, and populations with such lines necrotic phenotype.

In another aspect of the present invention, a composition for the treatment of melanoma is provided, wherein such composition comprises at least one allogenic melanoma cell line, for example (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), or combinations thereof, wherein such cell lines are incapable of proliferate. The composition may also comprise excipients, adjuvants such as BCG, and immunomodulators such as GM-CSF, or IFN α . In a preferred embodiment, the composition comprises combinations of the four allogenic melanoma cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832) and (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), where such cell lines have been irradiated and are incapable of proliferate. In another preferred embodiment, the composition of the invention comprising combinations of the three allogenic melanoma

cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), and (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), where such cell lines have been irradiated and are incapable of proliferate.

In another aspect of the present invention, a composition for adjuvant treatment of melanoma is provided, wherein such composition comprises at least one allogenic melanoma cell line, for example (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), and combinations thereof, and where such cell lines have been irradiated and are incapable of proliferate. The composition may also comprise excipients, adjuvants such as BCG, and immunomodificadores such as GM-CSF and/or IFN α . In one preferred embodiment the composition of the invention comprises a combination of the allogenic melanoma cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), or (d) Mel-XX4 (deposited

at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), where such cell lines have been irradiated and are incapable of proliferate. In another preferred embodiment, the composition of the invention comprises a combination of the allogenic melanoma cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), or (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), where such cell lines have been irradiated and are incapable of proliferate.

In another aspect of the present invention, a composition is provided for the treatment of human melanomas comprising mature autologous dendritic cells, autologous dendritic cells charged with cells with at least a allogenic human melanoma cell line, apoptotic cells of such at least one heterologous human melanoma cell line of such at least one heterologous human melanoma cell line. The human melanoma cell line is one or more of the following lines: (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), or (e) subpopulations thereof.

In another aspect of the invention, a composition for adjuvant treatment of human melanoma is provided, comprising mature dendritic cells, dendritic cells charged with cells of at least one allogenic human melanoma cell line, apoptotic cells of one heterologous human melanoma cell line and necrotic cells of one heterologous human melanoma cell line. The melanoma cell line is one or more of the following cell lines: (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), or sub-populations thereof.

In another aspect of the present invention, a procedure for preparing the composition is provided, wherein such procedure is carried out in the following stages:

- a) thawing and culturing cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), and (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832);
- b) blending such three cell lines;
- c) irradiating such three cell lines;

d) adding adjuvants and excipients to the cell line mixtures. The procedure may also comprise in stage a) adding cell line Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829).

In another object of the present invention, a procedure for preparing the composition is provided, which comprises the stages of:

- a) thawing and culturing cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC^{*}2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), and Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829);
- b) blending such cell lines;
- c) irradiating such cell lines;
- d) obtaining autologous dendritic cells; and
- e) co-culturing for some time the autologous dendritic cells with the irradiated cell lines of stage c).

In another aspect of the present invention, a method to induce an anti-tumor immune response in patients carrying a melanoma is provided, which comprises administering to a patient in need thereof an affective amount of a combination of cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), and (c)

Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), where such cell lines are incapable of proliferate. The administration may be done together adjuvants and/or immunomodulators.

In another aspect of the present invention, a method of inducing an anti-tumor immune response in patients carrying a melanoma is provided, which comprises administering to a patient in need thereof an effective amount of a combination of cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), and (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), where such cell lines are incapable of proliferating.

In another aspect of the present invention, a method of inducing an anti-tumor immune response in patients carrying a melanoma is provided, which comprises administering to a patient in need thereof an effective amount of a co-culture from between 6 and 72 hours of autologous dendritic cells, and a combination of cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), and (d) Mel-XX4 (deposited at

German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), where such cell lines are incapable of proliferating.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows a representative example of the results of Gamma irradiation of the mixture of cell lines of 1a invention in reference to apoptosis induction and necrosis (Apo-Nec cells). Panel A shows non-irradiated cells, and panel B shows the cells after Gamma irradiation 70Gy, and stained with Annexin V-FITC and IP (propidium iodide). Early apoptotic cells are defined as Annexin V-FITC⁺/ IP⁻, while necrotic cells were doubly positive.

Figure 2 shows a Kaplan Meier graph of patients treated with the composition of the invention DC/Apo-Nec.

Figure 3 shows *in vitro* lymphocytes proliferation in response to autologous tumor cells presented by DC. Results are shown as mean $\pm$ SD cpm (counts per minute) of triplicates. Lymphocytes with phytohemagglutinin (PHA) incorporating more than 7×10^4 cpm were incubated as positive controls.

Figure 4 shows tetramer staining for antigens Melan A/MART-1, and gp100. Panel A shows results obtained with PBMN samples from HLA-A*0201 patients participating in the test. *ND means: non-determined due to insufficient amount of CD8⁺ T cells in the samples post-application. Panel B shows the increase of CD8⁺ HLA T lymphocytes/tetramer peptide + in PBMC from patient #2. Amounts represent percentage of CD8⁺ HLA/tetramer peptide +. HLA-A*0201 PBMC from healthy donors were stained as controls.

Figure 5 shows intra-cytoplasmic measurement of IL-10 and IL-12 in Apo-Nec cells of the invention. Panel A

19

12

shows results of FACS from DCin, and panel B shows results of FACS from DC/Apo-Nec cells.

Figure 6 shows antigen HMB45 and Mart-1 expression in line Mel-XY1 and in such cell line derivative clones. The three top panels correspond to the cell line, and the three lower panels correspond to the clones. Column 1 correspond to the cell line and control clones, column 2 correspond to the cell line HMB45 expression and the clones, respectively; and column 3 corresponds to the cell line Mart-1 expression and clones.

Figure 7 shows a melanoma biopsy from patient #100. Panel A shows a low magnification image (25X), wherein Ag gp100 positive and negative tumor cells can be seen; panel B shows heterogeneous expression of gp100, wherein cells with high, moderate, and nil expression can be seen (400x); panel C shows heterogeneous Ag MART-1 expression, where a cell clone with high expression surrounded by negative cells can be seen (400x).

Figure 8 shows a Kaplan-Meier graph of patients treated with the Apo-Nec composition of the invention.

Figure 9 shows dermal metastases excised from patient #200, treated with the Apo/Nec composition of the invention, in addition to GM-CSF and BCG. Panel A shows macrophages in the necrotic area of the tumor (1), infiltrated with de lymphocytes in contact with tumor cells (2), and a viable tumor area (3). Panel B is a 100x detail of the area of strong tumor infiltration, panel C is a 400x detail of the same area, wherein infiltrating lymphocytes are observed, panel D shows a detail of the same metastasis wherein most of it is necrotized with macrophages charged with melanin (1), and a viable area(2) (25X).

20

Figure 10 show computerized axial tomography images from patient #300, treated with Apo-Nec composition of the invention in addition to BCG. Panel A shows with an arrow the location of lung metastasis, and panel B shows an axial tomography image taken 5 months later.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

As regards this application, the terms "combination", and "mixture" are interchangeable.

Where in the present invention reference is made to compositions which modify the immune system in mammals it must be understand that these compositions are also known by skilled in the art as vaccine compositions, cell based vaccines, or simply vaccines.

The four cell lines of the invention were deposited according the Budapest Treaty with the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ en March 23, 2007 under the following access numbers: Mel-XY1 DSM ACC2830 cell line, Mel XY2 DSM ACC2831 line, Mel XY3 DSM ACC2832 line, and Mel XX4 DSM ACC2829 line.

The results of cell line characterization assays are shown in the following Table:

Table 1: HUMAN MELANOMA TUMOR CELL MARKERS OF THE INVENTION

MARKER	XY1	XY2	XY3	XX4
Gp100 (HMB45)	ND	ND	+	+
Gp100 (PCR)	+	+	+	+
Tyrosinase (PCR)	+	+	+	+
MART-1 (PCR)	+	-	+	-
MAGE 1 (PCR)	ND	-	+	+

21

S100	+	+	+	+
Vimentin	ND	+	+	+
CEA	ND	+	+	ND
GD2	+	+	+	+
GD3	+	+	+	+
P53	+	+	+	+
MIA	+	+	+	+
MCP-1	-	+	+	+
TRP-2	+	+	ND	+
MDR1	-	ND	-	-
HLA class I	A02/23 B18/B37	A30/33 B18/B65	A02/A23 B18	A24(9)/A33(19) B18/B65 (14)
HLA class II	DR7/DR11 DR52/DR53	DR1/DR1	DR11 DR13 DR52	DR1/DR11
Tumorigenici- ty in nude mice	+	+	+	+
Growth in soft agar colonies	++	++	++++	++

From the MEL-XY1 cell line characterization appears that cells grow as a heterogeneous amelanotic cell monolayer in size and shape, where most are cubic or elongated in shape, and without extensions. They are slightly melanotic at high density. MEL-XY1 cells form great amount of colonies in semi-solid agar. MEL-XY1 cells are tumorigenic in athymic mice (nude), and do not generate metastasis.

22

From the MEL-XY2 cell line characterization appears that cells grow as a heterogeneous amelanotic cell monolayer in size. The cells are small in size and in less number, multinucleated and with prominent nucleoli. Cells with characteristic dendritic extensions in melanoma are also seen. By growing at high density, they may pile up and develop micro-tumors. MEL-XY2 cells are tumorigenic in athymic mice (nude), and do not generate metastases.

From the MEL-XY3 cell line characterization appears that cells grow in mono-layer. Cells are uniform, small, and partly rounded. By growing at high density, they may pile up and develop micro-tumors. MEL-XY3 cells form numerous colonies in semi-solid agar. MEL-XY3 cells are tumorigenic in athymic mice (nude), and do not generate metastases.

From the Mel-XX4 cell line characterization appears that such line grows in spindle-formed mono-layer at high density. At low density, it shows dendritic projections similar to melanocytes. Cells are melanotic, and some of them have multiple nuclei with prominent nucleolus. Population duplication time is of 172-173 hours, and they form colonies in soft agar assays.

When Mel-XX4 cell line of the invention was transplanted to nude mice (immuno-depressed) tumor cell lines were generated *in vivo*. Serial passages from the initial tumors demonstrated that 100% of transplanted animals developed tumors during the first month. Tumor growth was slowly, and at 84 days reached an average value of $372 \pm 63 \text{ mm}^3$. Cell line Mel-XX4 of the invention is tumorigenic when injecting subcutaneously an amount of 3×10^6 cells.

23

16

From the analysis of modal chromosome number, the following appears: MEL-XY1 line of the invention shows a dispersion in chromosomal count (between 105 and 110), and thus a clear modal number did not stand out (male). MEL-XY2 line of the invention shows a bimodal tendency with chromosome numbers 89 and 91 (male). MEL-XY3 cell line of the present invention shows a modal number of (male). Most frequent number alterations were chromosome absence on pairs 2 and 6, and extra chromosomes on pairs 20 and 22. MEL-XY4 cell line of the invention shows a modal number of 57-58 (female sex).

Gamma radiation inducing apoptosis in the cell lines of the invention was studied. The application of 50 Gy radiation was enough to totally suppress clonogenic capacity in soft agar for each cell line of the invention. No significant differences were observed in the apoptosis/necrosis induction degree when cells were irradiated with 70, or 100 Gy. Figure 1 A showed that non-irradiated melanoma cells contained between 6-9% early apoptotic cells characterized by Annexin-V⁺/IP⁻ coloration (bottom right hand panel). After radiation at 70 Gy and 72 hr culture, 45-53% of early apoptotic cells were obtained (see Figure 1 B, bottom right hand panel). Annexin-V and IP stained necrotic cells increased from 7.5% in non-irradiated cells to about 15% in irradiated cells (top left hand panels). Thus, in reference to the present patent application, irradiated melanoma cells of the invention are called Apo-Nec cells, and the composition comprising one or more of any of the Apo-Nec cell lines (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 and/or Mel-XX4) is known as Apo-Nec composition.

Cell irradiation allowed to obtain cells incapable of proliferate, useful for the manufacture of compositions

such as Apo-Nec composition of the invention. It shall be evident for a skilled in the art that the Apo-Nec composition of the invention may comprise any of the lines of the invention or different combinations thereof. In a preferred embodiment, composition Apo-Nec of the invention comprises a mixture or combination of Mel-XY1, Mel-XY2, and Mel-XY3 cell lines. In another preferred embodiment, composition Apo-Nec of the invention comprises a mixture, or combination of Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, and Mel-XX4 cell lines. The mixture of the preferred Apo-Nec cell lines of the invention provides a combination of multiple antigens inducing an excellent anti-tumor immune response.

Surprisingly, the combination of tumor antigens presented by the mixture of the four Apo-Nec cell lines of the invention induce a specific T cell immune response against the tumor, and allows to obtain more than 80% of patients free of disease, when treated with Apo-Nec composition of the invention (see figure 8).

The lines of the invention were also used to prepare the composition of the invention known as DC/Apo-Nec, which comprises at least one of the cell lines of the invention and autologous dendritic cells.

In a preferred embodiment, the cell lines are different combinations of lines Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, and Mel-XX4. As an example, and without limitation, the combination may comprise a mixture of cell lines Mel-XY1, and Mel-XY2, or a mixture of lines Mel-XY1, Mel-XX4. In a preferred embodiment, the combination of cell lines comprises a mixture of cell lines Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, and Mel-XX4; therefore, the four cells are present.

In a preferred embodiment, composition DC/Apo-Nec of the invention comprises a combination of irradiated cell

lines Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, Mel-XX4, and autologous dendritic cells.

The particular combination of the four cell lines of the invention provides a unique source of native antigens to charge dendritic cells, additionally providing antigens of clonogenic cells. It must be taken into account that the combination of the four irradiated cell lines of the invention not only provides a particular combination of native antigens, but also comprises a particular combination of cell population, wherein about 50% of apoptotic cells, and about 15% of necrotic cells are present. This combination of populations induces maturity of DC.

Stage I study with composition DC/Apo-Nec of the invention was performed in 16 melanoma patients which characteristics are shown in Table 2

Table 2: characteristics of patients

Patient	Sex	Age	Clinical stage	Mts	PBMC ($\times 10^9$ cells)	Dose of DC/Apo- Nec ($\times 10^6$ cells)	Dose	Clinical evolu- tion (30/3 /07)	DTH score
1	F	42	IV	LN	3.5	5	4	P (8 m)	4
2	F	57	III	ND	3.6	5	4	NED (54 m+)	8
3	M	32	III	ND	3.3	5	4	NED (35 m+)	14.25

WO 2008/126039

PCT/IB2008/051385

19

4	F	17	III	ND	4.4	5	4	NED (45 m+)	9.5
5	M	56	IV	L	5	10	4	P (4 m)	4
6	M	60	III	ND	1.5	3	4	NED (37 m+)	4.5
7	M	27	IV	SC	4.2	10	2	WP (1 m)	ND
8	M	26	III	ND	3.6	10	4	P (7 m)	10.5
9	F	42	III	ND	7.5	15	4	NED (71m+)	5.6
10	M	34	IV	LN	6.2	15	4	P (11 m)	5.5
11	M	44	IV	L	4.7	15	4	P (4 m)	10
12	M	56	III	ND	8	15	4	NED (25m+)	4.5
13	M	47	IIC	ND	9.3	20	4	NED (26 m+)	6.5
14	M	30	III	ND	7.5	20	4	NED (39 m+)	7.25
15	M	52	IV	LN	6	20	4	P (10 m)	3.75

20

16 F 57 IV SC 8.2 20 4 P (6 5.25
m)

ND: Non detectable; SC: subcutaneous; L: lung LN: lymph node

Average age was 42 years (ranging from 17 to 60 years). Five women and eleven men were treated. One of the patients had stage IIC AJCC melanoma, eight had stage III melanoma, and seven had stage IV melanoma. Patients #5 and #11 had been submitted to lung metastases surgery; patient #16 had subcutaneous metastases, and patients #1, #10, and #15 had received radiotherapy in the armpit area after surgery, due to rupture of the lymphatic node capsule. Cohorts of four patients were treated and washed with 5, 10, 15, or 20 $\times 10^6$ dendritic cells (DCs) co-cultured with Apo-Nec cells (composition DC/Apo-Nec of the invention). Every patient received each two weeks a dose of the composition DC/Apo-Nec (0.3 ml) without adjuvants. Patient #7 was eliminated from the protocol after a second application due to a rapid progression of the disease after a sport trauma on the right thigh, and a non-controlled infection; this patient was not replaced.

Immature dendritic cells (DCin) showed the following pattern: $95.1 \pm 3.6\%$ were CD14⁻/CD11c⁺, and $70 \pm 6\%$ were CD1a⁺. Purity was esteemed in about 60%.

About 3×10^6 DCs were obtained from 1×10^8 PBMC sown in medium free from serum.

When DCin obtained from patients, and the cells comprised in the composition DC/Apo-Nec of the invention were characterized it was found that $42.3 \% \pm 13.7$ of Dcin cells from patients (n= 15) were able of fagociting Apo-Nec cells of the invention. Phagocytosis of Apo-Nec cells was assessed by electronic microscopy, observing whole Apo-Nec cells or parts of them within DCs in vacuoles.

The ability of the Apo-Nec cells of the invention to affect the maturation process of the monocyte derivative DC cells was examined through measurements of specific DC cell markers by flow cytometry (FACS) (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA). Phagocytosis of the Apo-Nec cells of the invention resulted in a DC cell mature phenotype compared to controls incubated with LPS. DC cell maturity was evidenced by the increase of CD83, CD80, CD86, HLA class I, and II and CD40 expression. After phagocytosis, a 75.2 % $\pm$ 16 reduction in endocytosis FITC-Dx was found, compared to DCin.

The chemokine receptor (C-C motif) receptor 7 (CCR7) increased its expression in DCs after phagocytosis of Apo-Nec cells of the invention in all patients, and this was related to DC cell migration *in vitro* towards MIP-3 β . DCin cells (9.6% CCR7+, MFI: 23.3) migrated towards MIP-1 α but not towards MIP-3 β ; in contrast, DC/Apo-Nec cells (81.8% CCR7+, MFI: 41.2) clearly migrated towards MIP-3 β , and not towards MIP-1 α .

29

Except patient #6, which showed low PBMC yield, and thus the 10×10^6 DC/Apo-Nec cell dose could not be obtained, and doses of 3×10^6 cells per application had to be administered, all remaining patients received the expected dosage of the DC/Apo-Nec composition of the invention cohort 1: 5×10^6 , cohort 2: 10×10^6 , cohort 3: 15×10^6 , and cohort 4: 20×10^6 . The DC/Apo-Nec composition of the invention was well tolerated, and mean toxicity cases found were always of Degree 1. Weak local reactions and DTH were found in the application sites, consisting in erythema, and papule. None of the patients developed autoimmune disease manifestations (Table 3).

Table 3

Toxicity associated to application of the DC/Apo-Nec composition of the invention

Symptoms	Compositio n 5×10^6	Composit ion 10×10^6	Compositi on 15×10^6	Composition 20×10^6
Fatigue	1/4	1/3	0/4	0/4
Headache	1/4	0/3	0/4	0/4
Chills	1/4	0/3	0/4	0/4
Abdominal cramps	0/4	0/3	0/4	1/4
Local reaction	4/4	3/3	4/4	4/4
Asthenia	0/4	1/3	0/4	0/4
Nausea	0/4	0/3	0/4	1/4
Abdominal	0/4	0/3	0/4	1/4

pain				
Vomiting	0/4	0/3	0/4	1/4
Anorexia	0/4	1/3	0/4	0/4
Diarrhea	0/4	0/3	0/4	1/4
Myalgia	1/4	0/3	1/4	0/4

After a mean follow-up of 41.5 months post-surgery (between 25 and 71 months), stage IIC patients showed no evidences of disease (NED); 7/8 (87.5%) of stage III patients were NED, and 7/7 of stage patients IV showed progression of the disease (see figure 2).

DTH reactions were assessed for each application to heterologous cells Apo-Nec of the invention and the intensity of the reaction was assessed, with the DTH score as described in the examples. Only 6/15 patients showed a slight DTH reaction before application against Apo-Nec cells of the invention. DTH assays disclosed that the application of Apo-Nec cells induce a specific reactivity in all patients, since the DTH score was significantly higher after the application of the second dose of the DC/Apo-Nec composition, compared to base reactions observed after the first application (Mann Whithney test $P=0.029$, $n=15$). DTH scores were higher in the NED patients than in those experiencing progression of the disease ($P= 0.28$, Mann Wilcoxon Rank Sum test).

The increase of the amount of DC/Apo-Nec cells per application did not significantly increase DTH score.

No humoral response against living melanoma cells comprised in the composition of the invention was observed before and after the application, assessed through FACS analysis. Presence of reactive antibodies against Apo-Nec cells was also assessed in serum pre and post application,

by the Western blot technique. In four patients (#3, #4, # and #16) only a tenuous band of melanoma protein (>200 kDa) was observed and detected in post-application serum, and which was not recognized in the breast cancer cell extracts used as non-specific control.

An autologous melanoma cell line was established for patient #1, and thus the likelihood of the application in such patient of the DC/Apo-Nec cells inducing an lymphocyte proliferation response against the own tumor cells could be assessed. Lymphocyte proliferation was assessed after 5 days lymphocyte incubation pre- and post-application with Apo-Nec#1 cells (irradiated tumor cells from patient #1 obtained as described in the examples). Figure 3 shows that lymphocyte proliferation post-application as a response to DC/Apo-Nec#1 cells was higher compared to lymphocytes pre-application, which suggests that specific immunization to tumor antigens presented by Apo-Nec cells exists, which is also present in the patient #1 tumor after the application of DC/Apo-Nec cells.

Seven of the 15 patients enrolled in the study had haplotype HLA-A*0201 class I, and this allowed to study the restrictive HLA tumor-specific response in their own PBMC samples. Anti-gp100 response, and specific Melan A/MART-1 CD8+ T cells induced by the CD/Apo-Nec composition were assessed through the specific link of HLA tetramers/peptides, and the secretion de IFN- γ measured by ELISpot, directly in the peripheral blood samples.

I 5/7 patients, sufficient PBMC were obtained pre (7 days before the first application) and post (15 days after the fourth application) in order to analyze presence of specific CD8+ T lymphocytes reactive to gp100, and Melan A/MART-1 by stain of tetramers. Results are shown in Figure

32

25

4 A. Patients #2 and #6 increased significantly the frequency of gp100 and Melan A/MART-1 specific CD8+ T cells after application above 1%, and they were still NED (53, and 36 months, respectively, after the surgery), while patients #5, # 8, and #16 reduced the pre-application tetramer coloration, and all of them progressed in the disease after the application (Figure 3 A). An example is shown in Figure 4 B, with the results of patient #2. The percentage of CD8+ T cells recognizing gp100, or Melan A/Mart-1 peptide increased after the application from 0.17 and 0.26 to 1.15, and 1.16, respectively. No reactivity was observed in an experiment performed in the same conditions with healthy positive HLA-A*0201 donors.

Release of IFN- γ was analyzed in an ELISpot of total PBMC pre and post-application after 24 hrs incubation with autologous DCs cells pulsed with gp100 or Melan A/MART-1, and using influenza peptides as control (flu₅₈₋₆₆). This assay was evaluated in 5/7 HLA-A*0201 patients. It was observed that two patients (#5 and #16) induced IFN- γ after the application of the DC/Apo-Nec composition of the invention, secreted by specific CD8+ T cells for gp100, and Melan a/MART-1. In patients #5, and #16, frequencies of $7-3.5 \times 10^{-4}$ CD8+ T cells secreting IFN- γ were induced. In patient #2, a great amount of specific CD8+ T cells for gp100, and Melan A/MART-1 were found before and after the application. This patient is still free from disease, 54 months after surgery. Patients #8, and #15 showed a low amount on base point (pre-application) and no changes were observed after four applications with the DC/Apo-Nec composition of the invention.

Balance between IL-12 e IL-10 in the DC/Apo-Nec cells of the invention was quantified by FACS in

differentes times after phagocytosis, and followed by 8 hours treatment with Brefeldin A in order to accumulate cytokines intra-cytoplasmically. As shown in Figure 5, only 6.1% of DCin produce IL-12, but after 32 hrs. From co-culture, 30.8% of DC/Apo-Nec cells was induced to produce IL-12. On the other hand, 81.6% of the DCin contained cytokines in the cytoplasm, and they were not modified after phagocytosis. Double positive cells producing IL-10 e IL-12 were 27.8% at 24 hours (see Figure 5).

The DC/Apo-Nec composition of the invention was safe, and well tolerated by the patients.

The DC/Apo-Nec composition of the invention induced cell responses in patients, since the DTH reaction using Apo-Nec cells as immunogens increased in all patients after the second application, compared to base values.

85% of patients (stage IIc, and III) treated with the DC/Apo-Nec composition of the invention are free of disease after an average follow-up of 41.5 months, when treated after surgery (see figure 2). The DC/Apo-Nec composition of the invention is useful per se for the treatment of patients with melanoma, and is also useful as adjuvant after radical treatments, since it stimulates an immune response in the patient, where the immune system deletes all residual tumor cells, protecting the patient against possible recurrences. More specifically, the DC/Apo-Nec composition of the invention is useful for treating patients in stages IIB, IIC and III, who contain less tumor mass, and it is useful as adjuvant after radical therapies for stage IV patients.

It is evident for a skilled in the art that the DC/Apo-Nec composition of the invention may be used in treating human melanoma; it may also be used as adjuvant

31

together with other treatments, and as immune system stimulant, for example depending on the stage of the patient and the stage of the treatment.

Importantly, it must be pointed out that the combination of Apo-Nec cells of the invention induces maturity of autologous DC cells. The mixture or combination of Apo-Nec cells of the invention is a good source of melanoma antigens to charge dendritic cells. Note that dendritic cells only mature by contacting, and phagocytosing the combination of Apo-Nec cells of the invention, without adding an extra stimulus such as, for example Interleukine 1, Tumor Necrosis Factor α , CD40 ligand, or Prostaglandin E, which are commonly used as a maturation cocktail. DCs phagocytosing the Apo-Nec cells of the invention increase migration *in vitro* in response to chemokine MIP-3 β , and intracellular production of IL-12. The DC/Apo-Nec cells of the invention are capable of presenting crossed native tumor antigens to specific CTL antigens.

As mentioned above, phagocytosis of Apo-Nec cells by DCs of each patient induced maturity of such DC.

On the other hand, the cell lines of the invention were analyzed for their clonogenic ability. MEL-XY3 cell line colonies of the invention in soft agar present a heterogeneous morphology, with low adhesion between cells. A low proportion of melanotic colonies is observed. MEL-XY1 cell line colonies of the invention in soft agar present a compact morphology, with high adhesion between the comprised cells. Melanotic colonies are seldom observed.

As a way of characterizing colonies, the melanoma antigen expression levels were compared, normalized to the expression of β -actin in the cell lines of the invention,

35

and in such cell line colonies in soft agar. Clone characterization results are found in Table 4, and figure 6.

Table 4
Comparative study of antigen expression between cell lines of the invention, and clonogenic lines of the invention.

Melanoma differentiation antigens	Cell lines			
	MEL-XY3 line	MEL-XY3 colonies	MEL-XY1 line	MEL-XY1 colonies
MART1	+++	+	+	+
MAGE1	+	ND	+	ND
NYESO-1	++++	+	+	+
GP100	+	++	+	+
TYR	+	ND	+	ND
TRP2	+	+	+	+
B-ACTIN	+	+	+	+

ND: non-determined

* Data not yet normalized

As may be observed, within the population, and each cell line of the invention a sub-population of de clonogenic cells exists, and these clonogenic cells are also included in the scope of the present invention. The presence of clonogenic cells may provide the patient with typical antigens of undifferentiated cells, also called stem cells.

The heterogeneity of melanoma tumors is high, therefore for immuno-therapy it is fundamental to use complex antigen mixtures provided by the mixture, or combination of cell lines and their sub-populations. As an example, figure 7 shows a primary melanoma biopsy

36

evidencing the heterogeneity of such tumors compared to the expression of melanocytic differentiation antigens.

When patients were treated with the Apo-Nec composition of the invention together with BCG as adjuvant, and GM-CSF as immuno-modulator according to the scheme disclosed below in the examples, it was observed that 75 % of patients (stages IIC and III) were free of disease with a maximum follow-up of 51 months (see Figure 8), and toxicity was low, and only of degree 1.

Exemplary results from one selected protocol patient are shown. Patient #200 is female, Caucasian, 67 years old, appeared in November 2003. In June 2002, she was subjected to surgery on an increased dorsal nevus. Histology disclosed a cutaneous melanoma, Clark's level IV, Breslow's level 5.7 mm. In August 2002, some satellitoses were detected, which were excised. Patient was administrated Apo-Nec + BCG + GM-CSF, receiving 600 µg GM-CSF (per composition) and finished treatment with little toxicity. At the last clinical examination, a suspected node was detected on the back, which was excised, and the microscopic image is shown in Figure 9. Intensive lymphoid infiltration is observed, with viable tumor areas remaining, but also intensive tumor tissue necroses, and the presence of macrophages charged with melanin.

As an example, the results in a patient treated with the Apo-Nec composition of the invention + BCG + IFN- α are also shown. Patient #300 is male, 17 years old, who appeared with left inguinal adenopathy. Two months later, another left inguinal excision was performed, where 4/11 nodes with melanoma metastases were obtained. He received treatment with interleukin-2 in low doses.

37

30

14 months after the second excision, recurrence was detected in left inguinal arch, and again a surgery was performed, where 5/7 nodes with melanoma metastases were isolated. The patient presented back pain. Computed axial tomography disclosed retroperitoneal adenopathies, and chemotherapy with Dartmouth scheme was performed. After finishing chemotherapy, he began treatment with Apo-Nec composition of the invention + BCG. 14 months after beginning treatment with the composition of the invention, a node was detected in the left inguinal area. He was subjected to surgery, and melanoma metastases were detected with large lymphoplasmacyte infiltration. The patient continued treatment with Apo-Nec composition + IFN- α . Figure 10 shows the remission of a left lung node. Currently, the patient is disease-free.

The present invention discloses melanoma cell lines, which in combination express most melanoma-associated antigens, compositions comprising such irradiated lines, and compositions comprising autologous DC generated ex vivo, which have phagocytosed a mixture of apoptotic/necrotic cells of the melanoma cell lines.

This invention is better illustrated according to the following examples, which must not be understood as a limitation imposed to its scope. On the contrary, it must be clearly understood that other embodiments, modifications, and equivalents may be referred, which after reading the present description, may be suggested to skilled in the art without leaving the spirit of the present invention and/or the scope of the attached claims.

Example 1: Obtaining, establishment, and maintenance of cell lines of the invention

38

Mel-XY1: Line Mel-XY1 was obtained from a male Caucasian patient, from a lung metastasis secondary to a primary melanoma on the back. The patient died two years later due to brain metastases.

Mel-XY2: The patient from whom the line originated was 44 years old, and was a Caucasian male who presented ulcerated melanoma on the back (Clark's level III). Two years later, he developed simultaneous axillary adenopathies, and lung metastases. The axillary adenopathies were excised, dissociated, and such cells gave rise to the cell line.

Mel-XY3: The patient was a Caucasian 43-year-old male, who had developed a primary arm melanoma. Two years later, axillary lymphatic node metastasis appeared. The patient received chemotherapy with DTIC, without apparent clinical response. The axillary metastases were excised, and the cells gave rise to cell line Mel-XY3.

Mel-XX4: It was obtained by surgery of an inguinal adenopathy in a white 33-year-old woman, where such adenopathy was diagnosed as melanoma metastasis. The primary tumor was unknown. Fifteen months later, the patient had a recurrence in the inguinal lymphatic node. The gross melanotic node was excised, cut into small pieces, the fat and connective tissue were removed, and was suspended in Dulbecco modified by Eagle's Medium (DMEM), mechanically separated by pressure on a nylon mesh, and the cell aggregates were treated enzymatically overnight at 37 °C.

The cells were re-suspended in melanoma culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Natocor, Cordoba, Argentina), sown in 25 cm² culture flasks, and incubated at 37 °C with humidity, and a 5% CO²-

39

32

95% atmosphere in air. After 24 hrs, the culture medium was removed in order to eliminate non-adhered cells.

The cell suspension was passed four times through anti-fibroblast micro-sphere columns (Miltenyi Biotec, Germany). The cells obtained were named Mel-XX4

Maintenance of the four cell lines of the invention (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, and Mel-XX4) was done through culture in melanoma medium DMEM: F12 nutritive mixture (1:1) supplemented with 2 mM glutamine, 20 nM sodium selenite, 100 µM ascorbic acid, 0.3 mg/ml galactose, 0.15 mg/ml sodium piruvate, and 5 µg/ml insulin), 100 IU/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin, in addition to 10% fetal bovine serum (FBS) (Natocor, Córdoba, Argentina) at a GMP laboratory of Centro de Investigaciones Oncológicas-FUCA.

Clones CTL (restricted HLA A*0201) specific for Melan A/MART-1 (M27: AAGIGILTV), and gp100 (G154: KTWGQYWQV) antigens were expanded in RPMI medium with 10% inactivated AB human serum, and antibiotics, in 14-days-cycles using 30 ng/ml antibody anti-CD3 (OKT-3, BD Biosciences), and series of 300 UI/ml IL-2 (Chiron BV, Amsterdam, Netherlands) every 3 days.

Example 2: Cell line characterization:

Growth kinetics in vitro:

10⁴ cells were cultured by well in 24-well plates (Corning). Every 2-3 days, the cells were treated with EDTA (0.02%), harvested, and counted. The population duplication time was esteemed from the growth curve slope during the exponential phase.

Clonogenicity

Anchoring-independent cell growth was determined by the soft agar method (Hamburger, and Slamon, Science 197:

250

461, 1977). $3-10 \times 10^3$ cells were cultured in the upper layer. The plates were incubated for 21 days, and then fed each day with 50 μ l culture medium. Colonies with over 36 cells were counted under the microscope.

Characterization of melanoma antigens by immuno-cytochemistry (ICC) and FACS

For the ICC evaluation, the exponentially growing cells were treated with EDTA, centrifuged, fixed with formaldehyde, embedded in paraffin, and cut into fine sections. Normal tissue samples from the patient were used as control.

Tissues and cells were assayed with monoclonal antibodies (Mabs) against keratins, vimentin, and gp100/HMB 45 (Biogenex), MART1/Melan-A (Dako), and with polyclonal antibodies anti-S100 (Biogenex).

Reactions were visualized with avidin-biotin complexes (Vectastain ABC). Endogenous peroxides were blocked with 0.6% H_2O_2 .

Indirect immunofluorescence reactions were carried out by re-suspending EDTA-treated cells. After blocking with normal goat serum diluted 10%, the cells were incubated with primary antibodies, washed, incubated with secondary antibodies (FITC anti-mouse goat immunoglobulin (Dako), washed, fixed in 1% para-formaldehyde, and analyzed by FACS (FACS Vantage SE, Becton-Dickinson, USA). Primary antibodies were murine anti-p53 Mabs (DO-7, BD Pharmingen), 3F8 anti-GD2, R24 anti-GD3. In the case of p53, the cells were permeatized. Human leukocyte antigens (HLA) Class I, and Class II were typified by PCR-SSP.

Melanoma associated antigen determination by RT-PCR:

Total RNAs was extracted with Trizol (Invitrogen). In order to initiate cADN synthesis, the appropriate primers were added to 1-3 µg RNA, and incubated with 200 U MMLV-RT enzyme (Promega), 25-40 U RNasin (Promega), and 250-500 µM dNTPs (Invitrogen) for 5 min at 70 °C, and then for 60 min at 42 °C. cDNA aliquots (2-10 µl) were amplified with Taq DNA polymerase (Invitrogen), using specific pairs or primers.

Specific primers are shown below:

Gp100

5'-GCTTGGTGTCTCAAGGCAACT-3' (SEQ ID N° 1)

5'-CTCCAGGTAAGTATGAGTGAC-3' (SEQ ID N° 2)

MART-1

5'-CAAGATGCCAAGAGAAGATGCTCACT-3' (SEQ ID N° 3)

5'-GCTTGCATTTTTCCTACACCATTCCA-3' (SEQ ID N° 4)

Tyrosinase

5'-TTGGCAGATTGTCTGTAGCC-3' (SEQ ID N° 5)

5'-AGGCATTGTGCATGCTGCTT-3' (SEQ ID N° 6)

5'-GTCTTTATGCAATGGAACGC-3' (SEQ ID N° 7)

5'-GCTATCCCAGTAAGTGGACT-3' (SEQ ID N° 8)

TRP-2

5'-GAGTGGTCCCTACATCCTACG-3' (SEQ ID N° 9)

5'-GCGTCCTGGTCCTAATAATGT-3' (SEQ ID N° 10)

MAGE-1

5'-GAGTCCTCAGGGAGCCTCC-3' (SEQ ID N° 11)

5'-TTGCCGAAGATCTCAGGAAA-3' (SEQ ID N° 12)

42

NY-ESO-1

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

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

MDR-1

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

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

MIA

5'-CATGCATGCGGTCCTATGCCCAAGCTG-3' (SEQ ID N° 17)

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

β -actin

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

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

Anti-sense primers are shown in the lower line.

For tyrosine detection, a 1/100 aliquot from the first PCR reaction with internal primers (nested PCR) was also amplified.

PCR products were analyzed in agarose gels, and stained with ethidium bromide; the size of the fragments was calculated by comparison with the run sown with 100 bp DNA PM markers (Promega).

Cytogenetic, and cytomolecular analysis:

Cells corresponding to the four lines of the invention were incubated for cytogenetic analysis in exponential growth colchicine (0.1 μ g/ml) at 37 °C for 8-16 hrs, collected with a Trypsine-EDTA solution, and processed according to standard protocols. The G-band technique was used. Chromosome identification was done according to International System for Human Cytogenic Nomenclature

(Mitelman, 1995 ISCN.: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, (ed. S Karger, Basel).

Example 3: Generation of dendritic cells (DC) from monocytes, characterization thereof, and charge with Apo-Nec cells

The dendritic cells were obtained from buffy-coats or leukopheresis products from healthy donors. Peripheral mononuclear cells (PBMCs) were purified with a Fycoll-Hypaque density gradient. PBMCs were suspended in fresh AIM-V™ serum-free medium (Invitrogen), and were left adhering in culture flasks (TPP, Germany). After 2 hrs at 37 °C, non-adherent cells were removed, and adhered monocytes were cultured for 5 days in AIM-V supplemented with 800 U/ml rhuGM-CSF and 50 ng/ml IL-4 (Peprotech, Mexico), thus obtaining DCin. Phenotype changes were analyzed by light microscope and FACS. To induce DCin controlled maturation 2 µg/ml LPS (*E. coli* J5 lipopolysaccharides, Sigma, St. Louis, CA), and finally cells were cultured for 48 hrs.

DC cell phenotype characterization was performed when cells were in immature state (DCin), and after apoptotic/necrotic cell (Apo-Nec cells) phagocytosis assays through staining of 5×10^5 cells with antibodies marked with fluorochromes against CD14, CD11c, CD1a, HLA class II, CD80, CD86, CD83, CD40, HLA class I, and CCR7 antigens (BD Biosciences, San Jose, CA), through FACS analysis (Becton Dickinson, San Jose, CA). Appropriate iso-type controls were rat IgG2a PE, and mouse IgG1 and IgG2a (BD Biosciences, San Jose, CA). The expression of CD83 in DCs phagocytosing Apo/Nec cells was also analyzed, employing non-marked monoclonal antibody anti-CD83 (IgG1), and the

appropriate iso-type as control; for developing, an anti-mouse IgG1-PerCP (BD Biosciences, San José, CA) was used.

DC endocytosis capacity was assessed by incubating 1×10^6 DCs with 1 mg/ml conjugated Dextran with FITC (Dx-FITC) (Sigma, St Louis, CA) for 30 min at 37 °C. After incubation, the cells were washed with PBS, and analyzed by FACS. Controls included DCs incubated with Dx-FITC for 30 min at 4 °C in order to inhibit the endocytosis process; on the other hand, basal incorporation basal was considered at time 0 of the assay. DX-FITC incorporation (endocytosis) was quantified by FACS.

Assessment of DC cell phagocytosis:

DCin cells were co-cultivated with Apo-Nec cells (prepared as shown above) in fresh AIM-V medium on different times. In some assays, DCs were stained red with PKH26, and the Apo-Nec cells were stained green with PKH67 (Sigma, St. Louis, CA). Analysis by FACS was performed after co-culture, and the percentage of DCs phagocytosing Apo-Nec cells was defined as the percentage of double positive cells. Appropriate controls were performed for each color. The control of non-specific bond of Apo-Nec cells with DCs was performed by incubating cells at 4 °C for the same periods of time.

DCs in vitro migration:

DCs in vitro migration was assayed before and after co-culture with Apo-Nec cells, using 48-well chemotaxis chamber (AP 48 Neuroprobe Inc., Gaithersburg, MD). 10 ng/ml de MIP-1 α , or MIP-3 β (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) diluted in RPMI were placed in the bottom compartment. Basal migration was assayed by placing RPMI in the lower chamber. DCs were sown in the upper chamber (3×10^4 CDs/well) in RPMI. A 5 μ m-pore poly-carbonate membrane was

45

placed between the upper and the lower chamber (Neuroprobe, Inc., Bethesda, MD). After 90 min at 37 °C, cells of the upper side of the membrane were removed, and cells migrating adhered to the lower side of the membrane were stained with Giemsa 10% diluted in neutral water. Membranes were air-dried, mounted on a slide with Canada balsam, and the migrating runs were counted using a microscope. Five fields per well were analyzed with 40X magnification, and 3 wells/condition were analyzed. Statistical analysis was performed by Student's Test.

Electronic microscopy:

The phagocytosis process was also studied by electronic microscopy. Co-culture samples were fixed with 2,5% glutaraldehyde in 0,1 M phosphate buffer, and the post-fixation staining with 1% osmium tetroxide was carried out, they were washed twice with distilled water, and counter-stained with 5% uranyl acetate for 2 hr. After washing, and dehydration, the samples were embedded in resin (Durkupan). Ultra-thin sections were obtained (70-90 nm), mounted on copper meshes, and counter-stained with Reynold's lead citrate. Meshes were analyzed in a Zeiss 109 transmission electronic microscope. Alternatively, in order to obtain figures of the complete cells, thin sections (0.5 µm) were obtained in a ultra-microtome (Reichert-Jung), stained with 0,4% toluidine blue, 0,1 M carbonate buffer, mounted on Durkupan, and analyzed with light microscope (1000x). Images were obtained with a Sony Cybershot Digital digital camera (5 megapixels), and processed with Adobe photoshop 6.0 program.

In vitro cross presentation assay, IFN-γ secretion:

98% CD14⁺ monocytes were purified from HLA A*0201 donors using anti-CD14 micro-spheres (Miltenyi Biotec,

4b

Germany), and differentiated to DCin cells by 5 days culture as described above. DCin cells were incubated with Apo-Nec cells for 6, 12, 24, and 48 hrs, and exposed overnight to specific CTL MelanA/MART-1, or gp100 clones in 1 ml AIMV medium. IFN- γ secretion to supernatant was determined in triplicate by the ELISA technique (OptEIA IFN- γ , Pharmingen BD Biosciences, San Diego, CA) according to the supplier's suggestions. A calibration curve was drawn for each experiment, and sample concentration was calculated using a log-log regression analysis, and using Cembal 2.2 software. Controls included: DCs plus 20 μ g/ml MART-1 or gp100 peptides, HLA A*0201⁺ viable melanoma cell lines expressing MART-1, and gp100 antigens (positive controls) or DCs cells cultivated with non-specific peptides, and HLA A*0201⁺ viable melanoma cell lines not expressing the appropriate antigens (negative controls).

Measurement of intracytoplasmic cytokines IL-10 e IL-12:

DCs marked with PKH26 (red) were co-cultured with Apo-Nec cells marked with PKH67 on different times (6, 12, 24, and 48 hrs). Accumulated cytokine measurement was done by the intracellular immunofluorescence technique, after blocking the output thereof with Brefeldin A (8 hrs) post-culture (Golgi Plug, BD Biosciences, San Jose CA). The cells were permeatized with 0,05% saponin, and stained with anti-IL10 (rat isotype IgG2a)-APC, and anti-IL12 sub-unit p40-p70 (mouse isotype IgG1)-PerCp (BD Biosciences, San Jose, CA). Double stained PKH26/PKH67 population was selected for studies by FACS, and cytokines were assessed for such population in a four color experiment. Co-culture at 4 °C was used as control.

Example 4: Preparation of compositions of the invention, and application schemes:

Apo-Nec composition:

Irradiation of cell lines:

The four cell lines of the invention (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3, and Mel-XX4) were irradiated with gamma radiation at 70Gy (Siemens, Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Argentina), subsequently the cells were frozen (50% DMEM, 40% human albumin, and 10% DMSO) in liquid nitrogen until use.

The day of cell application, they were thawed, washed, and prepared in composition doses containing between $5 - 10 \times 10^6$ cells of each of the isolated cell lines of the invention, or combinations thereof, re-suspending them in DMEM medium.

300 ul were injected intradermally.

DC/Apo-Nec composition:

Preparation of apoptotic/necrotic tumor cells:

Irradiated and frozen cells (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 and Mel-XX4) as described above were thawed and sown in melanoma medium plus 10% fetal bovine serum until complete apoptotic process. After 72 hrs culture, the cells were detached from the bottom of the flasks, washed, counted, and re-suspended in fresh AIMV™ medium free of serum (therapeutic grade, GIBCO, Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y). Apoptosis and necrosis was assayed by the Annexin-V FITC link technique, and incorporation of propidium iodide (IP) (Annexin-V apoptosis detection kit, BD Biosciences, San Jose, CA), and analyzed by FACS. Clonogenic assays in soft agar were performed in sextuplicate (1.5×10^4 cells/well) in order to analyze

proliferation capability in irradiated cells, compared to non-irradiated control cells.

5, 10, 15, o 20 $\times 10^6$ DCs, according to each patient's dose, were co-cultured with Apo-Nec cells in AIMV medium for 48 hrs at 37 °C. On application day, co-cultivated cells were centrifuged at 1200 rpm for 5 min, re-suspended in DMEM medium (300 μ l), and injected intra-dermically in one of the four extremities with intact drainage of lymphatic nodes.

Quality controls, and sterility assays were done for all composition preparations.

Example 5: Patient study design, and selection criteria:

Studies in patients were carried out to assess toxicity, viability, and immune response to treatment. The studies were approved by the Institutional Revision Council of Instituto Alexander Fleming, and by an ethics commission. Viability criteria were (a) cutaneous melanoma, confirmed by histology in stages IIB, IIC, III, or IV (AJCC); (b) patients with minimal or non-detectable disease (ND) after surgery, assessed Computed Axial Tomography, and lactate dehydrogenase (LDH) enzyme values. Patients with unknown primary melanoma could be included in the study; (c) age between 15, and 60 years; (d) life expectation > 6 months; (e) yield (ECOG) 0, o 1; (f) patients of stage III preciously treated with IFN- α who had finished or interrupted treatment due to disease progression, toxicity, or any other clinical cause, or patients who had not initiated treatment with IFN- α six months prior to the surgery; (g) adequate venous access for the leukopheresis procedure, (h) laboratory election criteria were:

49

42

hemoglobin > 10 gr%; white blood cell count > 4800/mm³, platelets > 150,000/mm³; total and direct bilirubin, oxalacetic transaminases, glutamic-pyruvic transaminase < 1.5 times normal highest value; LDH ≤ 450 mU/ml; i) non-pregnancy, with serum β-HCG determined one week before each application in pre-menopausal women; (i) creatinine < 1.4 mg %; (k) no chemotherapeutic, radiotherapy treatment, or biological treatment for the previous month; (k) no medication with corticosteroids, or non-steroid anti-inflammatory medication (AINEs); (l) no active brain metastasis; (m) normal ECG; (n) all patients had to sign informed consent.

Patient assessment and treatment scheme:

Patient basic assessment was done within 35 days before the first application. Clinical evaluation included complete clinical history, physical exam, electrocardiogram (ECG), Computed Axial Tomography (thorax, abdomen, pelvis, and brain), determination of tumor stage, tumor size, and documentation of sites of disease, chemical blood test, and hematology. The selected patients were subjected to leukopheresis in order to obtain PBMC, to generate DCs.

Patients received 4 applications of DC/Apo-Nec with 2 weeks intervals. Inoculation was done intradermally (300 μl), and with each dose DTH test were assayed consisting in inoculation in the forearm of between 5, and 20 × 10⁶ DC/Apo-Nec cells without adjuvant. Vital signs and DTH skin reactions were analyzed at 2, 24, and 48 hrs post-application. Patient status was investigated on day 70 by abdominal ultrasonography, and thorax X-rays, and the protocol was ended on day 75 with a clinical exam.

For the application of Apo/Nec cells of the invention, patients were injected intradermally (id) in one

extremity with intact lymphatic nodes. Twenty (20) patients received a 400 µg rhGM-CSF dose (100 µg per day, four days). On the day of application, 0,1 ml hGM-CSF were mixed with Apo-Nec (16×10^6 irradiated cells in 0,3 ml), and BCG (1×10^6 colony forming units) in 0,05 ml. During the following 3 days, 0.1 ml rhGM-CSF were injected i.d. on the application site. Each patient received 4 applications separated by 3 weeks, then 1 composition every two months for a year, 1 composition every three months the second year, and continued afterwards with 1 composition every 6 months.

Statistical analysis:

All adverse results were classified according to Common Toxicity Criteria for National Cancer Institute (NCI).

The assessable population was defined as all patients receiving the four applications. Since most patient data were not normally distributed, the total data were analyzed using the Wilcoxon's Rank Sum test. DTH values of the different groups receiving different amount of DCs/Apo-Nec were compared between each group with one variable ANOVA, and the Dunnett multiple comparison test. A $P < 0.05$ value was considered significant.

Methods to evaluate immune response of treated patients:

To evaluate patient immune response, serum was obtained on day 7 before application (pre-serum), and day 15 after finishing treatment (post-serum), and the samples were stored at -80°C . PBMC cells were purified by a Ficoll-Hypaque gradient, and subsequent centrifugation form leukopheresis (pre-application), or from 100 ml blood

51

obtained 15 days after the last dose (post-application), PBMC were frozen in 50% DMEM, 40% human albumin, and 10% DMSO until use in immunologic assays. HLA-A*0201 HLA typification was determined after incubating patient samples with mouse anti-HLA-A*0201 monoclonal antibodies conjugated with FITC (BD-Pharmingen, San Jose, CA).

DTH Reaction:

On each application day, a DTH test was done in the forearm with 2×10^6 Apo-Nec cells, and the reaction was evaluated at 2, 24, and 48 hrs post-application. DTH intensity value was established as follows: 0: erythema < 0.5 cm; 1: macular erythema 0.5-1.0 cm; (2) macular erythema 1.0-2.0 cm; 3: macular erythema > 2.0 cm, or papular erythema < 1.5 cm; 4: papular erythema > 1.5 cm. Store DTH corresponds to the sum of all individual DTH intensities/4.

Proliferation assay:

Pre- and post-composition PBMC were obtained by a Ficoll-Hypaque density gradient, and stored frozen in liquid nitrogen until use. The cells were thawed for the assay, and incubated in AIM-V medium (Gibco, Grand Island, NY) for 1 hr at 37 °C. 5×10^5 cells were sown in 96-well plates in the presence or in absence of phyto-hemoagglutinin (PHA) (5 µg/ml) (Gibco, Grand Island, NY), and incubated at 37 °C for 72 hrs. During the last 16 hrs, the cells were pulsed with (^3H)dThd (Amersham, 1 µCi/well), and after cell lysis, the DNA incorporated radioactivity was measured (Cell Harvester, Nunc, Rochester, NY), with a liquid scintillation counter.

Determination of cytokines:

Patient serum IL-10 and IL-12 concentrations were determined before the application (pre-application serum), and two weeks after the fourth application (post-

52

application serum). Sera were frozen at -80 °C until ELISA assay (OptEIA IL-10 and IL-12, BD Biosciences, San Diego, CA) was performed. A calibration curve was drawn for each assay, and the sample concentration was calculated by log-log linear regression analysis using Cembal 2.2 software.

Measurement of IFN- γ by ELISpot technique:

CD14⁺ cells were purified as stimulators from PBMC from HLA-A2 positive patients using micro-spheres covered by anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Paris, France), cultivated 5 days in synthetic SYN-H medium (AbCys, Paris, France) with 100 ng/ml GM-CSF, and 20 ng/ml IL-4, and matured with 10 μ g/ml LPS for additional 48 hrs. Mature DCs were pulsed for 1 hr at 37 °C with 10 μ g/ml of the appropriate peptide diluted in SYH-H medium, washed, and mixed with PBMC until reaching an relation E/T patients of 10:1, using a total of 10⁵ CD8⁺ lymphocyte cells/well.

96-well plates were covered with nitrocellulose (MAIPS 450; Millipore, Bedford, MA) overnight at 4 °C with 10 μ g/ml human anti-IFN- γ mAb (Mabtech, Nacka, Sweden) in carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6, washed, and blocked with IMDM medium + 10% AB human serum (Biowest, Nuaille, France) for 1 hr at 37 °C. Effector cells were sown in 100 μ L medium, and target cells were added until reaching an E/T relation of 10:1, at a total of 200 μ L/well. After 24 hrs incubation, the wells were washed 5 times with 0.1% Tween-20 in PBS. Plates were incubated 2 hrs at room temperature with 1 μ g/ml human biotinilated anti-IFN- γ mouse mAb (Mabtech) in PBS/HSA (0.4 g/L). After several washings with 0.1% Tween-20 in PBS, 1:1000 alkaline phosphatase-streptavidine (Mabtech) in PBS/HSA was added, and incubated for 1 hr at room temperature. Then the plates

53

46

were washed, and the 5-bromine-4-chlorine-3-indol phosphate/nitro-tetrazolium blue substrate was added for 30 minutes at room temperature (Mabtech). Development of color was quenched by washing the plates with water. After drying, the CD8+ T cells secreting IFN- γ were counted, visualized by a color spot on the nitro-cellulose membrane, using the ELISpot automatic image system reader (AID, Strassberg, Germany).

Staining with HLA tetramers/peptides:

HLA-A0201 tetramers were used to identify clones of specific CD8+ T lymphocytes for MART-1 (AAGIGILTV), or gp-100 (KTWGQYWQV) conjugated to PE (phycoerythrin), or APC (allo-phycoerythrin) respectively. The staining procedure was done at 37 °C for 15 minutes, and immediately placed on ice. Then, the samples were incubated with anti-CD8 FITC (BD Biosciences, San Jose CA) at 4 °C for additional 40 minutes, and analyzed by FACS. Positive controls were done with specific CTL clones (restricted HLA A*0201) for MART-1 (M27: AAGIGILTV), and gp100 (G154: KTWGQYWQV) antigens expanded un 14 day-cycles in RPMI medium in the presence of anti-CD3 antibodies (OKT-3, BD Biosciences) at 30 ng/ml, and series of IL-2 (Chiron BV) a 300 UI/ml each 3 days, plus 10% inactivated human AB serum, and antibiotics. Negative controls were performed PBMC samples from healthy HLA-A0201 donors.

Determination of humoral response:

Viable cells comprising Apo-Nec cells were mixed in equal en proportions, blocked with 10% rabbit serum for 30 min, and incubated with pre- and post-application serum, diluted 1/10 per 1 hr at 4 °C. Then they were washed, and the cells were incubated with a human anti-immunoglobulin antibody (IgG+A+M) obtained in rabbits (DakoCytomation,

Glostrup, DK) for 1 hr at 4 °C. The cells were washed, fixed in para-formaldehyde at 1%, and were analyzed by FACS. Alternatively, cells were first permeatized with saponin at 0,05% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) in PBS in the blocking stage, and 0,05% saponin/PBS was added in each after the reaction stage. Normal serum was used as first antibody control.

Protein extracts were prepared from Apo-Nec cell lines of the invention. Cell pellets were frozen at -80 °C, thawed, and treated for 20 min at 4 °C with lysis buffer (50 mM Tris-ClH, pH 7.5, 1% NP₄₀, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, and 1 mM PMSF). The suspension was homogenized with a Polytron (Brinkmann Instruments, USA), and was centrifuged for 40 min at 10,000 g. Supernatant was stored as aliquots frozen at -20 °C. Protein concentration was measured according to the Lowry method. IIB-BR-G human breast carcinoma cell line protein extracts were likewise prepared.

Protein extracts (50 µg) were run in a SDS-PAGE 3%-12% gradient, and transferred to a nitro-cellulose membrane (0.45 µm pore, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). After blocking with 3% skimmed bovine milk (Moliko, Argentina), they were incubated overnight at 4 °C with patient serum diluted 1/10. After several washings, the membranes were incubated with human anti-IgG + A + M antibodies obtained in goat, conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Zymed, San Francisco, CA), and developed with 4-Cl-naphthol plus H₂O₂.

Histopathologic analysis of melanoma metastases:

Paraffin-embedded biopsies were used to analyze lymphoid cells, and DCs cell infiltration. Between three and five sections were stained with hematoxylin/eosin, or

55

immuno-stained with anti-CD4 (1F6 clon), anti-CD8 (C8E - 144b clon), anti-CD20 (L26 clon), anti-CD1a (010 clon) (DakoCytomation, Glostrup, DK), and anti-CD57 (NK1 clon, Zymed, San Francisco, CA) antibodies, and developed with ABC reactant, and diamino-benzidine (DAB), or Novared as substrate (Vectastain, Vector, Burlingame, CA). Reactions were conducted as control by omitting primary antibodies. Sections were analyzed with an Olympus BX40 microscope.

56

SEQUENCE LIST

<110> CONICET
Mordoh, José
<120> Cell lines, compositions comprising them for the treatment de melanomas, procedures to prepare the compositions, and treatment methods
<130> CONICET
<160> 20
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> GP100 5'-3' PRIMER
<400> 1
gcttggtgtc tcaaggcaac t 21

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> anti-sense Gp100 primer
<400> 2
ctccaggtaa gtagtgatga c 21

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> MART-1 5'-3' direction primer
<400> 3
caagatgccca agagaagatg ctact 26

<210> 4
<211> 26

57

50

<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> MART-1 anti-sense primer
<400> 4
gcttgcatTT ttctacacc attcca 26

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 5'-3' sense tyrosinase primer
<400> 5
ttggcagatt gtctgtagcc 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> anti-sense tyrosinase primer
<400> 6
aggcattgtg catgctgctt 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 5'-3' sense internal tyrosinase primer (nested DNA)
<400> 7
gtctttatgc aatggaacgc 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

58

51

<220>
<223> anti-sense internal tyrosinase primer (nested PCR)
<400> 8
gctatcccag taagtggact 20

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 5'-3' sense TRP-2 primer
<400> 9
gagtggctcc tacatcctac g 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> antisense TRP-2 primer
<400> 10
gcgtcctggt cctaataatg t 21

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 5'-3' sense MAGE-1 primer
<400> 11
gagtcctcag ggagcctcc 19

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> anti-sense MAGE-1 primer

59

<400> 12
tgccgaaga ttcaggaaa 20

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 5'-3' sense NY-ESO-1 primer
<400> 13
agccgcctgc ttgagttcta cctc 24

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> antisense NY-ESO-1 primer
<400> 14
agggaaagct gctggagaca g 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> 5'-3' sense MDR-1 primer
<400> 15
tccaagaagc cctggacaaa g 21

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> antisense MDR-1 primer

60

<400> 16	
ttgatgatgt ctctcactct gtcc	25
<210> 17	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 5'-3' sense MIA primer	
<400> 17	
catgcatgcg gtcctatgcc caagctg	27
<210> 18	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> anti-sense MIA primer	
<400> 18	
gataagcttt cactggcagt agaaatc	27
<210> 19	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> 5'-3' sense beta-actin primer	
<400> 19	
atgttgaga ccttcaacac ccc	23
<210> 20	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial	
<220>	
<223> anti-sense beta-actin primer	
<400> 20	

81

WO 2008/126039

PCT/IB2008/051385

54

gccatctctt gctcgaagtc cag

23

82

CLAIMS

1. A human melanoma cell line for the treatment of malignant diseases characterized by such cell line being selected from the group comprising (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), and (e) sub-populations thereof.

2. The cell line of claim 1, characterized in that it is the cell line Mel-XY1 deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830.

3. The cell line of claim 1, characterized in that it is the cell line Mel-XY2 deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831.

4. The cell line of claim 1, characterized in that it is the cell line Mel-XY3 deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832.

5. The cell line of claim 1, characterized in that it is the cell line Mel-XX4 deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829.

43

6. The cell of any one of claims 1 a 5, characterized by such cell line has been irradiated, and is incapable of proliferating.

7. The cell of any one of claims 6, characterized by such cell line comprising an apoptotic phenotype cell population.

8. The cell line of claim 7, characterized in that the apoptotic cell population comprises an amount from 35%, to 60% of such cells.

9. The cell of any one of claims 6, characterized by such cell line comprising a necrotic phenotype cell population.

10. The cell line of claim 9, characterized in that the necrotic cell population comprises an amount from 10% to 25% of such cells.

11. The cell line of claim 1, characterized in that the sub-population comprises human melanoma cells capable of forming colonies in soft agar.

12. A composition for the treatment of melanoma, characterized by comprising at least one allogenic melanoma cell line selected from the group comprising (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), and combinations thereof, where such cell lines are incapable of proliferating.

67

57

13. The composition of claim 12, characterized by additionally comprising excipients, adjuvants, and immuno-modificadores.

14. The composition of claim 13, characterized in that the adjuvant is BCG.

15. The composition of claim 13, characterized in that the immuno-modifier is selected from the group comprising GM-CSF, G-CSF, IFN α , cyclophosphamide, and mixtures thereof.

16. The composition of claim 12, characterized in that such cell line has been irradiated.

17. The composition of claim 12, characterized in that such cell line comprises an apoptotic phenotype cell population.

18. The composition of claim 17, characterized in that the apoptotic cell population comprises an amount from 35% to 60% of such cells.

19. The composition of claim 12, characterized in that such cell line comprises a necrotic phenotype cell population.

20. The composition of claim 19, characterized in that the necrotic cells population comprises an amount from 10% to 25% of such cells.

21. The composition of claim 12, characterized in that it comprises at least one combination of the allogenic melanoma cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), and (d) Mel-XX4

65

58

(deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), where such cell lines have been irradiated, and are incapable of proliferating.

22. The composition of claim 21, characterized in that additionally it comprises excipients, adjuvants, and immuno-modifiers.

23. The composition of claim 12, characterized in that it comprises at least one combination of the allogenic melanoma cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), and (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), where such cell lines have been irradiated and are incapable of proliferating.

24. The composition of claim 23, characterized in that it additionally comprises excipients, adjuvants, and immuno-modifiers.

25. A composition for adjuvant treatment of melanoma, characterized by comprising at least an allogenic melanoma cell line selected from the group comprising (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German

50

59

Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), and combinations thereof.

26. The composition of claim 25, characterized in that such cell line has been irradiated, and is incapable of proliferating.

27. The composition of claim 25, characterized in that such cell line comprises an apoptotic phenotype cell population.

28. The composition of claim 27, characterized in that the apoptotic cell population comprises an amount from 35% to 60% of such cells.

29. The composition of claim 25, characterized in that such cell line comprises a necrotic phenotype cell population.

30. The composition of claim 29, characterized in that the necrotic cell population is found in an amount from 10% to 25%.

31. The composition of claim 25, characterized by additionally comprising excipients, adjuvants, and immuno-modifiers.

32. The composition of claim 31, characterized in that the adjuvant is BCG.

33. The composition of claim 31, characterized in that the immuno-modifier is selected from the group comprising GM-CSF, G-CSF, IFN α , cyclophosphamide, and mixtures thereof.

34. The composition of claim 25, characterized by comprising at least one mixture of the allogenic melanoma cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access

67

number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), and (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), where such cell lines have been irradiated, and are incapable of proliferating.

35. The composition of claim 34, characterized by additionally comprising excipients, adjuvants, and immuno-modifiers.

36. The composition of claim 25, characterized by comprising at least one mixture of the allogenic melanoma cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), and (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), where such cell lines have been irradiated, and are incapable of proliferating.

37. The composition of claim 36, characterized by additionally comprising excipients, adjuvants, and immuno-modifiers.

38. The composition of claim 25, characterized by being employed as adjuvant treatment in combination with treatments selected from the group comprised by surgery, radiotherapy, chemotherapy, bio-chemotherapy, and immunotherapy.

39. A composition for the treatment of human melanomas characterized by comprising mature autologous dendritic cells, autologous dendritic cells charged with cells from at least one heterologous human melanoma cell line, apoptotic cells from such at least one heterologous

64

human melanoma cell line, and necrotic cells from such at least one heterologous human melanoma cell line.

40. The composition of claim 39, characterized in that the human melanoma cell line is selected from the group comprising (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), (e) subpopulations thereof and combinations from (a) to (d).

41. The composition of claim 39, characterized in that the mature dendritic cells have CD14⁻, CD11c⁺, CD1a⁺, and CD83⁺ phenotype.

42. The composition of claim 39, characterized by additionally comprising excipients, adjuvants, and immuno-modifiers.

43. A composition for adjuvant treatment of human melanoma, characterized by comprising mature dendritic cells, dendritic cells charged with cells from least one heterologous human melanoma cell line, apoptotic cells from one heterologous human melanoma cell line, and necrotic cells from one heterologous human melanoma cell line.

44. The composition of claim 43, characterized in that the cell line is selected from the group comprising (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access

number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), (e) subpopulations thereof and combinations from (a) to (d).

45. The composition of claim 43, characterized in that the mature dendritic cells have CD14⁻, CD11c⁺, CD1a⁺ and CD83⁺ phenotype.

46. The composition of claim 43, characterized by additionally comprising excipients, adjuvants, and immunomodifiers.

47. The composition of claim 43 characterized by such composition employed as adjuvant treatment in combination with treatments selected from surgery, radiotherapy, chemotherapy, bio-chemotherapy, and immunotherapy.

48. A procedure for preparation of the composition according to any one of claims 12, 21, 23, 25, 34, or 36 characterized by the stages of:

- a) thawing and culturing cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), and (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832);
- b) mixture such three cell lines;
- c) irradiate such three cell lines;
- d) add adjuvants, and excipients to the cell line mixture.

70

63

49. The procedure of claim 48, characterized in that the cells are irradiated to a value from 50 to 100 Gy.

50. The procedure of claim 48, characterized in that the adjuvant is BCG.

51. The procedure of claim 48, characterized in that in stage d) an immuno-modifier is additionally added.

52. The procedure of claim 51, characterized in that the immuno-modifier is selected from the group comprising GM-CSF, G-CSF, IFN α , ciclophosphamide, and mixtures thereof.

53. The procedure of claim 48, characterized in that stage a) additionally comprises line Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829)

54. An procedure for preparing the composition according to any one of claims 39, or 43, characterized by comprising the stages of:

- a) thawing and culturing cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), and Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829);
- b) mixture such cell lines;
- c) irradiate such cell lines;
- d) obtain autologous dendritic cells; and
- e) co-culture for certain time the autologous dendritic cells with the irradiated cell of stage c).

55. The procedure of claim 54, characterized in that the cells are irradiated at a value from 50 to 100 Gy.

56. The procedure of claim 54, characterized in that co-culture is conducted at a temperature from 35 to 39 °C, and for a period of time from 6 to 72 hours.

57. The procedure of claim 54, characterized in that in stage e) the relation between autologous dendritic cells, and cell lines is from 1:1 to 3:1.

58. The procedure of claim 54, characterized in that dendritic cells of stage e) comprise immature dendritic cells.

59. A method to induce an anti-tumor immune response in patients carrying a melanoma characterized in that it comprises administering to a patient in need thereof an effective amount of a combination of cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), and (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), where such cell lines are incapable of proliferating.

60. The treatment method of claim 59, characterized in that it is administered intradermally.

61. The treatment method of claim 59, characterized in that it is administered together with an adjuvant.

62. The treatment method of claim 61, characterized in that the adjuvant is BCG in an amount from 0.1 to 2×10^6 colony forming units per application dose.

72

65

63. The treatment method of claim 59, characterized in that it is administered together with an immuno-modulator.

64. The treatment method of claim 63, characterized in that the immuno-modulator is GM-CSF in an amount from 100 to 600 µg per application dose.

65. The treatment method of claim 59, characterized in that the effective amount of cells comprises between 5, and 50×10^6 of the cell combination.

66. Un method to induce an anti-tumor immune response in patients carrying a melanoma characterized by comprising the administration to a patient in need thereof an effective amount of a combination of cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), and (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), where such cell lines are incapable of proliferating.

67. The treatment method of claim 66, characterized in that it is administered intradermically.

68. The treatment method of claim 66, characterized in that it is administered together with an adjuvant.

69. The treatment method of claim 66, characterized in that the adjuvant is BCG in an amount from 0.1 to 2×10^6 colony forming units per application dose.

70. The treatment method of claim 66, characterized in that it is administered together with an immuno-modulator.

71. The treatment method of claim 66, characterized in that the immuno-modulator is GM-CSF in an amount from 100 to 600 µg per application dose.

72. The treatment method of claim 66, characterized in that the effective amount of cells comprises from 5 to 50×10^6 cell combination.

73. Un method to induce an anti-tumor immune response in patients carrying a melanoma characterized in that it comprises administering to a patient in need thereof an effective amount of a co-culture from 6 to 72 hours of autologous dendritic cells, and a combination of cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), and (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829), where such cell lines are incapable of proliferating.

74. The method of claim 73, characterized in that the autologous dendritic cells at the beginning of the co-culture are immature dendritic cells, and at the end of the co-culture are a mixture of mature autologous dendritic cells, and autologous dendritic cells charged with cell lines (a) Mel-XY1 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (deposited at German Collection

of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2832), and (d) Mel-XX4 (deposited at German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ under access number DSM ACC2829).

75. The method of claim 73, characterized in that at the end of the co-culture the cells of each cell line comprise a mixture of apoptotic cell populations, and necrotic cell populations.

76. The method of claim 73, characterized in that it is administered intradermally.

77. The method of claim 73, characterized in that the effective amount of cells from the co-culture comprise from 5 to 50 $\times 10^6$ total cells.

56

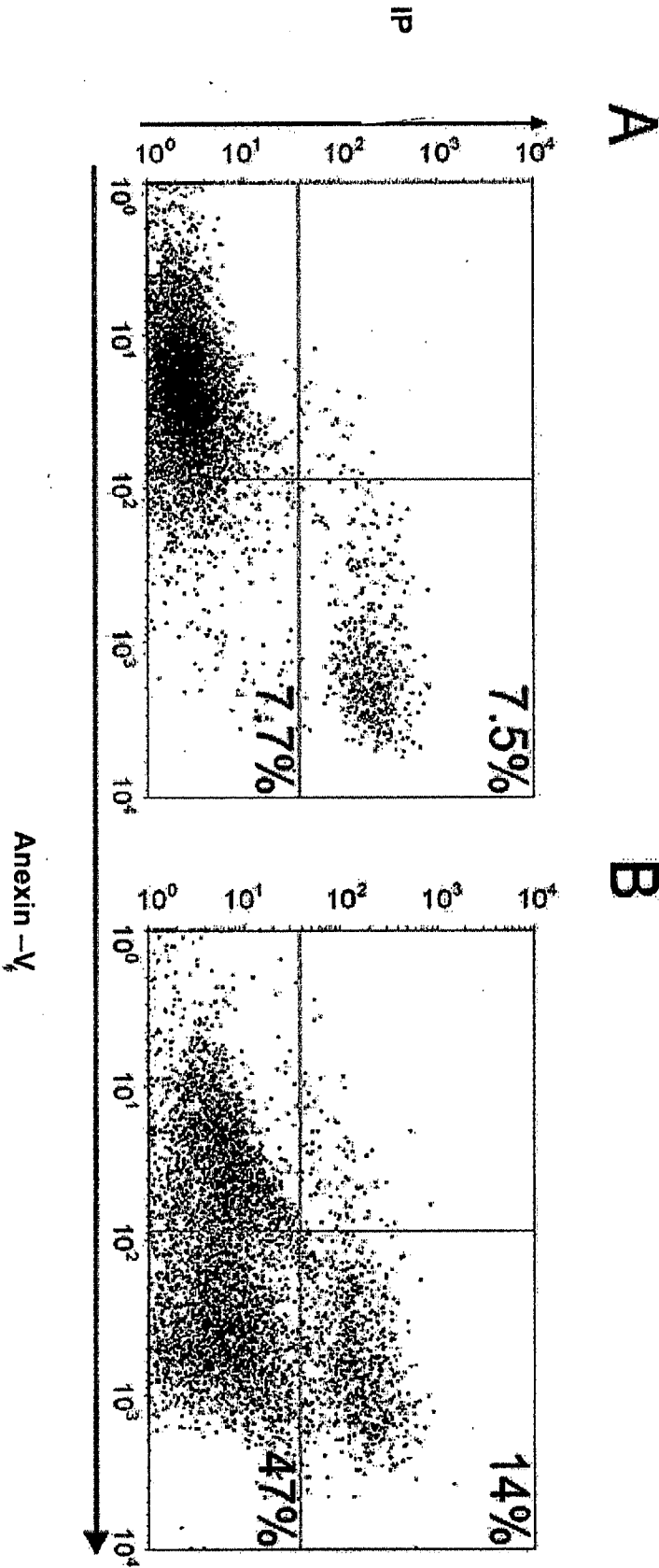


Fig. 1

76

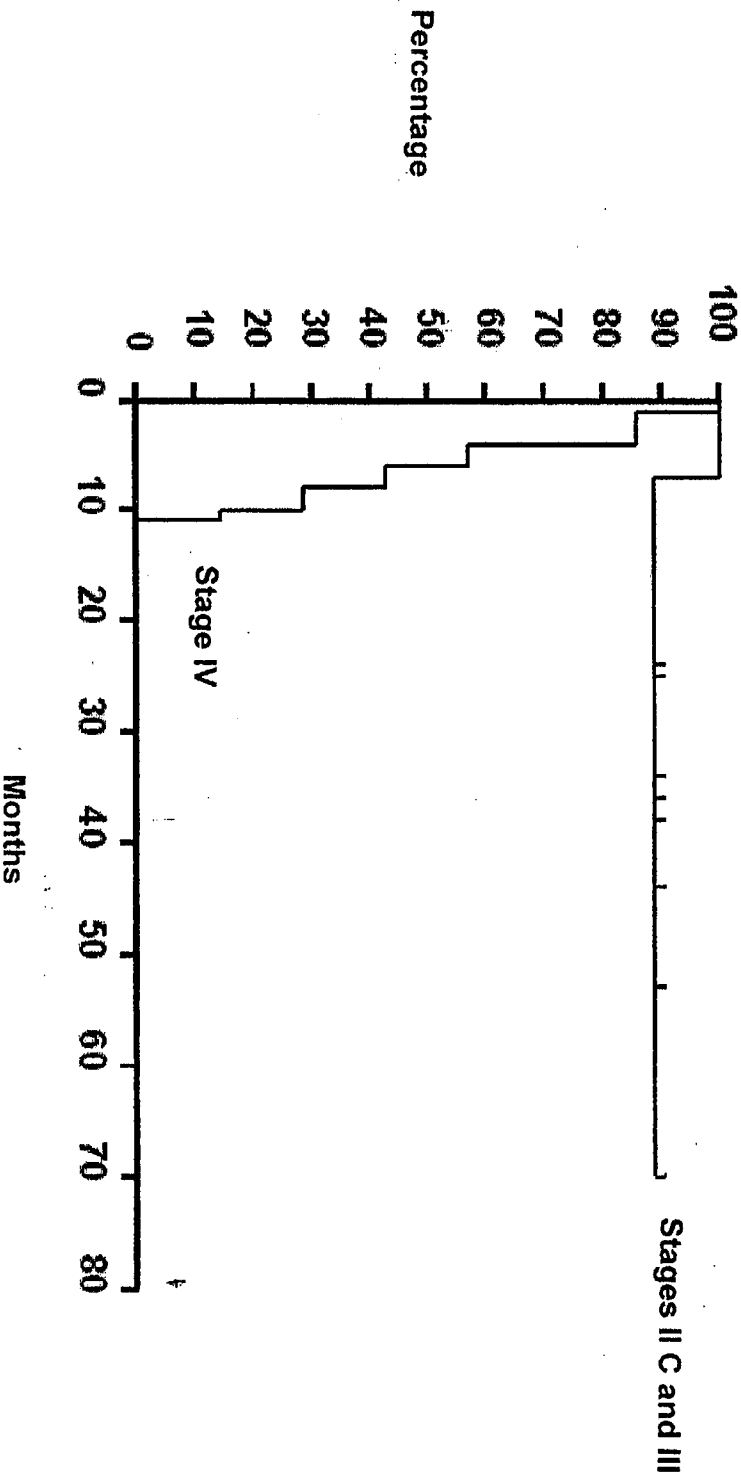


Fig. 2

77

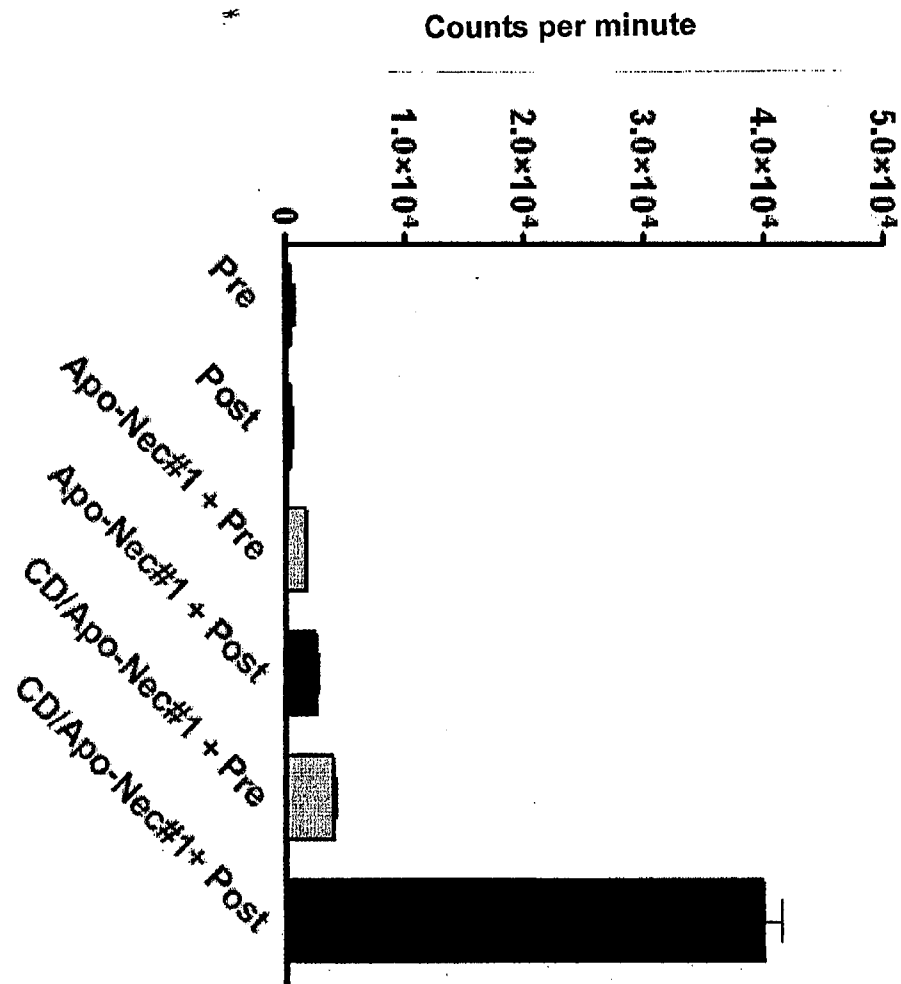


Fig. 3

28

A

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

B

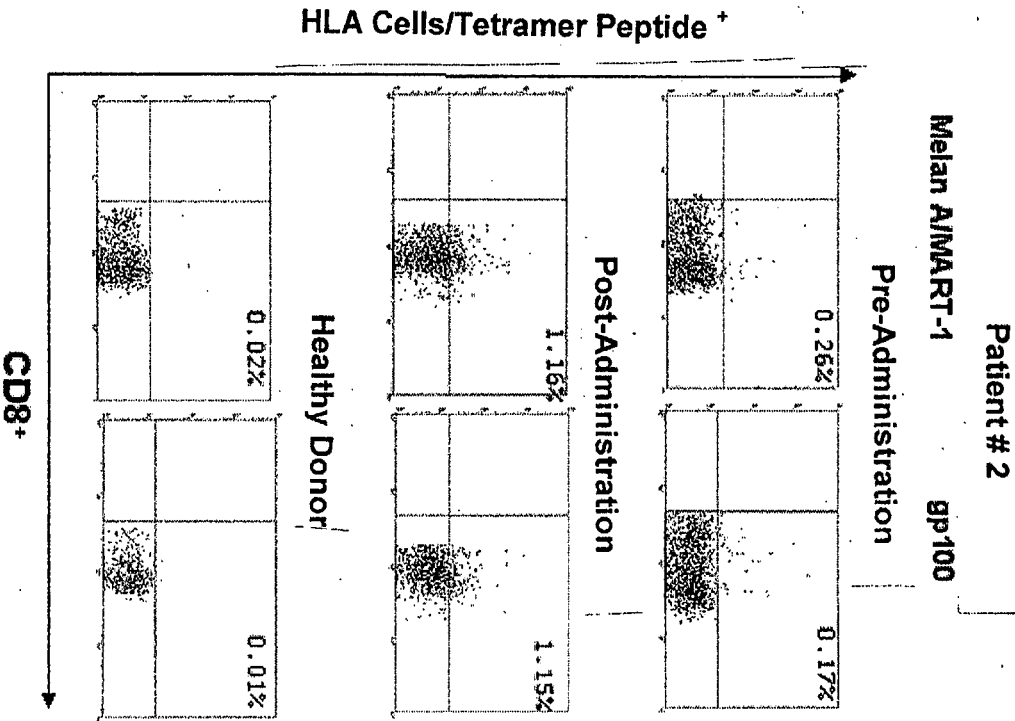
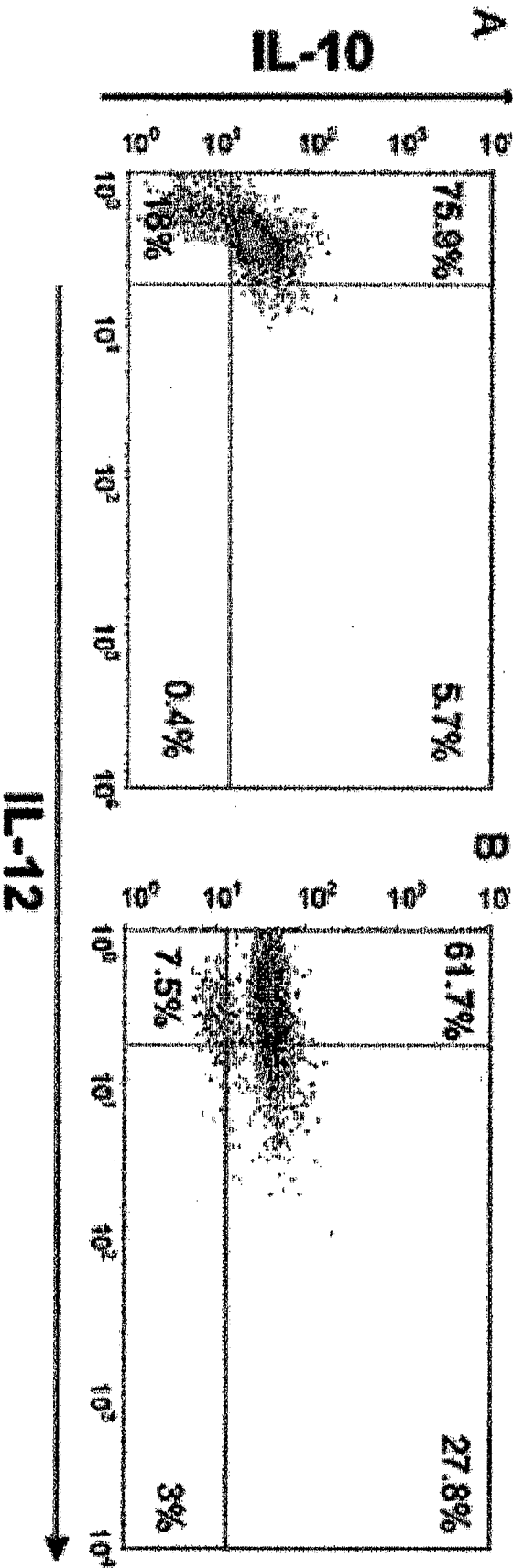


Fig. 4

Handwritten signature or mark.

Fig. 5



AO

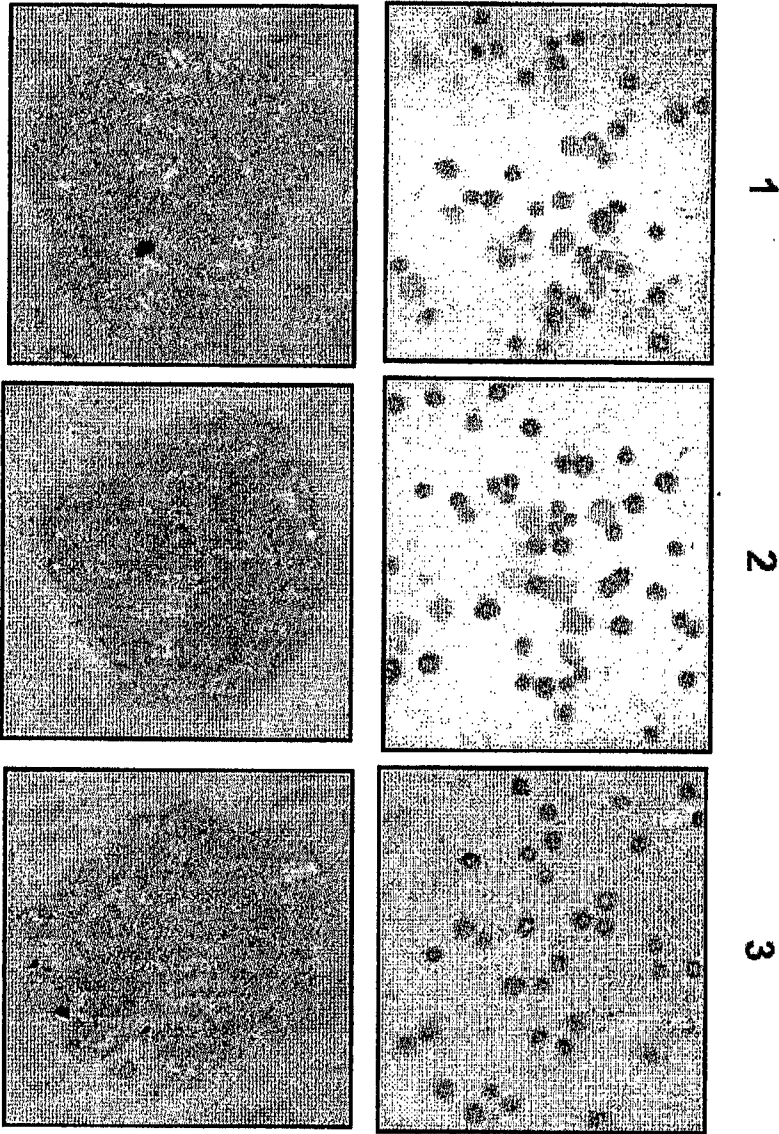
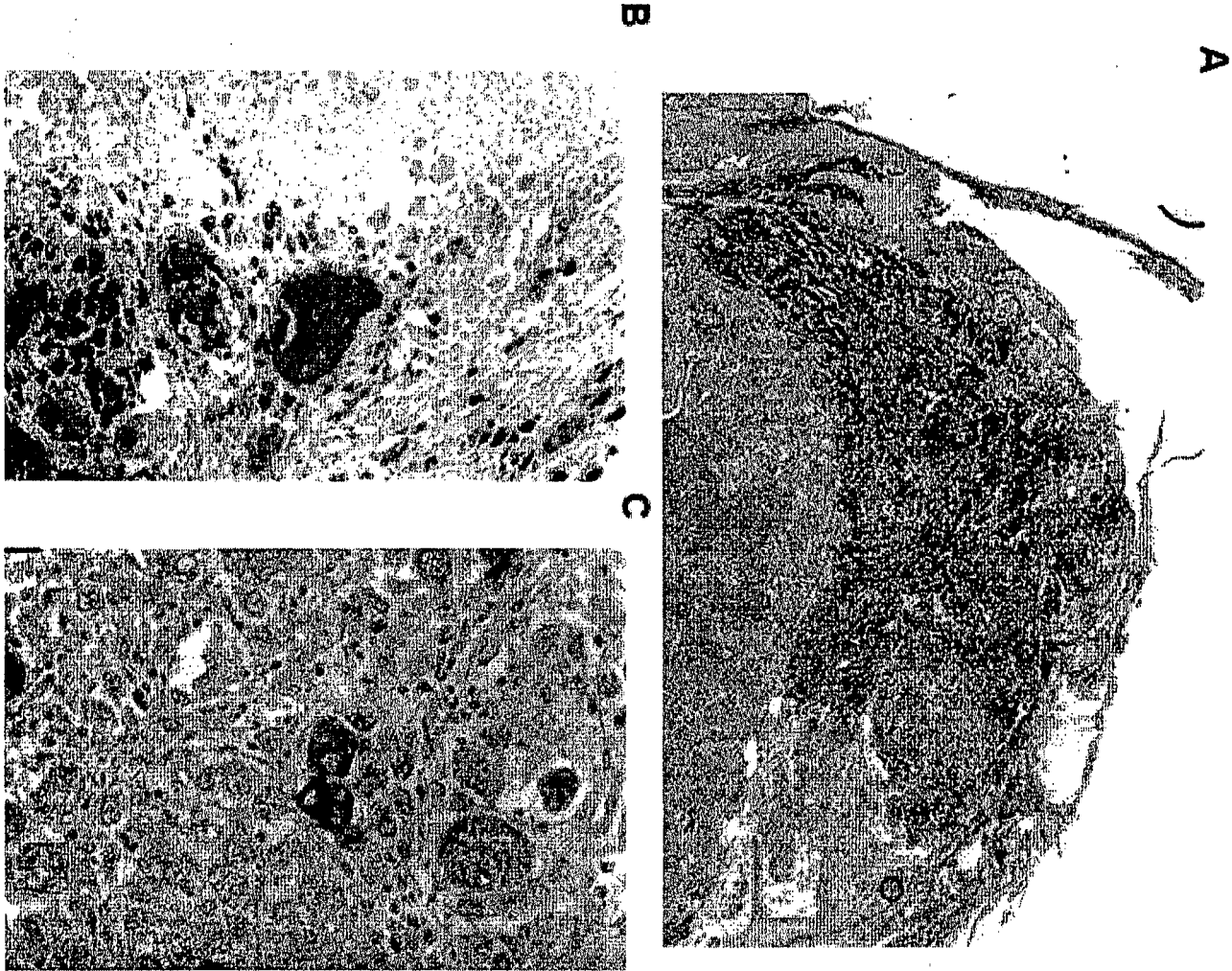


Fig. 6

81

Fig. 7



82

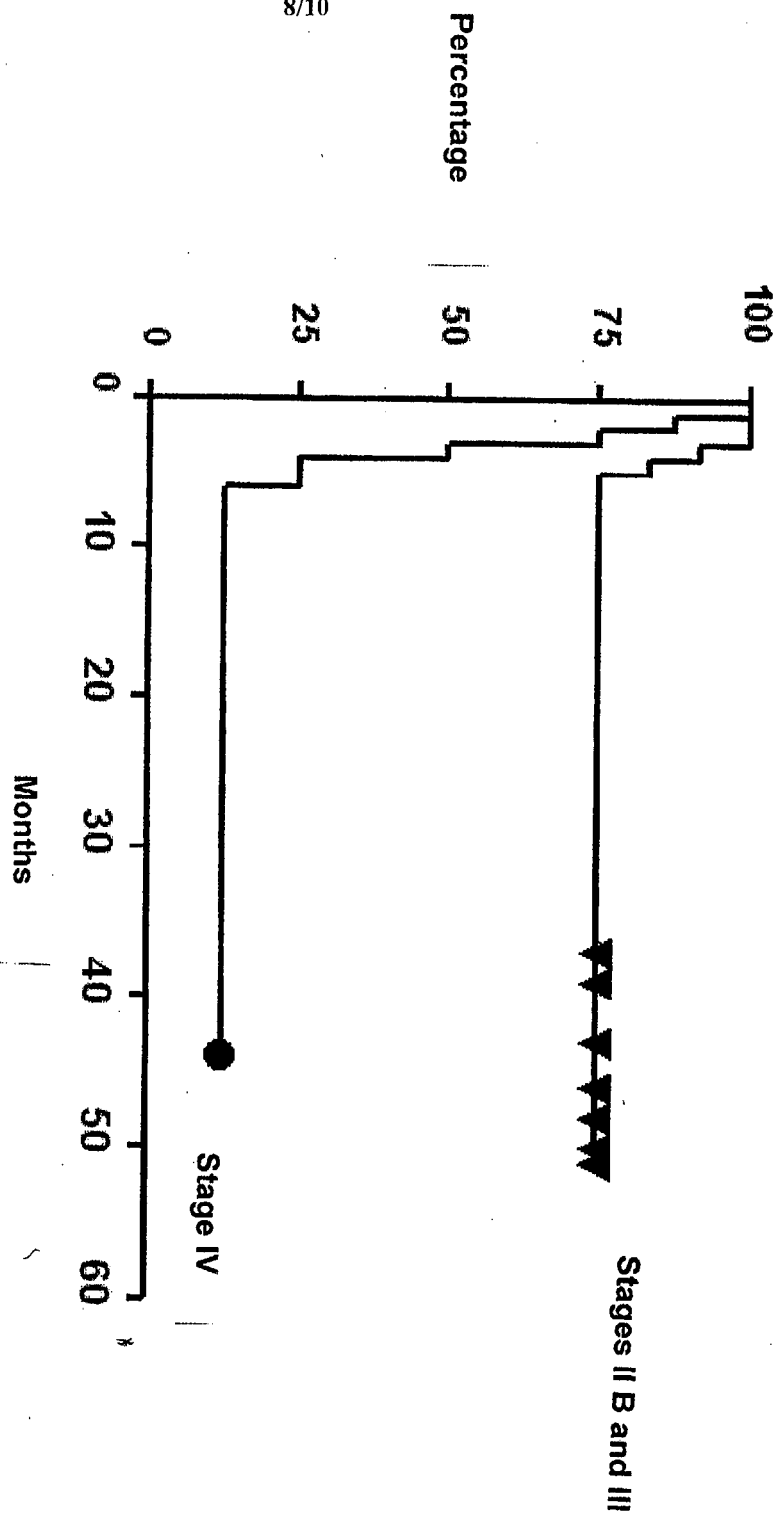


Fig. 8

83

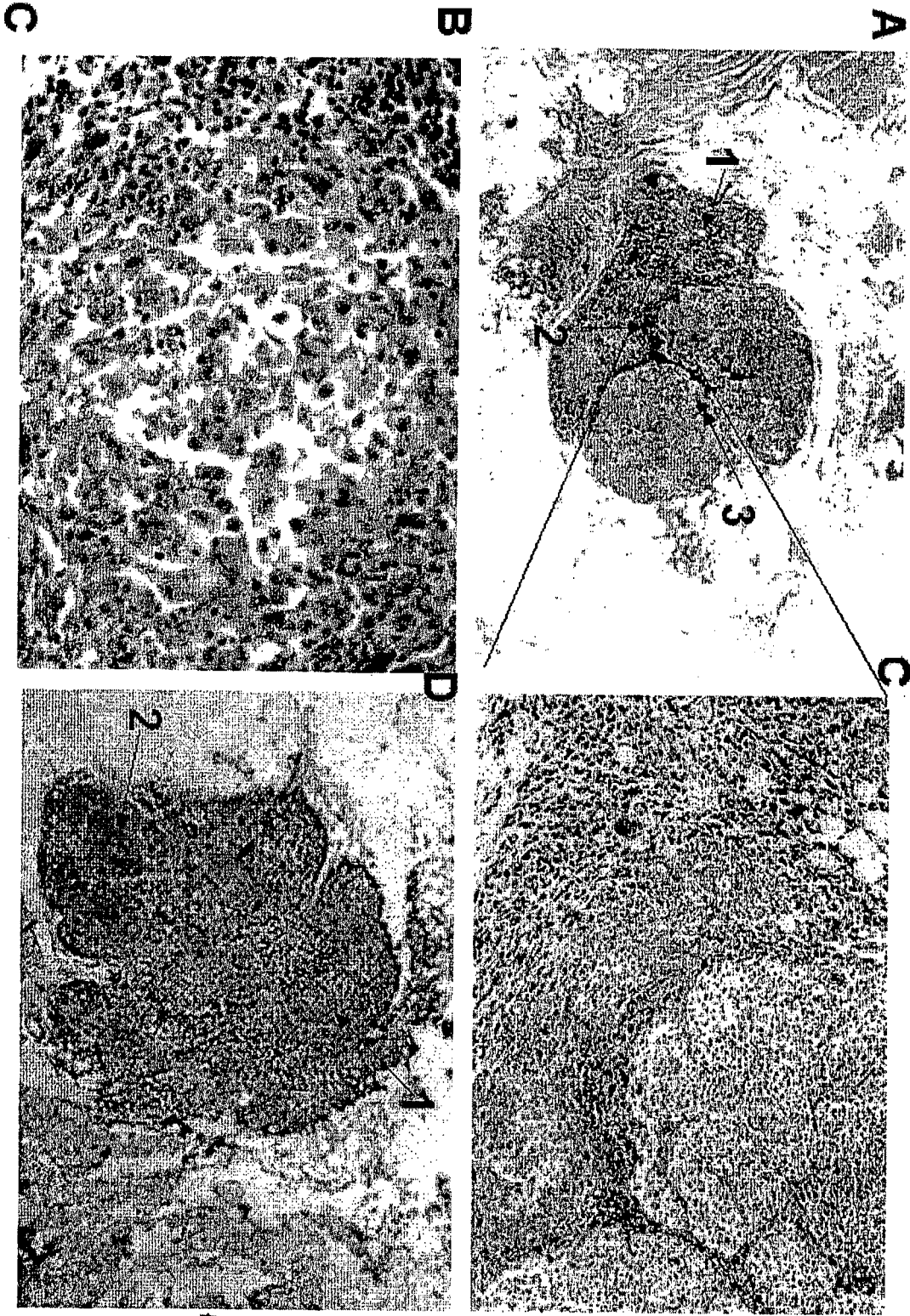


Fig. 9

87

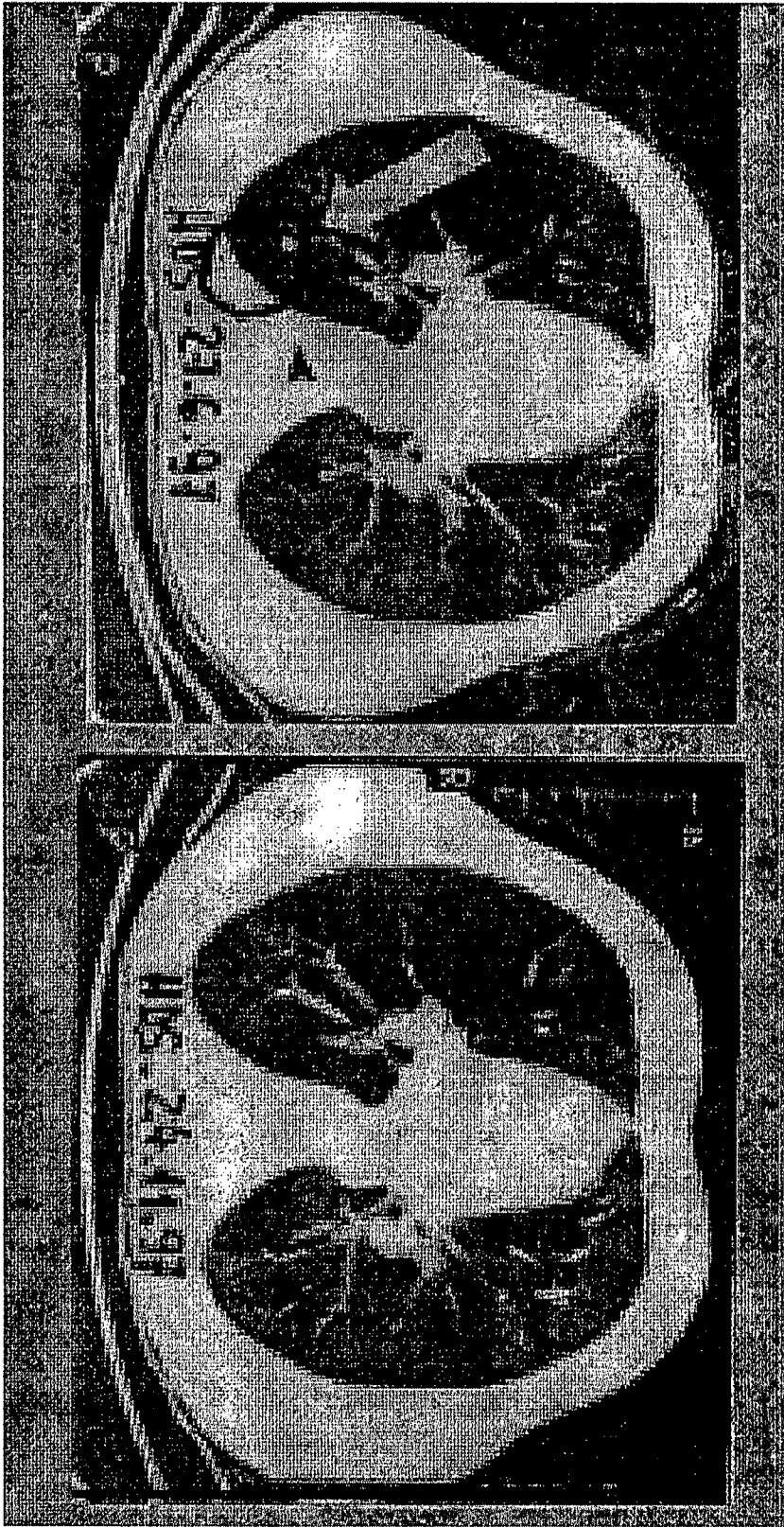


Fig. 10

AS

- M E M O R I A D E S C R I P T I V A -

TITULO

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

CAMPO DE LA TECNICA

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad se realizan muchos esfuerzos y se destinan muchos recursos en para investigar en el área de

26

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

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

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

27

Breetaudeau L, Gervois N, Bodinier M, Bougras G, Diez E, Lang F, Gregoire M, Jotereau F. Int J Cancer 2002, 101: 280-286 y Demaria S, Santori FR, Ng B, Liebes L, Formenti SC, Vukmanovic S. J Leukoc Biol. 2005, 77: 361-368).

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

Los documentos de patente US 5.882.654 y US 5.840.317 divulgan líneas celulares de melanoma irradiadas de para emplearse como vacunas alogeneicas. El tratamiento divulgado alcanza valores inferiores al 50% de pacientes NED (16/37) y se muestra una efectiva actividad anti-tumoral de tipo humoral.

El documento de patente US 2006/0034811 de Wallack y colaboradores divulga vacunas comprendidas por células presentadoras de antígenos cargadas con células tumorales lisadas o rotas que incluyen al citosol y las membranas.

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

El documento de patente US 6.602.709 de Albert y colaboradores se divulga el uso de células apoptóticas para presentar antígenos a las células dendríticas para la inducción de células T. El método es útil para inducir linocitos T citotóxicos antígeno específicos y células T helper. Las células dendríticas son cebadas por células apoptóticas o fragmentos de las mismas y son capaces de procesar y presentar a los antígenos procesados e inducir la actividad de linfocitos T citotóxicos, pudiendo ser empleadas como vacunas terapéuticas.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

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

Es otro objeto de la presente invención proveer una composición para el tratamiento del melanoma, en donde dicha composición comprende al menos una línea celular de melanoma alogeneica, por ejemplo (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) o combinaciones de las mismas, en donde

90

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

Es otro objeto de la presente invención proveer una composición para el tratamiento adyuvante del melanoma, en

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

92

comprende una combinación de las líneas celulares de melanoma alogeneicas (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831) o (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar.

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

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

Es otro objeto de la presente invención proveer un procedimiento para preparar la composición, en donde dicho procedimiento se lleva a cabo en las siguientes etapas:

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

94

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

Es otro objeto de la presente invención proveer un procedimiento para preparar la composición que comprende las etapas de:

- a) descongelar y cultivar las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829);
- b) mezclar dichas líneas celulares;
- c) irradiar dichas líneas celulares;
- d) obtener células dendríticas autólogas; y
- e) co-cultivar durante un tiempo las células dendríticas autólogas con las líneas celulares irradiadas de la etapa c).

Es otro objeto de la presente invención proveer un método para inducir una respuesta inmune anti-tumoral en

95

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

Es otro objeto de la presente invención proveer un método para inducir una respuesta inmune anti-tumoral en pacientes que portan melanoma que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de una combinación de las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar.

Es otro objeto de la presente invención proveer un método para inducir una respuesta inmune anti-tumoral en

96

pacientes que portan melanoma que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un co-cultivo de entre 6 y 72 horas de células dendríticas autólogas y una combinación de las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

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

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

97

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

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

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

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

48

celular y los clones, respectivamente; y la columna 3 corresponde a la expresión de Mart-1 de la línea celular y los clones.

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

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

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

En la figura 10 se muestran imágenes de tomografía axial computada del paciente #300 tratado con la

99

composición de la invención Apo-Nec más BCG. En el panel A Se muestra con una flecha la ubicación de la metástasis pulmonar y en el panel B se observa una imagen de tomografía axial tomada 5 meses después.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENION

A los efectos de la presente solicitud los términos "combinación" y "mezcla" son intercambiables.

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

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

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

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

MARCADOR	XY1	XY2	XY3	XX4
Gp100 (HMB45)	ND	ND	+	+
Gp100 (PCR)	+	+	+	+
Tirosinasa (PCR)	+	+	+	+

700

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

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

De la caracterización de la línea celular MEL-XY2 surge que las células crecen como una monocapa de células amelanóticas heterogeneas en tamaño. Se presentan células pequeñas, y en menor número, multinucleadas con nucleolos

prominentes. Se observan también células con prolongaciones dendríticas características en el melanoma. Creciendo a alta densidad pueden apilarse y formar microtumores. Las células MEL-XY2 son tumorigénicas en ratones atímicos (nude) y no generan metástasis.

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

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

Cuando la línea celular Mel-XX4 de la invención fue transplantada a ratones desnudos (inmuno-deprimidos) se generaron líneas celulares tumorales in vivo. Los pasajes seriados a partir de los tumores iniciales demostraron que el 100% de los animales transplantados desarrollaban tumores durante el primer mes. El crecimiento de los tumores era lento y a los 84 días alcanzaban un valor promedio de $372 \pm 63 \text{ mm}^3$. La línea celular de la invención

Mel-XX4 es tumorigénica cuando se inyecta en forma subcutánea una cantidad de 3×10^6 células.

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

Se ensayó la energía de radiación gamma que induce apoptosis en las líneas celulares de la invención. La aplicación de 50 Gy de irradiación fue suficiente para suprimir completamente la capacidad clonogénica en agar blando para cada línea celular de la invención. Cuando las células se irradiaron con 70 o 100 Gy, no se observaron diferencias significativas en el grado de inducción de apoptosis/necrosis. En la figura 1 A se puede observar que las células de melanoma no irradiadas contenían entre 6-9% de células apoptóticas tempranas caracterizadas por coloración Anexina-V⁺/IP⁻ (panel de más abajo a la derecha). Luego de la radiación a 70 Gy y 72 hs de cultivo, se obtuvo un 45-53% de células apoptóticas tempranas (ver Figura 1 B, panel de más abajo a la derecha). Las células

103

necróticas teñidas con Anexina-V e IP se incrementaron desde el 7,5% en las células no irradiadas hasta alrededor de un 15% en las células irradiadas (paneles de más arriba a la izquierda). Por lo tanto a los efectos de la presente solicitud de patente las células de melanoma irradiadas de la invención se denominan células Apo-Nec y la composición que comprende una o más de cualquiera de las líneas celulares Apo-Nec (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y/o Mel-XX4) se denomina composición Apo-Nec.

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

Sorprendentemente la combinación de antígenos tumorales presentados por la mezcla de las cuatro líneas celulares Apo-Nec de la invención inducen una respuesta inmune de células T específica contra el tumor y permite obtener más de un 80% de pacientes libre de enfermedad

101

cuando son tratados con la composición Apo-Nec de la invención (ver figura 8).

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

En una realización preferida las líneas celulares son diferentes combinaciones de las líneas Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4. A modo de ejemplo y sin limitarlo al mismo la combinación podría comprender una mezcla de las líneas celulares Mel-XY1 y Mel-XY2 o una mezcla de las líneas Mel-XY1, Mel-XX4. En una realización preferida la combinación de líneas celulares comprende una mezcla de las líneas celulares Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4, estando por lo tanto las cuatro líneas celulares presentes.

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

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

105

células apoptóticas y alrededor de un 15% de células necróticas. Esta combinación de poblaciones induce la maduración de las CD.

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

Tabla 2: Características de los pacientes

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

yob

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

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

El promedio de edad estaba en los 42 años (rango desde 17 a 60 años). Se trataron cinco mujeres y once hombres. Uno de los pacientes tenía melanoma AJCC estadio IIC, ocho tenían melanoma estadio III y siete tenían melanoma estadio IV. Los pacientes #5 y #11 se les había efectuado cirugía de las metástasis de pulmón; el paciente #16 tenía metástasis subcutáneas y los paciente #1, #10 y #15 habían recibido radioterapia en la zona axilar después de la cirugía por la ruptura de la cápsula de los nódulos linfáticos. Se prepararon cohortes de cuatro pacientes y se los trató con 5, 10, 15 o 20 $\times 10^6$ de células dendríticas (CDs) co-cultivadas con células Apo-Nec (composición CD/Apo-Nec de la invención). Todos los pacientes recibieron cada dos semanas una dosis de la composición CD/Apo-Nec (0,3 ml) sin adyuvantes. El paciente #7 fue retirado del protocolo luego de la segunda aplicación debido a la rápida progresión de la enfermedad luego de un trauma deportivo en el muslo derecho y una infección descontrolada; este paciente no fue reemplazado.

Las células dendríticas inmaduras (CDin) mostraban el siguiente patrón: el $95.1 \pm 3.6\%$ eran CD14⁻/ CD11c⁺ y el

107

70 $\pm$ 6% eran CD1a⁺. Se estimó que la pureza era de alrededor del 60%.

Aproximadamente se obtuvieron 3×10^6 CDs a partir de 1×10^8 PBMC sembradas en medio libre de suero.

Cuando se caracterizaron las CDin obtenidas de los pacientes y las células comprendidas en la composición CD/Apo-Nec de la invención se encontró que el 42.3 % $\pm$ 13.7 de las células CDin de los pacientes (n= 15) fueron capaces de fagocitar a las células Apo-Nec de la invención. La fagocitosis de las células Apo-Nec se corroboró por microscopía electrónica, observándose células Apo-Nec enteras o partes de ellas dentro de las CDs en vacuolas.

La capacidad de las células Apo-Nec de la invención para influir en el proceso de maduración de las células CD derivadas de monocitos se examinó mediante mediciones de marcadores específicos para células CD por citometría de flujo (FACS) (FACSCalibur, BD Biosciences, San José, CA). La fagocitosis de las células Apo-Nec de la invención dio como resultado un fenotipo maduro de las células CD en comparación con los controles incubados con LPS. La maduración de las células CD se evidenció por el incremento en la expresión de CD83, CD80, CD86, HLA clase I, y II y CD40. Luego de la fagocitosis se observó un 75.2 % $\pm$ 16 de reducción en la endocitosis FITC-Dx en comparación con las CDin.

El receptor de quemoquina (C-C motif) receptor 7 (CCR7) incrementó su expresión en las CDs luego de la fagocitosis de las células Apo-Nec de la invención, en la totalidad de los pacientes y esto se correlacionó con la

100

migración *in vitro* de las células CD hacia MIP-3β. Las células CDin (9.6% CCR7+, MFI: 23.3) migraron hacia MIP-1α pero no migraron hacia MIP-3β; en cambio las células CD/Apo-Nec (81.8% CCR7+, MFI: 41.2) claramente migraron hacia MIP-3β y no lo hicieron hacia MIP-1α.

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

Tabla 3

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

Síntomas	Composició n 5 x10 ⁶	Composic ión 10 x10 ⁶	Composici ón 15 x10 ⁶	Composición 20 x10 ⁶
Fatiga	1/4	1/3	0/4	0/4
Dolor de cabeza	1/4	0/3	0/4	0/4
Escalofríos	1/4	0/3	0/4	0/4

109

Calambres	0/4	0/3	0/4	1/4
Abdominal				
Reacción	4/4	3/3	4/4	4/4
Local				
Astenia	0/4	1/3	0/4	0/4
Nausea	0/4	0/3	0/4	1/4
Dolor	0/4	0/3	0/4	1/4
Abdominal				
Vómito	0/4	0/3	0/4	1/4
Anorexia	0/4	1/3	0/4	0/4
Diarrea	0/4	0/3	0/4	1/4
Mialgia	1/4	0/3	1/4	0/4

Luego de un seguimiento medio de 41.5 meses post-cirugía (entre 25 y 71 meses), los pacientes en estadio IIC estaban sin evidencias de enfermedad (NED); 7/8 (87.5%) de los pacientes en estadio III estaban NED y 7/7 de los pacientes en estadio IV mostraron progresión de la enfermedad (ver figura 2).

Se evaluó para cada aplicación las reacciones DTH a las células Apo-Nec heterólogas de la invención y se determinó la intensidad de la reacción, el score de DTH tal como se describe en los ejemplos. Sólo 6/15 pacientes mostraron una leve reacción DTH pre aplicación contra las células Apo-Nec de la invención. Los ensayos DTH revelaron que la aplicación de células Apo-Nec induce una reactividad específica en todos los pacientes, dado que el score DTH fue significativamente mayor luego de la aplicación de la segunda dosis de la composición CD/Apo-Nec en comparación con las reacciones basales observadas luego de la primera aplicación (Mann Whithney test $P=0.029$, $n=15$). Los score

DTH fueron mayores en los pacientes NED que en aquéllos que experimentaron progresión de la enfermedad ($P= 0.28$, Mann Wilcoxon Rank Sum test).

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

No se indujo respuesta humoral contra las células vivas de melanoma comprendidas en la composición de la invención antes y después de la aplicación, y evaluada mediante análisis por FACS. También se analizó la presencia de anticuerpos reactivos contra las células Apo-Nec en sueros pre y post aplicación mediante la técnica de Western blot. En cuatro pacientes (#3, #4, # y #16) se observó solo una tenue banda de proteínas de melanoma (>200 kDa) detectada en el suero post aplicación que no se reconoció en los extractos de células de cáncer de mama utilizadas como control inespecífico.

Se estableció una línea celular de melanoma autóloga para el paciente #1 y de esta manera se pudo analizar si la aplicación en dicha paciente de las células CD/Apo-Nec inducía una respuesta de proliferación de linfocitos hacia las propias células tumorales. Se midió la proliferación de linfocitos luego de 5 días de incubación de los linfocitos de pre y post aplicación con células Apo-Nec#1 (células tumorales irradiadas del paciente #1 obtenidas tal como se describe en los ejemplos). En la figura 3 se muestra que la proliferación de los linfocitos post aplicación en respuesta a las células CD/Apo-Nec#1 fue mayor respecto de los linfocitos pre aplicación, sugiriendo

que existe inmunización específica a los antígenos tumorales presentados por las células Apo-Nec, los cuales también están presentes en el tumor del paciente #1, después de la aplicación de las células CD/Apo-Nec.

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

En 5/7 pacientes se obtuvieron suficientes PBMC pre (7 días antes de la primera aplicación) y post (15 días después de la cuarta aplicación) para analizar la presencia de linfocitos T CD8+ específicos reactivos con gp100 y Melan A/MART-1 mediante tinción de tetrámeros. Los resultados se muestran en la Figura 4 A. Los pacientes #2 y #6 incrementaron significativamente su frecuencia de gp100 y Melan A/MART-1 células T CD8+ específicas T después de la aplicación por encima del 1% y ellos estaban aún como NED (53 y 36 meses, respectivamente, después de la cirugía), mientras que los pacientes #5, # 8 y #16 disminuyeron su coloración de tetrámeros pre aplicación y la totalidad de ellos progresaron en la enfermedad luego de la aplicación (Figura 3 A). Como ejemplo se muestra en la Figura 4 B los resultados del paciente #2. Los porcentajes de células T CD8+ T que reconocen a los péptidos gp100 o Melan A/Mart-1

se incrementaron después de la aplicación desde 0,17 y 0,26 a 1,15 y 1,16 respectivamente. No se observó reactividad en un experimento realizado bajo las mismas condiciones de dadores sanos HLA-A*0201 positivos.

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

El balance entre IL-12 e IL-10 en las células CD/Apo-Nec de la invención fue cuantificado mediante FACS en diferentes momentos luego de la fagocitosis y seguido de 8 horas de tratamiento con Brefeldin A para acumular intracitoplasmáticamente a las citoquinas. Tal como se muestra en la Figura 5 sólo el 6,1% de las CDin producen IL-12, pero después de 32 hs. Del co-cultivo el 30,8% de

las células CD/Apo-Nec estaban inducidas a producir IL-12. Por otra parte, el 81,6% de las CDin contenían dentro del citoplasma las citoquinas y estas no se modificaron luego de la fagocitosis. Las células doblemente positivas que producían IL-10 e IL-12 fueron a las 24 horas el 27,8% (ver Figura 5).

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

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

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

11-9

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

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

Tal como se comentó mas arriba la fagocitosis de las células Apo-Nec por las CDin de cada paciente indujo la maduración de dichas CDs.

Por otra parte, se analizaron las líneas celulares de la invención en relación a sus capacidades clonogénicas.

115

Las colonias en ágar blando de la línea celular de la invención MEL-XY3 presentan una morfología heterogénea, con baja adhesión entre las células. Se observa una baja proporción de colonias melanóticas. Las colonias en ágar blando de la línea celular de la invención MEL-XY1 presentan una morfología compacta, con una alta adhesión entre las células que la componen. Rara vez se observan colonias melanóticas.

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

Tabla 4

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

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

ND: no determinado
* Datos aún no normalizados

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

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

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

A modo de ejemplo se muestran resultados de uno de los pacientes del protocolo seleccionado. El paciente #200 es de sexo femenino, raza caucásica, de 67 años, consultó en Noviembre de 2003. En junio de 2002 fue intervenido quirúrgicamente por un nevo dorsal que había crecido. La

anatomía patológica reveló un melanoma cutáneo, nivel IV de Clark, nivel de Breslow 5.7 mm. En agosto de 2002 aparecieron satelitosis que fueron extirpadas. Al paciente se le administró Apo-Nec + BCG + GM-CSF, recibiendo 600 µg GM-CSF (por composición) y finalizó el tratamiento con escasa toxicidad. En el último examen clínico se detectó un nódulo sospechoso en dorso, que fue extirpado, y cuya imagen microscópica se muestra en la Figura 9. Se observa una intensa infiltración linfoide, con zonas remanentes de tumor viable, pero también una intensa necrosis del tejido tumoral, así como la presencia de macrófagos cargados de melanina.

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

A los 14 meses del segundo vaciamiento se detectó recaída en arcada inguinal izquierda, y se efectuó nuevamente cirugía, aislándose 5/7 ganglios con metástasis de melanoma. El paciente presentaba dolor lumbar. La tomografía axial computada reveló adenopatías retroperitoneales, se efectuó quimioterapia con esquema de Dartmouth. Al finalizar la quimioterapia inició el tratamiento con la composición Apo-Nec de la invención + BCG. A los 14 meses de iniciado el tratamiento con la

118

composición de la invención se detectó nódulo en región inguinal izquierda. Reoperado, se detectó metástasis de melanoma con infiltrado linfoplasmocitario abundante. El paciente continuó tratamiento con la composición Apo-Nec + IFN- α . En la figura 10 se muestra la remisión de un nódulo pulmonar izquierdo. El paciente se encuentra actualmente libre de enfermedad.

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

Esta invención se encuentra mejor ilustrada según los siguientes ejemplos, los cuales no deben ser interpretados como una limitación impuesta al alcance de la misma. Por el contrario, debe entenderse claramente que puede recurrirse a otras realizaciones, modificaciones y equivalentes de la misma que luego de leerse la presente descripción, puede sugerir a aquellos entendidos en el tema sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o alcance de las reivindicaciones anexas.

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

Mel-XY1: La línea Mel-XY1 se obtuvo de un paciente masculino de raza caucásica, a partir de una metástasis

pulmonar secundaria a un melanoma primario de la espalda. El paciente falleció dos años después de metástasis cerebrales.

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

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

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

520

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

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

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

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

Ejemplo 2: Caracterización de las líneas celulares:

Cinética de crecimiento in vitro:

Se sembraron 10^4 células por pozo en placas de 24 pocillos (Corning). Cada 2-3 días las células fueron tratadas con EDTA (0,02%), cosechadas y contadas. El tiempo de duplicación de la población fue estimado a partir de la pendiente de la curva de crecimiento durante la fase exponencial.

Clonogenicidad

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

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

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

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

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

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

Determinación de antígenos asociados a melanoma mediante RT-PCR:

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

Los cebadores específicos se muestran más abajo:

Gp100

5'-GCTTGGTGTCTCAAGGCAACT-3' (SEQ ID N° 1)

123

5'-CTCCAGGTAAGTATGAGTGAC-3' (SEQ ID N° 2)

MART-1

5'-CAAGATGCCAAGAGAAGATGCTCACT-3' (SEQ ID N° 3)

5'-GCTTGCATTTTTCCTACACCATTCCA-3' (SEQ ID N° 4)

Tirosinasa

5'-TTGGCAGATTGTCTGTAGCC-3' (SEQ ID N° 5)

5'-AGGCATTGTGCATGCTGCTT-3' (SEQ ID N° 6)

5'-GTCTTTATGCAATGGAACGC-3' (SEQ ID N° 7)

5'-GCTATCCCAGTAAGTGGACT-3' (SEQ ID N° 8)

TRP-2

5'-GAGTGGTCCCTACATCCTACG-3' (SEQ ID N° 9)

5'-GCGTCCTGGTCCTAATAATGT-3' (SEQ ID N° 10)

MAGE-1

5'-GAGTCCTCAGGGAGCCTCC-3' (SEQ ID N° 11)

5'-TTGCCGAAGATCTCAGGAAA-3' (SEQ ID N° 12)

NY-ESO-1

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

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

MDR-1

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

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

MIA

5'-CATGCATGCGGTCCTATGCCCAAGCTG-3' (SEQ ID N° 17)

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

β -actina

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

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

Los cebadores antisentido se muestran en la línea de más abajo.

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

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

Análisis citogenéticos y citomoleculares:

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

725

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

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

La caracterización del fenotipo de las células CD se realizó cuando las células estaban en el estado inmadura (CDin) y luego de los ensayos de fagocitosis de las células apoptóticas/necróticas (células Apo-Nec) mediante la tinción de 5×10^5 células con anticuerpos marcados con fluorocromos contra los antígenos CD14, CD11c, CD1a, HLA clase II, CD80, CD86, CD83, CD40, HLA clase I y CCR7 (BD Biosciences, San Jose, CA), mediante análisis por FACS, (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los controles de isotipo correspondientes fueron Rata IgG2a PE y ratón IgG1 e IgG2a

(BD Biosciences, San Jose, CA). También, se analizó la expresión de CD83 en CDs que fagocitaron células Apo/Nec, se empleó un anticuerpo monoclonal no marcado anti-CD83 (IgG1) y el correspondiente isotipo como control, en el revelado se empleó un anticuerpo anti-ratón IgG1-PerCP (BD Biosciences, San José, CA).

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

Evaluación de la fagocitosis de las células CDs:

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

Migración in vitro de las CDs:

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

Microscopía electrónica:

También se estudio el proceso de fagocitosis por microscopía electrónica. Se fijaron las muestras de los co-cultivos con glutaraldehído al 2,5% 0,1 M de buffer fosfato, y luego se realizó una tinción post-fijación con tetróxido de osmio 1%, se lavaron dos veces con agua destilada y se contrastaron con acetato de uranilo 5% durante 2 hr. Luego de un lavado y de la deshidratación las muestras se embebieron en resina (Durkupan). Se realizaron

128

cortes ultradelgados (70-90 nm), se montaron en rejillas de cobre y se contrastaron con citrato de plomo de Reynold. Se analizaron las rejillas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 109. Alternativamente, para obtener figuras de las células completas, se obtuvieron cortes finos (0.5 μ m) en un ultramicrotomo (Reichert-Jung), se colorearon con azul de toluidina 0,4%, 0,1 M de buffer carbonato, se montaron en Durkupan y se analizaron bajo un microscopio óptico (1000x). Se obtuvieron las fotos con una cámara digital Sony Cybershot Digital (5 megapixels) y las imágenes fueron procesadas con el programa Adobe photoshop 6.0.

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

Se purificaron monocitos CD14+ al 98% a partir de dadores HLA A*0201 utilizando microesferas anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Germany) y fueron diferenciadas a células CDin mediante 5 días de cultivo tal como se describió mas arriba. Las células CDin se incubaron con células Apo-Nec durante 6, 12, 24 y 48hs y se enfrentaron durante toda la noche a clones CTL MelanA/MART-1 o gp100 específicos en 1 ml de medio AIMV. La secreción de IFN- γ al sobrenadante se determino por triplicado mediante la técnica de ELISA (OptEIA IFN- γ , Pharmingen BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo a las sugerencias del proveedor. Se realizó una curva de calibración para cada experimento y la concentración de las muestras se calculó usando un análisis de regresión log-log y empleando el software Cembal 2.2. Los controles incluyeron: CDs más 20 μ g/ml de

péptidos MART-1 o gp100, líneas celulares viables de melanoma HLA A*0201⁺ que expresan los antígenos MART-1 y gp100 (controles positivos) o células CDs sembradas con péptidos no específicos y líneas celulares viables de melanoma HLA A*0201⁺ que no expresan los correspondientes antígenos (controles negativos).

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

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

Ejemplo 4: Elaboración de la composición de la invención y esquemas de aplicación:

Composición Apo-Nec:

Irradiación de las líneas celulares:

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

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

Se inyectaron 300 μ l en forma intradérmica.

Composición CD/Apo-Nec:

Preparación de células tumorales apoptóticas/necróticas:

Las células (Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4) irradiadas y congeladas tal como se describe más arriba fueron descongeladas y sembradas en medio de melanoma más suero fetal bovino al 10% hasta completar el proceso apoptótico. Después de 72 hs de cultivo, las células fueron despegadas del fondo de los frascos, lavadas, contadas y resuspendidas en medio fresco libre de suero AIMV™ Medium (grado terapéutico, GIBCO, Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y). La apoptosis y necrosis se ensayó mediante la técnica de unión de Anexina-V FITC e incorporación de Ioduro de Propidio (IP) (Anexina-V kit de detección de apoptosis, BD Biosciences, San José, CA) y se analizó por FACS. Los ensayos clonogénicos en ágar blando se llevaron a

cabo por sextuplicado (1.5×10^4 células/pocillo) en función de analizar en las células irradiadas la capacidad de proliferación en comparación con células control no irradiadas.

Se co-cultivaron 5, 10, 15 o 20×10^6 CDs, según la dosis para cada paciente, con células Apo-Nec en medio AIMV durante 48h, a 37°C. El día de la aplicación las células de los co-cultivos fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 min, resuspendidas en medio DMEM (300 μ l) e inyectada vía intradérmica en una de las cuatro extremidades que tuviera intacto el drenaje de los nódulos linfáticos.

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

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

Los estudios realizados en pacientes se llevaron a cabo para evaluar la toxicidad, viabilidad y respuesta inmune al tratamiento. Los estudios fueron aprobados por el consejo Revisor Institucional del Instituto Alexander Fleming, y por un comité de ética. Los criterios de viabilidad fueron (a) melanoma cutáneo, histológicamente confirmado en los estadios IIB, IIC, III ó IV (AJCC); (b) pacientes con enfermedad mínima o no detectable (ND) después de la cirugía evaluados por Tomografía Axial Computada y valores de la enzima lactatodeshidrogenasa (LDH). Los pacientes de melanoma con primario desconocido podían ser incluidos en el estudio; (c) edad entre 15 y 60

132

años; (d) expectativa de vida > 6 meses; (e) rendimiento (ECOG) 0 o 1; (f) pacientes en estadio III tratados previamente con IFN- α que hubieran finalizado o suspendido el tratamiento debido a la progresión de la enfermedad, toxicidad u otra razón clínica o aquellos pacientes que no hubieran iniciado el tratamiento con IFN- α seis meses antes de la cirugía (g) adecuado acceso venoso para el procedimiento de leucoféresis, (h) Los criterios de elección de laboratorio fueron: hemoglobina > 10 gr%; recuento de glóbulos blancos > 4800/mm³, plaquetas > 150.000/mm³; bilirubina total y directa, transaminasas oxalacéticas y transaminasas glutámico pirúvicas < 1.5 veces el valor superior normal; LDH $\leq$ 450 mU/ml; i) ausencia de embarazo con β -HCG sérica determinada una semana antes de cada aplicación en las mujeres premenopáusicas; (i) creatinina < 1.4 mg % (k) sin tratamiento de quimioterapia, radioterapia o tratamiento biológico durante el mes previo; (k) sin medicación con corticosteroides o antiinflamatorios no-esteroides (AINEs); (l) sin metástasis de cerebro activas; (m) ECG normal (n) todos los pacientes debían de firmar el consentimiento informado.

Evaluaciones de los pacientes y esquema de tratamiento:

La evaluación de base de los pacientes fue realizada dentro de los 35 días previos a la primera aplicación. La evaluación clínica incluyó una historia médica clínica completa, examen físico, electrocardiograma (ECG), Tomografía Axial Computada (tórax, abdomen, pelvis y

133

cerebro), determinación del estadio tumoral, tamaño del tumor y documentación de los sitios de enfermedad, examen químico de sangre y hematología. Los pacientes seleccionados fueron sometidos a leucoféresis para obtener PBMC para generar CDs.

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

Para las aplicaciones de las células Apo/Nec de la invención los pacientes fueron inyectados intradérmicamente (id) en una de las extremidades con ganglios linfáticos intactos. Veinte (20) pacientes recibieron una dosis de 400 μ g rhGM-CSF (100 μ g por día, cuatro días). En el día de la aplicación, 0,1 ml de hGM-CSF se mezcló con Apo-Nec (16×10^6 células irradiadas en 0,3 ml) y BCG (1×10^6 unidades formadoras de colonias) en 0,05 ml). Durante los siguientes 3 días, 0.1 ml de rhGM-CSF se inyectó i.d. en el sitio de aplicación. Cada paciente recibió 4 aplicaciones con separación de 3 semanas, luego 1 composición cada dos meses

134

por un año, 1 composición cada tres meses el segundo año y luego continuaron con 1 composición cada 6 meses.

Análisis estadístico:

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

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

Métodos para evaluar la respuesta inmunológica de los pacientes tratados:

Para evaluar la respuesta inmune de los pacientes, se obtuvo suero el día 7 previo a la aplicación (suero pre), y el día 15 posterior a la finalización del tratamiento (suero post), las muestras se conservaron a -80°C . Las células PBMC se purificaron mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque y posterior centrifugación a partir de leucoféresis (pre-aplicación) o a partir de 100 ml de sangre tomados 15 días posteriores a la última dosis (post-aplicación), los PBMC fueron congelados en 50% de DMEM, 40% de albúmina humana y 10% de DMSO hasta ser utilizados en

135

los ensayos inmunológicos. La tipificación HLA de HLA-A*0201 se determinó luego de una incubación de las muestras de los pacientes con anticuerpos monoclonales de ratón anti-HLA*A0201 conjugados con FITC (BD-Pharmingen, San Jose, CA).

Reacción DTH:

En cada uno de los días de aplicación se realizó una prueba de DTH en el antebrazo con 2×10^6 células Apo-Nec y la reacción se evaluó a las 2, 24 y 48 hs post aplicación. Se estableció el valor de intensidad DTH de la siguiente manera: 0: eritema < 0.5 cm; 1: eritema macular $0.5-1.0$ cm; (2) eritema macular $1.0-2.0$ cm; 3: eritema macular > 2.0 cm o eritema papular < 1.5 cm; 4: eritema papular > 1.5 cm. El score DTH corresponde a la sumatoria de todas las intensidades DTH individuales/4.

Ensayo de proliferación:

Se obtuvieron PBMC pre- y post-composición mediante un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque y se los conservó congelados en nitrógeno líquido hasta su utilización. Para los ensayos las células fueron descongeladas e incubadas en un medio AIM-V (Gibco, Grand Island, NY) durante 1 hr a 37°C . Se sembraron 5×10^5 células en placas de 96 pocillos en presencia o ausencia de fitohemoaglutinina (PHA) ($5 \mu\text{g/ml}$) (Gibco, Grand Island, NY) y se incubaron a 37°C por 72 hs. Durante las últimas 16 hs, las células se pulsaron con (^3H)dThd (Amersham, $1 \mu\text{Ci/pocillo}$) y se midió luego de la lisis celular la radiactividad incorporada al ADN (Cell Harvester, Nunc, Rochester, NY), en un contador de centelleo líquido.

Determinación de citoquinas:

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

Medición de IFN- γ por la técnica de ELISpot:

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

Se recubrieron placas 96 pocillos de nitrocelulosa (MAIPS 450; Millipore, Bedford, MA) toda la noche a 4°C con 10 μ g/ml de mAb anti-IFN- γ humano (Mabtech, Nacka, Sweden) en buffer carbonato-bicarbonato pH 9.6, se lavaron y se bloquearon con medio IMDM + 10% suero humano AB (Biowest, Nuaille, France) por 1 hr a 37°C. Las células efectoras fueron sembradas en 100 μ L de medio y se agregaron células

blanco hasta alcanzar una relación E/T de 10:1, en un total de 200 μ L/pocillo. Luego de 24 hs de incubación, los pocillos se lavaron 5 veces con 0,1% de Tween-20 en PBS. Se incubaron las placas 2 hs a temperatura ambiente con 1 μ g/ml de mAb de ratón anti-IFN- γ humano biotinilado (Mabtech) en PBS/HSA (0,4 g/L). Luego de varios lavados con 0,1% de Tween-20 en PBS, se agregó 1:1000 de fosfatasa alcalina-streptavidina (Mabtech) en PBS/HSA y se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. Las placas fueron luego lavadas y se agregó el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/nitroazul de tetrazolio durante 30 minutos a temperatura ambiente (Mabtech). Se detuvo el desarrollo del color lavando las placas con agua. Luego de ser secadas se contaron las células T CD8+ que secretan IFN- γ , visualizada por un punto de color en la membrana de nitrocelulosa, usando el lector de sistema de lectura automática de imágenes ELISpot (AID, Strassberg, Germany).

Tinción con tetrámeros HLA/péptidos:

Se utilizaron los tetrámeros HLA-A0201 para identificar clones de linfocitos T CD8+ específicos para MART-1 (AAGIGILTV) o gp-100 (KTWGQYWQV) conjugados con PE (ficoeritrina) o APC (aloficocianina) respectivamente. El procedimiento de tinción se realizó a 37°C por 15 minutos y se colocó inmediatamente en hielo. Luego, las muestras fueron incubadas con anti-CD8 FITC (BD Biosciences, San Jose CA) a 4°C durante 40 minutos adicionales y se analizaron mediante FACS. Los controles positivos se realizaron con clones CTL (HLA A*0201 restrictos) específicos para los antígenos MART-1 (M27: AAGIGILTV) y

gp100 (G154: KTWGQYWQV) expandidos en ciclos de 14 días en medio RPMI en presencia de anticuerpos anti-CD3 (OKT-3, BD Biosciences) a 30 ng/ml y series de IL-2 (Chiron BV) a 300 UI/ml cada 3 días, más 10% suero AB humano inactivado y antibióticos. Los controles negativos se realizaron con muestras de PBMC de dadores HLA-A0201 sanos.

Determinación de la respuesta humoral:

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

Se prepararon extractos proteicos a partir de las líneas celulares Apo-Nec de la invención. Los pellets celulares se congelaron a -80°C, se descongelaron y se trataron durante 20 min a 4 °C con buffer de lisis (50 mM Tris-ClH pH7.5, 1% de NP40, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA y 1 mM de PMSF). La suspensión fue homogeneizada con un Polytron (Brinkmann Instruments, USA) y fue centrifugada

139

durante 40 min a 10.000 g. Se conservó el sobrenadante en alícuotas congeladas a -20 °C. La concentración proteica se midió según el método de Lowry. Se prepararon de la misma forma extractos proteicos de la línea celular de carcinoma de mama humano IIB-BR-G.

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

Análisis histopatológicos de las metástasis de melanoma:

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CONICET

Mordoh, José

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

<130> CONICET

<160> 20

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> CEBADOR GP100 5'-3'

<400> 1

gcttggtgtc tcaaggcaac t 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador Gp100 antisentido

<400> 2

ctccaggtaa gtatgagtga c 21

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

141

<213> Artificial

<220>

<223> cebador MART-1 dirección 5'-3'

<400> 3

caagatgccca agagaagatg ctcact

26

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador MART-1 antisentido

<400> 4

gcttgcatTT ttctacacc attcca

26

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador de tirosinasa en sentido 5'-3'

<400> 5

ttggcagatt gtctgtagcc

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

142

<223> cebador de Tirosinasa antisentido

<400> 6

aggcattgtg catgctgctt 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador interno de tirosinasa (nested DNA) en sentido 5'-3'

<400> 7

gtctttatgc aatggaacgc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador interno de Tirosinasa (nested PCR) antisentido

<400> 8

gctatcccag taagtgact 20

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador TRP-2 en sentido 5'-3'

<400> 9

743

gagtggtccc tacatcctac g 21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador TRP-2 antisentido

<400> 10

gcgtcctggt cctaataatg t 21

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador MAGE-1 en sentido 5'-3'

<400> 11

gagtcctcag ggagcctcc 19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador de MAGE-1 antisentido

<400> 12

ttgccgaaga tctcaggaaa 20

144

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador NY-ESO-1 en sentido 5'-3'

<400> 13

agccgcctgc ttgagttcta cctc

24

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador NY-ESO-1 antisentido

<400> 14

agggaaagct gctggagaca g

21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador de MDR-1 en sentido 5'-3'

<400> 15

tccaagaagc cctggacaaa g

21

MS

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador de MDR-1 antisentido

<400> 16

ttgatgatgt ctctcactct gttcc 25

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador de MIA en sentido 5'-3'

<400> 17

catgcatgcg gtcctatgcc caagctg 27

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador de MIA antisentido

<400> 18

gataagcttt cactggcagt agaaatc 27

<210> 19

746

<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> cebador de beta-actina en sentido 5'-3'
<400> 19
atgtttgaga ccttcaacac ccc 23

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> cebador de beta-actina antisentido
<400> 20
gccatctctt gctogaagtc cag 23

747

- REIVINDICACIONES -

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Una línea celular de melanoma humano para el tratamiento de enfermedades malignas caracterizada porque dicha línea celular es seleccionada del grupo comprendido por (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) y (e) sub-poblaciones de las mismas.

2. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque es la línea celular Mel-XY1 depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830.

3. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque es la línea celular Mel-XY2 depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831.

148

4. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque es la línea celular Mel-XY3 depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832.

5. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque es la línea celular Mel-XX4 depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829.

6. La línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque dicha línea celular ha sido irradiada y es incapaz de proliferar.

7. La línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6, caracterizada porque dicha línea celular comprende una población de células con fenotipo apoptótico.

8. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque la población de células apoptóticas comprende una cantidad de entre un 35% y 60% de dichas células.

9. La línea celular de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6, caracterizada porque dicha línea celular comprende una población de células con fenotipo necrótico.

10. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque la población de células necróticas comprende una cantidad de entre un 10% y 25% de dichas células.

11. La línea celular de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la subpoblación

549

comprende células de melanoma humano capaces de formar colonias en agar blando.

12. Una composición para el tratamiento del melanoma, caracterizada porque comprende al menos una línea celular de melanoma alogeneica seleccionada del grupo comprendido (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) y combinaciones de las mismas, en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar.

13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque comprende además excipientes, adyuvantes e inmunomodificadores.

14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque el adyuvante es BCG.

15. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque el inmunomodificador es seleccionado del grupo comprendido por GM-CSF, G-CSF, IFN α , ciclofosfamida y mezclas de los mismos.

16. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque dicha línea celular ha sido irradiada.

153

17. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque dicha línea celular comprende una población de células con fenotipo apoptótico.

18. La composición de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizada porque la población de células apoptóticas comprende una cantidad de entre un 35% y 60% de dichas células.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque dicha línea celular comprende una población de células con fenotipo necrótico.

20. La composición de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizada porque la población de células necróticas comprende una cantidad de entre un 10% y 25% de dichas células.

21. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque comprende al menos una combinación de las líneas celulares de melanoma alogeneicas (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar.

151

22. La composición de acuerdo con la reivindicación 21, caracterizada porque comprende además excipientes, adyuvantes e inmunomodificadores.

23. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizada porque comprende al menos una combinación de las líneas celulares de melanoma alogeneicas (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831) y (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar.

24. La composición de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizada porque comprende además excipientes, adyuvantes e inmunomodificadores.

25. Una composición para el tratamiento adyuvante del melanoma caracterizada porque comprende al menos una línea celular de melanoma alogeneica seleccionada del grupo comprendido (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell

Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829) y combinaciones de las mismas.

26. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizada porque dicha línea celular ha sido irradiada y es incapaz de proliferar.

27. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizada porque dicha línea celular comprende una población de células con fenotipo apoptótico.

28. La composición de acuerdo con la reivindicación 27, caracterizada porque la población de células apoptóticas comprende una cantidad de entre un 35% y 60% de dichas células.

29. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizada porque dicha línea celular comprende una población de células con fenotipo necrótico.

30. La composición de acuerdo con la reivindicación 29, caracterizada porque la población de células necróticas se encuentra en una cantidad de entre un 10% y 25%.

31. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizada porque comprende además excipientes, adyuvantes e inmunomodificadores.

32. La composición de acuerdo con la reivindicación 31, caracterizada porque el adyuvante es BCG.

33. La composición de acuerdo con la reivindicación 31, caracterizada porque el inmunomodificador es seleccionado del grupo comprendido por GM-CSF, G-CSF, IFN α , ciclofosfamida y mezclas de los mismos.

34. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizada porque comprende al menos una mezcla de

las líneas celulares de melanoma alogeneicas (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar.

35. La composición de acuerdo con la reivindicación 34, caracterizada porque comprende además excipientes, adyuvantes y inmunomodificadores.

36. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizada porque comprende al menos una mezcla de las líneas celulares de melanoma alogeneicas (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831) y (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), en donde dichas líneas celulares han sido irradiadas y son incapaces de proliferar.

37. La composición de acuerdo con la reivindicación 36, caracterizada porque comprende además excipientes, adyuvantes e inmunomodificadores.

38. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, caracterizada porque se emplea como tratamiento adyuvante en combinación con tratamientos seleccionados del grupo comprendido por cirugía, radioterapia, quimioterapia, bioquimioterapia e inmunoterapia.

39. Una composición para el tratamiento de melanomas humanos caracterizada porque comprende células dendríticas autólogas maduras, células dendríticas autólogas cargadas con células de al menos una línea celular de melanoma humano heterólogo, células apoptóticas de dicha al menos una línea celular de melanoma humano heterólogo y células necróticas de dicha al menos una línea celular de melanoma humano heterólogo.

40. La composición de acuerdo con la reivindicación 39, caracterizada porque la línea celular de melanoma humano es seleccionada del grupo comprendido por (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832), (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), (e) subpoblaciones de las mismas y combinaciones de (a) a (d).

41. La composición de acuerdo con la reivindicación 39, caracterizada porque las células dendríticas maduras tienen el fenotipo CD14⁻, CD11c⁺, CD1a⁺ y CD83^{alto}.

155

42. La composición de acuerdo con la reivindicación 39, caracterizada porque comprende además excipientes, adyuvantes e inmunomodificadores.

43. Una composición para el tratamiento adyuvante de melanomas humanos, caracterizada porque comprende células dendríticas maduras, células dendríticas cargadas con células de al menos una línea celular de melanoma humano heterólogo, células apoptóticas de una línea celular de melanoma humano heterólogo y células necróticas de una línea celular de melanoma humano heterólogo.

44. La composición de acuerdo con la reivindicación 43, caracterizada porque la línea celular es seleccionada del grupo comprendido por (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832); (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), (e) subpoblaciones de las mismas y combinaciones de (a) a (d).

45. La composición de acuerdo con la reivindicación 43, caracterizada porque las células dendríticas maduras tienen el fenotipo CD14⁻, CD11c⁺, CD1a⁺ y CD83^{alto}.

46. La composición de acuerdo con la reivindicación 43, caracterizada porque comprende además excipientes, adyuvantes e inmunomodificadores.

756

47. La composición de acuerdo con la reivindicación 43 caracterizada porque dicha composición se emplea como tratamiento adyuvante en combinación con tratamientos seleccionados del grupo comprendido por cirugía, radioterapia, quimioterapia, bioquimioterapia e inmunoterapia.

48. Un procedimiento para la preparación de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12, 21, 23, 25, 34 o 36 caracterizado por las etapas de:

- a) descongelar y cultivar las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831) y (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832);
- b) mezclar dichas tres líneas celulares;
- c) irradiar dichas tres líneas celulares;
- d) agregar a la mezcla de líneas celulares adyuvantes y excipientes.

49. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 48, caracterizado porque las células son irradiadas a un valor de entre 50 y 100 Gy.

50. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 48, caracterizado porque el adyuvante es BCG.

157

51. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 48, caracterizado porque en la etapa d) se agrega además un inmunomodificador.

52. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 51, caracterizado porque el inmunomodificador es seleccionado del grupo comprendido por GM-CSF, G-CSF, IFN α , ciclofosfamida y mezclas de los mismos.

53. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 48, caracterizado porque la etapa a) comprende además a la línea Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829)

54. Un procedimiento para preparar la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 o 43, caracterizado porque comprende las etapas de:

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

b) mezclar dichas líneas celulares;

c) irradiar dichas líneas celulares;

- d) obtener células dendríticas autólogas; y
- e) co-cultivar durante un tiempo las células dendríticas autólogas con las líneas celulares irradiadas de la etapa c).

55. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 54, caracterizado porque las células son irradiadas a un valor de entre 50 y 100 Gy.

56. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 54, caracterizado porque el co-cultivo se lleva a cabo a una temperatura de entre 35 y 39°C y durante un tiempo de entre 6 y 72 horas.

57. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 54, caracterizado porque en la etapa e) la relación entre células dendríticas autólogas y las líneas celulares es desde 1:1 a 3:1.

58. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 54, caracterizado porque las células dendríticas de la etapa e) comprenden células dendríticas inmaduras.

59. Un método para inducir una respuesta inmune anti-tumoral en pacientes que portan melanoma caracterizado porque comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de una combinación de las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831) y (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ

15a

bajo el número de acceso DSM ACC2832), en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar.

60. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 59, caracterizado porque se administra de forma intradérmica.

61. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 59, caracterizado porque se administra conjuntamente con un adyuvante.

62. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 61, caracterizado porque el adyuvante es BCG en una cantidad entre 0,1 y 2×10^6 unidades formadoras de colonias por dosis de aplicación.

63. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 59, caracterizado porque se administra conjuntamente con un inmunomodulador.

64. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 63, caracterizado porque el inmunomodulador es GM-CSF en una cantidad de entre 100 y 600 μg por dosis de aplicación.

65. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 59, caracterizado por la cantidad efectiva de células comprende entre 5 y 50×10^6 de la combinación de células.

66. Un método para inducir una respuesta inmune anti-tumoral en pacientes que portan melanoma caracterizado porque comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de una combinación de las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de

160

acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar.

67. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 66, caracterizado porque se administra de forma intradérmica.

68. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 66, caracterizado porque se administra conjuntamente con un adyuvante.

69. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 66, caracterizado porque el adyuvante es BCG en una cantidad entre 0,1 y 2×10^6 unidades formadoras de colonias por dosis de aplicación.

70. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 66, caracterizado porque se administra conjuntamente con un inmunomodulador.

71. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 66, caracterizado porque el inmunomodulador es GM-CSF en una 100 y 600 μg por dosis de aplicación.

72. El método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 66, caracterizado porque la cantidad efectiva de células comprende entre 5 y 50×10^6 de la combinación de células.

161

73. Un método para inducir una respuesta inmune anti-tumoral en pacientes que portan melanoma caracterizado porque comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de un co-cultivo de entre 6 y 72 horas de células dendríticas autólogas y una combinación de las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829), en donde dichas líneas celulares son incapaces de proliferar.

74. El método de acuerdo con la reivindicación 73, caracterizado porque las células dendríticas autólogas al inicio del co-cultivo son células dendríticas inmaduras y al finalizar el co-cultivo son una mezcla de células dendríticas autólogas maduras y células dendríticas autólogas cargadas con las líneas celulares (a) Mel-XY1 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2830), (b) Mel-XY2 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2831), (c) Mel-XY3 (depositada en German Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2832) y (d) Mel-XX4 (depositada en German

162

Collection of Microorganisms and Cell Cultures DSMZ bajo el número de acceso DSM ACC2829).

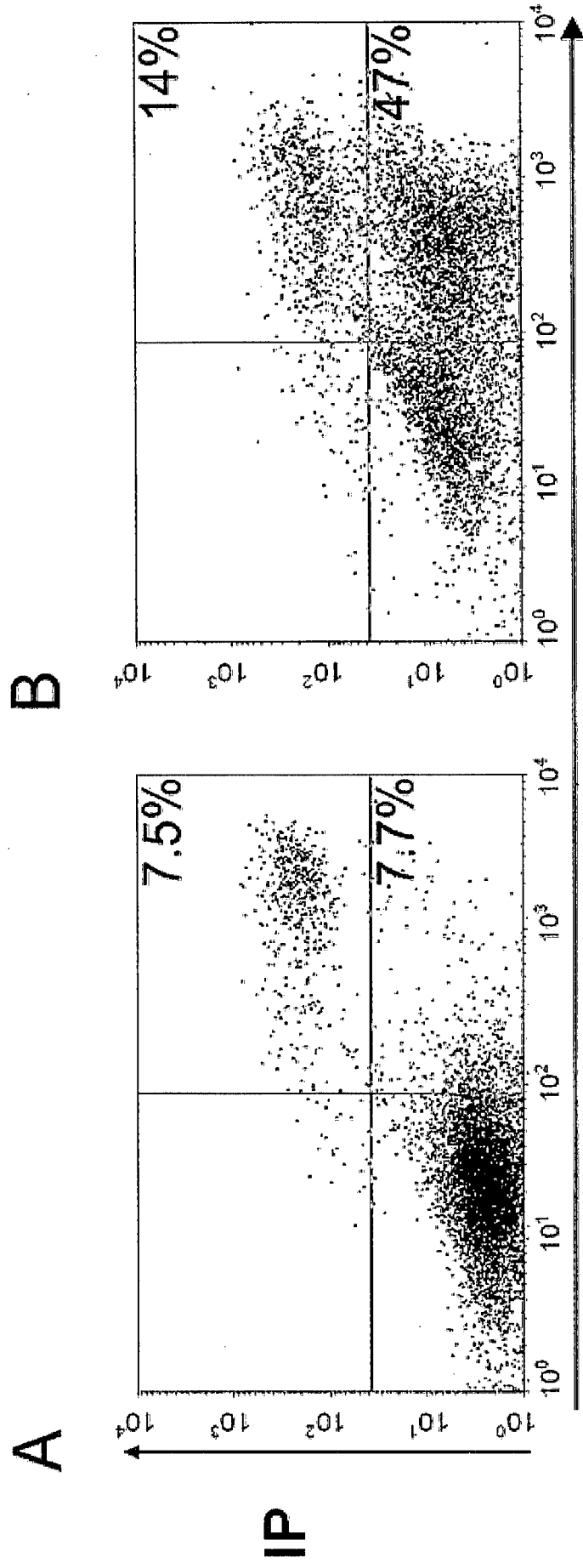
75. El método de acuerdo con la reivindicación 73, caracterizado porque al finalizar el co-cultivo las células de cada línea celular comprenden una mezcla de poblaciones de células apoptóticas y poblaciones de células necróticas.

76. El método de acuerdo con la reivindicación 73, caracterizado porque se administra en forma intradérmica.

77. El método de acuerdo con la reivindicación 73, caracterizado porque la cantidad efectiva de células del co-cultivo comprende entre 5 y 50×10^6 células totales.

RESUMEN

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



Anexina -V

Figura 1

KA

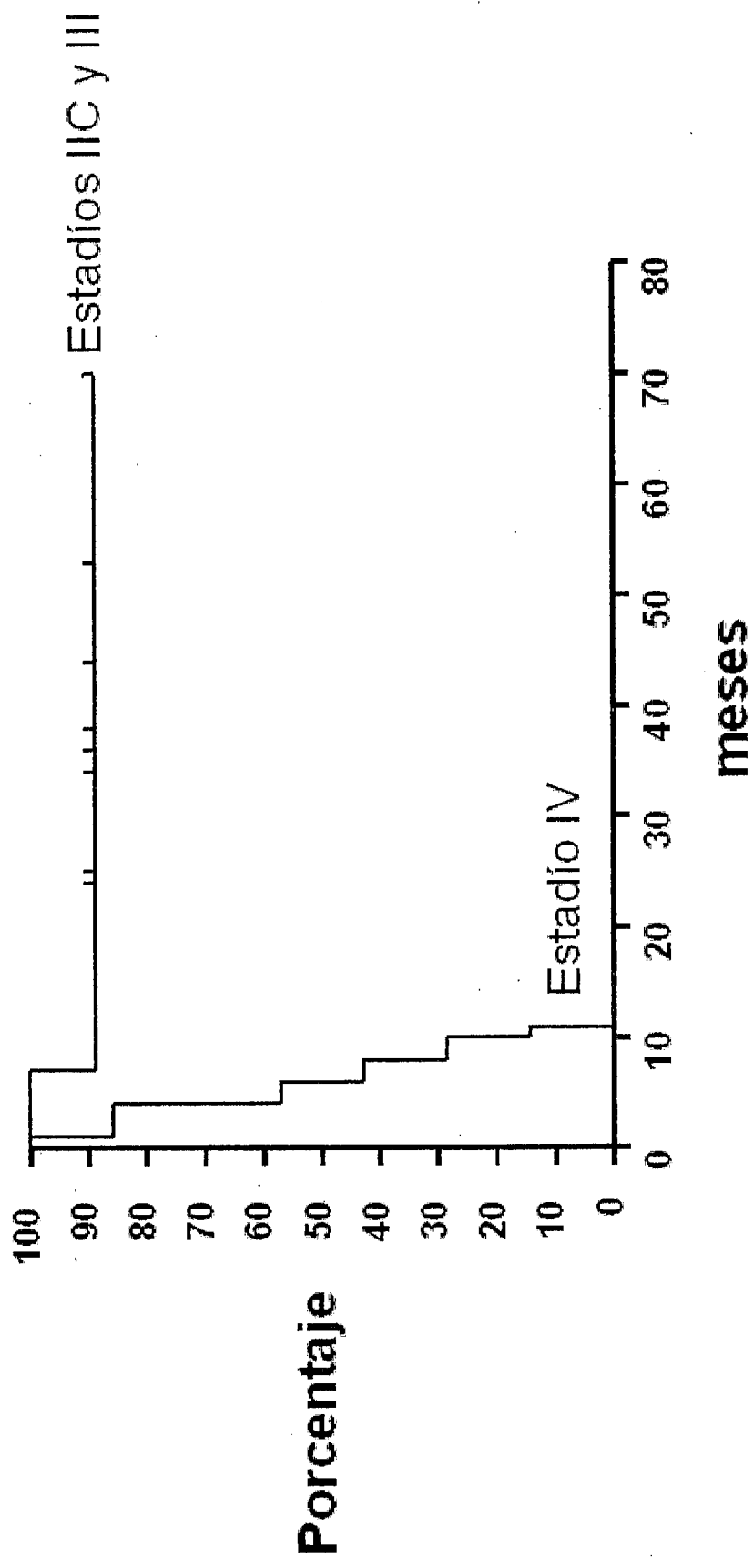


Figura 2

165-

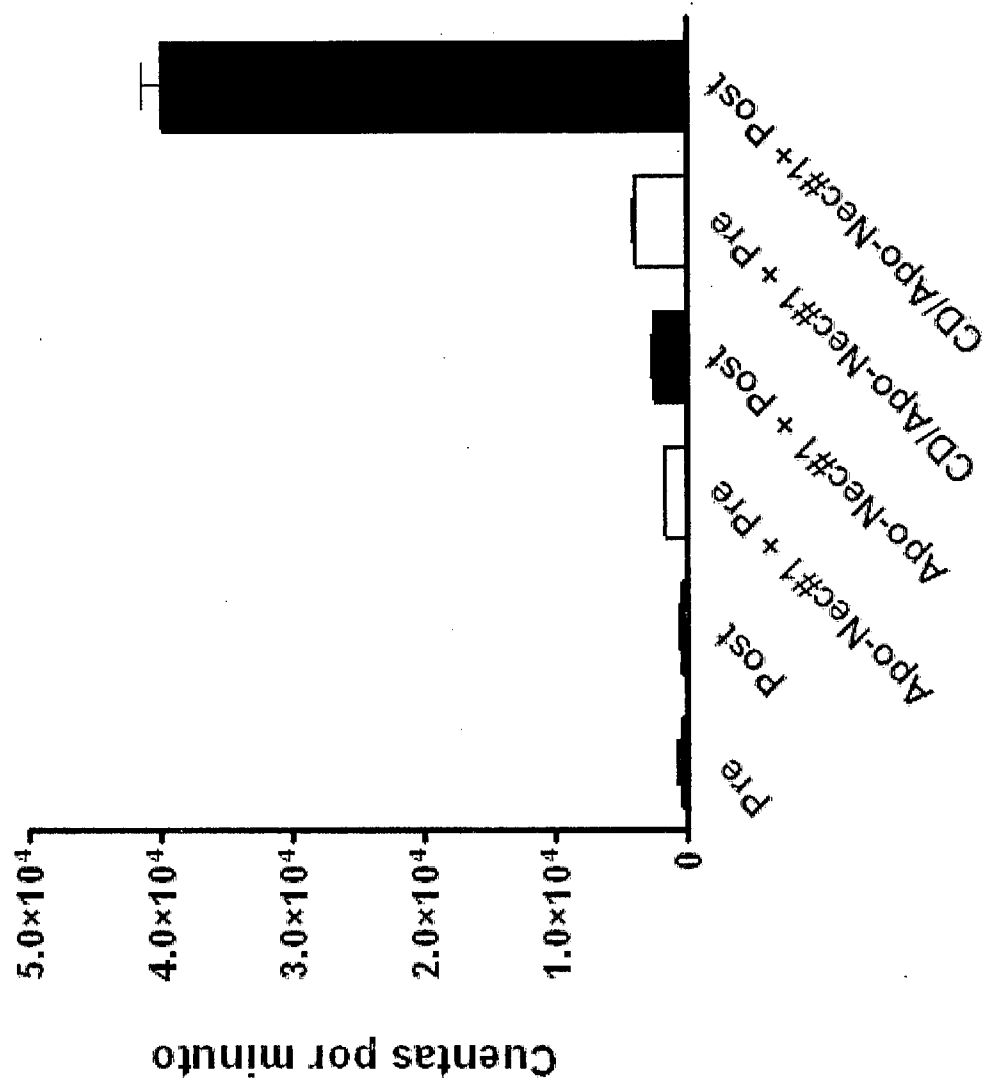


Figura 3

A

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

B

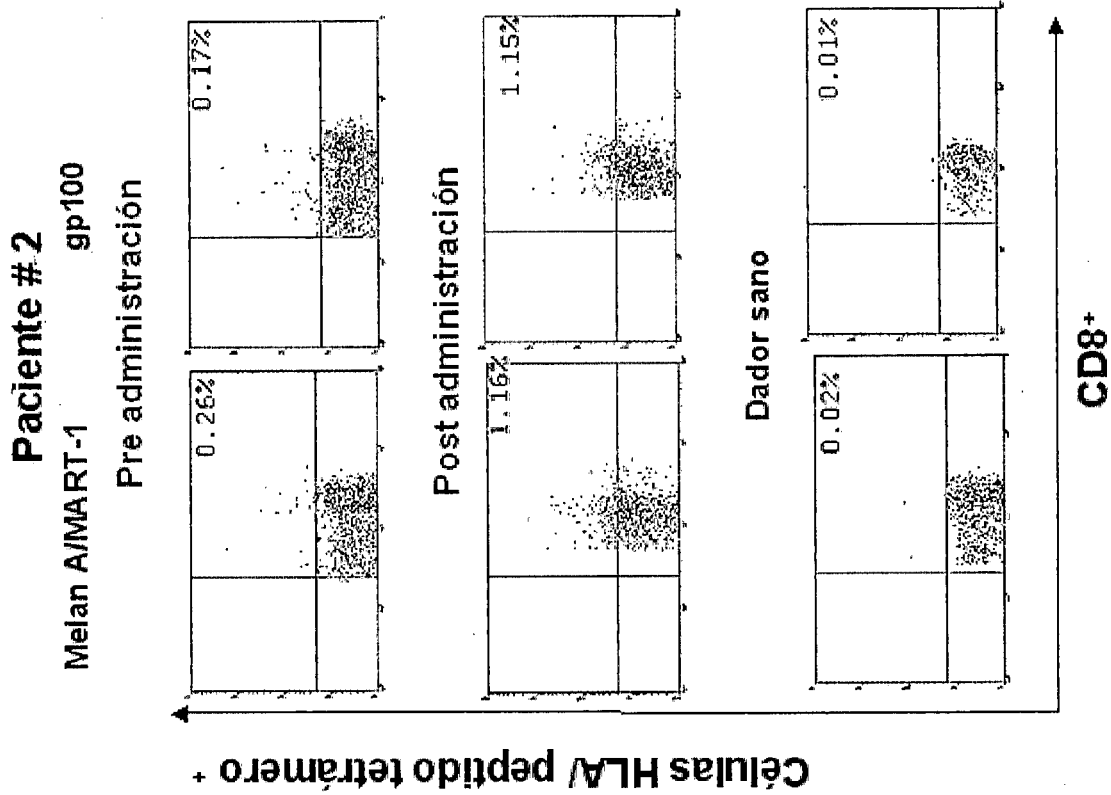


Figura 4

167

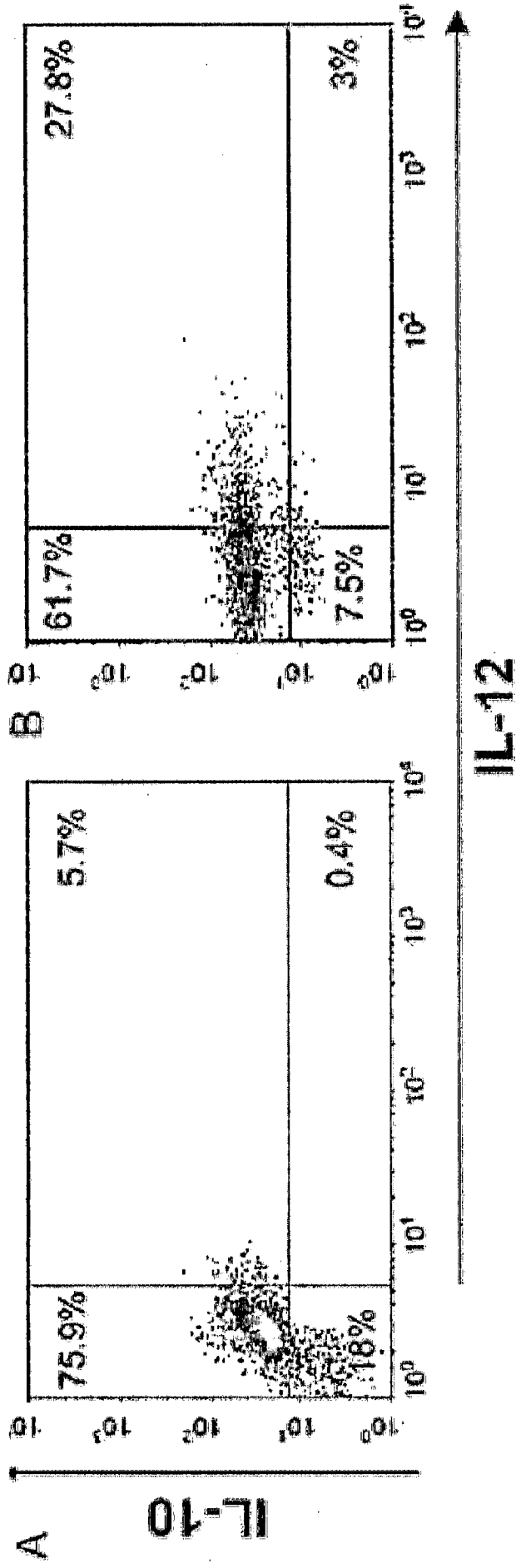


Figura 5

869

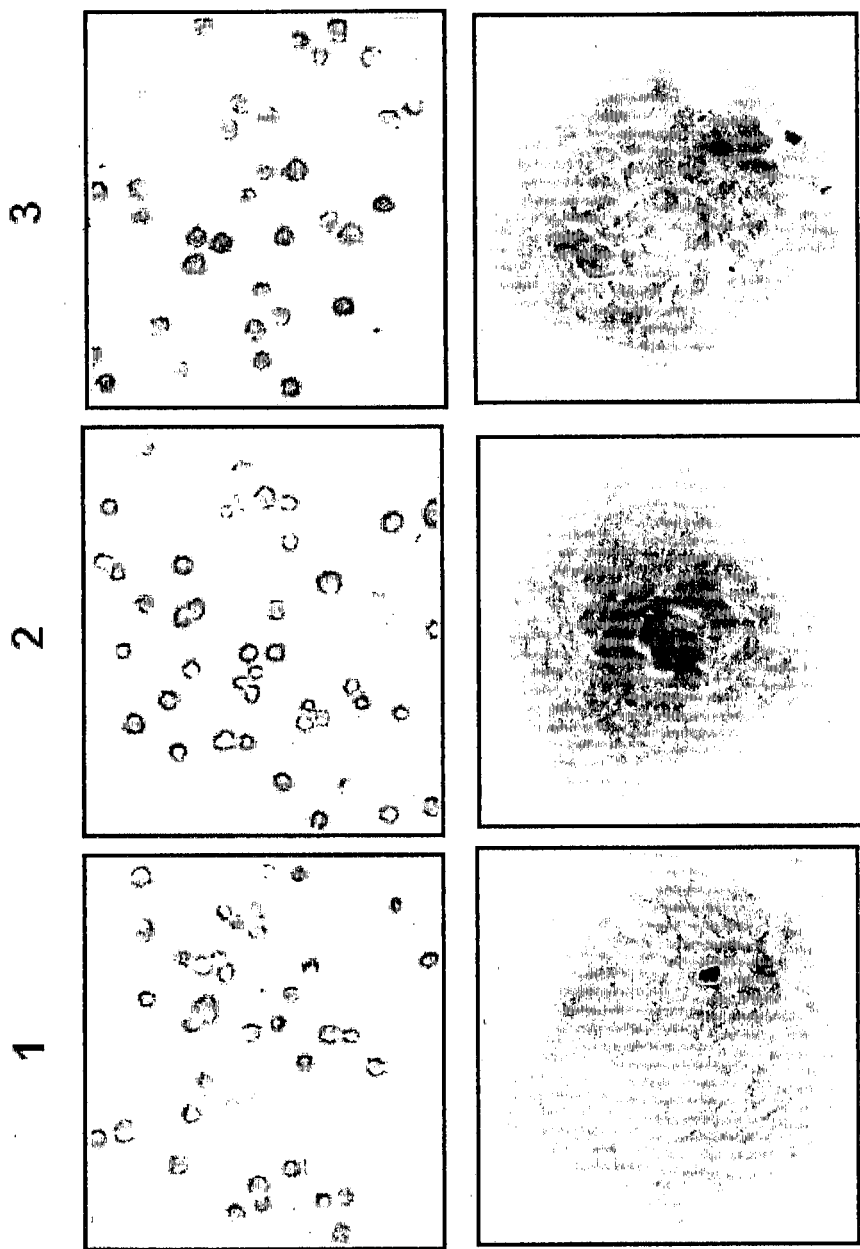


Figura 6

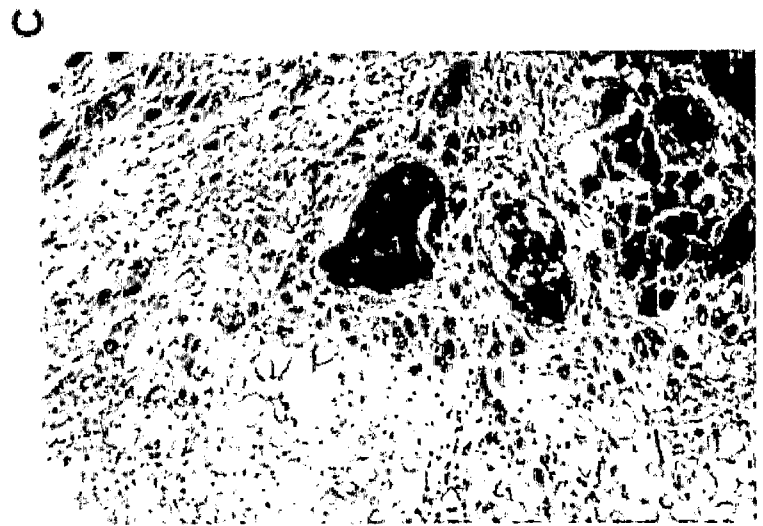
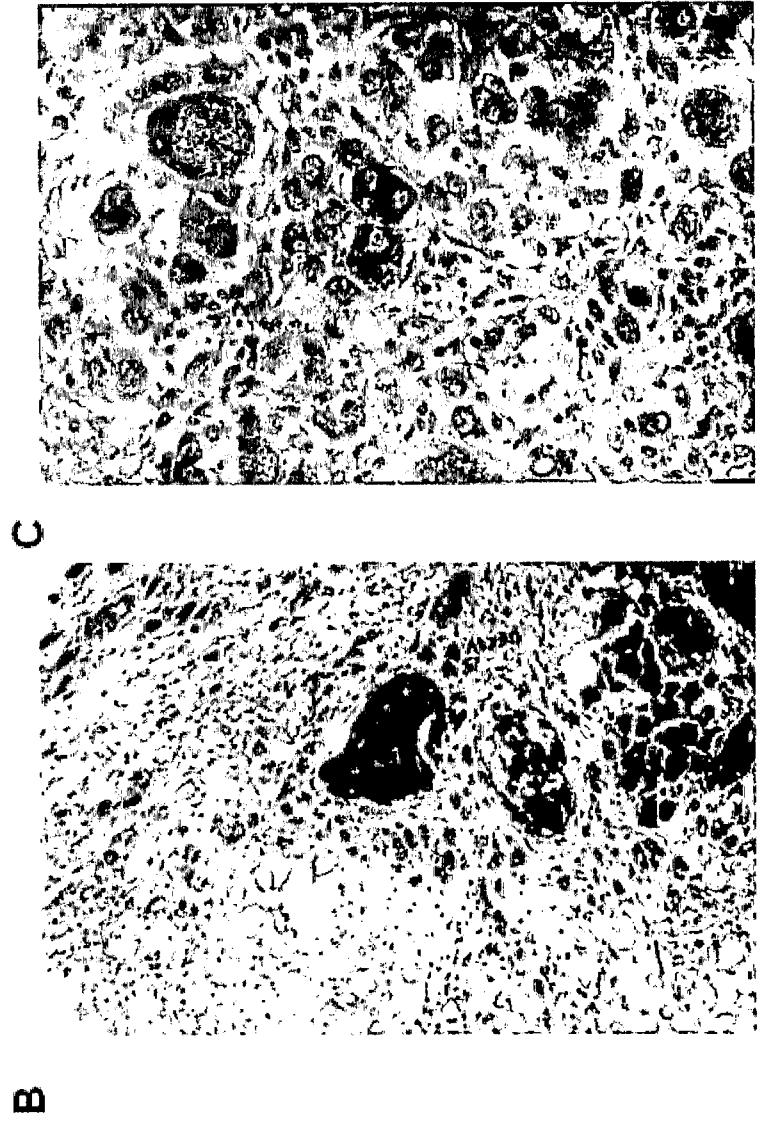


Figura 7

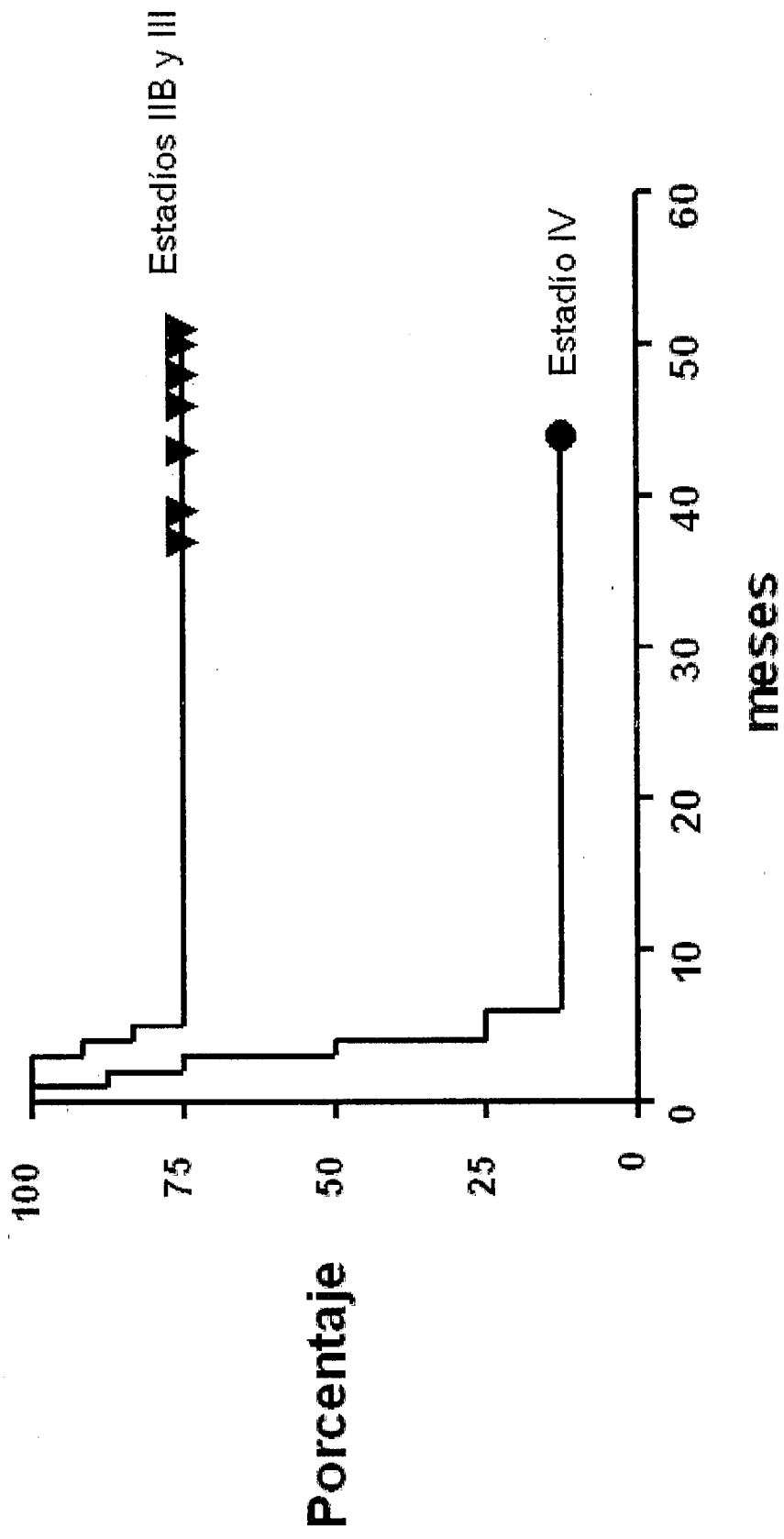


Figura 8

172

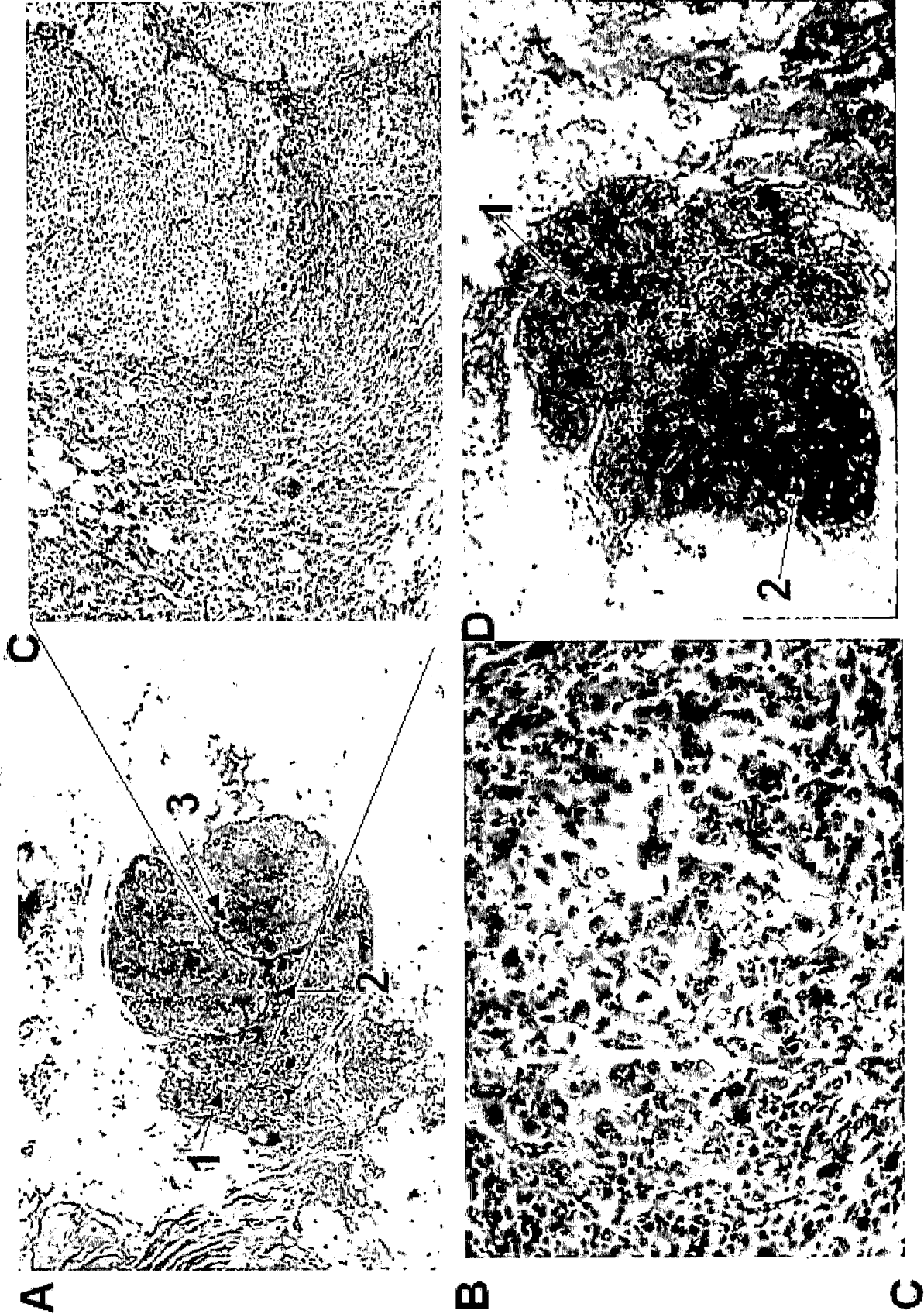


Figura 9

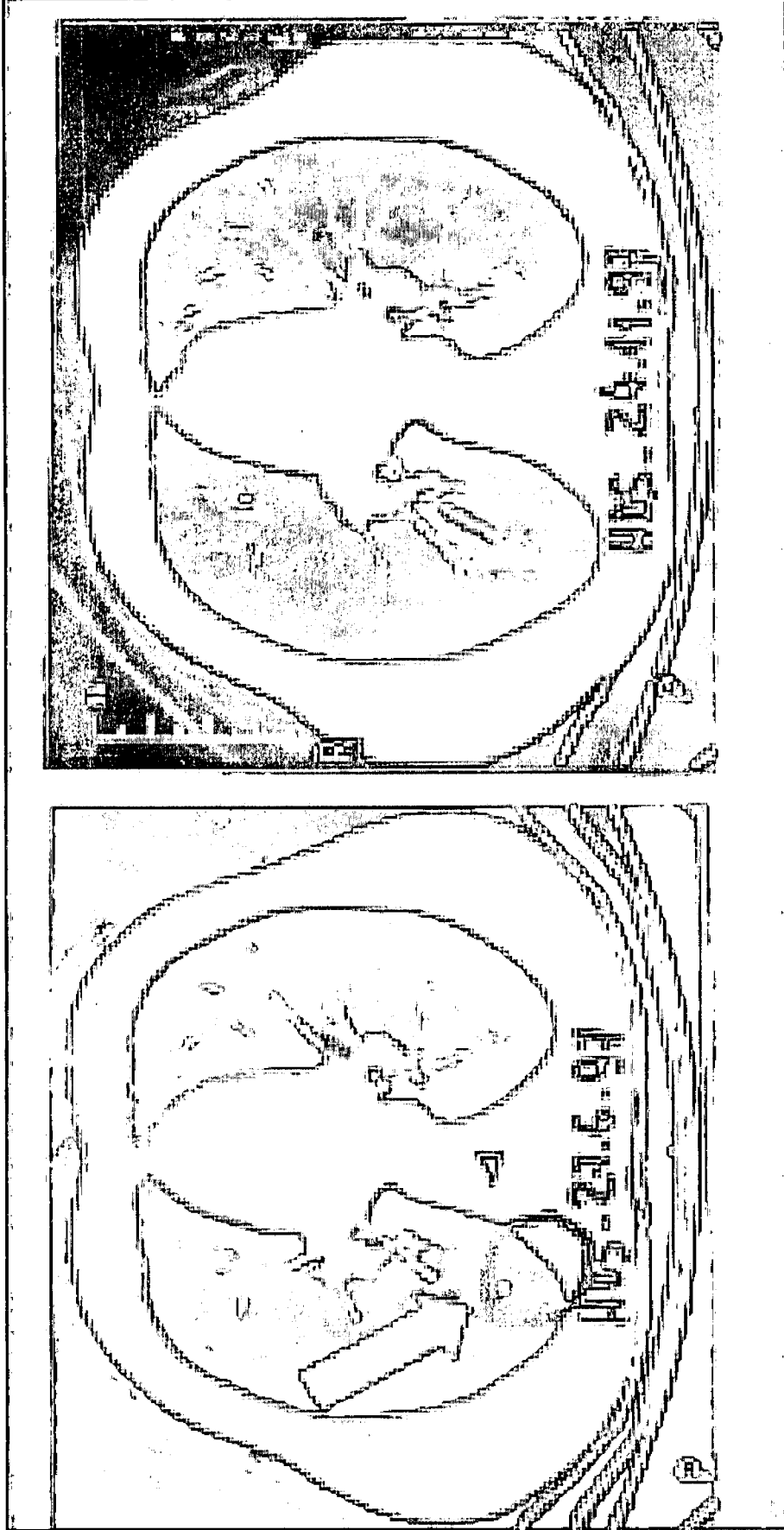


Figura 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2008/051385

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	LESTERHUIS ET AL: "Dendritic cell vaccines in melanoma: From promise to proof?" CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY / HEMATOLOGY, ELSEVIER SCIENCE IRELAND LTD., LIMERICK, IE, vol. 66, no. 2, 8 February 2008 (2008-02-08), pages 118-134, XP022575954 ISSN: 1040-8428 the whole document ----- -/--	1-77

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 2008

Date of mailing of the international search report

23/10/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Friedrich, Christof

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2008/051385

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	VON EUW ERIKA M ET AL: "Monocyte-derived dendritic cells loaded with a mixture of apoptotic/necrotic melanoma cells efficiently cross-present gp100 and MART-1 antigens to specific CD8+ T lymphocytes" JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 5, no. 1, 20 April 2007 (2007-04-20), page 19. XP021024930 ISSN: 1479-5876 the whole document	39,43
P,X	VON EUW ERIKA M ET AL: "Vaccination of melanoma patients with dendritic cells loaded with a mixture of allogeneic apoptotic/necrotic melanoma cells: a phase I clinical study." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 48, April 2007 (2007-04), page 441, XP001538653 & 98TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; LOS ANGELES, CA, USA; APRIL 14 -18, 2007 ISSN: 0197-016X the whole document	39,43
X	THUMANN P ET AL: "Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 277, no. 1-2, 1 June 2003 (2003-06-01), pages 1-16, XP004430542 ISSN: 0022-1759 page 6, column 1, paragraph 2 - page 7, column 1, paragraph 1; figures 2,5 paragraphs [02.5], [02.6]	39,43
X	LONGHI PAULA ET AL: "Preclinical studies of a human vaccine based on dendritic cells loaded with apoptotic/necrotic melanoma cells." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 45, March 2004 (2004-03), page 292, XP001538633 & 95TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH; ORLANDO, FL, USA; MARCH 27 -31, 2004 ISSN: 0197-016X the whole document	39,43

-/--

176

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/051385

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOLDSZMID ROMINA S ET AL: "Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 171, no. 11, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 5940-5947, XP002497573 ISSN: 0022-1767 page 5941, column 1 -----	39,43
Y	WO 01/28583 A (ST VINCENT S HOSPITAL AND MEDI [US]) 26 April 2001 (2001-04-26) page 24 -----	1-77
Y	WO 02/053176 A (HADASIT MED RES SERVICE [IL]; LOTEM MICHAL [IL]; PERETZ TAMAR [IL]; SH) 11 July 2002 (2002-07-11) pages 42-43; claims 1-5 -----	1-77
Y	WO 02/22648 A (ORTHO MCNEIL PHARM INC [US]) 21 March 2002 (2002-03-21) page 3 -----	1-77
Y	ALBERT M L ET AL: "IMMATURE DENDRITIC CELLS PHAGOCYTOSE APOPTOTIC CELLS VIA ALPHA V BETA 5 AND CD36, AND CROSS-PRESENT ANTIGENS TO CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, JP, vol. 188, no. 7, 5 October 1998 (1998-10-05), pages 1359-1368, XP000906793 ISSN: 0022-1007 the whole document -----	1-77
Y	ALBERT MATTHEW L ET AL: "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs" NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, LONDON, UK, vol. 392, no. 6671, 5 March 1998 (1998-03-05), pages 86-89, XP002154749 ISSN: 0028-0836 the whole document -----	1-77
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2008/051385

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TOBIASOVA ET AL: "In vitro assessment of dendritic cells pulsed with apoptotic tumor cells as a vaccine for ovarian cancer patients" CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 122, no. 1, 16 December 2006 (2006-12-16), pages 18-27, XP005725448 ISSN: 1521-6616 the whole document	1-77
Y	SHILYANSKY ET AL: "Induction of cytolytic T lymphocytes against pediatric solid tumors in vitro using autologous dendritic cells pulsed with necrotic primary tumor" JOURNAL OF PEDIATRIC SURGERY, W. B. SAUNDERS COMPANY, US, vol. 42, no. 1, 17 January 2007 (2007-01-17), pages 54-61, XP005821074 ISSN: 0022-3468 the whole document	1-77
Y	RÖHN TILL A. ET AL: "Melanoma cell necrosis facilitates transfer of specific sets of antigens onto MHC class II molecules of dendritic cells." EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY OCT 2005, vol. 35, no. 10, October 2005 (2005-10), pages 2826-2839, XP002497574 ISSN: 0014-2980 the whole document	1-77
A	BARRIO MARIA M ET AL: "A phase I study of an allogeneic cell vaccine (VACCIMEL) with GM-CSF in melanoma patients" JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 29, no. 4, July 2006 (2006-07), pages 444-454, XP009106300 ISSN: 1524-9557 the whole document	1-77
A	YOUNG ET AL: "Dendritic Cells in Transplantation and Immune-Based Therapies" BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, KLUGE CARDEN JENNINGS PUBLISHING, CHARLOTTESVILLE, VA, US, vol. 13, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 23-32, XP022184525 ISSN: 1083-8791 the whole document	1-77
	----- -/--	

178

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2008/051385

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/072013 A (BAYLOR RES INST [US]; BANCHEREAU JACQUES F [US]; PALUCKA ANNA KAROLINA) 19 September 2002 (2002-09-19) the whole document -----	1-77

179

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2008/051385

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0128583	A	26-04-2001	NONE	
WO 02053176	A	11-07-2002	AU 2002219485 A1	16-07-2002
WO 0222648	A	21-03-2002	AT 371017 T	15-09-2007
			AU 8886301 A	26-03-2002
			CA 2422454 A1	21-03-2002
			DE 60130130 T2	15-05-2008
			DK 1326961 T3	07-01-2008
			EP 1326961 A2	16-07-2003
			ES 2292619 T3	16-03-2008
			JP 2004512030 T	22-04-2004
WO 02072013	A	19-09-2002	CA 2440229 A1	19-09-2002
			EP 1390064 A2	25-02-2004
			JP 2004536787 T	09-12-2004

180

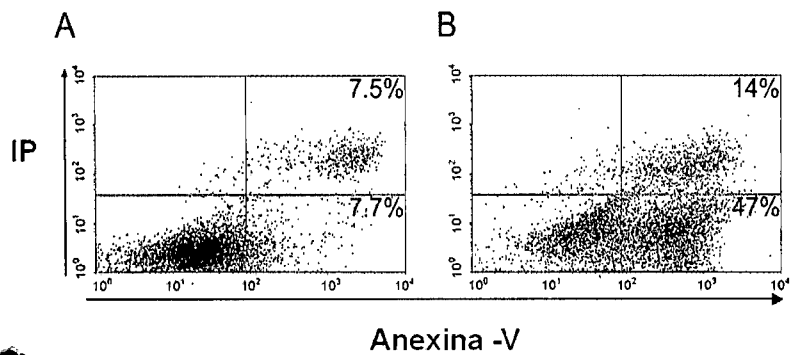


Figura 1

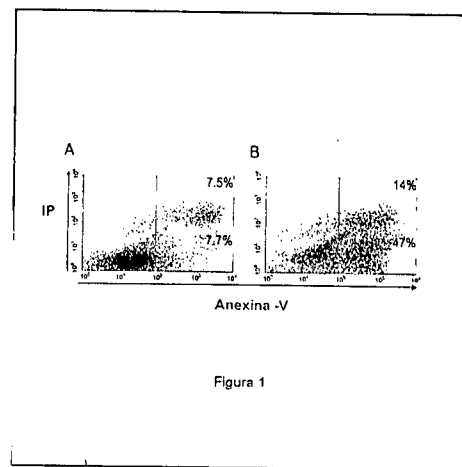


Figura 1

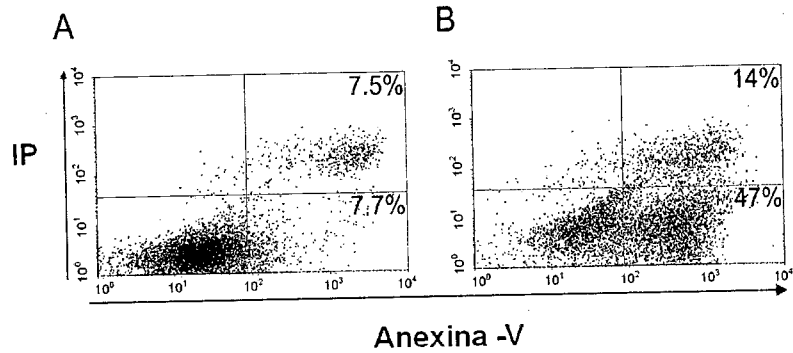


Figura 1

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 80,209
FECHA : OCTUBRE 26 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-121156- -00000-0000

Fecha: 2009-10-28 10:01:12 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 185

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130928151	26/10/2009	29,860,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO	
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	*** TASA ANUAL C.RECARGO A#DS 17 a 30	1,090,000.00

TOTAL : \$ 1,090,000.00

SON: UN MILLON NOVENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

colo: 17293-841 - 001-3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 78,678

FECHA : OCTUBRE 19 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-121156- -00000-0000

Fecha: 2009-10-28 10:01:12 Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION Folios: 185

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130928162	19/10/2009	47,325,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
3		PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS	688,000.00
		TOTAL :	\$ 688,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 17293 - 841 - 001 - 3,

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 54,948
FECHA : JULIO 27 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-121156-00000-0000

Fecha: 2009-10-28 10:01:12 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 185

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	128402573	27/07/2009	34,414,220.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	86 EXAMEN DE PATENTABILIDAD DE MODEL	302,000.00
	TOTAL :	\$ 302,000.00

SON: TRESCIENTOS DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

000-17293-841-001-3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 78,580

FECHA : OCTUBRE 19 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-121156-00000-0000

Fecha: 2009-10-28 10:01:12 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 185

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130928162	19/10/2009	47,325,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21 CERTIFICACIONES
			12,000.00
TOTAL :			\$ 12,000.00

SON: DOCE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 17293-841-001-3

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

[Handwritten mark]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Descripción de la invención
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

☒
☒
☒
☒
☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

[Handwritten signature]
Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-121156- -00000-0000

Fecha: 2009-10-28 10:01:12 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 185

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



Bogotá,
2020

187

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

REFERENCIA	Radicación No.	9 121156
	Solicitud internacional	PCT/IB2008/051385
	Fecha inicio fase nacional	11/11/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	14357

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

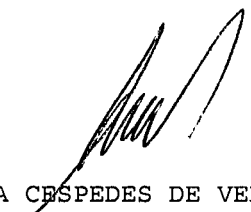
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.: 9 121156

188


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 11 DIC. 2009
adpall