



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 694**

51 Int. Cl.:
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 5/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04728317 .1**
96 Fecha de presentación : **20.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1699480**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

54 Título: **Agente terapéutico antitumor alógeno.**

30 Prioridad: **30.12.2003 PCT/DE03/04299**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2011

73 Titular/es: **MOLOGEN AG.**
Fabeckstrasse 30
14195 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Dobric, Tomislav;**
Wittig, Burghardt y
Schmidt, Manuel

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 694 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

Agente terapéutico antitumor alógeno

5 La invención se refiere a una vacuna basada en células tumorales alógenas para el tratamiento terapéutico de enfermedades tumorales, así como a un procedimiento para la preparación de tales vacunas, además de células tumorales humanas transfectadas para el uso como vacuna.

Además de los procedimientos de tratamiento convencionales de enfermedades cancerígenas, como la radioterapia y la quimioterapia, que constituyen desde los años 50 la única opción de tratamiento para enfermedades tumorales progresivas y muy dispersas, la inmunoterapia parece ser en tumores metastásicos un nuevo enfoque prometedor.

10 La inmunoterapia tiene como finalidad reforzar la respuesta inmune natural frente a la enfermedad tumoral mediante modificaciones de ingeniería genética, es decir, influir sobre la "atención" del sistema inmune frente a células cancerígenas, y con ello la reacción de defensa, de tal manera que el propio cuerpo combate el tumor.

Debido a que algunas enfermedades malignas como, por ejemplo, el carcinoma de células renales progresivo, parecen ser relativamente sensibles a los tratamientos inmunoterapéuticos, la terapia sistémica con citoquinas como IL-2 e IFN-alfa conlleva por ejemplo efectos secundarios considerables, se desarrollaron otros protocolos inmunoterapéuticos.

15 La mayoría de los estudios clínicos conducen hoy en día a la extirpación del tumor, a continuación a una transfección ex vivo de las células tumorales con un gen terapéutico, irradiación de la población de células tumorales y subsiguiente reimplantación de las células tumorales ahora modificadas. Mediante esta vacunación con células tumorales se puede aumentar en distinta medida la respuesta antitumor en función del gen terapéutico transfectado.

20 En base a este enfoque así como de los resultados experimentales en animales se autorizó una serie de estudios clínicos de fase I y II (Finke y col., 1997; Witting y col., 2001).

Sin embargo, los primeros resultados con genes terapéuticos singulares transfectados además de una buena tolerabilidad de la terapia sólo en unos pocos casos produjeron remisiones parciales o completas.

En un modelo de ratón de carcinoma de colon la transferencia génica de CD40UCD154 pudo generar un vertido de citoquinas, una erradicación del tumor y una inmunidad (Sun y col, 2000).

25 Los inventores de la presente solicitud pudieron demostrar que la transferencia de plásmidos de expresión para interleuquina 7 humana (IL-7) en células tumorales conduce a una sensibilidad elevada contra células efectoras del sistema inmune, especialmente en transferencia autóloga (Finke y col., 1997, Cancer Gene Ther, 4:260-268). Igualmente los inventores pudieron demostrar que tras la transfección de dos genes terapéuticos (IL-7, GM-CSF) en células tumorales autólogas se vislumbraba en la mitad de los pacientes tratados una reacción clínica significativa (documento WO
30 02/060476).

35 Del documento US 5.681.562 se sabe inyectar pacientes con determinadas células de enfermedades cancerígenas que se transfectaron con ADN o ARN que codifica citoquina. El sistema inmune del paciente se debe estimular contra antígenos de tumores. En el documento de patente se describen ensayos en los que se transfectaron fibroblastos de ratones con vectores retrovirales, que codifican IL-2. Igualmente se describe el ensayo in vivo en el que se ensayó la actividad del tratamiento en un modelo de carcinoma de intestino grueso murino. Los ratones cuyos fibroblastos transfectados se inyectaron desarrollaron, en comparación con los grupos de control, un crecimiento de tumor claramente más lento. En el ensayo in vitro con fibroblastos transfectados humanos se pudo determinar igualmente un nivel de expresión de IL-2 claramente elevado. Además de los datos clínicos erróneos que surgen con el modelo de ratón, los vectores víricos usados como vector de expresión se consideran como poco ventajosos. Debido a la inestabilidad de la
40 cepa de inoculación atenuada no se excluye una reconversión en una cepa virulenta, además pueden actuar propiamente los componentes víricos, lo que conduce a una disminución de su actividad mediante el sistema inmune del paciente. Estos riesgos aparecen con considerable nivel con uso frecuente como vector de terapia génica.

45 Diversas publicaciones muestran que los mejores resultados terapéuticos se consiguen mediante una combinación de genes de citoquina con el factor de crecimiento GM-CSF (Paillard, 1998, Hum. Gene Ther. 9: 2547-2458; Schadendorf y col., 1995, J. Mol. Med. 73: 473-477). La importancia de GM-CSF se puso de manifiesto en inoculaciones con antígeno de tumor también en el aumento de la respuesta antitumor clínica e inmunológica en vacunaciones de péptido (Jäger y col., 1996). A este respecto desempeña un papel esencial la activación de células dendríticas presentadoras de antígeno así como la estimulación de una población de células efectoras.

50 Sin embargo, hasta la fecha no está claro qué genes de citoquina en combinación en una composición inmunógena con GM-CSF consiguen la respuesta inmune anti-tumoral más efectiva.

En experimentos en ratones se demostró que una inoculación con construcciones de expresión que codifican IL-7 provoca

un efecto anti-tumoral (Miller y col., 1993, Blood 18: 3686-3694; Murphy y col., 1993, J. Clin. Invest. 92: 1918-1924). Igualmente se sabe que la incubación de CTL con IL-7 o células transfectadas con IL-7 conduce a la regresión del tumor en ratones (Jicha y col., 1991; Hock y col., 1993) y se induce la transfección con IL-7 e infiltrados de células T B7.1/CD80 CD28⁺CD25⁺ e inmunidad (Cayeux y col., 1995).

5 Hasta ahora no hubo éxito terapéutico alguno, tampoco en el modelo de ratón.

Adicionalmente se ha observado en ensayos para la estimulación de respuestas inmunes mediante terapia génica con ADN de plásmido o secuencias de oligonucleótidos, que determinadas secuencias de ácido nucleico, que presentan el motivo CpG (CpG = dinucleótido citosina-guanosina no metilado), pueden tener un enorme efecto inmunoestimulador (Schmidt-Wolf y col., 1989, J. Immunol. Methods 125: 185-189). Las secuencias de ácido nucleico inmunoestimuladoras (ISS) se han usado ya desde muy pronto por este motivo como adyuvantes en protocolos de inmunización basados en ADN frente a agentes patógenos infecciosos (Sato y col., 1996, Science 273: 352-354). En experimentos con ratón se demostró que la administración de secuencias de ADN ricas en CpG conduce a una fuerte activación de las células B y estimula la expresión de determinadas citoquinas, por ejemplo, de IL-6 y GM-CSF. Igualmente se pudo demostrar en el modelo de ratón que una inmunización con CpG-oligodesoxirribonucleótidos (ODN) junto con una proteína de fusión pudo impedir tres días antes de la inoculación del tumor un crecimiento del tumor en el ratón (Liu y col., 1998). La indicación de consumo y preparación de ISS que contiene gen Cp inmunoestimulador se incluye en el documento WO 98/18810.

Del documento WO 00/04918 se sabe transfectar células tumorales con genes que codifican, por ejemplo, interferona-gamma y GM-CSF. Como vectores de expresión se usan plásmidos. Este documento muestra un concepto, tratar enfermedades tumorales por inmunoterapia. No se muestran datos o resultados clínicos in-vivo o in-vitro de gran valor informativo que confirmen la actividad de las vacunas reivindicadas. Es de resaltar que estos vectores basados en plásmidos son adecuados para una aplicación en la terapia génica humana sin restricción, ya que además de las secuencias terapéuticas llevan las unidades de función genética que se necesitan para su replicación. Además presentan genes resistentes a antibióticos que son imprescindibles para su selección. Se realiza por tanto una expresión duradera terapéutica de proteínas no deseadas de mamíferos o de bacterias.

25 A pesar de las investigaciones a lo largo de muchos años y de enfoques prometedores no se ha conseguido hasta ahora el desarrollo de una terapia basada en inmunización efectiva contra enfermedades tumorales mediante la aplicación de sustancias inmunogénicas.

Es objetivo de la invención proporcionar una vacuna como medicamento para el tratamiento de enfermedades que se dan en relación con citoquinas como, por ejemplo, enfermedades cancerígenas, que se pueda usar específica y eficientemente y de forma particular conduzcan a la inducción de respuestas inmunes específicas del tumor. Además se debe preparar un procedimiento correspondiente para la preparación de una vacuna de este tipo.

Este objetivo se consigue con las características de las reivindicaciones independientes.

En el sentido de la invención significan:

35	alógeno	de un individuo genéticamente diferente de la misma especie en contraposición a "autólogo" (células del propio cuerpo)
	APC	células presentadoras de antígeno
	B7.1/CD80	clúster de diferenciación 80
	CD40L/CD154	clúster de diferenciación 40 ligando
	CD	células dendríticas
40	DSLIM	oligodesoxirribonucleótidos inmunomoduladores en forma de tallo y horquilla
	GM-CSF	factor estimulador de colonia de granulocitos y macrófagos
	IL-7	interleuquina-7
	ISS	secuencias de ácido nucleico inmunoestimulador
45	MIDGE	vector de expresión génica minimalista definido inmunológicamente (MIDGE® es una marca comercial de Mologen AG)
	ODN	oligodesoxirribonucleótido
	TAA	antígeno asociado a tumor

A continuación se deben entender una serie de términos generales como sigue:

Células transfectadas en el sentido de la invención son células tumorales alógenas humanas que se trataron ex-vivo con vectores de expresión de codificación en correspondencia con la invención y expresan como consecuencia de este tratamiento las secuencias del factor de citoquina y coestimulador codificado y se usan como inmunoterapéutico en enfermedades tumorales.

En lo que respecta a la presente invención el término factor coestimulador y/o citoquina se refiere tanto a factores coestimuladores y/o citoquinas de origen natural como a todas las modificaciones, mutantes o derivados de factores coestimuladores y/o citoquinas, factores coestimuladores y/o citoquinas preparados mediante técnicas de recombinación, las modificaciones de aminoácidos como inversiones, deleciones, inserciones, transposiciones y similares, en tanto esté presente al menos una parte de las funciones esenciales de los factores coestimuladores de tipo salvaje y/o citoquinas. Tales factores coestimuladores y/o citoquinas pueden comprender también aminoácidos no habituales y/o modificaciones como una alquilación, oxidación, modificación con tiol, desnaturalización y oligomerización y similares. En lo que respecta a la presente invención los factores coestimuladores y/o citoquinas pueden ser particularmente proteínas, péptidos y/o proteínas de fusión, que contienen además de otras proteínas, péptidos o partes de los mismos factores coestimuladores y/o citoquinas por completo o parcialmente. En una forma de realización adicional de la presente invención los factores coestimuladores y/o citoquinas son formas reducidas de factores coestimuladores y/o citoquinas de origen natural.

Todos los factores coestimuladores citados anteriormente que son adecuados para modular la reacción del sistema inmune son sustancias inmunógenas en el sentido de la esta invención. En consecuencia una vacuna de acuerdo con la invención representa en el sentido de esta invención una composición inmunógena, ya que contiene una combinación de sustancias inmunógenas. Las células tumorales se diferencian de células normales entre otros por una expresión modificada de proteínas de superficie celular. Sobre todo la expresión de antígenos asociados a tumor (TAA) permite teóricamente el reconocimiento y la destrucción de estas células con el sistema inmune. Frecuentemente sin embargo el sistema inmune del paciente está suprimido, de modo que no se consigue reconocer las células modificadas.

Este problema se resuelve mediante la preparación de una vacuna para el tratamiento de pacientes con enfermedades tumorales definidas, componiéndose esta vacuna de células tumorales de otro paciente (células alógenas) y transfectándose estas células tumorales previamente ex-vivo con construcciones de expresión que codifican interleuquina-7 (IL-7), factor GM-CSF estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (granulocyte makrophage-colony-stimulating factor), y construcciones de expresión que codifican factores coestimuladores CD40UCD154 y B7.1/CD80. En una forma de realización adicional de la invención se proporciona una vacuna correspondiente en donde se transfectaron previamente estas células tumorales ex-vivo con construcciones de expresión que codifican interleuquina-7 (IL-7), factor GM-CSF estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (granulocyte makrophage-colony-stimulating factor), y construcciones de expresión que codifican factor coestimulador CD40UCD154.

Las células tumorales usadas pueden tratarse de células que proceden de pacientes con el mismo cuadro de enfermedad que el paciente que se va a tratar, o bien de células de pacientes con otro cuadro de enfermedad que el paciente que se va a tratar.

La combinación de componentes (sustancias inmunógenas) de vacunas debe asegurar que se generan estos tres niveles de cascada de señal que son necesarios básicamente para la inducción de una respuesta inmune específica. Los tres niveles comprenden la presentación de antígeno, la coestimulación y la preparación de un entorno local adecuado.

La expresión de GM-CSF y CD40UCD154 debe provocar que se recluten y activen localmente células presentadoras de antígeno (APC) así como células dendríticas (DC). Como consecuencia se llega a una presentación reforzada de TAA.

La expresión de B7.1/CD80 conduce a un aumento de la actividad coestimuladora. Mediante la que se refuerza la antigenicidad de TAA y aumenta la cantidad de linfocitos T activados frente a TAA.

La expresión de IL-7 induce adicionalmente la proliferación de linfocitos T específicos del tumor.

La vacuna de acuerdo con la invención conduce por tanto en el punto de aplicación a una concentración elevada de citoquinas solubles que fomentan la proliferación y moléculas coestimuladoras en relación con el TAA en la superficie de las células tumorales, que conduce a activación y proliferación de células T específicas del tumor. Igualmente se "bloquean" APC y DC en el lugar de aplicación.

Las construcciones de expresión están presente como plásmido, pero preferiblemente también construcciones de expresión génicas minimalistas definidas inmunológicamente. A este respecto se trata de un casete de expresión cerrado covalentemente, de doble hebra lineal, que se compone solamente de un promotor de CMV, de un intrón, de la secuencia génica de codificación y de una secuencia de poliadenilación. El casete de expresión está covalentemente cerrado en ambos extremos de la doble hebra mediante una bucle corto de restos de nucleótidos de hebra única. Estas construcciones de ADN minimalistas cerradas covalentemente se designan en lo sucesivo como vectores MIDGE

(MIDGE: vector de expresión génica minimalista definidos inmunológicamente); véase el documento EP 0941318 B1. Las construcciones MIDGE tienen la ventaja de que se puede evitar con ellas estructuras que no son esenciales para el efecto terapéutico, lo que en última instancia evita las desventajas de los procedimientos genéticos convencionales.

5 La creación de un entorno local que sea permisivo para la inducción de una respuesta inmune específica se asegura con el uso de un adyuvante en forma de secuencias de ácido nucleico inmunoestimuladoras (ISS). Para este fin se propone de acuerdo con la invención que la vacuna comprenda adicionalmente oligodesoxirribonucleótidos inmunomoduladores. Se prefiere aquí un oligodesoxirribonucleótido inmunomodulador, que

10 a) comprenda una secuencia con la sucesión de bases $N^1N^2CGN^3N^4$, siendo N^1N^2 un elemento seleccionado del grupo que comprende GT, GG, GA, AT o AA, N^3N^4 un elemento seleccionado del grupo que comprende CT o TT, así como C desoxicitosina, G desoxiguanosina, A desoxiadenosina y T desoxitimidina,

b) y una hebra circular comprende ácido desoxirribonucleico con una secuencia de bases antiparalela parcialmente complementarias entre sí, y está configurada en forma de haltera.

15 Los motivos CpG de ISS (véase a tal fin la figura 2a) provocan un aumento de la actividad de células NK y macrófagos así como una fuerte estimulación de la respuesta inmune a TH1 celulares. Estos actúan por tanto como inmunomoduladores y permiten y refuerzan la respuesta inmune específica del tumor. Se prefiere usar ISS cerrados covalentemente con una longitud de 30 bp, como se describen en el documento WO 01/07055. Las construcciones se designan además como dSLIM (oligodesoxirribonucleótidos inmunomoduladores en forma de tallo y horquilla).

La secuencia con la sucesión de bases $N^1N^2CGN^3N^4$ está posicionada en la región de hebra única del oligodesoxirribonucleótido y comprende de 40 a 200 nucleótidos (véase la figura 2b).

20 Es objeto de la invención también un procedimiento para la preparación de una vacuna descrita anteriormente para el tratamiento de pacientes con enfermedades tumorales, que contienen células tumorales alógenas y oligodesoxirribonucleótidos inmunomoduladores, en donde las células tumorales se transfectan previamente ex-vivo con

25 a) interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), CD40L/CD154 y B7.1/CD80 o

b) interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y CD40L/CD154

30 y a continuación se transforman en una composición farmacéutica que se puede administrar. Los oligodesoxirribonucleótidos inmunomoduladores ya descritos anteriormente comprenden un ácido desoxirribonucleico de hebra circular con una secuencia de bases antiparalela, parcialmente complementaria entre sí y están configurados en forma de haltera. Son como adyuvantes igualmente componentes del procedimiento.

Se prevé de acuerdo con la invención que una célula tumoral alógena comprenda al menos tres, preferiblemente cuatro moléculas de ácido nucleico, que codifican conjuntamente los factores coestimuladores B7.1/CD80 y CD40L/CD154 y las citoquinas interleuquina-7 y GM-CSF.

35 Por tanto son objeto de la invención también células tumorales humanas alógenas, transfectadas en correspondencia, que se transfectaron ex-vivo con moléculas de ácido nucleico que codifican

a) interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), CD40L/CD154 y B7.1/CD80 o

b) interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y CD40L/CD154

40 y presentan construcciones de expresión correspondientes. Las células tumorales presentan construcciones de expresión en forma de un plásmido o bien como casete de expresión cerrado covalentemente, de doble hebra lineal, que se compone solo de un promotor de CMV, de un intrón, de la secuencia génica de codificación y de una secuencia de poliadenilación, que está cerrada covalentemente en ambos extremos de la hebra doble mediante un bucle corto de restos de nucleótidos de hebra única. Se trata preferiblemente de una célula tumoral alógena de una línea celular del carcinoma de células renales.

45 Como con la vacuna propiamente se prevé también en el procedimiento de acuerdo con la invención que las moléculas de ácido nucleico se presenten en una o varias construcciones de expresión. Se puede tratar por tanto de una construcción de expresión de ADN para la expresión génica múltiple,

- compuesta de regiones de doble hebra, que contienen un casete de expresión lineal, que presentan al menos una secuencia promotora y una secuencia de codificación,

- y en donde estas regiones de doble hebra están unidas entre sí con hebras únicas de ADN o hebras dobles de ADN de no codificación,

- y los casetes de expresión en los extremos en los que no están unidos con otros casetes de expresión por hebras únicas de ADN o hebras dobles de ADN de no codificación, están protegidos contra degradación por exonucleasa.

5 Una construcción de expresión de ADN de este tipo ya se describe para la expresión génica múltiple en el documento PCT/DE03/02478. Por tanto varios ácidos nucleicos, que son el objeto de la vacuna de acuerdo con la invención, pueden estar dispuestos en una construcción de expresión individual.

10 En una forma de realización especialmente preferida de la invención la molécula de ácido nucleico es un ADN, de forma particular un ADNc o un ADN genómico. Evidentemente también puede ser ventajoso que la molécula de ácido nucleico sea un ARN.

Las células tumorales alógenas proceden de pacientes con carcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de ovarios y carcinoma de células renales, así como melanoma maligno.

15 En el marco de la invención se usó de forma particular una línea celular de carcinoma de células renales, que es especialmente adecuada para la preparación de la vacuna de acuerdo con la invención. Una línea celular de carcinoma de células renales se depositó en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) como cultivo viable con el número DSM ACC 2635. En células de esta línea celular de carcinoma de células renales se aplican mediante procedimientos de transfección esencialmente conocidos de tipo biológico, químico y/o físico, las construcciones de expresión de ADN que conducen en las células a la expresión de genes deseados. Para tales
20 células alógenas transfectadas de esta forma se añade un adyuvante, preferiblemente ISS, con especial preferencia dSLIM (véase anteriormente). Tras la irradiación radioactiva de las células tumorales alógenas transfectadas con radiación gamma se aplica la vacuna de acuerdo con la invención a pacientes con una enfermedad tumoral.

25 El cuerpo de extracción de células no es – a diferencia de la terapia con células autólogas – del cuerpo que se va a tratar con el medicamento propiamente. El uso de células alógenas tiene por su parte la ventaja de la caracterización única y multiplicación fiable de células, por otra parte se prevé el estímulo alógeno como efecto adyuvante favorable adicional.

Las células de tratamiento pueden derivarse de un único cuerpo (extraño) o bien se combinan de varios cuerpos con igual cuadro de enfermedad (agrupadas).

30 La invención se refiere por tanto a la combinación de tres o cuatro ácidos nucleicos expresables que codifican dos citoquinas y uno o dos factores de coestimuladores.

Como inmunomoduladores adicionales se pueden usar ISS, preferiblemente dSLIM.

35 En experimentos de cultivo celular en líneas celulares humanas primarias se pudieron detectar tras la transfección células triple o cuádruple positivas (véase la figura 1). “Triple” o “cuádruple” positivas significa a este respecto que se transfectó con éxito un mayor porcentaje de células con todos los tres o cuatro genes que codifican GM-CSF, IL-7, CD40UCD154 y B7-1/CD80 y se expresaron luego estos tres o cuatro genes por parte de estas células. En la línea celular del carcinoma de colon usada se pudieron determinar el 14,4 % de todas las células como células positivas múltiples mediante análisis FACS (clasificador de células activadas por fluorescencia). Además se pudo comprobar que se transfectaron independientemente del gen 20,3 % de todas las células tras la electroporación con un gen;
40 con tres genes distintos lo harían con éxito el 19,9 % de las células. Se comprobó que la proporción porcentual de las células de carcinoma de colon transfectadas con éxito tras la transfección cuádruple con construcciones de expresión que codifican CD40L/CD154, GM-CSF, B7.1/CD80 e IL-7 se encuentra en el 14,4 % de las células. El 14,4 % de las células serían en consecuencia transfectadas con cuatro genes distintos y en consecuencia podrían expresar estas. En total se transfectarían el 69,4 % de todas las células con uno o varios de los genes.

45 La transfección con varios genes es ventajosa ya que de este modo las citoquinas y los factores coestimuladores expresados se expresan en estrecha proximidad espacial entre sí en los órganos efectores del sistema inmune. Esta proximidad espacial es importante ya que las señales coestimuladoras sólo en relación con antígenos proporcionan un refuerzo efectivo de la inoculación.

50 Para la transfección se pueden usar esencialmente procedimientos biológicos, químicos y/o físicos conocidos, por ejemplo, transfección mediante transferencia balística (documento EP 0686697), transfección con policonaciones, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, fusión de protoplastos, fusión de liposomas, sistemas de transfección víricos, lipofección y/o electroporación in-vivo y/o in-vitro. En una forma de realización preferida de la invención la transfección se realiza mediante electroporación.

- 5 Otros procedimientos ventajosos son los procedimientos de transfección biológicos como la transferencia génica mediada por receptor. A este respecto se unen por ejemplo las construcciones de expresión de ADN que codifican al menos uno, preferiblemente dos factores coestimuladores y dos citoquinas, covalentemente con un oligopéptido, que es preferiblemente la secuencia de localización del núcleo (señal de localización nuclear = NLS) del virus de simio SV-40.
- Mediante el uso de otros péptidos de preparación en parte sintética es posible aumentar la eficiencia de transfección. Este procedimiento es adecuado particularmente para la transferencia génica in vivo específica de las células tras aplicación por vía intravenosa.
- 10 La vacuna de acuerdo con la invención preparada mediante el procedimiento de acuerdo con la invención a partir de células tumorales alógenas modificadas muestra efectos sorprendentes. De forma ventajosa se pueden eliminar tanto déficits en el sistema inmune de pacientes con tumor como al mismo tiempo reforzar la respuesta inmune intrínsecamente presente en el antígeno específico del tumor.
- 15 Adicionalmente se puede usar la vacuna en pacientes cuyo tumor se extirpó, como terapia adyuvante para la mejora y el reestablecimiento de su respuesta inmune contra células tumorales residuales o para la reducción de la masa tumoral que quede. Se abre una perspectiva para pacientes con tumor primario tratado quirúrgicamente sin metástasis reconocida que podrían beneficiarse de una terapia adicional específica del tumor que reduce la tasa de recidivas.
- 20 Otras formas de configuración ventajosas de la invención resultan de las reivindicaciones subordinadas y de la descripción. La invención incluyendo el efecto sorprendente del medicamento de acuerdo con la invención (como inóculo para terapia contra carcinoma) así como el procedimiento de acuerdo con la invención se describen con mayor detalle a continuación en función de las figuras y de los ejemplos de realización; estas muestran:
- Figura 1 intensidades de FACS de células de carcinoma humanas transfectadas por cuadruplicado. La transfección se realizó mediante electroporación con vectores de expresión que codifican CD40UCD154, GM-CSF, B7.1/CD80 e IL-7;
- 25 Figuras 2a y b esquemas de estructura inmunomoduladora (dSLIM) en forma de haltera respectivamente con tres motivos de CG representados esquemáticamente en las estructuras en forma de tallo y herradura; significan I: bucle y II: cepa.
- Para la detección de productos génicos se usaron anticuerpos que están acoplados en los cuatro colorantes de fluorescencia distinguibles. En la figura 1 se designan con
- 30 CD80-FITC
hGMCSF-PE
IL7-PerCP
CD154-APC
- 35 El clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) reconoce estos colores en cuatro canales distintos. En las abscisas se designan con FL1-H, FL2-H, FL3-H y FL4-H. Los exponentes de las abscisas dan una intensidad de fluorescencia relativa. En las ordenadas se dan los conteos, que corresponden aproximadamente a la cantidad de células medidas. La evaluación se realiza con el denominado *gating*, que significa que se cuentan sólo las células que pasan por un determinado nivel de energía.
- 40 En la tabla 1 siguiente se representan la proporción porcentual de células del carcinoma de células renales alógenas transfectadas con éxito según la transfección triple con construcciones de expresión que codifican CD40L/CD154, GM-CSF e IL-7 o bien transfección cuádruple con construcciones de expresión que codifican CD40UCD154, GM-CSF, B7.1/CD80 e IL-7.

Tabla 1

Gen de codificación	Transfección triple con construcciones de expresión que codifican CD40L/CD154, GM-CSF e IL-7	Transfección cuádruple con construcciones de expresión que codifican CD40L/CD154, GM-CSF, B7.1/CD80 e IL-7
	Proporción de células transfectadas (1 medida)	Proporción de células transfectadas (2 medidas)
B7.1/CD80	---	de 66,3 a 87,6 %
CD40L/CD154	60,8 %	de 21,6 a 29,5 %
IL-7	21,7 ng en 1×10^6 células	de 14,9 a 38,2 ng en 1×10^8 células
GM-CSF	698,9 ng en 1×10^6 células	de 370,6 a 1.567,2 ng en 1×10^6 células

La transfección de los factores co-estimuladores B7.1/CD80 o CD40UCD154 se determinó mediante coloración de células con anticuerpos marcados con fluorescencia; la magnitud de la transfección con citoquinas IL-7 o GM-CSF se determinó en función de la concentración de citoquinas en medio de cultivo celular.

- 5 La vacuna de acuerdo con la invención compuesta por células transfectadas ex-vivo alógenas se administró a pacientes con tumores sólidos metastásicos, a intervalos de 7 a 10 días en forma de 4 ciclos de inyección constituidos respectivamente por 2 inyecciones. Las células se transfectaron previamente con vectores de expresión que codifican IL-7, GM-CSF, CD40UCD154 y/o B7.1/CD80 y a continuación se añadieron secuencias inmunoestimuladoras (ISS). Las dos primeras inyecciones se realizaron en el día 1 en el punto de inoculación típico en la piel (por vía intradérmica) lateralmente en el antebrazo izquierdo y derecho, en el día 7 (hasta el 10) en la zona de inoculación típica por vía intradérmica en el lateral delantero del muslo izquierdo y derecho, en el día 14 (hasta el 20) bajo la piel (por vía subcutánea) aproximadamente 30 mm a la izquierda y derecha del abdomen y en el día 21 (hasta el 30) de nuevo en el antebrazo pero bajo la piel (por vía subcutánea).

- 15 Todos los pacientes se encontraban al comienzo del tratamiento en una fase avanzada de la enfermedad. Para la evaluación del éxito clínico sirven las siguientes formulaciones en correspondencia con la Organización Mundial de la Salud (1979): como una reacción parcial (respuesta parcial, PR) se entiende el retroceso del tumor en más del 50 % en las últimas cuatro semanas así como la contención de nuevos tumores. Con transcurso estable de la enfermedad (enfermedad estable, SD) se entiende el mantenimiento del estado. Una respuesta mixta (MR), es una reacción mixta, por ejemplo el progreso de la metástasis y un retroceso de la metástasis en otro lugar. Una respuesta completa (CR) designa el retroceso completo del tumor.

A continuación se explicará más detalladamente la invención en función de los ejemplos, pero sin que se limite la invención a estos ejemplos.

Vacunación

- 25 El paciente, varón, enfermo de carcinoma de pulmón de células pequeñas, recibió a intervalos de 7 días cuatro inoculaciones sucesivas con la vacuna de acuerdo con la invención. La línea celular de carcinoma de células renales alógenas se trató como se describió previamente. Se realizó un control de expresión 24 h tras la transfección. El control de la expresión de factores coestimuladores B7.1/CD80 o CD40UCD154 se realizó mediante coloración de las células con anticuerpos marcados con fluorescencia y a continuación medida por citometría de flujo. La determinación de la expresión de citoquinas IL-7 y GM-CSF se realizó mediante medida de la concentración en medio de cultivo celular con ayuda de ELISA.

- 35 Transfectadas con éxito significa: células positivas vivas. Los datos de transfección se representan en la tabla 1. La proporción porcentual en células transfectadas exitosamente con B7-1/CD80 estaba entre 66,3 y 87,6 %. La proporción de células transfectadas con CD40L/CD154 estaba entre 21,6 y 29,5 %. La concentración de la citoquina IL-7 en 1×10^6 células estaba entre 14,9 y 38,2 ng. La concentración en GM-CSF en 1×10^6 células estaba entre 370,6 y 1.567,2 ng.

En el caso de transfección para la vacunación triple con construcciones de expresión que codifican CD40L/CD154, GM-CSF e IL-7 la proporción porcentual en células transfectadas exitosamente con CD40L/CD154 se encontraba en 60,8 %. La concentración de la citoquina IL-7 en 1×10^8 células se encontraba en 21,7 ng. La concentración en GM-

CSF en 1×10^6 células era de 698,9 ng.

Tratamiento de enfermedades tumorales metastásicas

- Selección de los pacientes: se reclutaron pacientes con carcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de ovarios y carcinoma de células renales, así como melanoma maligno, con edades entre los 18 y los 70 años, y un índice de Karnofsky de 70 a 100. Los criterios de exclusión fueron: un tratamiento con citoquina o quimioterapia previo en menos de 28 días, valores de creatina por encima de 265 micromol/l, valores de bilirrubina por encima de 51 micromol/l, insuficiencia cardiaca no compensada, alteraciones del ritmo ventricular, enfermedades psiquiátricas severas, hepatitis A, B o C activa, infección por VIH.
- 5 Tratamiento: además de la anamnesis se determinaron los siguientes parámetros antes del comienzo del tratamiento: estudio físico, hematología (hemoglobina, hematocrito, leucocitos y nivel de plaquetas), valores sanguíneos químicos y análisis de orina. Se tomó sangre para la determinación del estado inmune. Se llevaron a cabo ensayos de piel DHT (hipersensibilidad de tipo retardado) con el ensayo Multitest Merieux (Leimen, Alemania). Se realizaron radiografías del tronco así como tomografías por ordenador del tronco y del abdomen. Los pacientes
- 10 recibieron cuatro inyecciones por vía subcutánea con al menos $8 \times 10^8 - 1,4 \times 10^7$ células con células tumorales tratadas previamente ex-vivo. Se repitieron los estudios inmunológicos, estudios hematológicos y estudios clínicos básicos (estudio físico, estudio por ultrasonidos y estudio de bajo vientre, según necesidad) los días 14, 28 y 56. El día 84 tuvo lugar un estudio clínico e inmunológico completo, comparable con el estudio de selección llevado a cabo al comienzo.
- 15 Construcción de expresión génica minimalista definida inmunológicamente (MIDGE)
- Se usaron vectores de expresión de ADN minimalistas cerrados covalentemente para la transfección de células tumorales. Los vectores de expresión sirvieron para la expresión de interleuquina-7 (IL-7) humana, del factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos humano (GM-CSF), de factores coestimuladores B7.1/CD80 y CD40L/CD154. Los vectores MIDGE se sintetizaron según prescripción SOP y en uno de los laboratorios
- 20 correspondientes a la clase B con control de calidad subsiguiente.
- Las secuencias de codificación de IL-7 (NCBI nº de acc.: J04156), GM-CSF (NCBI nº de acc.: M11220), B7.1/CD80 (NCBI nº de acc.: AF177937) y CD40L/CD154 (NCBI nº de acc.: S49008, obtenidas del banco de datos (www.ncbi.nlm.nih.gov) del National Center for Biotechnology Information), se insertaron en plásmidos pMOK y sirvieron como construcciones de partida para la preparación de vectores MIDGE. El plásmido pMOK posee además
- 30 del "promotor inmediato prematuro" fuerte del virus de CMV, un intrón y una secuencia de poliadenilación del virus SV40 (MOLOGEN, Berlín). El plásmido pMOK que codifica IL-7 se digirió completamente con el enzima de restricción Eco311 durante la noche a 37 °C. Mediante la digestión por restricción se produjeron dos fragmentos de ADN. Uno consistía en el gen de resistencia a canamicina y el otro en secuencias necesarias para la propagación del plásmido en bacterias. El otro fragmento consistía en las secuencias que deberían ser componente del ADN MIDGE:
- 35 promotor de CMV mejorado, intrón quimérico, de la secuencia génica para IL-7 y de la secuencia de poliadenilación de SV-40. Mediante el enzima T4-ADN ligasa se ligaron los oligodesoxirribonucleótidos filiformes fosforilados en 5' ((TIB-MolBiol, Berlín, ODN 1 = ID sec 5 del documento WO 03/031469 A2 (Molgen y col.) sin base modificada X) y ODN 2 = ID sec 6 del documento WO 03/031469 A2 (Molgen y col.)) en presencia del enzima de restricción Eco311 durante la noche a 37 °C en el fragmento de ADN que forma ADN MIDGE. Entre tanto se hace referencia a la síntesis mostrada en el documento WO 03/031469 A2 (Molgen y col.) y a las secuencias de oligonucleótidos (ODN) ahí citadas. La reacción se detuvo tras calentamiento a 70 °C. La mezcla resultante en ácidos nucleicos se trató con el enzima T7-ADN-polimerasa. El ADN MIDGE se purificó mediante cromatografía de intercambio de aniones y se precipitó con isopropanol (véase el documento EP 0 941 318 B1).
- 40 Se realizó correspondientemente la preparación de los vectores que codifican GM-CSF, B7.1/CD80 y CD40L/CD154.
- 45 Preparación de MIDGE acoplado con NLS
- Para la preparación de NLS-MIDGE se hace referencia a la síntesis mostrada en el documento WO 03/031469 A2 (Molgen y col.) y las secuencias de oligonucleótidos (ODN) ahí citadas. Se acopla previamente el péptido de NLS (ID sec 4 del documento WO 03/031469 A2 (Molgen y col.) en el ODN. A tal fin se usó en la herradura con un ODN 1 provisto con un desoxiuracilo (XT) modificado con grupos amino así como el ODN 2 no modificado del documento
- 50 WO 03/031469 A2 (Molgen y col.):
- En primer lugar se activó el oligonucleótido ODN 1 (0,1 mM) modificado con sulfo-KMUS (5 mM) en PBS a temperatura ambiente. Después de 120 minutos se detuvo la reacción con tris-(hidroximetil)aminometano 50 mM y el ODN 1 activado se obtiene tras precipitación con etanol (NaOAc 300 mM pH 5,2, MgCl₂ 5,5 mM, etanol al 70 %), centrifugación y lavado una vez con etanol al 70 %. El ODN 1 así obtenido (0,1 mM) se disolvió en PBS y reaccionó

con el péptido NLS (0,2 mM) durante una hora a temperatura ambiente. La reacción se controló con electroforesis en gel (3 %) y coloración con bromuro de etidio. El ODN 1 acoplado con NLS que se genera se purificó mediante HPLC y se usó como se describe previamente con el ODN 2 para la síntesis de construcciones MIDGE-NLS.

Oligodesoxinucleótidos inmunizadores de doble hebra (d-SLIM)

5 Oligodesoxinucleótidos inmunizadores de doble hebra son moléculas con secuencias CG. Para ello se cierran covalentemente oligodesoxinucleótidos (ODN) lineales mediante bucle de nucleótido de modo que se protegen contra la degradación por exonucleasas. A este respecto resultan moléculas en forma de haltera, que se llaman dSLIM, "inmunomodulador en forma de tallo y horquilla" (véase la figura 2). El efecto inmunomodulatorio se basa en una activación no específica del sistema inmune mediante las secuencias CG no metiladas que se unen a receptores de tipo Toll. Cualquier bucle del DSLIM contiene tres motivos de CG no metilados.

10 Se prepararon inmunomoduladores de doble hebra d-SLIM del tipo ISS30 (SOP) y subsiguiente control de calidad en el laboratorio de clase B. A tal fin se ligaron oligodesoxirribonucleótidos (ODN) fosforilados en 5' en forma de herradura de hebra única con ligasa T4-ADN. Tras digestión de los eductos restantes con T4-polimerasa y purificación cromatográfica se concentraron los ODN mediante precipitación con etanol y acetato de sodio y magnesio y se disolvieron en PBS. El procedimiento exacto se representa en el documento WO 01/07055. La figura 15 2b muestra un d-SLIM de este tipo.

Caracterización de la línea tumoral alógena

La línea celular usada procede de un carcinoma de células renales primarias de una paciente femenina. A partir de estas células primarias se dispuso una línea celular y se depositó en la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) como cultivo viable con el número DSM ACC2635. Después de un procedimiento de cribado se determinaron tales células a partir de los cultivos primarios dispuestos de la paciente con tumor, lo que sirvió como material de partida para la preparación del banco de células madre. La población de células debió caracterizarse por la expresión estable de TAA, con una tasa de distribución constante y buena, así como un comportamiento de crecimiento lo más homogéneo posible. Igualmente se debió asegurar la ausencia de 25 de contaminación vírica o bacteriana.

La línea celular de carcinoma de células renales se comprobó en un laboratorio certificado que era negativa en virus HI, virus de hepatitis B y C. Igualmente se realizó una caracterización en lo referente al tipo de HLA, la expresión de TAA y la liberación de citoquinas. A tal fin se establecieron distintas técnicas como ELISA para determinaciones de citoquinas por ejemplo de: TNF-alfa, IL-6, GM-CSF e IL-7. Adicionalmente se desarrollaron medidas de FACS 30 intracelulares y ensayos de PCT RT a tiempo real. Tras la transfección se estudiaron las células en relación a la expresión de antígenos de superficie, moléculas de transducción de señal y genes reporteros. La línea celular se caracteriza por los siguientes valores inmunológicos de marcadores de superficie específicos:

EpCAM: positivo

Her-2/nuevo: negativo

35 Citoqueratina 7+8: positivo

HLA-A1: positivo

HLA-A2: positivo

Fibroblastos: negativo

Determinación de antígenos específicos del tumor:

40 PRAME: positivo SCP-1: positivo

MAGE-4: negativo Fertalina-beta: negativo

MAGE-3: negativo RAGE-1: positivo

MAGE-1: negativo G250: positivo

Electroporación

45 Para la transferencia génica ex-vivo en los núcleos de células de las células tumorales y de las células de control se usó preferiblemente el procedimiento de electroporación. Las células tumorales se desprenden con solución de tripsina/EDTA del recipiente de cultivo y se ajustan a una densidad de $1-1,5 \times 10^7$ células por 600 µl en medio (sin

FCS) o PBS. Esta suspensión celular de 600 µl se mezcla respectivamente con 5 a 10 µg de vector de expresión, se transfiere a cubetas de electroporación enfriadas (Eurogentec) y se somete a electroporación con una tensión de 300 v y la capacidad de 1050 microfaradios en un equipo de electroporación Easyject (EquiBio).

5 Después se transfieren las células a medio fresco (5-20 ml) y se incuban durante 24 horas en un armario de cultivo celular (CO₂ al 5 %, 37 °C, humedad saturada). Se realizó la medida de las moléculas de superficie (CD40L/CD154 y B7.1/CD80) y de citoquinas (GM-CSF e IL-7) mediante citometrías de flujo en cuatro colores. Igualmente se lleva a cabo un control de número de células y de vitalidad.

10 Inmediatamente tras la transferencia génica se cubrieron las células tumorales con 10 ml de medio de suspensión celular precalentado y se transfirió mediante pipeteo cuidadoso a tubos de centrifugación de 15 ml. Tras la sedimentación de las células a 300 x g y 4 °C durante 5 minutos se disolvieron en el medio. Se conservaron de nuevo alícuotas para ensayos de esterilidad, ensayos para regeneración de células y supervivencia, para análisis FACS y para la determinación de la expresión de citoquina. La eficiencia de transfección se determinó tal como se ha descrito (Foa y col., 1994, Nat. Immun. 13: 65-75)).

15 Se secó de nuevo la suspensión de células tumorales transfectadas, se recogió en 1,5 ml de medio de congelación (80 % de FCS, 10 % de DMSO, 10 % de medio de suspensión) y se conserva en porciones de células de 8×10^6 a $1,4 \times 10^7$ en tubos de congelación de 2 ml precintados. Los tubos se conservaron a -80 °C a 1 °C/minuto en nitrógeno líquido.

Acabado de la vacuna de acuerdo con la invención

20 Tras descongelación cuidadosa de los tubos de congelación se determinó de nuevo la cantidad de células y se reservaron alícuotas para ensayos de esterilidad. Tras lavado meticuloso repetido de las células se resuspendió el agregado celular obtenido en solución salina tamponada de fosfato de Dulbecco (DPBS, Camprex nº de catálogo: 17-512F). Según el preparado se incorporaron a la suspensión 500 microgramos del adyuvante DSLIM. La vacuna preparada se transfirió a un recipiente de reacción sin endotoxina estéril. Mediante cánulas se recogieron en jeringas respectivamente 750 microlitros de este preparado .

25 Antes de la aplicación se realizaron cinco irradiaciones de las inyecciones con radiación gamma, lo que correspondía a una dosis total de 150 Gray.

Preparación de linfocitos

30 Se obtuvieron monocitos sanguíneos periféricos (PBMC) a partir de sangre periférica heparinizada mediante Lymphoprep (GIBCO, Karlsruhe) por medio de centrifugación por densidad. Las células se lavaron dos veces con PBS y se secaron por congelación en nitrógeno líquido en presencia de más del 20 % de FCS para ELISPOT y ensayos citotóxicos.

Análisis estadístico

Se usó la prueba de muestras apareadas y no apareadas ajustada de Wilcoxon para el análisis de significantes estadísticos. Se considera un valor de $p < 0,05$ como significativo.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Vacuna para el tratamiento de pacientes con enfermedades tumorales, que contiene células tumorales alógenas y oligodesoxirribonucleótidos inmunomoduladores como adyuvante, en donde se transfectaron las células tumorales en primer lugar ex-vivo con moléculas de ácido nucleico que codifican interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), CD40L/CD154 y B7.1/CD80.
2. Vacuna para el tratamiento de pacientes con enfermedades tumorales, que contiene células tumorales alógenas y oligodesoxirribonucleótidos inmunomoduladores como adyuvante, en donde se transfectaron las células tumorales en primer lugar ex-vivo con moléculas de ácido nucleico que codifican interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y CD40L/CD154.
- 10 3. Vacuna según la reivindicación 1 ó 2, en donde las moléculas de ácido nucleico de codificación están presentes en una o varias construcciones de expresión.
4. Vacuna según la reivindicación 3, en donde la construcción de expresión
- a) es un plásmido, o
- 15 b) es un casete de expresión cerrado covalente, de doble hebra lineal, que se compone solamente de un promotor de CMV, de un intrón, de la secuencia génica de codificación y de una secuencia de poliadenilación, que está cerrado covalentemente en ambos extremos de la doble hebra mediante un bucle corto de restos de nucleótidos de hebra única.
5. Vacuna según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el oligodesoxirribonucleótido inmunomodulador
- a) comprende una secuencia con la sucesión de bases $N^1N^2CGN^3N^4$, siendo N^1N^2 un elemento seleccionado del grupo que comprende GT, GG, GA, AT o AA, N^3N^4 un elemento seleccionado del grupo que comprende CT o TT, así
- 20 como C desoxicitosina, G desoxiguanosina, A desoxiadenosina y T desoxitimidina,
- b) y una hebra circular comprende ácido desoxirribonucleico con una secuencia de bases antiparalela parcialmente complementarias entre sí, y está configurada en forma de haltera.
6. Vacuna según la reivindicación 5, en donde la secuencia con la sucesión de bases $N^1N^2CGN^3N^4$ está posicionada en la región de hebra única del oligodesoxirribonucleótido y comprende de 40 a 200 nucleótidos.
- 25 7. Vacuna según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende un vehículo farmacéuticamente compatible.
8. Vacuna según la reivindicación 1 ó 2, en donde las células tumorales alógenas se seleccionan de carcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de ovarios y carcinoma de células renales así como de melanoma maligno.
9. Vacuna según una o varias de las reivindicaciones 1 a 8, en donde las células tumorales proceden de la línea celular del carcinoma de riñón, que está depositada con el número DSM ACC 2635 en la DSMZ.
- 30 10. Procedimiento para la preparación de una vacuna según las reivindicaciones 1 a 8 para el tratamiento de pacientes con enfermedades tumorales, en donde se transfectan células tumorales alógenas ex vivo con moléculas de ácido nucleico que codifican
- a) interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), CD40L/CD154 y B7.1/CD80 o
- 35 b) interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y CD40L/CD154
- y a continuación se añaden oligodesoxirribonucleótidos inmunomoduladores como adyuvante y a continuación se realiza la transmisión en una composición farmacéutica que se pueda administrar.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en donde el oligodesoxirribonucleótido inmunomodulador comprende un ácido desoxirribonucleico de hebra circular con una secuencia de bases antiparalela parcialmente complementaria entre sí, y está configurada en forma de haltera.
- 40 12. Procedimiento según la reivindicación 10 u 11, en donde el oligodesoxirribonucleótido inmunomodulador comprende una secuencia con la sucesión de bases $N^1N^2CGN^3N^4$, siendo N^1N^2 un elemento seleccionado del grupo que comprende GT, GG, GA, AT o AA, N^3N^4 un elemento seleccionado del grupo que comprende CT o TT, así como C desoxicitosina, G desoxiguanosina, A desoxiadenosina y T desoxitimidina,
- 45 13. Procedimiento según la reivindicación 12, estando posicionada la secuencia con la sucesión de bases $N^1N^2CGN^3N^4$

en la región de una hebra del oligodesoxirribonucleótido y comprende de 40 a 200 nucleótidos.

14. Procedimiento según la reivindicación 10, en donde la molécula de ácido nucleico está presente en una o varias construcciones de expresión.
- 5 15. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 10 a 14, caracterizado porque la transfección se realiza mediante transferencia balística, transfección de policones, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, fusión de protoplastos, fusión de liposomas, sistemas de transfección víricos, lipofección y/o electroporación.
16. Procedimiento según la reivindicación 10, en donde las células tumorales alogenas se seleccionan de carcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de ovarios y carcinoma de células de riñón así como de melanoma maligno.
- 10 17. Procedimiento según la reivindicación 10, en donde las células tumorales proceden de varios pacientes con el mismo cuadro de enfermedad.
18. Procedimiento según una de las reivindicaciones 10 a 17, en donde se usan células tumorales de la línea celular del carcinoma de riñón que está depositada con el número DSM ACC 2635 en la DSMZ.
19. Célula tumoral humana que se transfectó ex vivo con moléculas de ácido nucleico que codifican
- 15 a) interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), CD40L/CD154 y B7.1/CD80 para o
- b) interleuquina-7 (IL-7), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) y CD40L/CD154
- y presenta construcciones de expresión correspondientes.
20. Célula tumoral humana según la reivindicación 19, en donde la construcción de expresión
- 20 a) es un plásmido, o
- b) es un casete de expresión cerrado covalente, de doble hebra lineal, que se compone solamente de un promotor de CMV, de un intrón, de la secuencia génica de codificación y de una secuencia de poliadenilación, que está cerrado covalentemente en ambos extremos de la doble hebra mediante un bucle corto de restos de nucleótidos de hebra única.
- 25 21. Célula tumoral humana según las reivindicaciones 19 y 20, que se trata de una célula tumoral alogena de una línea celular del carcinoma de células renales.
22. Célula tumoral humana según la reivindicación 21, que se trata de células tumorales de la línea celular del carcinoma de células renales, que está depositada con el número DSM ACC 2635 en la DSMZ.
23. Célula tumoral humana según una o varias de las reivindicaciones 19 a 22 para uso como vacuna para el tratamiento de enfermedades tumorales.

Figura 1

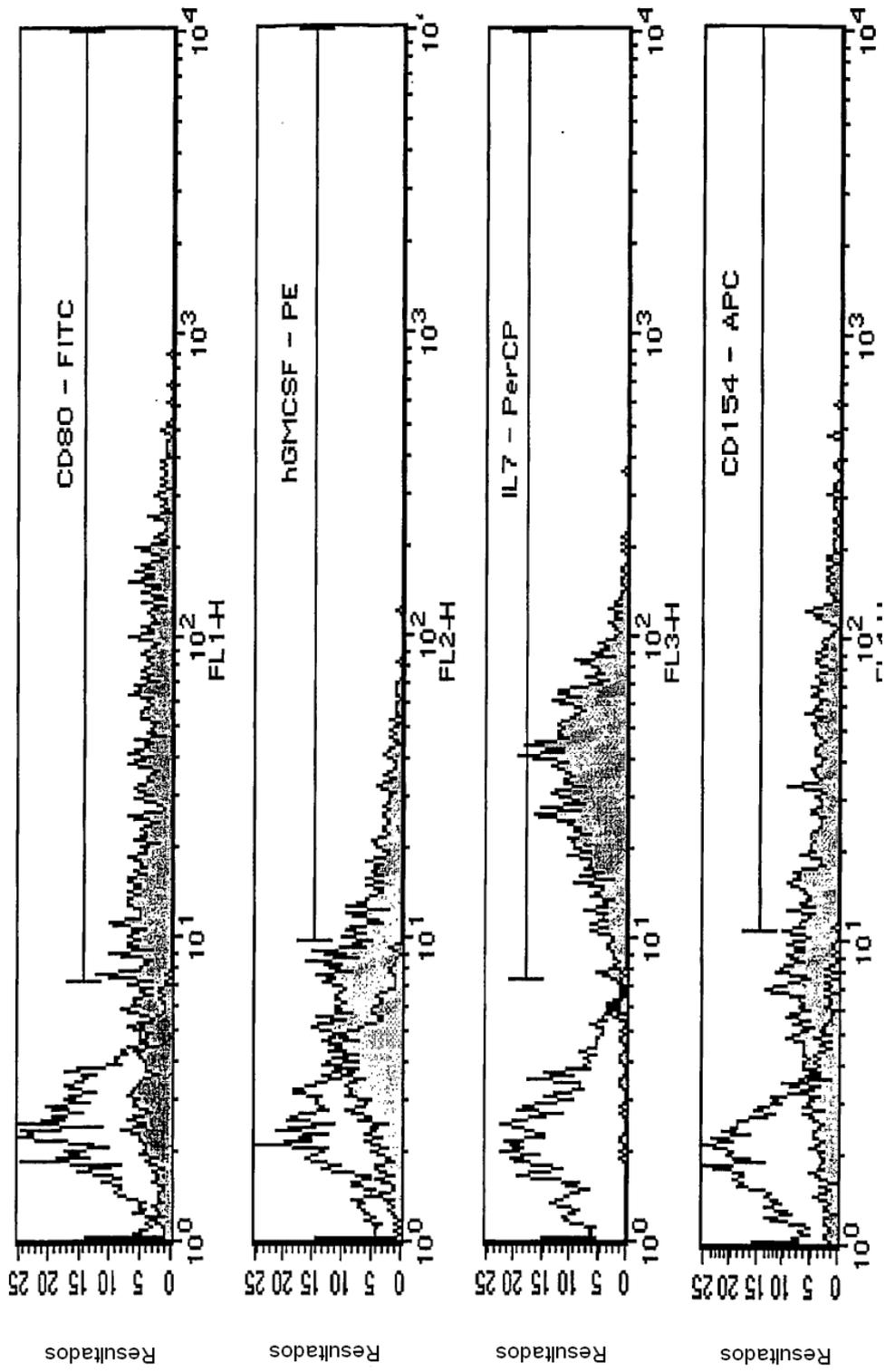


Fig. 2 a

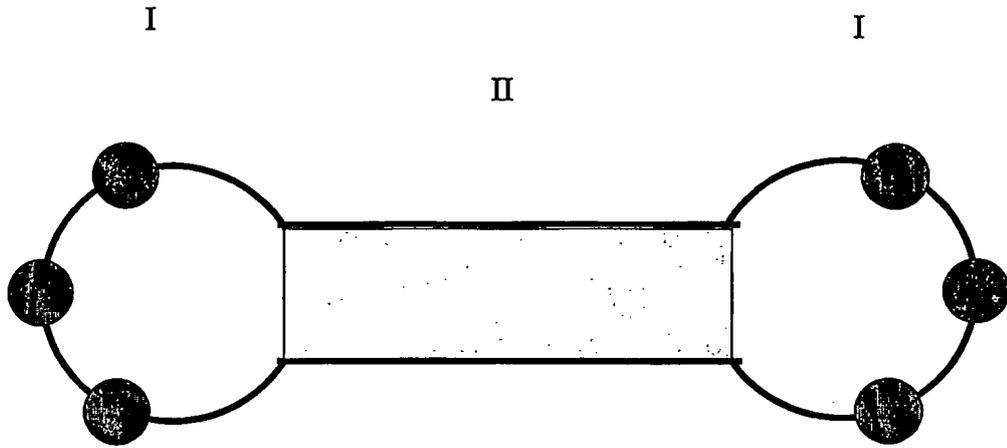


Fig. 2.b

