



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 223**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07712123 .4**
96 Fecha de presentación : **26.01.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1993595**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.11.2008**

54 Título: **Vacuna contra tumores que comprende células tumorales alogénicas o xenogénicas.**

30 Prioridad: **26.01.2006 GB 0601598**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.05.2011

73 Titular/es: **Apostolos Stathopoulos**
17, rue Belle-Vue
4974 Dippach, LU

72 Inventor/es: **Stathopoulos, Apostolos**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 223 T3

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

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

Esta invención se refiere al tratamiento de tumores. En particular, esta invención se refiere al tratamiento de los tumores mediado inmunológicamente.

5 Antecedentes de la invención

10 El sistema inmunitario consiste en dos ramas, que aunque separadas por velocidad y especificidad, están intrínsecamente ligadas, creando una respuesta rápida y directa frente a las agresiones tanto endógenas como exógenas^{16,21}. El sistema inmunitario innato proporciona una defensa inmediata del hospedante frente a las agresiones físicas, químicas y microbiológicas^{16,21}. Dicho sistema involucra a los neutrófilos, monocitos, macrófagos, complemento, citocinas y proteínas en fase aguda^{16,21}. A pesar de la falta de especificidad de antígeno, el sistema inmunitario innato es capaz de reconocer los péptidos propios de los péptidos no propios, extraños^{16,21}. La inmunidad adaptativa, sin embargo, implica a los linfocitos B y T en una respuesta altamente específica dirigida al antígeno^{16,21}. Una ventaja de la inmunidad adaptativa es la memoria inmunitaria potencial, que lleva a una respuesta más fuerte y más rápida en posteriores estimulaciones^{8,9}.

15 La característica que define a la inmunidad adaptativa (inmunidad específica) es el uso de los linfocitos B y T que llevan receptores específicos del antígeno, en una respuesta inmunitaria dirigida²¹. Los principales efectores de células T son las células ayudadoras T que llevan receptores CD4, y las células citotóxicas T que llevan receptores CD8^{16,21}. Las células ayudadoras T interactúan con el MHC II, y son responsables de coordinar la respuesta inmunitaria, reconocer antígenos extraños, activar diferentes partes del sistema inmunitario y activar las células B. Las células citotóxicas T interactúan con los receptores MHC I y desempeñan un papel en la organización de una respuesta inmunitaria frente a patógenos exógenos^{16,21}.

20 El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es una región genética que codifica proteínas que desempeñan un papel esencial en la regulación y modulación de la respuesta inmunitaria^{10,18}. Los productos génicos del MHC se dividen en dos grupos separados, basados en la estructura y en las propiedades biológicas: MHC I y MHC II^{10,16}. Los receptores MHC clase I, están presentes en todas las células nucleadas^{10,16}. Estos receptores presentan péptidos sintetizados endógenamente y están íntimamente implicados en su autoidentificación. Los receptores MHC clase II, se encuentran solamente en las células implicadas en las respuestas inmunitarias y presentan proteínas derivadas exógenamente tales como las de producción bacteriana^{10,16}. Clásicamente, se había creído que el MHC I estaba implicado en el rechazo de los tumores, pero más recientemente se ha encontrado que el MHC II desempeña un papel.

25 La diversidad de la unión al antígeno mediante las moléculas de MHC clase I se basa en tres principios básicos e interrelacionados. En primer lugar, las moléculas de clase I tienen la habilidad de unirse a péptidos con muchas secuencias diferentes^{2,16}. Estos complejos de MHC clase I:antígeno pueden ser reconocidos por los linfocitos T citotóxicos (CDS), llevando eventualmente a la destrucción de cualquier célula portadora de una proteína extraña similar^{2,16}. En segundo lugar, cada organismo expresa muchos genes diferentes de clase I^{2,16}. Finalmente, el MHC presenta polimorfismos con un número de alelos en cada locus^{2,16,23}. En los seres humanos, el MHC I está representado en más de un locus denominado el antígeno leucocitario humano (HLA), siendo los locus HLA-A, HLA-B y HLA-C, el más polimórfico de los cuales es HLA-B^{16,23}. Estos factores implican un alto grado de especificidad individual y la necesidad de un regulador que ejerza una presión selectiva: el sistema celular inmunitario.

30 Es este alto grado de especificidad y de anulación de la presión selectiva lo que se explota en el trasplante de órganos y tejidos entre individuos²³. Los gemelos idénticos y los miembros de una familia genéticamente cercanos son menos propensos a rechazar el tejido trasplantado porque tienen locus HLA similares¹⁶. Esto se basa en el hecho de que los MHC I están expresados co-dominantemente y en la mayor parte de los casos se heredan intactos sin recombinación^{16,23}. Por lo tanto, los individuos homocigóticos tales como los gemelos idénticos y las ratas singénicas podrían aceptar teóricamente un tumor cerebral procedente de su donante homocigótico. Aún más críticamente, ellos deberían rechazar un tumor cerebral procedente de un donante heterocigótico basándose en una respuesta inmunitaria específica y dirigida.

35 Como se indicó al principio, los receptores MHC clase I son glucoproteínas de superficie localizadas en la mayoría de las células que desempeñan un papel crucial en la respuesta inmunitaria. Estos MHC clase I se unen a los péptidos antigénicos e interactúan con las células NK y CD8^{5,16,25}. Estos péptidos se derivan de proteínas endógenas degradadas procedentes de células infectadas por virus y tumores^{5,16,25}. La formación del antígeno es un mecanismo complejo que incluye numerosas etapas. Un defecto en cualquiera de estas etapas puede llevar a la no expresión del complejo de MHC clase I:antígeno, y a librarse del reconocimiento y destrucción de las células T¹². La pérdida o desregulación de los complejos MHC I es un mecanismo frecuente para evitar la destrucción procedente de CD8¹². Intuitivamente, se puede asumir que este marcador de "pérdida de lo propio" ("*missing self*")¹⁷ podría llevar a un aumento del reconocimiento por las células NK, que son inhibidas por interactuar con el complejo MHC I, y que son estimuladas por las células con expresión de HLA-2/HA regulada por disminución¹⁸. Incluso con un sistema inmunitario que funcione completamente, es posible que los tumores eludan el reconocimiento mediante el uso de una estrategia de escape elusiva¹². Aunque el mecanismo de escape se entiende difícilmente, algunos experimentos han descrito varios meca-

nismos que permiten que los tumores escapen del reconocimiento por el sistema inmunitario. Estos mecanismos varían desde la pérdida o mutación de los halotipos HLA hasta la falta de receptividad para los interferones¹². Así mientras un cambio o pérdida de los receptores MHC clase I se asocia con la génesis de diferentes tumores, se ha demostrado que la presencia de moléculas de MHC clase I participa en la resistencia al cáncer.

5 Un ejemplo de los efectos anti-tumorígenos de una molécula de MHC clase I está en la vigilancia inmunitaria de la integridad del ADN mitocondrial. En un estudio, uno de los papeles de las moléculas de MHC I fue eliminar las células que llevan una mutación mitocondrial¹³. Las células del glioma humano llevan múltiples mutaciones tanto del ADN mitocondrial como del complejo mitocondrial⁷. A partir de estos datos, es posible asumir que los gliomas del mismo tipo/grado histológico llevarán mutaciones similares en sus ADN y tendrán proteínas de superficie anormales similares asociadas tanto con las moléculas de MHC clase I como con la membrana celular. A la inversa, un sistema inmunitario intacto puede permitir también el desarrollo y progreso de los tumores.

10 Se ha demostrado que el progreso de ciertos cánceres está asociado con la expresión de antígenos específicos del tumor y con una respuesta inmunitaria asociada¹⁵. Por lo tanto, no se puede alcanzar el rechazo eficaz del tumor ni la inmunidad únicamente por la auto-vacunación. A pesar de estas barreras, hay indicios crecientes de que el sistema inmunitario se puede utilizar para combatir el cáncer. Aunque tanto un sistema inmunitario no regulado como un sistema inmunitario que funcione normalmente luchan contra el rechazo inmunitario del cáncer, se han publicado resultados del rechazo espontáneo de tumores malignos^{19,26}. Curiosamente, se ha sugerido también que las enfermedades autoinmunes pueden contribuir a un mejor pronóstico en pacientes con tumores malignos^{6,19}. En estos pacientes, la mayoría de las especificidades IgG identificadas comparten considerable homología con péptidos tanto humanos como microbianos¹⁴. Esto ha llevado a la hipótesis de que el mimetismo molecular puede iniciar la autoinmunidad tumoral observada. Estudios relacionados con esto han demostrado la remisión a largo plazo de tumores malignos de cerebro después de infección intracraneana en cuatro pacientes⁴, y una mejor supervivencia de los pacientes de cáncer con infección microbiana^{20,22}. Esto plantea la cuestión de si se puede usar para tratar tumores la autoinmunidad inducida por mimetismo molecular. De forma importante, se ha demostrado que existe una homología significativa entre las proteínas humanas y las proteínas de otras especies²⁴. Otros experimentos han demostrado que el antígeno xenogénico procedente de células endoteliales puede romper la tolerancia inmunitaria frente a las células endoteliales angiogénicas autólogas²⁰. Esto da a entender que la autotolerancia a los tumores se puede romper mediante la reactividad cruzada con un antígeno homólogo extraño.

25 El documento WO2004/018659 se refiere a métodos de producción de compuestos inmunógenos mediante la lisis de células tumorales necróticas para obtener un lisado. Se describen también los compuestos farmacéuticos que comprenden dichos lisados de células tumorales para uso en la vacunación contra los cánceres.

Sumario de la invención

35 La presente invención se basa en la comprensión de que si dos o más individuos heterocigóticos tienen el mismo cáncer/tumor de un grado histológico similar o del mismo grado, entonces el trasplante de tejidos/células del tumor/cáncer de un individuo (o más individuos) a otro individuo (u otros individuos) no solamente inducirá el rechazo del tejido/cáncer trasplantado, sino que también aumentará la percepción inmunológica del sistema inmunitario frente a los péptidos compartidos entre los tumores/cánceres y otros tumores que tienen péptidos similares. Las células tumorales alogénicas se pueden usar por tanto para vacunar frente a un tumor establecido, reducir su tamaño o eliminarlo y establecer una memoria duradera. Esta técnica no solamente llevará al rechazo eventual del tumor primario, sino que también llevará a una memoria inmunológica duradera, evitando que el organismo desarrolle de nuevo el tumor.

40 Según un primer aspecto de la invención, una composición para el tratamiento o prevención de un tumor en un paciente comprende

(i) células tumorales alogénicas o xenogénicas;

(ii) un lisado de células tumorales singénicas; y

45 (iii) un excipiente farmacéuticamente aceptable,

donde las células de (i) y (ii) se definen con referencia a las células del tumor del paciente.

Las células alogénicas o xenogénicas se presentan como células completas.

Según un segundo aspecto de la invención existe el uso de (i) células tumorales alogénicas o xenogénicas y (ii) un lisado de células singénicas, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor en un paciente.

50 Las células tumorales alogénicas o xenogénicas son células completas.

La presente invención no trata los tumores solamente, sino que tiene la ventaja de que el sistema inmunitario es capaz de dirigirse efectivamente al tumor, evitando los problemas asociados con la administración/selección de los compuestos quimioterapéuticos convencionales. Además, la quimioterapia tiene muchos efectos secundarios indesea-

bles, incluyendo calvicie, náuseas, diarrea, anemia y aumento del riesgo de infección, y estos efectos se evitan utilizando la terapia de la invención.

Descripción de los dibujos

La invención se describe con referencia a las figuras adjuntas, de las que:

5 La Figura 1 es un esquema del diseño experimental en ratas Sprague Dawley. Se dividieron las ratas en dos grupos. Las que recibieron la línea de células singénicas (C6; SD-A) y las que recibieron la línea de células alogénicas (9L; SD-B). La rama singénica del estudio se dividió en dos grupos: control (5 ratas; SD-A1) y tratamiento (4 ratas; SD-A2). El día 27, se sacrificaron 4 ratas SD-A1. En este momento, la rata SD-A1 restante (rata 9) entró en el protocolo de tratamiento. Todas las ratas SD inyectadas inicialmente con la rama 9L alogénica (SD-B) recibieron inyecciones en el flanco con la línea de células singénicas C6 (100.000 células), seguidas diez días después con un bolo adicional de 500.000 células C6.

15 La Figura 2 es un esquema del diseño experimental en ratas Fisher 344. Se dividieron las ratas en dos grupos. Las que recibieron la línea de células singénicas 9L (Fisher A) y las que recibieron la línea de células alogénicas C6 (Fisher B). Las ratas del grupo singénico (Fisher A) se dividieron en un grupo control (Fisher A-1) y un grupo tratado (Fisher A-2). Las ratas Fisher A-1 se expusieron a células RG2, 9L singénicas o a medio sólo. Se trataron 2 ratas Fisher A-2 con células alogénicas, células alogénicas y lisado celular alogénico, lisado celular singénico y células xenogénicas, o células xenogénicas solo. Las ratas Fisher B fueron inyectadas inicialmente con células alogénicas C6. Fueron posteriormente expuestas a inyecciones en el flanco de células singénicas 9L (100.000 células), seguidas diez días después con un bolo adicional de 500.000 células.

20 La Figura 3 es un gráfico de la evolución/progresión del tumor en 9 ratas SD con tumor singénico implantado subcutáneamente (C6). Se pusieron las ratas en grupos de control o de tratamiento como se ha descrito previamente. La progresión del tumor se determinó mediante medidas del volumen del tumor (mm³). Las ratas 1, 2, 3, 4 no recibieron ningún tratamiento después de la implantación del tumor C6. Las ratas 5, 6, 7, 8 recibieron tratamiento con células alogénicas 9L y lisados con lisado singénico C6. Se dejó que la rata 9 formara un tumor muy grande antes de ser cambiada al grupo de tratamiento como las ratas 5-8.

25 La Figura 4 es un gráfico de la evolución/progresión del tumor en ratas Fisher 344 con tumor singénico implantado subcutáneamente (9L). Se inyectaron entonces las ratas control (Fisher A-1) con células singénicas RG2 (rata 1), células singénicas 9L (rata 2), o medio solo (rata 3). La rata 1 tuvo doble dosificación de células inyectadas y formó un tumor extremadamente grande. Las ratas tratadas (Fisher A-2) fueron tratadas con células alogénicas C6 solo (rata 4), con células alogénicas C6 y lisado (rata 5), con lisado singénico 9L y células xenogénicas U87 y LN229 (rata 6), con células xenogénicas U87 y LN229 solo (rata 7). La rata 8 fue tratada con lisado de células singénicas 9L solo. El progreso del tumor se determinó mediante medidas del volumen del tumor (mm³).

30 La Figura 5 presenta secciones tumorales tomadas del control A y de B. Tratamiento de ratas Fisher 344. Las secciones se cortaron con un espesor de 7 µm y se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra el receptor CD4 según el protocolo descrito previamente. Las flechas indican la localización de las células que se tiñen positivamente para el marcador de superficie CD4. El aumento tanto de la muestra control (A) como de la muestra de tratamiento (B) es de 40X.

35 La Figura 6 presenta secciones tumorales tomadas del control A y de B. Tratamiento de ratas Fisher 344. Las secciones se cortaron con un espesor de 7 µm y se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra el receptor CD8 según el protocolo descrito previamente. Las flechas indican la localización de las células que se tiñen positivamente para el marcador de superficie CD8. El aumento tanto de la muestra control (A) como de la muestra de tratamiento (B) es de 40X.

40 La Figura 7 presenta secciones tumorales tomadas del control A y de B. Tratamiento de ratas Fisher 344. Las secciones se cortaron con un espesor de 7 µm y se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra los linfocitos B (CD-20) según el protocolo descrito previamente. Las flechas indican la localización de las células que se tiñen positivamente para el marcador de superficie CD 20 (Figura 5b). El aumento tanto de la muestra control (A) como de la muestra de tratamiento (B) es de 40X.

45 La Figura 8 presenta secciones tumorales tomadas del control A y de B. Tratamiento de ratas Fisher 344. Las secciones se cortaron con un espesor de 7 µm y se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra los macrófagos (CD 68) según el protocolo descrito previamente. Las flechas indican la localización de las células que se tiñen positivamente para el marcador de superficie CD 68. El aumento tanto de la muestra control (A) como de la muestra de tratamiento (B) es de 40X.

50 La Figura 9 presenta secciones tumorales tomadas del control A y de B. Tratamiento de ratas Fisher 344. Las secciones se cortaron con un espesor de 7 µm y se tiñeron con un anticuerpo dirigido contra el marcador de células dendríticas (DRC) según el protocolo descrito previamente. Las flechas indican la localización de las células que se tiñen positivamente para el marcador de superficie DRC. El aumento tanto de la muestra control (A) como de la muestra de tratamiento (B) es de 40X.

Descripción de la invención

5 La presente invención utiliza células tumorales alogénicas o xenogénicas y células singénicas, para aumentar la percepción del sistema inmunitario de un paciente, para tratar un tumor. Las vacunas de células tumorales de la presente invención comparten péptidos similares en el cáncer/tumor con el mismo grado histológico, con diferentes moléculas de MHC I.

Las vacunas se preparan con células tumorales alogénicas o xenogénicas completas y un lisado de una o más células singénicas. La vacuna puede comprender además un lisado de células alogénicas o xenogénicas.

10 Las células alogénicas o xenogénicas serán preferiblemente células tumorales del mismo grado histológico (o similar) que las células tumorales del paciente a tratar. Por lo tanto, si el paciente tiene un glioblastoma cerebral, se preparará la vacuna con células de glioblastoma cerebral alogénicas o xenogénicas. De este modo, los péptidos comprendidos en las células serán similares y aumentarán la probabilidad de que se genere la apropiada respuesta inmunitaria.

15 Las composiciones de vacuna usualmente comprenderán células/lisados alogénicos o xenogénicos procedentes de dos o más individuos heterocigóticos. Preferiblemente, las composiciones de vacuna se preparan utilizando células/lisados alogénicos o xenogénicos procedentes de al menos tres individuos heterocigóticos.

El término "alogénico" se refiere a células tomadas de diferentes individuos de la misma especie.

El término "xenogénico" significa lo que se deriva u obtiene de un organismo de una especie diferente.

El término "singénico" se refiere a miembros genéticamente idénticos de la misma especie. Por ejemplo, los gemelos idénticos tendrán células y tejidos que son singénicos.

20 Se hace referencia en la descripción a cánceres/tumores del "mismo grado histológico o similar". Los expertos entenderán que esto se refiere a cánceres del mismo tipo y que presentan el mismo nivel de diferenciación. La calificación del grado se puede llevar a cabo según el método de Elston-Ellis (Simpson et al. J. Clin. Oncol., 2000; 18: 2059-2069).

Las referencias a "cáncer" y "tumor" se utilizan de modo intercambiable.

25 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de células tumorales alogénicas o xenogénicas y un lisado de células tumorales singénicas y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina humana o veterinaria.

30 Los excipientes farmacéuticos para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y están descritos por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). La elección de excipiente farmacéutico se puede seleccionar con respecto a la vía de administración pretendida y a la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como excipientes o en adición a los excipientes, cualquier aglutinante o aglutinantes, lubricante o lubricantes, agente o agentes de suspensión, agente o agentes de recubrimiento, agente o agentes solubilizantes, adecuados. La referencia a "excipientes" incluye diluyentes y vehículos.

En la composición farmacéutica se pueden incluir conservantes, estabilizantes y colorantes. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Se pueden utilizar también antioxidantes y agentes de suspensión.

40 Puede haber diferentes requerimientos para la composición/formulación dependientes de los diferentes sistemas de administración.

Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar mediante inyección, parenteralmente, por ejemplo, intravenosamente, intramuscularmente o subcutáneamente. Para la administración parenteral, las composiciones se pueden usar preferiblemente en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para hacer que la solución sea isotónica con la sangre.

45 Las vacunas se pueden preparar a partir de las composiciones de la invención.

50 La preparación de vacunas que contienen células inmunógenas como ingredientes activos, es conocida por los expertos en la técnica. Típicamente, tales vacunas se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en el líquido antes de la inyección. La preparación se puede emulsionar también o se pueden encapsular las células en liposomas. Los ingredientes inmunógenos activos se mezclan a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Son excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y sus combinaciones.

En adición, si se desea, la vacuna puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH, y/o adyuvantes que aumentan la eficacia de la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces incluyen pero sin limitarse a ellos: hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, al que se hace referencia como nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, al que se hace referencia como MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil-lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión al 2 % de escualeno/Tween 80.

Otros ejemplos de adyuvantes y otros agentes incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio (alum), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbón, emulsiones agua en aceite, emulsiones aceite en agua, dipéptido de muramilo, endotoxinas bacterianas, lípido X, *Corynebacterium parvum* (*Propionibacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, polirribonucleótidos, alginato de sodio, lanolina, lisolecitina, vitamina A, saponina, liposomas, levamisol, DEAB-dextrano, copolímeros de bloque u otros adyuvantes sintéticos. Tales adyuvantes están disponibles comercialmente de varias fuentes, por ejemplo, Adyuvante 65 Merck (Merck and Company, Inc. Rahway, N.J.) o Adyuvante Incompleto y Adyuvante Completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

Típicamente, se utilizan adyuvantes tales como Amphigen (aceite en agua), Alhydrogel (hidróxido de aluminio) o una mezcla de Amphigen y Alhydrogel. Solamente el hidróxido de aluminio está aprobado para uso humano.

La proporción de inmunógeno y adyuvante se puede variar a lo largo de un amplio intervalo siempre que ambos estén presentes en cantidades eficaces. Por ejemplo, el hidróxido de aluminio puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 % de la mezcla de vacuna (base A1203). De manera conveniente, las vacunas se formulan para contener una concentración final de inmunógeno en el intervalo de 0,2 a 200 mg/ml, preferiblemente de 5 a 50 mg/ml, lo más preferiblemente 15 mg/ml.

Las vacunas se administran convencionalmente parenteralmente, por inyección, por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente.

Típicamente, un médico determinará la dosis real que sea la más adecuada para un sujeto individual y ésta variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Las dosis que se indican más adelante son ejemplos del caso medio. Naturalmente puede haber casos individuales en los que se necesiten dosis más altas o más bajas.

Las cantidades de cada componente resultarán obvias para los expertos. Son cantidades adecuadas las siguientes:

- a) 1×10^6 ($\pm 0,5 \times 10^6$) células tumorales alogénicas con diferente MHC I modificadas por DNP.
- b) 2×10^6 ($\pm 1 \times 10^6$) células tumorales autólogas modificadas por DNP e irradiadas.
- c) 2×10^6 ($\pm 1 \times 10^6$) células lisadas de tumores autólogos (singénicos).
- d) 1×10^6 ($\pm 0,5 \times 10^6$) células lisadas de tumores alogénicos.

La invención se describirá ahora con referencia a las figuras adjuntas.

Ejemplo

Líneas celulares y cultivo celular:

Las líneas celulares utilizadas en este experimento fueron las líneas celulares de glioma de rata (9L, C6, RG2) y las líneas celulares de glioma humano (U87, LN229). Se obtuvieron todas las líneas de la American Type Tissue Collection (ATTC) y se cultivaron en medio Eagles modificado por Dubecco (DMEM) (GIBCO, Grand Island, NY) suplementado con 10 % de suero fetal de ternera (FCS) desactivado por calor, penicilina-estreptomina al 5 %, y tampón Hepes en un incubador humidificado a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

Reparación del lisado celular:

Se pusieron $1,0 \times 10^6$ células en un tubo de 5 ml en medio de cultivo y se centrifugaron durante 5 min a $2,5 \times 10^3$ rpm. Se desechó el sobrenadante y se añadieron al tubo 150 µl de agua destilada estéril. La solución de células/agua se mezcló bien y se transfirió a un tubo de Eppendorf de 1,0 ml y se centrifugó a $1,0 \times 10^4$ durante 10 minutos. No se desechó el sobrenadante y se utilizó esta solución entera para las inyecciones de lisado celular.

Anticuerpos e inmunohistoquímica:

Se congelaron las muestras tumorales tomadas de las ratas Fisher 344 en compuesto de temperatura óptima (OTC) y se cortaron en secciones de 7 µm sobre un criostato. Se secaron estas secciones, se fijaron con acetona, y se lavaron bien con PBS durante 1-2 minutos. Se realizó el bloqueo utilizando suero inmune procedente de las especies de las que se había tomado el anticuerpo secundario. Se lavaron de nuevo los portas concienzudamente y después se

5 tiñeron con anticuerpo primario frente a CD-4, CD-57 (Nora Castro Lab Ltd. Burlingame, CA), CD-8, células dendríticas de retículo (DRC) (Dako Corporation, Carpintería, CA), CD-20, CD-68 (Ventana, Tucson, AZ). Se lavaron de nuevo los portas y se añadió un anticuerpo secundario biotinilado. Se lavaron de nuevo y se pusieron en una solución de peroxidasa de hidrógeno al 3 % y 9 partes de azida de sodio al 1 % en PBS. Se enjuagaron entonces los portas y se añadió ABC durante 30-40 minutos. Se lavaron con PBS y se desarrollaron usando tetrahidrocloruro de diaminobezidina y se sometieron a tinción de contraste. Se tomaron fotografías de todos los portas mediante microscopio óptico.

Análisis del crecimiento del tumor:

10 Se encontraron todos los tumores mediante inspección visual y palpación. Una vez descubiertos, se expuso adicionalmente el área alrededor del tumor afeitando con una máquina eléctrica. En el momento de la inyección, se midió el tamaño del tumor en milímetros utilizando calibres Vernier. Se tomaron las medidas en dirección craneal/caudal (longitud), superior/inferior (altura), y medial/lateral (anchura). Se calculó el volumen del tumor por longitud x anchura x altura x 0,5.

Estudios in-vivo:

15 Todos los protocolos animales fueron aprobados por el Comité institucional de cuidado y uso de animales (IA-CUC) de la Universidad de Southern California. Se mantuvieron todas las ratas en un ambiente libre de patógenos. Para el experimento, se usaron ratas Sprague Dawley y Fisher 344. Todas las ratas eran machos y de edades comprendidas entre 4-6 semanas. Se obtuvieron las ratas de Harlan (Indianapolis, Indiana). En el modelo de tumor subcutáneo, se recogieron C6 y 9L utilizando solamente DMEM para lavarlas procedentes de los matraces de cultivo de tejidos. Se prepararon entonces jeringas que contenían 100.000-150.000 células suspendidas en 150 μ l.

20 Las ratas Sprague Dawley (SD) se dividieron en dos grupos (Figura 1). Las SD-A (9 ratas) fueron implantadas con el glioma C6, una línea celular de glioma tipo singénico para ratas SD. Las SD-B (3 ratas) fueron inyectadas con la línea celular alogénica 9L. Una vez que se hubo desarrollado un tumor palpable en el flanco en las ratas del Grupo A, se dividieron éstas adicionalmente en dos grupos. El grupo SD-A1 (grupo control – 5 ratas) no recibió ninguna inyección. El grupo SD-A2 (grupo de tratamiento – 4 ratas) fue inyectado con una combinación de células alogénicas 9L, lisado alogénico 9L, y lisado singénico C6. El día 27, se sacrificaron 4 de las 5 ratas SD-A1. En este momento, una de las ratas control, la rata 9, empezó a recibir el mismo protocolo de tratamiento que las ratas SD-A2. Se utilizó la combinación de células alogénicas, lisados singénicos y alogénicos, para mejorar la respuesta inmunitaria. Se analizaron las ratas SD-B, que nunca formaron tumores, en cuanto a la memoria inmunitaria enfrentándolas con células singénicas C6 (100.000 células), y con otro refuerzo de 500.000 células C6 10 días más tarde, y se chequearon para detectar la formación de un tumor en el flanco.

35 Las ratas Fisher se dividieron también en dos grupos (Figura 2). Las Fisher-A (8 ratas) fueron implantadas con la línea celular singénica 9L. Las Fisher-B (3 ratas) fueron inyectadas con la línea celular alogénica C6. Una vez que se hubo desarrollado un tumor palpable en el flanco en las ratas del Grupo Fisher-A, se dividieron éstas adicionalmente en dos grupos. El grupo Fisher-A-1 (grupo control – 3 ratas) recibió inyecciones de células singénicas L9, células singénicas RG2, o medio solamente. . El grupo Fisher-A-2 (grupo de tratamiento – 5 ratas) recibió una combinación de células alogénicas C6, lisado celular alogénico C6, o células singénicas U87 y LN229 (véase la Figura 2). Se analizaron las ratas Fisher B, que inicialmente formaron tumores que fueron subsiguientemente rechazadas, en cuanto a la memoria inmunitaria enfrentándolas con un cóctel de combinación de células singénicas 9L y lisado, y se chequearon para detectar el crecimiento tumoral.

Recolección de tejido subcutáneo:

40 Se sacrificaron todos los animales experimentales con una sobredosis de pentobarbital. Se separaron todos los tumores y se diseccionaron en condiciones estériles, se cortaron en 4 piezas y se conservaron a – 80 °C. Se cortaron todas las secciones tumorales a 7 μ m y se tiñeron por inmunohistoquímica.

Resultados

45 La mayor parte de los estudios de glioblastoma emplean modelos de animales de laboratorio pequeños. Los modelos de hospedante inmuno-competente utilizados más frecuentemente incluyen dos cepas diferentes de rata, las ratas Sprague Dawley y las ratas Fisher 344¹. La C6 es un línea celular de tipo singénico para las ratas SD, mientras que las líneas celulares 9L y RG2 son singénicas para las ratas Fisher 344^{1,11}.

50 Tres de las ratas Fisher fueron inyectadas con la línea celular C6 (Fisher B). Cuando se formaron tumores bien circunscritos, fueron subsiguientemente rechazadas en cuarenta días. Se utilizó un procedimiento similar para tratar tres ratas SD con la línea celular 9L (SD-B). Cada una de las ratas SD rechazaron el tumor 9L sin crecimiento visible o palpable del tumor. Se inyectaron cada una de las ratas SD-A con la línea celular C6. Todas estas ratas desarrollaron tumores visibles en diez días. En este punto, se mantuvieron cinco ratas como un grupo de control (SD-A1) mientras que las cuatro ratas restantes se pusieron en grupos de tratamiento (SD-A2). El día 27, se sacrificaron las ratas 1-4 y se hizo un intento para “rescatar” a la rata 9. En este momento, la rata 9 entró en el grupo de tratamiento y empezó a recibir las mismas inyecciones que el grupo SD-A2.

Se ha analizado el crecimiento del tumor y la respuesta al tratamiento en las nueve ratas SD-A (Figura 3). En las ratas SD-A2 tratadas (ratas 5-8), las ratas individuales recibieron distintas combinaciones de lisados alogénicos y singénicos, así como células. Por ejemplo, después de cinco días, la rata número 5 tenía un tumor palpable en el flanco y recibió una inyección contralateral al tumor con lisados alogénicos 9L (50.000), lisados singénicos C6 (50.000), y células alogénicas 9L (50.000). Cinco días después de la inyección, se resolvió el tumor. Las ratas 6, 7, 8 (ratas SD-A2) tenían todos tumores visibles 18 días después de la inyección. En este momento, cada una de ellas recibió una inyección con 50.000 células de lisado alogénico 9L más 50.000 células de lisado singénico C6 y 50.000 células alogénicas 9L. Se repitieron estas inyecciones los días 23 y 28. La rata 6 tuvo un tratamiento adicional el día 33, 15 días después de que empezó el tratamiento. Las ratas no tratadas (SD-A1, ratas 1-4) se sacrificaron 27 días después de la inyección debido al tamaño del tumor. Comparado con el progreso del tumor en las ratas no tratadas (ratas 1-4), las ratas 5, 6, 7, 8 (SD-A2) tuvieron completa resolución de sus tumores. La rata número nueve empezó el experimento en el grupo no tratado, y después fue salvada días después de sacrificar las ratas 1-4. La rata 9 recibió inyecciones cada cuatro días con lisados alogénicos 9L (50.000) más lisados singénicos C6 (50.000), y células alogénicas 9L (50.000) y se sacrificó para el análisis histológico el día 55, cuando el tamaño del tumor fue el 11 % desde el tiempo inicial de rescate.

Veinte días más tarde, las ratas SD "tratadas" con ningún tumor medible fueron reinyectadas en el flanco trasero contralateral con la misma línea de células tumorales singénicas C6 que causaron el tumor original, utilizando en primer lugar 100.000 células y cinco veces este número de células (500.000 células) diez días después. Se monitorizaron las ratas cada tres días para buscar cualquier signo de crecimiento visual o palpable del tumor. A los 160 días, las ratas SD permanecían libres de tumores.

La Figura 4 muestra el crecimiento del tumor y la respuesta al tratamiento de ocho ratas Fisher (Fisher-A) implantadas con células 9L. Las ratas 1, 2 y 3 (Fisher A-1) recibieron inyecciones en el flanco contralateral el día 20 con células singénicas RG2 (100.000 células; rata 1) y 9L (100.000 células; rata 2) o medio solo (rata 3). No hubo disminución del tamaño del tumor, y las células RG2 incluso parecieron tener un efecto sinérgico en la rata 1. Las ratas 4-8 (Fisher A-2), inyectadas con células alogénicas C6/ lisado alogénico 9L, lisado singénico 9L, o células xenogénicas U87 y LN 229, parecieron tener todas una reducción del tamaño del tumor.

Se sacrificaron todas las ratas Fisher 344 el día 40 cuando desarrollaron un pie péndulo e incapacidad para deambular. Los tumores de cada una de estas ratas se separaron y cortaron para tinción. Se ha encontrado que los tumores con este tratamiento tuvieron cantidades de linfocitos CD4, CD8 y B (CD-20), macrófagos (CD68) y células dendríticas significativamente mayores que los tumores control (Figuras 3-7).

Para determinar el papel de la memoria inmunitaria, se examinó si las ratas SD y Fisher 344 inicialmente inyectadas con una línea celular alogénica serían capaces de aceptar una línea celular singénica. Las ratas Fisher 344 que rechazaron las células C6 (Fisher B) después de 40 días fueron re-inyectadas con células singénicas 9L; las ratas SD (SD-B) que inicialmente rechazaron la línea celular 9L fueron inyectadas con células C6. Todas las inyecciones se realizaron en el flanco colateral a la inyección original y con 500.000 células. En las ratas SD, no se desarrolló ningún tumor visual ni palpable. En las ratas Fisher se desarrolló un pequeño crecimiento (< 1 cm x < 1 cm x < 1 cm) en el sitio de la inyección. Este crecimiento fue perceptible sólo a la palpación y llegó a ser progresivamente más pequeño y completamente indetectable en 10 días. Ambas cepas de ratas permanecieron sin tumor 150 días.

Estos resultados dan a entender que la inyección subcutánea repetida de células alogénicas (o xenogénicas), lisados de células alogénicas y lisados de células singénicas lleva a la reducción del tamaño del tumor aumentando la percepción inmunológica.

Referencias

1. Beutler AS, Banck MS, Wedekind a et al: Tumour gene therapy made easy: allogeneic major histocompatibility complex in the C6 rat glioma model. *Hum Gene Ther* 10: 95-101, 1999
2. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al: Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512, 1987
3. Boudreau CR, Yang I, Liao LM: Gliomas: advances in molecular analysis and characterization. *Surg. Neurol* 64: 286-294; discussion 294, 2005
4. Bowles AP, Jr., Perkins F: Long-term remission of malignant brain tumours after intracranial infection: a report of four cases. *Neurosurgery* 44: 636-642; discussion 642-633, 1999
5. Budd RC: Activation-induced cell death. *Curr Opin Immunol*. 13: 356-362, 2001
6. Bystryjn JC, Rigel D, Friedman RJ, et al: Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 123: 1053-1055, 1987
7. DeHann C, Habibi-Nazhad B, Yan F, et al: Mutation in mitochondrial complex I ND6 subunit is associated with defective response to hypoxia in human glioma cells. *Mol Cancer* 3: 18, 2004

8. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343: 37-49, 2000
9. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343: 108-117, 2000
10. Duquesnoy Ri, Trucco M: Genetic basis of cell surface polymorphisms encoded by the major histocompatibility complex in humans. *CS Rev Immunol* 8: 103-145, 1988
- 5 11. Ehtesham M, Kabos P, Gutierrez MA, et al: Intratumoral dendritic cell vaccination elicits potent tumouricidal immunity against malignant glioma in rats. *J Immunother* 26: 107-116, 2003
12. García-Lora A, Algarra 1, Garrido F: MHC class I antigens, immune surveillance and tumour immune escape. *J Cell Physiol* 195: 346-355, 2003
- 10 13. GuY, Wang C, Roifman CM, et al: Role of MHC class I in immune surveillance of mitochondrial DNA integrity. *J. Immunol* 170: 3603-3607, 2003
14. Hansen MH, Ostenstad B, Sioud M: Antigen-specific IgG antibodies in stage IV long-time survival breast cancer patients. *Mol Med* 7: 230-239, 2001
15. Jager D, Jager F, Knuth A: Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer, *J Clin Pathol* 54: 669-674, 2001
16. Janeway C, National Center for Biotechnology Information (U.S.): Immunobiology S the immune system in health and disease, ed 5th, New York: Garland Pub, 2001
17. Ljunggren HG, Karre K: In search of the missing self: MHC molecules and NK cell recognition, *Immunol Today* 11: 237-244, 1990
- 20 18. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al: Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 14: 619-648, 1996
19. Palo J, Duchesne J, Wikstrom J: Malignant diseases among patients with multiple sclerosis, *J Neurol* 216: 217-222, 1977
20. Papachristou DN, Fortner JG: Effect of postoperative wound infection on the course of stage II melanoma. *Cancer* 43: 1106-1111, 1979
- 25 21. Parkin J, Cohen B: An overview of the immune system, *Lancet* 357: 1777-1789, 2001
22. Pizzo PA, Commers J, Cotton D, et al: Approaching the controversies in antibacterial management of cancer patients, *Am J Med* 76: 436-449, 1984
23. Shiina T, Inoko H, Kulski JK: An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 64: 631-649, 2004
- 30 24. Sioud M: How does autoimmunity cause tumour regression? A potential mechanism involving cross-reaction through epitope mimicry, *Mol Med* 8: 115-119, 2002
25. Vigouroux 5, Yvon F, Biagi F, et al: Antigen-induced regulatory T cells, *Blood* 104: 26-33, 2004
26. von Mensdorff-Pouilly 5, Gourevitch MM, Kenemans P, et al: Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours. *Eur J Cancer* 32A: 1325-1331, 1996

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el tratamiento o prevención de un tumor en un paciente, que comprende
 - (i) células tumorales alogénicas o xenogénicas;
 - (ii) un lisado de células tumorales singénicas; y
 - (iii) un excipiente farmacéuticamente aceptable,
- 5 donde las células de (i) y (ii) se definen con referencia a las células del tumor del paciente.
2. Una composición según la reivindicación 1, que comprende además un lisado de células alogénicas o xenogénicas.
3. Una composición según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que las células de (i) son células derivadas del cerebro.
- 10 4. Una composición según la reivindicación 3, en la que las células singénicas son células derivadas del cerebro.
5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que las células alogénicas o xenogénicas se derivan de los tumores de dos o más individuos heterocigóticos.
- 15 6. El uso de (i) células tumorales alogénicas o xenogénicas y (ii) un lisado de células singénicas, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor en un paciente.
7. El uso según la reivindicación 6, en el que el tumor del paciente es del mismo grado histológico que el tumor de las células alogénicas o xenogénicas.
8. El uso según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que las células alogénicas o xenogénicas se derivan de los tumores de dos o más individuos heterocigóticos.

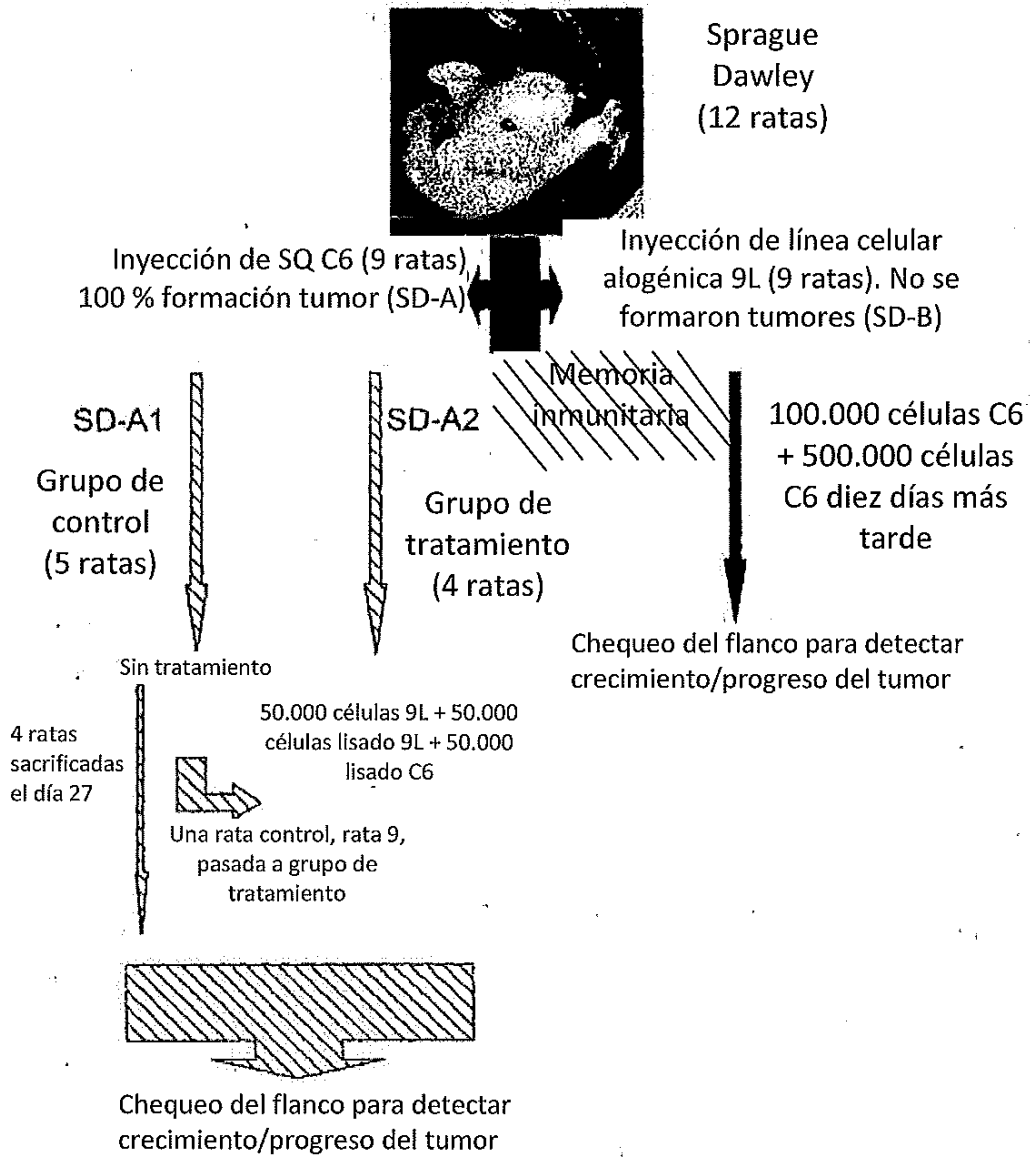


Fig. 1

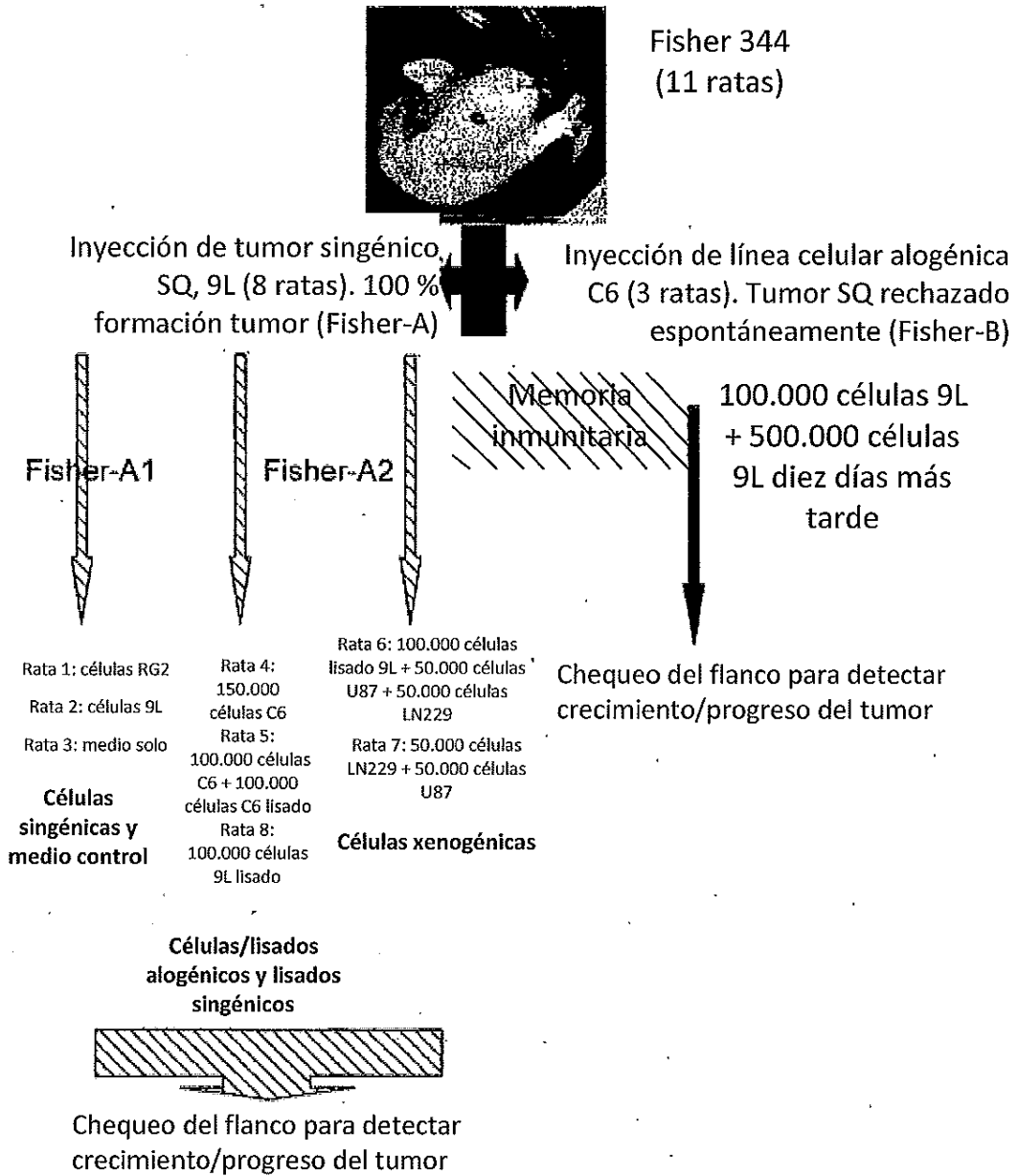


Fig. 2

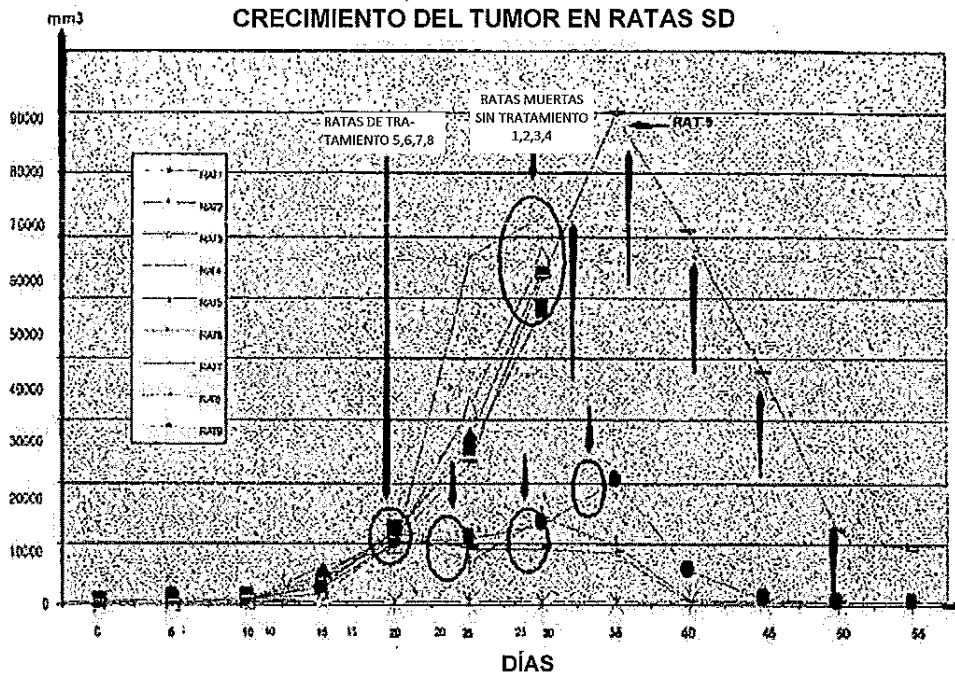


Fig. 3

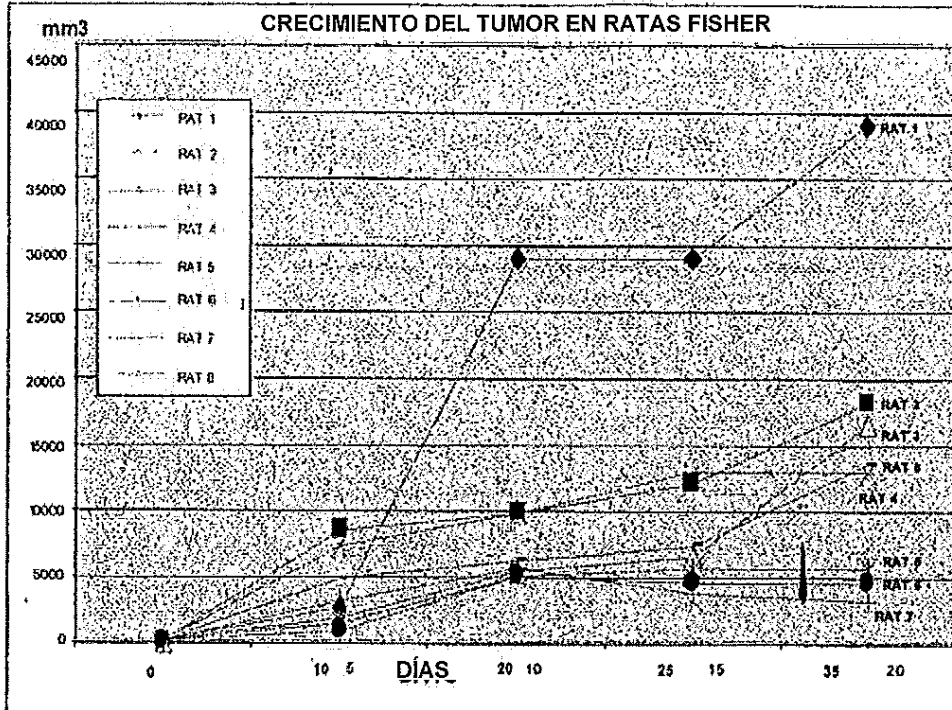


Fig. 4

5.)

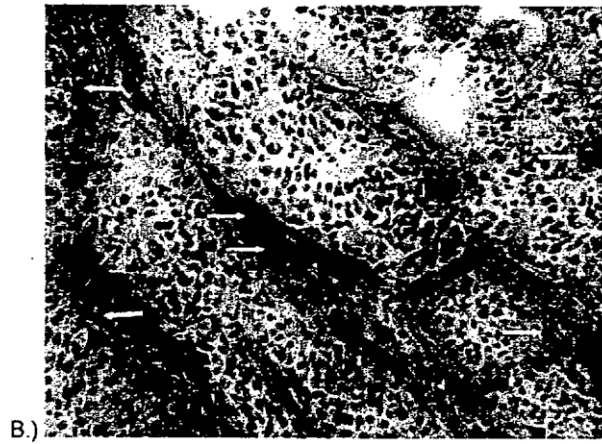
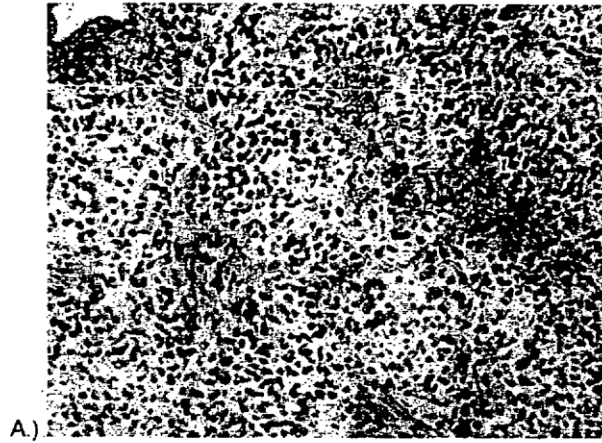


Fig 5

6.)

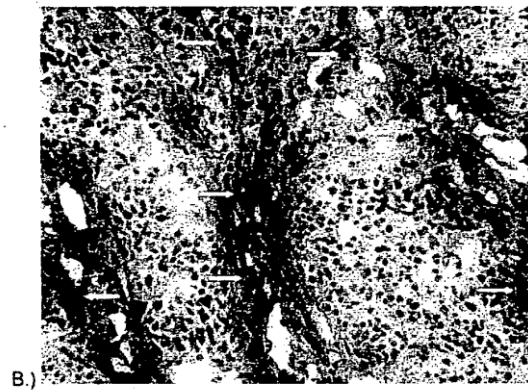
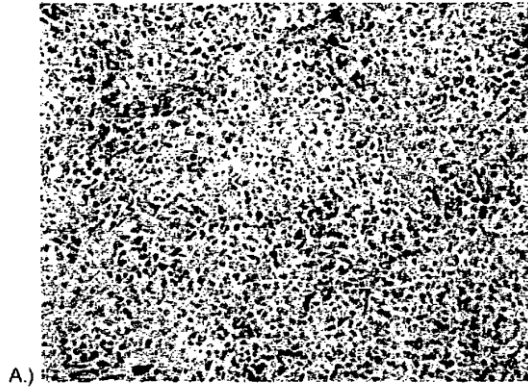
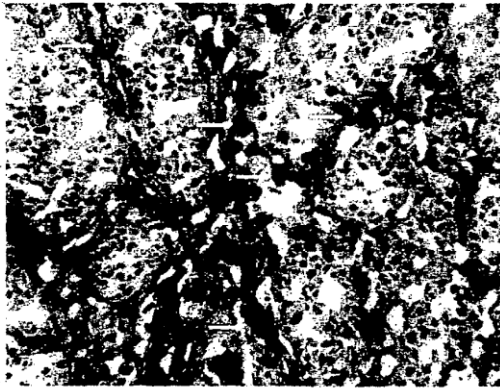


Fig 6

7.)



A.)



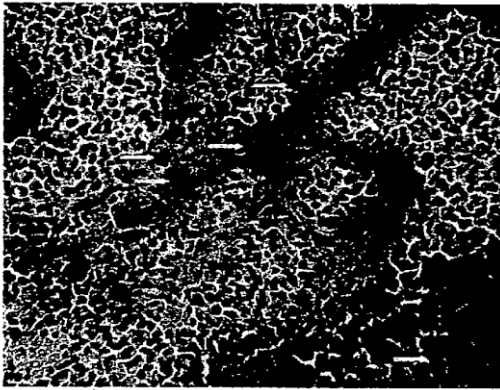
B.)

Fig 7

8.)



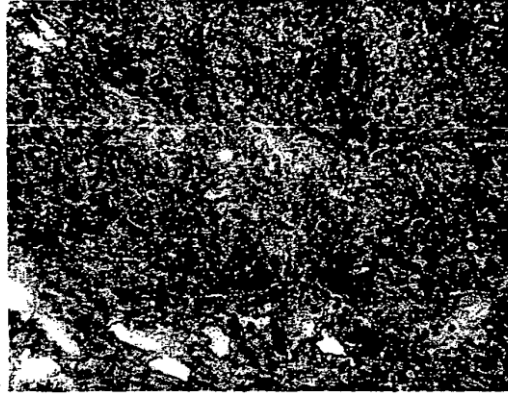
A.)



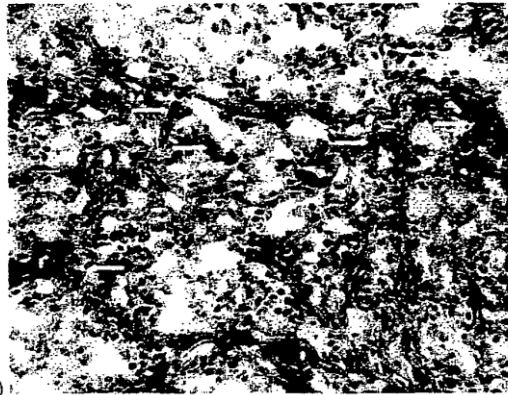
B.)

Fig 8

9.)



A.)



B.)

Fig 9