

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 077**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C12N 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03730977 .0**  
96 Fecha de presentación: **05.06.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1509244**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.03.2005**

54 Título: **NUEVO PROCEDIMIENTO Y COMPOSICIÓN PARA PRODUCIR UNA VACUNA ALOGÉNICA CELULAR.**

30 Prioridad:  
**06.06.2002 SE 0201726**  
**06.06.2002 US 385898 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.11.2011**

73 Titular/es:  
**IMMUNICUM AB**  
**STENA CENTER 1 HOLTERMANSGATAN 1**  
**412 92 GÖTEBORG, SE**

72 Inventor/es:  
**KARLSSON-PARRA, Alex;**  
**WALLGREN, AnnaCarin y**  
**ANDERSSON, Bengt**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

**ES 2 369 077 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

Nuevo procedimiento y composición para producir una vacuna alogénica celular

**[0001]** Esta invención se refiere al campo técnico de la inmunología molecular y la medicina, en particular, a un nuevo procedimiento para la obtención de una vacuna alogénica celular basada en células presentadoras de antígeno alogénicas (APCs), preferentemente monocitos, composiciones que comprenden dichos APCs y al uso de dichos APCs. La vacuna se utiliza preferentemente para el tratamiento del cáncer.

## Antecedentes

**[0002]** Durante la primera mitad de los años 1990, muchos grupos de investigación de 1990 trabajaron partiendo de la hipótesis de que las células tumorales autólogas (tomadas del mismo ser humano) podrían ser reformadas para ser potentes células presentadoras de antígeno (APCs) a través de modificación genética. En los estudios in vivo en ratones se informó en qué células tumorales, transfectadas ex vivo con genes que codifican para la molécula B7 co-estimuladora, utilizadas como vacuna contra el cáncer mediante la inyección de estas células en el receptor tuvieron un cierto éxito. La hipótesis era que la célula tumoral no sólo expresaría la señal 1 (MHC de clase I + péptido del tumor) para las células T específicas tumor CD8 +, sino también la señal 2, B7, lo cual teóricamente podría conducir a una activación eficiente de estos tumores reactivos CD 8 + CTL (linfocitos T citotóxicos).

**[0003]** Durante una revisión crítica de los mecanismos subyacentes inmunológicos responsables de los efectos a menudo muy positivos de este protocolo de vacunación, se demostró claramente que las APCs profesionales del receptor, más que las propias células del tumor de vacunación, fueron las responsables de cebado de CTL. Lo más probable es que las células tumorales que expresan B7 fueran asesinados de manera eficiente por células asesinas naturales (NK). Esta respuesta inmune mediada con células NK también se ha demostrado que induce un reclutamiento local células presentadoras de antígeno (APC) del receptor, incluyendo células dendríticas (DC), por lo que estas células toman todas las proteínas celulares liberadas al microambiente del tumor y las presentan indirectamente a los CTL, llamado cebado transversal. Esta vía indirecta de presentación de antígenos también explica por qué la vacunación con células tumorales transfectadas con el gen que codifica para el factor estimulante de la colonia de granulocitos macrófagos (GM-CSF) induce una respuesta antitumoral razonablemente buena en modelos de roedores ya la producción de GM-CSF local se ha demostrado que induce una producción local de la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 alfa, que es una fuerte quimioatrayente para precursores DG tales como monocitos y DCs inmaduros. Además, se ha mostrado que una inyección local de una vacuna de plásmido que expresa GM-CSF induce una acumulación local de DCs inmaduros en el sitio de la vacunación, que es seguida por la aparición de DCs maduros en los ganglios linfáticos regionales, en consonancia con la egresión de DC de maduración desde el lugar de la inyección y la migración a los ganglios linfáticos de drenaje. La vía indirecta de la presentación de antígenos tumorales también resuelve el problema con la demanda de una ayuda CD4 + T de células tipo 1 (Th1) para lograr una respuesta inmune CTL específica para el tumor eficiente y de larga duración, ya que también las células CD4 +restringidas MHC de clase II se pueden activar a través de la vía indirecta.

**[0004]** Con este conocimiento en la mano estaba abierto a la refinación de este principio, ex vivo e in vivo, que se basa en una presentación eficiente indirecta de antígeno tumoral por el receptor (autólogo) de APC. Un enfoque obvio ha sido el de propagar potentes APCs ex vivo, en particular, células dendríticas (DCs), y luego cargar estas células con proteínas derivadas de tumores, ya sea por pulsación o transfección. También se han desarrollado las llamadas vacunas dendritoma, donde las células tumorales autólogas se han fusionado con DCs autólogas derivadas de los monocitos. Un problema con la propagación ex vivo de DCs autólogas es sin embargo la migración menor de estas células para el drenaje de ganglios linfáticos (un requisito para las DCs inyectadas para encontrar células T ingenuas). Los estudios en humanos han demostrado que un 1% máximo de las DCs inyectadas de manera subcutánea migra a los ganglios linfáticos regionales.

**[0005]** Por lo tanto, se ha desarrollado un enfoque alternativo, sobre todo a partir de las observaciones durante la vacunación con células tumorales que producen GM-CSF en modelos de roedores, con el objetivo de inducir una contratación eficiente in vivo de DCs del receptor en el sitio de la vacunación. Los ensayos de fase I en humanos con cáncer de próstata y carcinoma renal y melanoma usando vacunas de células tumorales transfectadas GM-CSF autólogas han sido evaluados y considerados seguros, pero sin ningún efecto clínico evidente. Además, una vacuna basada en células tumorales autólogas se ha demostrado que crea varios problemas técnicos. En primer lugar, la vacuna depende de la disponibilidad de un número adecuado de células tumorales, que rara vez están disponibles debido al proceso reactivo que se encuentra con la infiltración de células tumorales de muchos tipos comunes de cáncer. En segundo lugar, la vacuna requiere la transferencia de genes novo para el tratamiento de cada paciente, que es una labor intensiva y puede causar niveles variables de expresión de citoquinas entre las diferentes vacunas en pacientes. En tercer lugar, hay gastos importantes y tiempo necesario para certificar la cantidad de vacuna para cada paciente para que cumpla con las directrices aceptadas para la administración. Una forma de soslayar estos obstáculos técnicos es utilizar una estrategia de vacuna que se basa en un panel de líneas de células tumorales alogénicas que expresan citoquinas que se pueden formular y almacenar antes de la iniciación de los estudios clínicos. Este es un enfoque particularmente atractivo para la mayoría de los cánceres comunes para que los que los antígenos específicos del tumor aún no han sido identificados. Dos hallazgos proporcionan la justificación inmunológica para un enfoque de vacuna de células tumorales alogénicas. En primer lugar, que las DCs del receptor, más que el propio tumor de la

vacuna, son responsables del cebado de las células CD4 + y CD8 + CTL, las cuales son necesarias para generar la inmunidad antitumoral sistémica (ver arriba). En segundo lugar, muchos antígenos tumores normalmente se expresan entre tumores de pacientes diferentes. Una vacuna GM-CSF sobre la base de este concepto ha sido desarrollada en modelos de roedores (Chang E. Y. et al, (International Journal of Cancer, 2000, Vol. 86. N° 5, páginas 725-730) y se estudió recientemente en un ensayo de Fase I y que se consideró seguro, pero sin ningún efecto clínico evidente. Lo más probable, esta insuficiencia clínica se debió a la producción de una sola citocina (GM-CSF), ya que teóricamente varios factores deben ser producidos localmente con el fin de inducir no sólo un reclutamiento eficiente de DCs inmaduras, sino también una maduración eficiente de estas células. Los factores necesarios probablemente incluyen citoquinas quimiotácticas tales como MIP-1 alfa y/o RANTES, factores de maduración tal como interleucina beta (IL)-1, IL-6 y/o factor de necrosis tumoral (TNF) alfa y, finalmente, factores de polarización Th1 tales como el interferón (IFN) gamma.

**[0006]** Dentro de las áreas de los trasplantes y las transfusiones se lucha a diario con el problema de la alo-inmunización, que es una inmunización mediada con células T contra antígenos HLA específicos de donantes presentados indirectamente. Esta inmunización se desarrolla frecuentemente con una fuerte potencia después de transfusiones con productos sanguíneos alogénicos y después del trasplante de órganos sólidos. Ni siquiera un potente tratamiento continuo inmunosupresor después de un trasplante con éxito primario de un órgano incompatible HLA parece evitar un proceso que progresa lentamente referido como rechazo crónico. Este proceso está mediado por células CD4+ de tipo Th1, que son activadas por péptidos HLA alogénicos indirectamente presentados por APCs autólogas. Estas células T CD4+ a su vez activan las células B que producen anticuerpos (IgG) específicos para los donantes y células T citotóxicas y los macrófagos tisulares, que constituyen los diferentes mecanismos efectores en el rechazo crónico. Un actor muy central para la puesta en marcha de un alo-inmunización parece ser APCs (alógenicas) derivadas del donante, viables y metabólicamente intactas. Si éstas se agotan o se inactivan por radiación UVB antes de una transfusión de, por ejemplo, concentrados de plaquetas, luego la inmunización es generalmente evitada. Esto también se aplica a APCs pasajeras en tejido trasplantado; si estas APCs alogénicas se agotan antes del trasplante, el riesgo de una inmunización posterior con rechazo crónico es esencialmente disminuido. Para tejido alogénico no viable, las mismas reglas de inmunización se refieren a otros antígenos derivados de proteínas extrañas, es decir, para lograr una inmunización esencial es necesario administrar el antígeno en una cantidad relativamente grande, junto con un adyuvante, tal como por ejemplo adyuvante Freud completo (FCA). Lo mismo es válido para la estimulación primaria in vitro con APCs alogénicas que expresan MHC no viables o alo-péptidos derivados de MHC que no inducen ningún cebado sustancial de células T ingenuas reconociendo indirectamente péptidos alo-derivados. Un cebado sustancial de estas células T es, sin embargo, obtenido mediante el uso de APC alogénica viable que expresa MHC durante la estimulación primaria.

**[0007]** Algo que difiere (discrimina) la estimulación primaria con APCs alogénicas viables de la estimulación primaria con APCs alogénicas no viables (lisadas o apoptóticas) in vitro es la proliferación muy poderosa de células T en la población de células de respuesta (receptor), que sólo se ve durante el la estimulación con APCs viables. Esta reacción que se denomina reacción de leucocitos mixtos alogénicos (MLR) también conduce a la producción de ciertas quimioquinas y citoquinas, incluyendo MIP-1 alfa, RANTES, IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa e IFN-gamma. La MLR es inducida tanto en células T ingenuas y de memoria de respuesta que reaccionan de manera cruzada con moléculas MHC en APCs alogénicas través de la experiencia de estas moléculas como sus propias secuencias de péptidos MHC + extranjeros, contra las que las células T estaban predestinadas a reaccionar. Se ha mostrado que por lo menos 1 de cada 20 de las células T circulantes pueden participar en este alo-reactividad preformada. Además, se sabe que el tratamiento de APC estimulador con agentes que reducen o eliminan los ácidos siálicos de las glicoproteínas en la membrana celular, así como la neuraminidasa y anticuerpos contra CD43, aumentan el potencial de las APC para inducir una respuesta proliferativa en las células T alogénicas.

**[0008]** Un procedimiento para inducir una respuesta inmune antígeno-específica mediante la administración conjunta de DCs alogénicas con DC autólogo, en el que se incorporó el antígeno a un sujeto se describe en el documento WO 99/47687. Las DC autólogas se esperaba que presentaran el antígeno a CTLs, mientras que las DC alogénicas se esperaba que indujeran una fuerte reacción de células T alo-reactivas resultando en la liberación local de moléculas estimuladoras que amplificarían la capacidad de las DC autólogas para activar CTLs. Ningún dato que apoye su hipótesis fue presentado ni provocó una respuesta inmune.

**[0009]** La vacunación con células híbridas que consiste en células tumorales autólogas fusionadas con DC maduras alogénicas se describe en "Regression of human metastatic cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids", A. Kugler et al. Nature Medicine, Vol. 6, N° 3, marzo de 2000, páginas 332-336. En teoría, este procedimiento se basa en la expectativa de que la co-expresión de la molécula MHC alogénica en la célula tumoral semi-alógenica (que expresa moléculas MHC de clase I autólogas + péptidos tumorales) activaría las células T alo-reactivas. Esta activación se traduciría en una liberación local de citoquinas estimulantes que ayudarían a activar la activación de los CTLs que reconocen el péptido tumoral en las moléculas MHC de clase I autólogas derivadas del tumor celular. El uso de este enfoque de la vacuna a un número limitado de pacientes con tumor renal mostraron una respuesta clínica contra el cáncer.

**[0010]** En el documento WO 9421798 se menciona que la transfección de ADN que codifica proteína de neuraminidasa en APCs autólogas (pero no APCs alogénicas) podría ser utilizado para aumentar su capacidad de presentar antígenos tumorales directamente las células T autólogas que restringen MHC, (ver página 3, línea 20 a 23 y

línea 28, página 4, línea 2 y página 7, línea 22-26). Este concepto se basa en el dogma central dentro de la inmunología presentada por Zinkemagl y Doherty en la mitad de los años 70: Una célula T-sólo reconoce péptidos extraños (por ejemplo, péptidos derivados de tumores a partir de un tumor autólogo o alogénico) si se presentan mediante APCs que expresan las propias moléculas MHC (es decir, APC compatible con MHC), llamada "auto-restricción MHG".

5 **[0011]** Los procedimientos que utilizan la inmunogenicidad de APCs alogénicas como adyuvante en la vacunación con APCs antígenas autólogas se ha descrito tal como se dijo arriba. En el documento WO 99/47687, APC autóloga cargada de antígenos se esperaba que presentara el antígeno a CTLs autólogos restringidos a MHC, mientras que la APC alogénica coadministrada se esperaba que indujera una respuesta inflamatoria alogénica que amplificaría la capacidad de la DC autóloga para activar los CTLs.

10 **[0012]** Una vacuna contra otros tumores, utilizando células dendríticas que se fusionan con células de cáncer, también se sugiere en "Smallpox, polio and now a cancer vaccine?", D.W. Kufe, Nature Medicine, Vol. 6, N° 3, marzo de 2000, páginas 252-253. Los procedimientos de Kugler et al y Kufe anteriores, sin embargo, están limitados por una serie de factores. En primer lugar, una vacuna autóloga depende de la disponibilidad de un número adecuado de células tumorales, que rara vez están disponibles debido al proceso de reacción que se encuentra en la infiltración de células tumorales de muchos tipos comunes de cáncer. En segundo lugar, una vacuna autóloga requiere la transferencia de genes de novo para el tratamiento de cada paciente, que requiere mucho trabajo y puede causar niveles variables de expresión de citoquinas entre las vacunas diferentes de pacientes. En tercer lugar, hay gastos importantes y de tiempo necesarios para certificar el lote de cada paciente de la vacuna para que cumplan con las directrices aceptadas de la administración.

20 **[0013]** En el documento US 20020039583 A1 también se mencionan APCs alogénicos y también xenogénicos cargados con complejos inmunes que contienen proteínas de estrés como una vacuna celular factible.

25 **[0014]** Los procedimientos descritos en el documento WO 99/47687 y en Nature Medicine por Kugler et al, sin embargo, están limitados por una serie de factores. En primer lugar, ambos procedimientos dependen de la disponibilidad de un número adecuado de células autólogas (APCs y/o células tumorales). En segundo lugar, ambos procedimientos requieren una manipulación con mucha mano de obra de las células autólogas para el tratamiento de cada paciente. En tercer lugar, hay un gasto importante y de tiempo requerido para certificar cada lote de la vacuna para los pacientes para que cumplan con directrices aceptadas por la administración.

**[0015]** El documento US-A-5985270 describe un procedimiento para el tratamiento de una persona con un tipo de cáncer que comprende la sensibilización de las células presentadoras de antígeno in vitro.

30 **[0016]** En "Generation of primary peptide-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocytes in vitro using allogeneic dendritic cells", Peshwa, MV et al (1998), Cell Transplantation 7:1-9 se describe el uso potencial del DC alogénico para inmunoterapia DC en SIDA y pacientes inmunocomprometidos de cáncer.

35 **[0017]** La publicación "Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation", Alijagic, S. et al (1995) Eur. J. Immunol. 25:3100-3107, se refiere al cebado de células T basado en APCs alogénicas incompatibles con MHC.

**[0018]** J.W. Fabre (2001) Nature Medicine 7:649-652 describe la presentación auto-restringida de MHC de péptidos tumorales mediante células dendríticas. Sin embargo, el concepto requiere un cierto grado de compatibilidad HLA, por lo que se aplican los inconvenientes antes mencionados.

40 **[0019]** Tanaka, Y. et al (2001) Clin. Immunol. 101:192-200 describe vacunación con DCs alogénicas fusionadas con células de carcinoma, induciendo inmunidad antitumoral en ratones. Sin embargo, la vacuna requiere algo de compatibilidad HMC, por lo que se aplican los inconvenientes antes mencionados.

**[0020]** Por lo tanto, hay una necesidad de una vacuna que cree una mejor respuesta inmune y que sea más adecuada para el almacenamiento, la producción en gran escala y sea independiente de las limitaciones de suministro.

#### **Descripción de la invención**

45 **[0021]** La presente invención resuelve los problemas antes mencionados, proporcionando una composición para uso médico y el uso de una composición que tiene las características indicadas en las reivindicaciones independientes 1 y 3, y una realización preferida de dicha composición para uso médico se define en la reivindicación dependiente 2 adjunta.

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

50 **[0022]** Se pretende a lo largo de la presente descripción que la expresión "vacuna alogénica celular" abarque cualquier reactivo, célula o compuesto capaz de provocar una respuesta inmune específica para un antígeno en un sujeto, en el que dicho reactivo, célula o compuesto es de origen alogénico, es decir, proviene de un donante, preferiblemente de un donante humano, que no sea el receptor, preferentemente un receptor humano, de la vacuna alogénica celular.

**[0023]** Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones, la forma singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, incluidas las mezclas de las mismas.

5 **[0024]** Los términos "célula(s) presentadora(s) de antígeno", "APC" o "APCs" incluyen tanto las células intactas, en conjunto, así como otras moléculas (todas de origen alogénico) que son capaces de inducir la presentación de uno o más antígenos, preferiblemente en asociación con moléculas MHC de clase I, y cualquier tipo de células mononucleares que son capaces de inducir una respuesta inmune alogénica. Preferiblemente, células viables completas se utilizan como APCs. Ejemplos de APCs adecuados se describen en detalle a continuación e incluyen, pero no se limitan a, células enteras, tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células dendríticas derivadas de monocitos, macrófagos derivados de células dendríticas, células B y células de leucemia mieloide, por ejemplo, líneas celulares THP-1, U937, HL-60 y CEM-CM3. Las células de leucemia mieloide se dice que proporcionan los llamados pre-monocitos.

10 **[0025]** Los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" se usan indistintamente y, en cualquier forma singular o plural, tal como figura en la presente descripción y en las reivindicaciones, y se refieren a células que han sufrido una transformación maligna que las hace patológicas para el organismo huésped. Las células de cáncer primarias (es decir, las células obtenidas cerca del sitio de la transformación maligna) se pueden distinguir fácilmente de las células no cancerosas mediante técnicas bien establecidas, en particular examen histológico. La definición de una célula de cáncer, tal como se usa aquí, incluye no sólo una célula de cáncer primario, sino también cualquier célula derivada de un antepasado de células cancerosas. Esto incluye las células de cáncer con metástasis, y cultivos in vitro y líneas celulares derivadas de células cancerosas. Cuando nos referimos a un tipo de cáncer que normalmente se manifiesta como un tumor sólido, un tumor "clínicamente detectable" es uno que es detectable sobre la base de la masa tumoral, por ejemplo, mediante procedimientos tales como la tomografía axial computarizada (CAT), resonancia magnética (MRI), rayos X, ultrasonidos o palpación. Los hallazgos bioquímicos o inmunológicos en solitario pueden ser insuficientes para cumplir con esta definición.

15 **[0026]** El término "genéticamente modificado" se entiende, tal y como aparece en la presente memoria, que contiene y/o expresa un gen extraño o secuencia de ácido nucleico que a su vez, modifica el genotipo o fenotipo de la célula o su progenie. En otras palabras, se refiere a cualquier adición, supresión o alteración de nucleótidos endógena de las células. APCs modificadas mediante transfección, infección o fusión son ejemplos de APCs modificados genéticamente. APCs que sólo pulsadas no están genéticamente modificadas.

20 **[0027]** Una "cantidad efectiva", tal como aparece en la presente descripción y en las reivindicaciones, es una cantidad suficiente para producir resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad efectiva puede ser administrada en una o más administraciones, aplicaciones o dosis. Las vacunas de la presente invención pueden ser administradas o aplicadas por vía transdérmica, oral, subcutánea, intramuscular, intravenosa o parenteral. Para propósitos de esta invención, una cantidad efectiva de las vacunas es la cantidad que provoca una respuesta inmune específica para el antígeno en el sujeto. Una cantidad adecuada puede ser de aproximadamente  $10 \times 10^5$  células para su administración a un sujeto. Una ampolla (que puede ser congelada y descongelada antes de usarse) puede contener  $20 \times 10^6$  células. Las células de una ampolla congelada (o vial) se pueden cultivar de nuevo antes de administrarse a un sujeto. Obviamente, la cantidad será determinada por el médico, que ha de juzgar la naturaleza y la severidad de la condición del sujeto que necesita el tratamiento. La condición del sujeto también puede pedir volver a la vacunación, que se puede realizar en cualquier punto de tiempo después de la primera vacunación, por ejemplo, cada tercera a sexta semana. Antes de administrar la vacuna o la composición de acuerdo con la presente invención, dicha vacuna o composición es preferiblemente irradiada con rayos gamma.

25 **[0028]** El término "un agente capaz de eliminar el ácido siálico en las superficies celulares", tal como aparece en la presente descripción y en las reivindicaciones, se refiere a un agente que es capaz de eliminar el ácido siálico de las superficies celulares. Ejemplos de tales células son las APCs en los términos expuestos. Agentes que son capaces de eliminar el ácido siálico de las superficies celulares puede ser ejemplificado por la neuraminidasa (NAS) y anticuerpos contra CD 43 (anti-CD43). Preferentemente, dicho agente es NAS. NAS se cree que se unirá al ácido siálico de glico-conjugados y anti-CD43 se piensa para trae el ácido siálico desde la superficie y en la célula. Otros ejemplos de dichos agentes son genes que codifican NAS o virus o bacterias que producen NAS. La NAS se puede obtener a partir de bacterias y virus, por ejemplo de *Vibrio cholerae*, virus de Newcastle, virus de influenza o *Clostridium perfringens*. Otro agente preferido es un anticuerpo contra CD43, es decir, la glicoproteína de membrana CD43.

30 **[0029]** El término "cultivar", tal como aparece en la presente descripción y en las reivindicaciones, se refiere a la propagación in vitro de células u organismos en medios de diversos tipos. Se entiende que los descendientes de una célula crecida en cultivo no pueden ser completamente idénticos (ya sea morfológica, genética o fenotípicamente) a la célula madre. Un medio de cultivo adecuado puede ser seleccionado por el experto en la materia y ejemplos de estos medios son medio RPMI o medio mínimo esencial Eagles (EMEM).

35 **[0030]** Un "sujeto", tal como aparece en la presente descripción y en las reivindicaciones, es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, simios, humanos, animales de granja, animales de deporte, y mascotas. El sujeto también puede ser un paciente.

**[0031]** Un "antígeno", tal como aparece en la presente descripción y en las reivindicaciones, se refiere a cualquier especie, espécimen o compuesto capaz de provocar una respuesta inmune, por ejemplo, espécimen tumoral, una célula tumoral, un virus, una bacteria, un hongo, un parásito, una proteína o un péptido. El espécimen tumoral también se puede obtener de cualquier tumor. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el espécimen es seleccionado para representar a tantos otros tipos de tumores como sea posible. Si por ejemplo, una vacuna contra el cáncer de páncreas es deseable, a entonces un espécimen representativo de cáncer de páncreas (antígeno) se utiliza para la fabricación de una vacuna contra el cáncer de páncreas. Si por el contrario, por ejemplo, una vacuna contra el cáncer de mama es deseable, entonces un espécimen representativo de cáncer de mama (antígeno) se utiliza para la fabricación de una vacuna contra el cáncer de mama. Dicho espécimen tumoral también puede ser preferiblemente de origen alogénico.

**[0032]** Una "composición", tal como figura en la presente descripción y en las reivindicaciones, se entiende que significa una combinación de agente activo, es decir, la vacuna, y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente detectable o etiqueta) o activo, tal como un adyuvante. En un aspecto particular, una composición de esta invención comprende la vacuna y un portador farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración al sujeto. Una "composición farmacéutica", tal como aparece en la presente descripción y en las reivindicaciones, se pretende que incluya la combinación de un agente activo con un portador, inerte o activo, haciendo la composición adecuada para su uso diagnóstico o terapéutico in vitro, in vivo o ex vivo.

**[0033]** Tal como se usa aquí, el término "portador farmacéuticamente aceptable", tal como aparece en la presente descripción y en las reivindicaciones, abarca cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como solución salina tamponada de fosfato, agua y emulsiones, tal como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes. Las composiciones pueden incluir también estabilizantes y conservantes. Para ejemplos de portadores, estabilizadores y adyuvantes, ver Martin, REMINGTON'S PHARM. SCI., 15a ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975)).

**[0034]** Los términos "complejo de histocompatibilidad mayor" o "MHC" se refieren a un conjunto de genes que codifican moléculas de la superficie celular que se requieren para la presentación de antígenos a células T y de rechazo del injerto rápido. En los seres humanos, el complejo MHC también se conoce como el complejo HLA. Las proteínas codificadas mediante el complejo MHC se conocen como "moléculas MHC", y se clasifican en moléculas MHC de clase I y clase II. Las moléculas MHC de clase I incluyen proteínas de la membrana heterodiméricas formadas por una cadena codificada en el MHC asociado de forma no covalente con  $\beta$ 2-microglobulina. Las moléculas MHC de clase I se expresan en casi todas las células nucleadas y se ha demostrado que funcionan en la presentación de antígenos a las células T CD8+. Las moléculas de clase I son HLA-A, -B, y -C en los seres humanos. Las moléculas de clase I generalmente se unen a péptidos de 8-10 aminoácidos de longitud. Las moléculas MHC de clase II también incluyen proteínas de la membrana heterodimérica. Los MHC de clase II son conocidos por participar en la presentación de antígenos a las células T CD4+ y, en los seres humanos, incluyen HLA-DP, -DQ y -DR. Las moléculas de clase II generalmente se unen a péptidos de 12-20 residuos de aminoácidos de longitud. El término "restricción MHC" se refiere a una característica de células T que les permite reconocer el antígeno sólo después de que se procesa y los péptidos antigénicos resultantes se muestran en asociación con una molécula MHC propia de clase I o propia de clase II.

**[0035]** El aislamiento de una APC se puede realizar in vivo y/o in vitro.

**[0036]** Aquí se proporciona un procedimiento para provocar respuestas inmunes específicas para el antígeno, y en particular, respuestas, inmunes contra antígenos tumorales.

**[0037]** De acuerdo con otra realización, se proporciona una vacuna donde dicha APC es un monocito alogénico, es decir, un monocito derivado de una segunda parte (no derivado del mismo sujeto que ha de ser tratado con la vacuna).

**[0038]** Las APCs, preferentemente monocitos, se pueden aislar de la fracción de glóbulos blancos de un mamífero, tal como un murino, simio o un ser humano, preferentemente un ser humano. La fracción de glóbulos blancos puede ser de la sangre periférica de los mamíferos, preferiblemente un donante de sangre normal. Este procedimiento incluye las siguientes etapas: (a) proporcionar una fracción de glóbulos blancos obtenidos a partir de una fuente de mamífero mediante procedimientos conocidos en la técnica tales como leucaféresis, (b) separar la fracción de glóbulos blancos de la etapa (a) en cuatro o más sub-fracciones mediante elutriación centrífuga de corriente contraria. Los monocitos también pueden ser recuperados a partir de PBMC mediante elutriación, gradientes de Ficoll y Percoll, a través de su capacidad de adherirse a plástico o a través de la selección negativa o positiva usando anticuerpos vinculados a cuentas, por ejemplo, cuentas magnéticas.

**[0039]** De acuerdo con otra realización, se proporciona un procedimiento que comprende una etapa adicional entre la etapa a) y la etapa b): cultivar una APC, preferentemente un monocito, o diferenciación de una APC, preferentemente un monocito, en un medio adecuado en DC derivado de monocito, macrófagos o DC derivado de macrófagos. Esto puede lograrse mediante la incubación de monocitos o células de leucemia mieloide en presencia de factores de diferenciación (factores de crecimiento) tales como GM-CSF y/o IL-4 y/o TNF-alfa y/o factor de formación de colonias de macrófagos (M-CSF) y/o IFN-gamma en distintas combinaciones.

- [0040]** De acuerdo con otra realización, se proporciona un procedimiento en el que la APC es un monocito alogénico o una célula in vitro diferenciada que se deriva directa o indirectamente de un monocito alogénico.
- 5 **[0041]** De acuerdo con otra realización, se proporciona un procedimiento en el que el antígeno, según se enumera en la etapa b), es un antígeno de cáncer, preferentemente en forma de un antígeno soluble, un lisado de célula tumoral o célula tumoral viable, todas de origen alogénico.
- 10 **[0042]** De acuerdo con otra realización, se proporciona un procedimiento en el que la etapa b) se realiza a través de la incorporación del antígeno dentro de la APC usando cualquiera de los siguientes procedimientos: pulsar con antígeno soluble o lisado de células tumorales, transfección con genes que codifican para el antígeno o fusión con una célula tumoral alogénica. Como resultado de ello, se proporciona una vacuna adaptada para su uso contra el cáncer. También se puede utilizar una mezcla de diferentes antígenos de cáncer.
- 15 **[0043]** De acuerdo con otra realización, se proporciona un procedimiento en el que el agente capaz de eliminar el ácido siálico de la superficie celular de la APC, tal como se indica en la etapa c), es neuraminidasa (NAS), uno o más genes que codifican para la neuraminidasa o virus o bacterias productoras de neuraminidasa, o un anticuerpo contra CD43.
- 20 **[0044]** De acuerdo con otra realización, se proporciona un procedimiento en el que el tratamiento de la etapa c) se lleva a cabo mediante cualquiera de los siguientes procedimientos: tratamiento de la APC con NAS, transfección de la APC con genes que codifican para la NAS o infección a la APC con virus o bacterias productoras de NAS, tal como se ha indicado anteriormente. Preferiblemente, las APCs pueden ser transfectadas con NAS después de la modificación, por ejemplo, transfección, con el antígeno tal como se ha indicado anteriormente.
- 25 **[0045]** De acuerdo con otra realización, se proporciona un procedimiento que comprende una etapa adicional en la que la APC está expuesta a hipertermia (tensión por calor) durante la etapa b), o entre las etapas b) y c).
- [0046]** De acuerdo con otra realización, se proporciona un procedimiento en el que la hipertermia indicada anteriormente se lleva a cabo a una temperatura de 39 a 42°C y durante 2 a 6 horas. Esta tensión por calor se realiza preferentemente a una temperatura de 39 a 42°C durante aproximadamente 3 horas. Preferiblemente, el pulsado, es decir, una forma de modificar las APCs, se realiza en el mismo tiempo, es decir, en paralelo.
- [0047]** De acuerdo con otra realización, se proporciona un contenedor congelado (tal como un tubo de ensayo, una ampolla o un vial) que comprende una composición.
- [0048]** De acuerdo con otra realización, se proporciona el uso terapéutico de una cantidad efectiva de una vacuna o una composición.
- 30 **[0049]** De acuerdo con otra realización, se proporciona una vacuna para uso médico.
- [0050]** De acuerdo con otra realización, se proporciona el uso de una vacuna para la fabricación de un medicamento para su uso contra el cáncer.
- 35 **[0051]** Una explicación para el efecto inesperado, al que los presentes inventores no están obligados en modo alguno, de la presente invención podría ser que las APCs alogénicas modificadas, preferentemente monocitos, cuando se inyectan en un sujeto, generalmente inducen un MLR local, que crea un entorno que es favorable para el reclutamiento y la maduración de los precursores de DC, que durante su diferenciación/maduración también adquieren por ejemplo, péptidos derivados de tumores a partir de células híbridas alogénicas localmente lisadas, es decir, APCs modificadas. Así, el efecto normalmente negativo inducido por una APC alogénica de un trasplante o una transfusión (alo-inmunización) se puede utilizar de manera positiva, por ejemplo inmunización frente a otros antígenos extraños, tales como los antígenos del cáncer.
- 40 **[0052]** Para un inmunólogo/un experto en la materia, el concepto de la presente invención es completamente diferente a la técnica descrita en el documento WO 9421798, es decir, el suministro de antígenos tumorales en una APC alogénica tratada con NAS pero incompatible con MHC, es completamente diferente a la técnica descrita en el documento WO 9421798, donde la compatibilidad con MHC entre la APC transfectada con NAS y las células T es un requisito previo. Para el experto en la materia, nuestro concepto incluso puede parecer prima facie como una locura (incluso si la APC fuera tratada con NAS). Este sería el caso si la estrategia actual de la presente invención partiera de la hipótesis de que la APC alogénica tratada con NAS fuera capaz de presentar el antígeno del tumor para las células T específicas del tumor del receptor. Por lo tanto, es una cuestión inmunológica, por supuesto, que en el documento WO 9421798 no han incluido APC alogénico como APC viable. El concepto actual de la presente invención, por el contrario, se basa en el uso de APCs alogénicos tratados con NAS como "portadores" de antígenos tumorales y, al mismo tiempo, un adyuvante que está en el receptor comienza una reacción inflamatoria (del mismo tipo pero muy probablemente más fuerte que el que lidera el cebado de células T alorreactivas después del trasplante de órganos alogénicos) que en un principio no es específico del tumor.
- 45 **[0053]** Los APCs alogénicos de la presente invención, por lo tanto, no están pensados para presentar el antígeno tumoral de los propios receptores de células T. Por el contrario, operan como un adyuvante a través de la
- 50
- 55

inducción de uno, sin relación con la activación no específica del tumor (alo-activación) del sistema inmune de los receptores. Esto a su vez conduce a que ellos mismos sean lisados (a través de la activación de células T aloreactivas/células NK), de modo que su contenido de antígeno tumoral se hace accesible para APCs de los receptores que debido al proceso inflamatorio han sido reclutados a la zona de vacunación.

5 **[0054]** La solicitud de patente US 20020039583 incluye APCs alogénicos "cargados" con antígeno (y APC xenogénico) como componentes celulares potenciales de una vacuna celular. Sin embargo, los inventores parecen creer que las células T reconocen complejos de péptidos/proteínas/inmunes que se encuentran en una superficie celular, sin necesidad de auto-restricción MHC. Aparentemente, ni siquiera un APC es necesario, ya que los inventores creen que el complejo no relacionados con las células también puede estimular las células T (vea la página 13, columna de la  
10 derecha *"las células T pueden ser estimulados con complejos de proteínas de estrés, polinucleótido que codifica un complejo de proteínas de estrés y/o células presentadoras de antígeno (APC), que expresan este complejo de proteínas de estrés"*). Nunca se menciona que un APC alogénico sería capaz de funcionar como un adyuvante para iniciar una reacción inmunológica que daría lugar al reclutamiento de las propias APCs de los pacientes (los sujetos). Para un experto en la materia debe parecer poco probable que el uso de APCs alogénicas "cargadas" de antígeno, tal como se  
15 indica en el documento US 2002' daría lugar a una activación directa de las células T incompatibles con MHC. Además, parece aún más improbable que un experto en la materia combinara este concepto con el concepto NAS descrito en el documento WO 9421798.

**[0055]** Al comparar la técnica descrita en Chang E.Y. et al, (International Journal of Cancer, 2000, Vol. 86. N° 5, páginas 725 a 730), uno de los objetivos es el mismo que en la presente invención, es decir, el reclutamiento de la  
20 APC de los pacientes al sitio de vacunación. En el concepto de la presente invención, además se obtiene una producción de quimiocinas tales como MIP-1 alfa y RANTES, reclutando monocitos/DCs inmaduras y factores de maduración tales como IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa e IFN-gamma que controla TH-1 (ver las figuras adjuntas de la presente memoria).

**[0056]** Las características preferidas de cada aspecto de la invención son para cada uno de los otros  
25 aspectos, mutatis mutandis. La invención también se describe en los siguientes ejemplos, junto con los dibujos adjuntos, que no limitan el alcance de la invención de ninguna manera. Las realizaciones de la presente invención, por lo tanto, se describen con más detalle con la ayuda de ejemplos de las realizaciones y las figuras, cuyo único propósito es ilustrar la invención y de ninguna manera la intención es limitar su alcance.

#### Descripción de las figuras

30 **[0057]**  
La figura 1 ilustra monocitos alogénicos como portadores de antígenos tumorales.  
La figura 2 muestra el concepto de vacuna de la presente invención.  
La figura 3 muestra los resultados del tratamiento previo usando neuraminidasa (NAS).  
35 La figura 4 muestra una fórmula óptima para la propagación in vivo de DCs maduros que llevan antígenos tumorales fagocitados, es decir, una realización preferida de la presente invención.  
La figura 5 muestra que los monocitos cultivados en medio que contiene 50% (v/v) de medio MLR acondicionado (MLR-CM) se convierten en células CD83+ con baja expresión de CD14 después de 6 días (gráfico inferior). El gráfico superior muestra un experimento de control, sin adición de MLR-CM.  
40 La figura 6 muestra que MLR-CM (50 v/v %) induce una maduración fenotípica (CD14 bajo, CD83+, CD86+, HLA-DR+ y CCR7+) de DCs inmaduras derivadas de monocitos, tal como se ilustra en los gráficos a la derecha. Los gráficos de la izquierda representan el fenotipo celular de los monocitos sin tratar.  
La figura 7 muestra el perfil de citocinas determinado en un MLR-CM usando Luminex.  
La figura 8 muestra el impacto de NAS en la célula tumoral alogénica y la producción de quimioquinas de APC tumoral alogénica durante MLR.  
45 La figura 9 muestra la producción de quimioquinas y de citoquinas en MLR autóloga vs alogénica, utilizando APCs estimuladoras tratadas con NAS.  
La figura 10 muestra el impacto del tratamiento con NAS en la producción de quimioquinas APC.  
La figura 11 muestra el impacto de anti-CD43 en la producción de quimioquinas de monocitos.



**Ejemplos**

**Ejemplo 1:**

**Preparación de los monocitos a partir de leucocitos**

5 [0058] Los monocitos se pueden obtener usando sangre periférica de un ser humano. Este procedimiento incluye las siguientes etapas: (a) proporcionar una fracción de glóbulos blancos obtenidos a partir de una fuente humana a través de leucaféresis, (b) separar la fracción de glóbulos blancos de la etapa (a) en cuatro o más sub-fracciones mediante elutriación centrífuga de corriente contraria. Los monocitos también pueden ser recuperados a partir de PBMC mediante elutriación, gradientes de Ficoll y Percoll o a través de su capacidad de adherirse al plástico. La selección negativa de los monocitos usando cuentas magnéticas vinculadas a ciertos anticuerpos disponibles por parte de Dynal o Miltenyi también es posible.

**Modificación de los monocitos**

15 [0059] Los monocitos pueden entonces someterse a un tratamiento de pulsación por el cual los monocitos son tratados (incubados) en una solución con proteína tumoral pura soluble (antígeno) en una concentración de proteínas de 1-10 mg/ml durante 3 horas a 37°C. La pulsación también se puede utilizar cuando el antígeno es lisados de células tumorales obtenidas por ejemplo, a partir de a) calentamiento - descongelación repetidos o b) sonicación, ambos con centrifugación posterior. A continuación, se mide la concentración de proteínas en el sobrenadante y se ajusta a 100 200 µg/ml.

20 [0060] Los monocitos también pueden ser fusionados (usando PEG, es decir, glicol de polietileno, como químico de fusión; la solución de PEG es preferiblemente un 50% y se diluye posteriormente) con células tumorales, creando así células inmortalizadas (híbridas) y, por lo tanto, vacunas. La fusión se realiza entre células tumorales alogénicas y monocitos alogénicos a partir de una segunda parte (véase más adelante). La transfección con genes que codifican antígenos también puede ser usada para crear monocitos modificados, es decir, vacunas (ver las figura 1 y 2).

**Tratamiento con neuraminidasa (NAS)**

25 [0061] Los monocitos modificados pueden ser tratados con 25 mU/ml de NAS. El tratamiento con NAS se ha demostrado que aumenta la mayoría de las quimiocinas/citoquinas (ver la figura 3). Los monocitos también pueden ser transfectados previamente con un gen adecuado que codifica para una NAS, por ejemplo, de V. cholerae.

**Efecto del tratamiento con neuraminidasa (NAS) en alo-reconocimiento directo y en la producción de quimioquinas/citoquinas**

30 [0062] Se ha sabido durante más de una década que el tratamiento de APC estimuladora con neuraminidasa, que conduce a la eliminación del ácido siálico en la membrana celular, mejora significativamente su capacidad para estimular las células T alogénicas en un MLR alogénico. Se ha sugerido que el aumento de la adhesividad intercelular inducida por una disminución de la carga de la superficie celular es una causa probable de este efecto de la neuraminidasa. También se ha sugerido que la APC tratada con neuraminidasa podría proporcionar algún factor accesorio no identificado requerido por las células T para la activación. Ahora se ha observado que las células mononucleares de sangre periférica alogénica (CMSP) tratadas con NAS de Vibrio cholerae (25 mU/ml) induce una respuesta proliferativa más fuerte entre las células T de respuesta en un MLR de una vía que PBMC sin tratar. Además, mediante la medición de la producción de quimioquinas y de citocinas durante un MLR alogénico de una vía se descubrió que MIP-alfa, RANTES, IL1-beta, TNF-alfa e IFN-gamma se producen en cantidades varias veces más altas cuando las células estimuladoras (monocitos irradiados) han sido tratados con NAS (figura 3).

40 **Hipertermia**

[0063] La hipertermia (tratamiento de estrés por calor) de las células modificadas puede realizarse sometiendo los monocitos modificados a calentamiento a 40°C durante 3 horas. El tratamiento para la fiebre también se ha demostrado que regula al alza la cantidad de antígeno tumoral acoplado a HSP (en el lisosoma y/o en el citoplasma) dentro de los monocitos. Este tratamiento también se ha demostrado que aumenta la cantidad de péptidos tumorales inmunogénicos. La presentación no se ve afectada negativamente.

**El efecto del estrés por calor en el alo-reconocimiento directo**

50 [0064] Las proteínas citosólicas, así como las lisosomales son conocidas por estar asociadas a proteínas de choque térmico (HSP) durante el estrés por calor y es bien sabido que los péptidos asociados a HSP se vuelven más inmunogénicos in vivo. Esto es probablemente debido a una absorción más eficiente por parte de DC (endocitosis/fagocitosis mediada por el receptor). Además, se ha demostrado que ciertas HSPs inducen a la maduración de DC inmadura in vitro. Se ha comprobado que un estrés de hipertermia leve (41°C durante 2 horas), conocido por inducir una regulación substancial de la expresión HSP celular, no afecta negativamente a la capacidad de estimulación de PBMC irradiada para inducir respuestas de células T alogénicas según lo determine por la proliferación en un MLR de una vía (datos no mostrados).

**Estudios fenotípicos mediante FACS y mediciones de citocinas/quimiocinas**

**[0065]** Estudios anteriores realizados por otros han demostrado que medio acondicionado con monocitos (sobrenadantes tomados de cultivos de monocitos activados por sus receptores Fc), así como medio acondicionado con células T (sobrenadantes tomados de cultivos de células T activadas mediante estimulación con anticuerpos anti-CD3) inducen de manera eficiente la maduración DC. Nuestra hipótesis era que la interacción inmune entre los monocitos alogénicos y las células T de respuesta conduce a la producción de un "cóctel" de quimioquinas/citoquinas que también podría inducir la maduración final de DC inmadura in vitro. Mediante la realización de estudios primarios fenotípicos durante un MLR tradicional, un interesante fenómeno fue descubierto. Durante un MLR llamado de una sola vía (células estimuladoras irradiadas), pero no durante el MLR llamado de dos vías o durante la estimulación con monocitos alogénicos necróticos o apoptóticos, fue encontrada una subpoblación de células CD83 positivas con baja expresión de CD14, pero alta expresión de CD86 y HLA-DR. Mediante la adición de MLR-CM (50% v/v) tomada en el día 6 de MLRs alogénicos de una vía irradiados con células mononucleares adherentes al plástico como estimuladores ( $1 \times 10^5$  células/ml) y PBMCs alogénicas ( $1 \times 10^6$  células/ml) a monocitos adherentes en medio de cultivo también se observó que estas células "espectadoras" desarrollaron un fenotipo similar (CD83+/CD14 bajo) después de 6 días, tal como se ilustra en la figura 5. MLR-CM (50 v/v%) se añade a las DCs inmaduras derivadas de monocitos (diferenciadas en GM-CSF/IL4 durante 6 días). Dos días después (día 8), las células fueron fenotipadas mediante FACS. Se encontró que los monocitos se diferenciaban de las DCs fenotípicamente completamente maduras, tal como se ilustra en la figura 5, donde los gráficos de la izquierda representan el fenotipo celular en el día 0 y los gráficos a la derecha representan el fenotipo en el día 8. De particular interés es que una alta expresión de CCR7 puede ser mostrada en estas DCs maduras, que es de vital importancia para la migración a los ganglios linfáticos regionales. Mediante el uso de una técnica de perfilado de múltiples análisis (Luminex), el perfil de citoquinas se determinó en un MLR-CM y varias citoquinas con efectos conocidos sobre la diferenciación de los monocitos y la maduración de DCs se encontraron que incluían TNF-alfa, IFN-gamma, IL-1 beta. Los resultados se representan en la figura 7. Además, varias quimiocinas se producen incluyendo MIP-1 alfa. A través del tratamiento previo de las células estimulantes con neuraminidasa (NAS) de *Vibrio cholerae*, se logró un aumento adicional de la producción de quimioquinas/citoquinas en un MLR (ver la figura 3).

**[0066]** Para concluir, el descubrimiento anterior podría explicar por qué APCs pasajeras viables son tan importantes para la alo-inmunización. La reactividad preformada de las células T frente a los alo-antígenos directamente presentados en estas células provoca así un ambiente favorable para el reclutamiento y la maduración local de DCs de la persona trasplantada. Esta acumulación y maduración de DCs es un requisito previo favorable para el cebado posterior eficiente de células T aloreactivas ingenuas (que reconoce alo péptidos por vía indirecta) en los órganos linfoides secundarios.

**Establecimiento de líneas celulares de monocitoma mediante fusión de líneas celulares de cáncer humano con monocitos de sangre periférica alogénica**

**[0067]** Se pueden usar líneas celulares tumorales humanas (TCLs) incluyendo la línea de células de cáncer de mama MCF7 y la línea de células de próstata DU-145, adquirido de la Colección de Cultivo de Tejidos de América. Las TCLs pueden ser cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero humano AB inactivado por calor. 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, y 100 microgramos/ml de estreptomycin hasta la fusión. Monocitos aislados de sangre periférica alogénica de donantes de sangre sanos puede ser incubados con la TCL durante 5 minutos en una proporción de 10:1 en medio RPMI 1640 libre de suero que contenía 50% de glicol polietileno (PEG). RPMI 1640 se añade entonces poco a poco para diluir el PEG. Después del lavado y la eliminación de las células fusionadas por gradiente de densidad, los monocitomas pueden ser resuspendidos en medio RPMI 1640 suplementado con suero humano AB, L-glutamina, penicilina y estreptomycin, tal como se ha indicado anteriormente.

**Selección de líneas celulares de monocitoma a partir de células no híbridas**

**[0068]** La generación de híbridos de células se puede realizar en analogía con la generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Esto se basa en que la HGPRT se pueden fusionar para la selección positiva y negativa. En un principio, 6-tioguanina puede ser usada para seleccionar líneas celulares de cáncer que han mutado al gen HGPRT. Este producto químico se convierte en un intermedio tóxico mediante el producto del gen HGPRT. Las células mutantes son posteriormente fusionadas con monocitos/células dendríticas usando PEG o electrofusión, y cuando se cultivan en medio HAT, solamente las células fusionadas sobrevivirán. Esto se debe a que el medio HAT eliminará las células cancerosas que carecen del gen HGPRT y que los monocitos/células dendríticas no son de larga vida en el cultivo a pesar de que tienen un gen activo.

**Cebado in vitro de células Th1 humanas contra antígenos tumorales**

**[0069]** La capacidad de un MLR primario alogénico para inducir un cebado sustancial de células Th1 CD4+ humanas específicas para el antígeno se puede evaluar de la siguiente manera:

**[0070]** Los monocitos pueden ser pulsados con cualquiera de las proteínas tumorales solubles (1-10 mg/ml durante 3 horas), incluyendo antígeno prostático soluble (PSA) y antígeno de cáncer (CA)-125 o lisados de células tumorales repetidamente congelados y descongelados (100-200 microgramos de proteínas de células cancerosas/ml durante 3 horas) a partir de líneas celulares de tumores tales como cáncer de mama y células de cáncer de próstata.

Después de lavar y de irradiación gamma, los monocitos pulsados pueden ser utilizados como células estimuladoras en un MLR primario utilizando PBMC alogénico como respondedores. Después de 6 días, el cultivo celular puede ser lavado y reemplazado en medio de cultivo fresco que contiene 10 U/ml de interleuquina (IL)-2. Dos días después, las células del MLR primario se volvieron a estimular mediante la adición de PBMC irradiadas, autólogas a las células de respuesta en el MLR primario, pulsado con el antígeno que se utilizó durante el MLR primario. El número de células Th1 CD4 + que fueron cebadas durante el MLR primario pueden ser grabadas 1-2 días más tarde mediante un ensayo ELISPOT específico para las células productoras de IFN gamma.

**[0071]** Usando el mismo principio de ensayo, la capacidad de los monocitomas alogénicos para cebar células Th1 CD4+ durante un MLR primario se puede estudiar después de la reestimulación con PBMC autólogas pulsadas con un lisado de células a partir del monocitoma utilizado en el MLR primario.

#### **Comparación con las técnicas anteriores**

**[0072]** Se realizó una comparación con las técnicas anteriores que se describen en el documento WO 9421798 y Chang E.Y. et al, (International Journal of Cancer, 2000, Vol. 86. Nº 5, páginas 725-730.

**[0073]** En Chang et al se describe que a través de la inyección de células tumorales que producen GM-CSF, tratan de inducir a un ambiente inflamatorio que lleva al reclutamiento de la propia APC de pacientes en el sitio de la vacunación (estudios adicionales sobre el efecto de GM-CSF han demostrado que la producción local de GM-CSF induce la producción de MIP-1 alfa, lo que podría explicar el reclutamiento observado de células inmunológicas, incluyendo APC en el sitio de la vacunación). Como estas células tumorales que producen GM-CSF no tienen la intención de funcionar por sí mismas como APC para células T específicas del tumor, se pueden usar células tumorales autólogas y alogénicas como fuente de antígeno. Una condición previa es, sin embargo, que contengan el mismo antígeno tumoral que se expresa en el tumor del paciente. La selección de células tumorales alogénicas en Chang et al es esencialmente de naturaleza práctica pura a pesar de que mencionan que las vacunas alogénicas (es decir, vacunas que comprenden células alogénicas tumorales, no APC) pueden dar una mejor respuesta inmunológica en comparación con las vacunas de células tumorales autólogas (no APC). El efecto de la vacuna obtenida en el estudio de Chang E.Y. et al no debe atribuirse esencialmente, según los autores, a que las células tumorales alogénicas (la mayoría de los tumores no están compuestos por células derivadas de APC y, por lo tanto, pierden la clase II de MHC, que es el componente más importante con el fin de inducir una reacción inflamatoria frente a las células alogénicas), sino a su capacidad para producir GM-CSF. En su publicación también había una comparación formal realizada entre la inmunogenicidad de las células tumorales alogénicas (B16E7) y células B16E7 que producen GM-SCF (B16GME7). El resultado descrito muestra claramente que las células alogénicas tumorales que no producen GM-SCF tienen un efecto de vacunación mínimo en comparación con las células que producen GM-CSF. Estos resultados se corresponden con los resultados que hemos obtenidos ahora in vitro mediante la comparación de la reacción inflamatoria (producción de quimiocinas/citocinas) que surge al mezclar células inmunes (células mononucleares de sangre periférica) con células tumorales alogénicas (células THP1 que comprenden precursores de monocitos) o APC alogénico (células THP1 que a través de cultivo en GM-CSF e IFN alfa se diferencian de APC funcional), ver la figura 8. Las células alogénicas tumorales (incluyendo precursores de APC como células THP-1), parecen así ser débiles estimuladores del sistema inmune, si se comparan con APC alogénico completamente madurado. Lo que se puede ver en la figura 8, el tratamiento con NAS de APC alogénica conduce a un fuerte aumento en la producción de quimioquinas/citoquinas.

**[0074]** Tenemos en un modelo in vitro observado que la reacción inflamatoria que se produce cuando una APC potente (el componente de la vacuna) se pone en contacto con células mononucleares alogénicas de trasplante (que corresponden a las células inmunes del paciente), produce varias otras quimiocinas con capacidad conocida de reclutamiento de APC, además de MIP-1 alfa. Además, se producen varias citoquinas pro-inflamatorias, con la capacidad conocida para hacer también DCs inmaduras reclutadas para desarrollarse en DCs completamente maduras (ni GM-CSF ni MIP-1 alfa tienen la capacidad para ello). A través de la incubación de DCs inmaduras con medio a partir de la reacción anterior, también hemos sido capaces de demostrar que este medio realmente induce una maduración de las DCs. Finalmente, a través de un tratamiento previo de APCs alogénicas con NAS, hemos observado que la producción de quimiocinas y citoquinas se multiplica en el modelo anterior.

**[0075]** También estudiamos si había alguna diferencia entre APCs autólogas y alogénicas tratadas con NAS en relación con la inducción de citoquinas y quimiocinas inflamatorias. En un estudio comparativo, el concepto del documento WO 9421798 se utilizó en la comparación (con la presente invención), en el que los inventores en WO 9421798 obtuvieron un efecto de la vacuna. En nuestro estudio comparativo (ver la figura 9) se demostró que las APCs tratadas con NAS inducen una respuesta inflamatoria más poderosa que las células de respuesta alogénicas en comparación con las células autólogas de respuesta. Lo que se desprende de la figura 9 (Auto A, Auto B representan MLR autólogo, Allo A y Allo B representan MLR alogénico) es que, sobre todo, la producción de IFN-gamma se ve influenciada (producción aproximadamente 100 veces más potente en la situación alogénica). Además, hemos observado que las APCs tratadas con NAS normalmente inducen una proliferación de 50 a 100 veces más fuerte de las células alogénicas de respuesta que las autólogas. Como IFN-gamma es una de las citoquinas más importantes para controlar la respuesta inmune contra lo que se llama respuesta TH1, una respuesta que uno busca en la vacunación del cáncer, el potencial de nuestro concepto de vacuna es aún más evidente. Como también se puede ver, las células tumorales alogénicas en sí mismas son poco inmunogénicas (ver la figura 9). Ho se ha encontrado una indicación de la activación evaluable in vitro de células alogénicas de respuesta, ni siquiera si las células tumorales "estimulantes"

fueron tratadas con NAS. Si, por otro lado, las células tumorales están compuestas por APCs completamente maduras, entonces el tratamiento con NAS provoca una respuesta inflamatoria muy poderosa con la producción de varias de las citocinas y quimiocinas antes mencionadas.

**El impacto del tratamiento con NAS en diferentes APCs en cuanto a la producción de quimioquinas CC**

5 [0076] Se ha informado de que las DCs inmaduras producen mayores niveles de quimioquinas CC de las DCs maduras bajo la estimulación con lipopolisacárido y que las DCs derivadas de macrófagos son más potentes que las DCs derivadas de monocitos en este aspecto. Hemos comparado monocitos recién aislados con macrófagos (monocitos diferenciados en medio M-CSF durante 7 días) y DCs inmaduras (monocitos diferenciados en GM-CSF + IL-4 durante 7 días) y se encontró que los monocitos eran más potentes que los macrófagos o DCs para producir quimiocinas CC sobre bajo tratamiento con NAS ( $1 \times 10^9$  células/ml estimuladas con *Vibrio cholerae* neuraminidasa 25 mU/ml durante 24 horas). Estos hallazgos se ilustran en la figura 10.

**El efecto de anti-CD43 en la producción de quimioquinas de monocitos**

15 [0077] El tratamiento células dendríticas derivadas de monocitos con anticuerpos contra la glicoproteína de membrana CD43 se ha demostrado que regular a la baja la expresión de ácido siálico en la membrana celular e induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL1-beta, IL-6 y TNF-alfa. Hemos estudiado el impacto de anti-CD43 en la producción de quimioquinas de monocitos y se encontró que anti-CD43 induce también una producción importante de quimiocinas que se ilustra en la figura 11.

20 [0078] Varias realizaciones de la presente invención se han descrito anteriormente, pero un experto en la materia se da cuenta de otros cambios menores, que entran dentro del ámbito de la presente invención. La amplitud y el alcance de la presente invención no deben estar limitados por cualquiera de las realizaciones de ejemplo antes descritas, sino que debe ser definido sólo de acuerdo con las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes. Por ejemplo, cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente y/o procedimientos pueden combinarse con terapias o composiciones conocidas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a la que pertenece la invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición que comprende una célula presentadora de antígeno (APC), aislada de un sujeto, o establecida y/o aislada de una línea celular de leucemia mieloide, y modificada con un antígeno utilizando pulsos, transfección, infección o fusión y se trata con un agente capaz de eliminar ácido siálico en la superficie de dicha APC, para su uso como una vacuna alogénica celular en un sujeto incompatible al MHC.
- 5 2. Composición para su uso como una vacuna celular alogénica en un sujeto incompatible con MHC según la reivindicación 1, que también comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. Uso de una composición según la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para su uso contra el cáncer en un sujeto incompatible con MHC.

### Monocitos alogénicos como portadores de antígenos tumorales

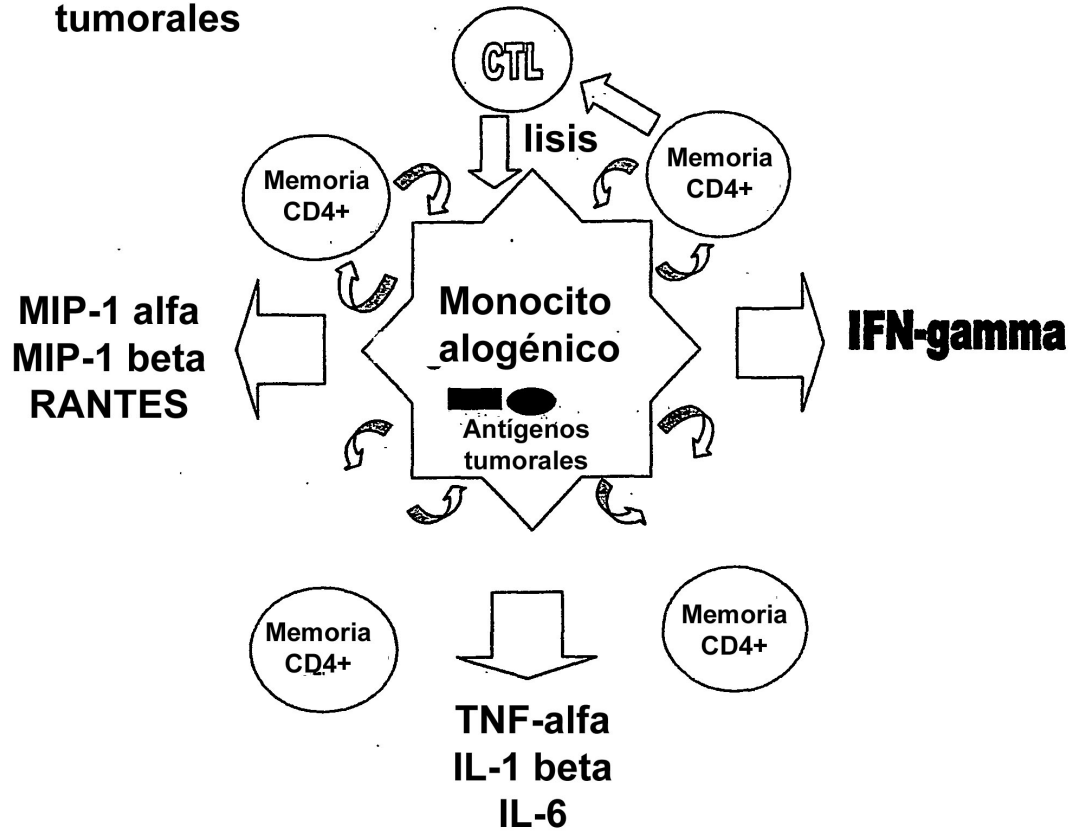
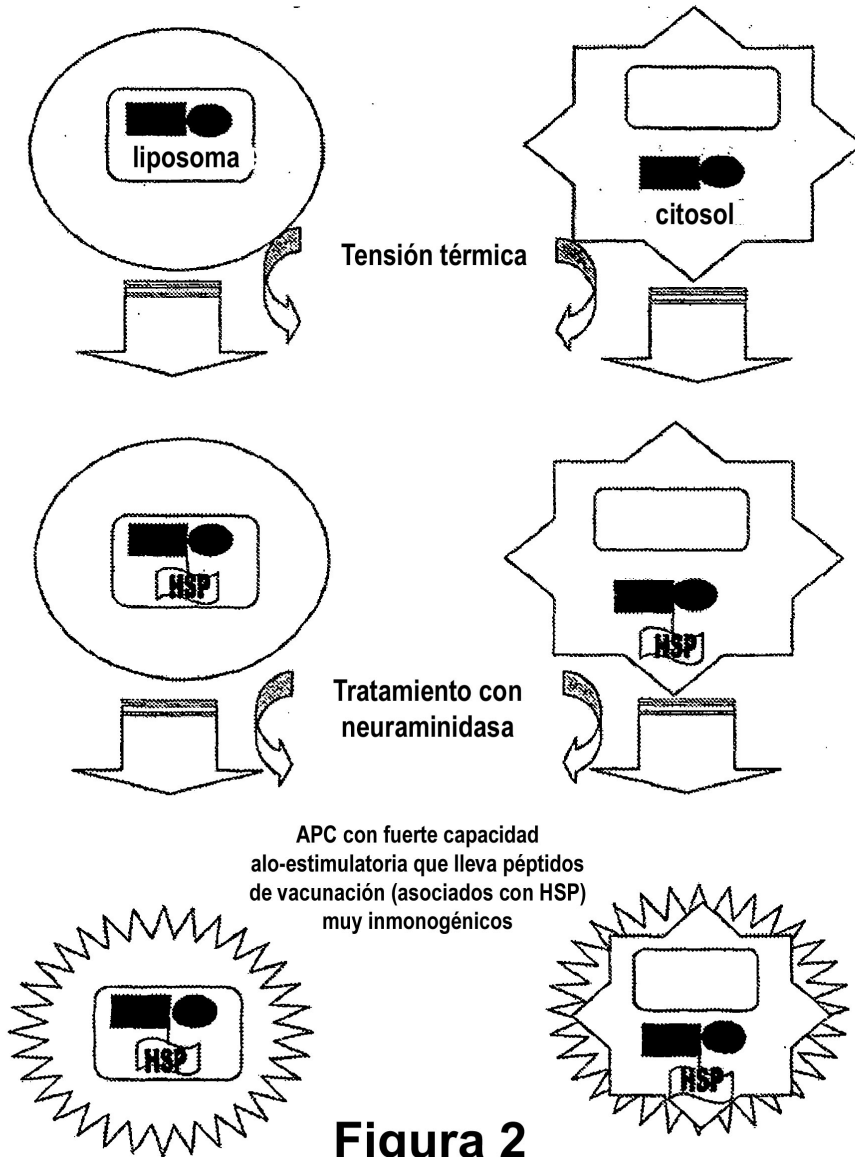


Figura 1

## Concepto de vacuna

Proteína purificada/recombinante  
**(virus, bacteria, tumor)**  
Proteína + monocito alogénico

Células tumorales  
(línea celular alogénica)  
Célula tumoral+monocito alogénico  
+ fusión química (PEG)



**Figura 2**

## Impacto de la neurominidasa en la producción de quimioquina/citoquina MLR

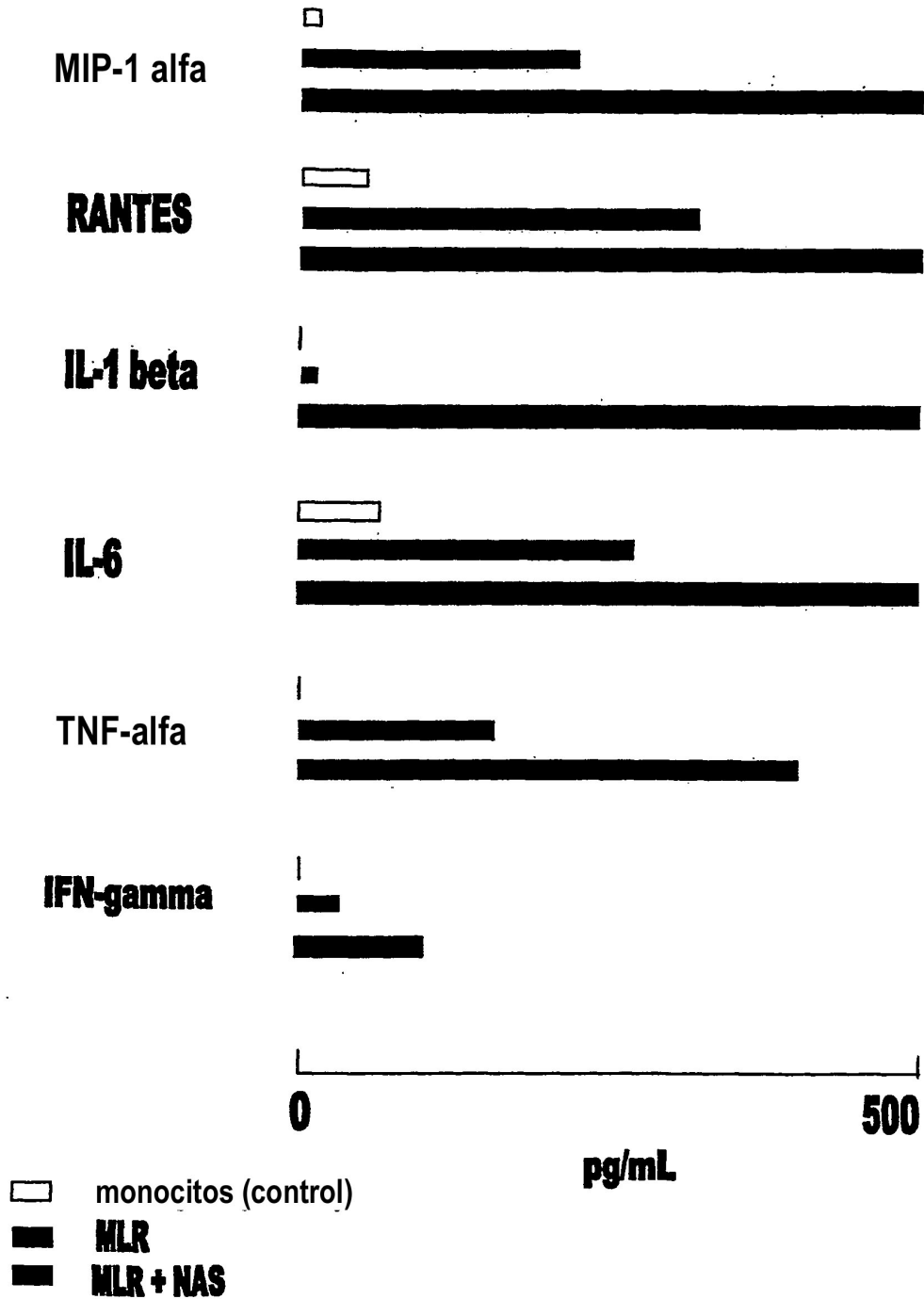


Figura 3



## Fórmula óptima para propagación eficiente in vivo de DC maduro que lleva antígenos fagocitados

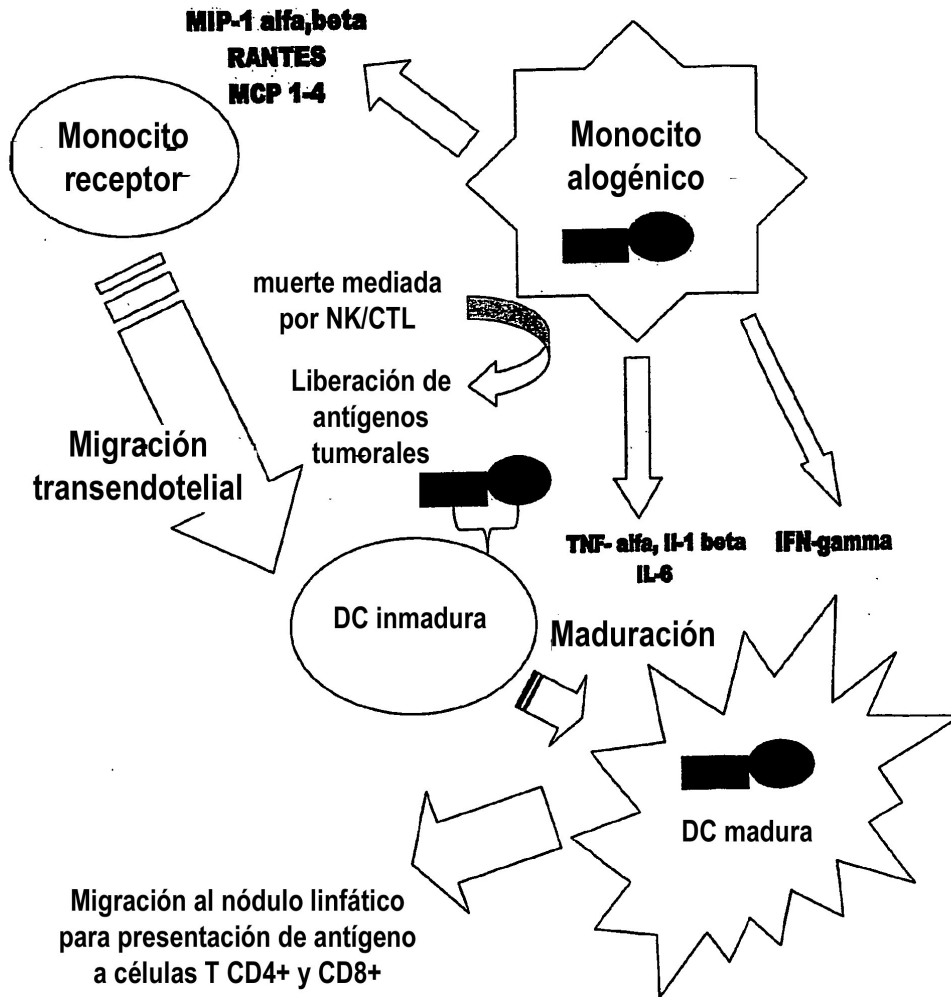


Figura 4

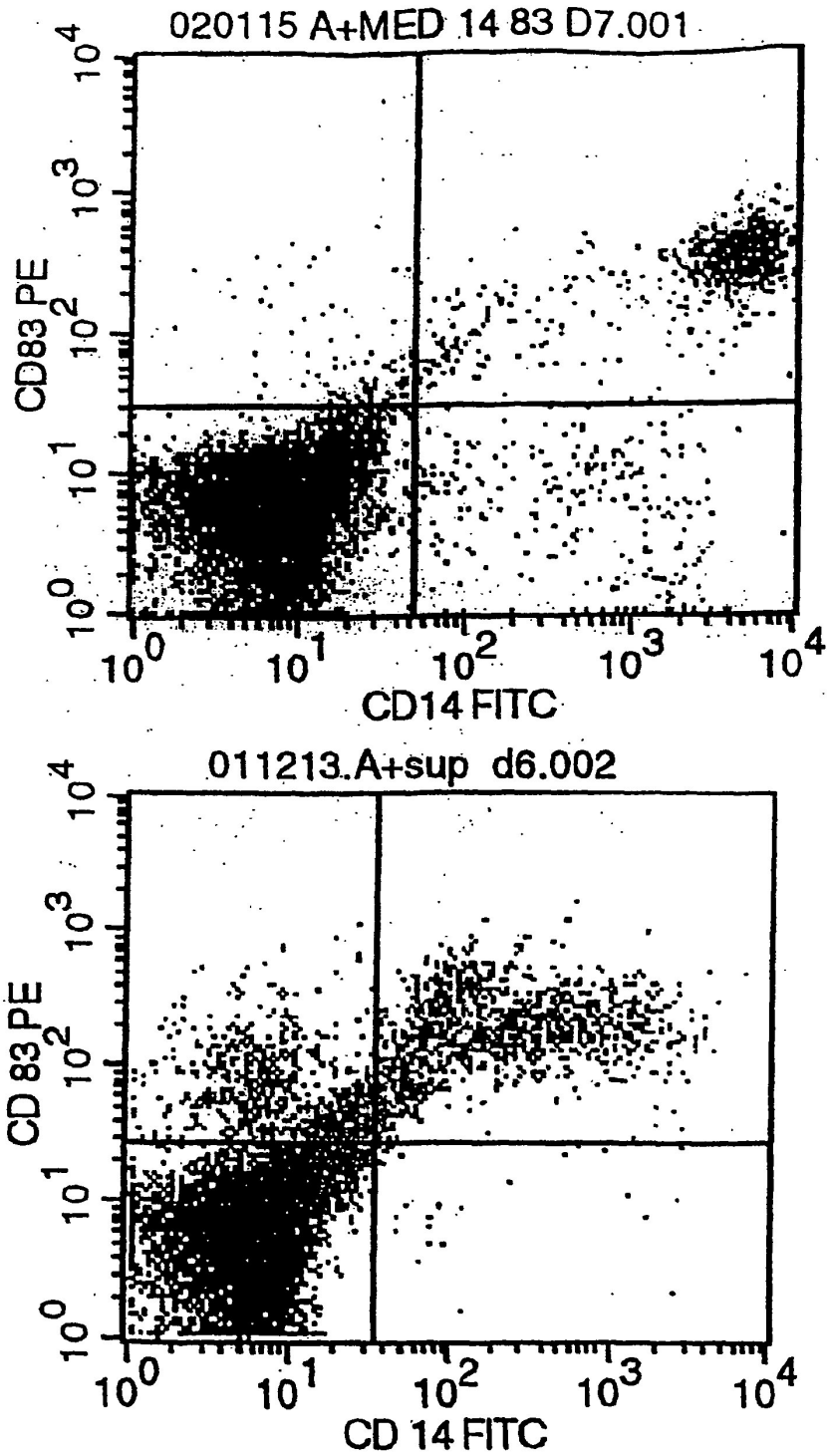


Figura 5

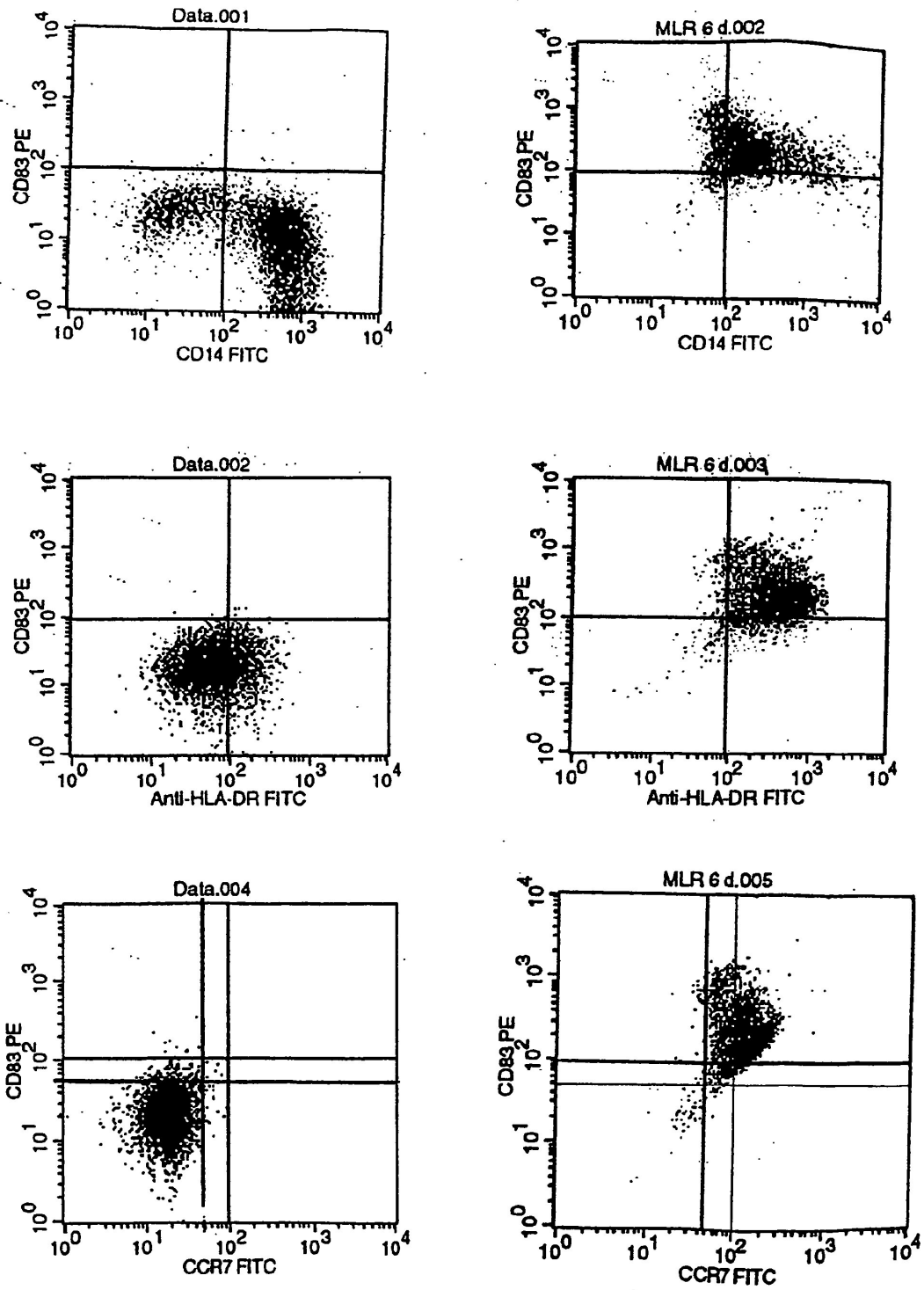


Figura 6

## MLR alogénico: Producción de quimioquina/citoquina

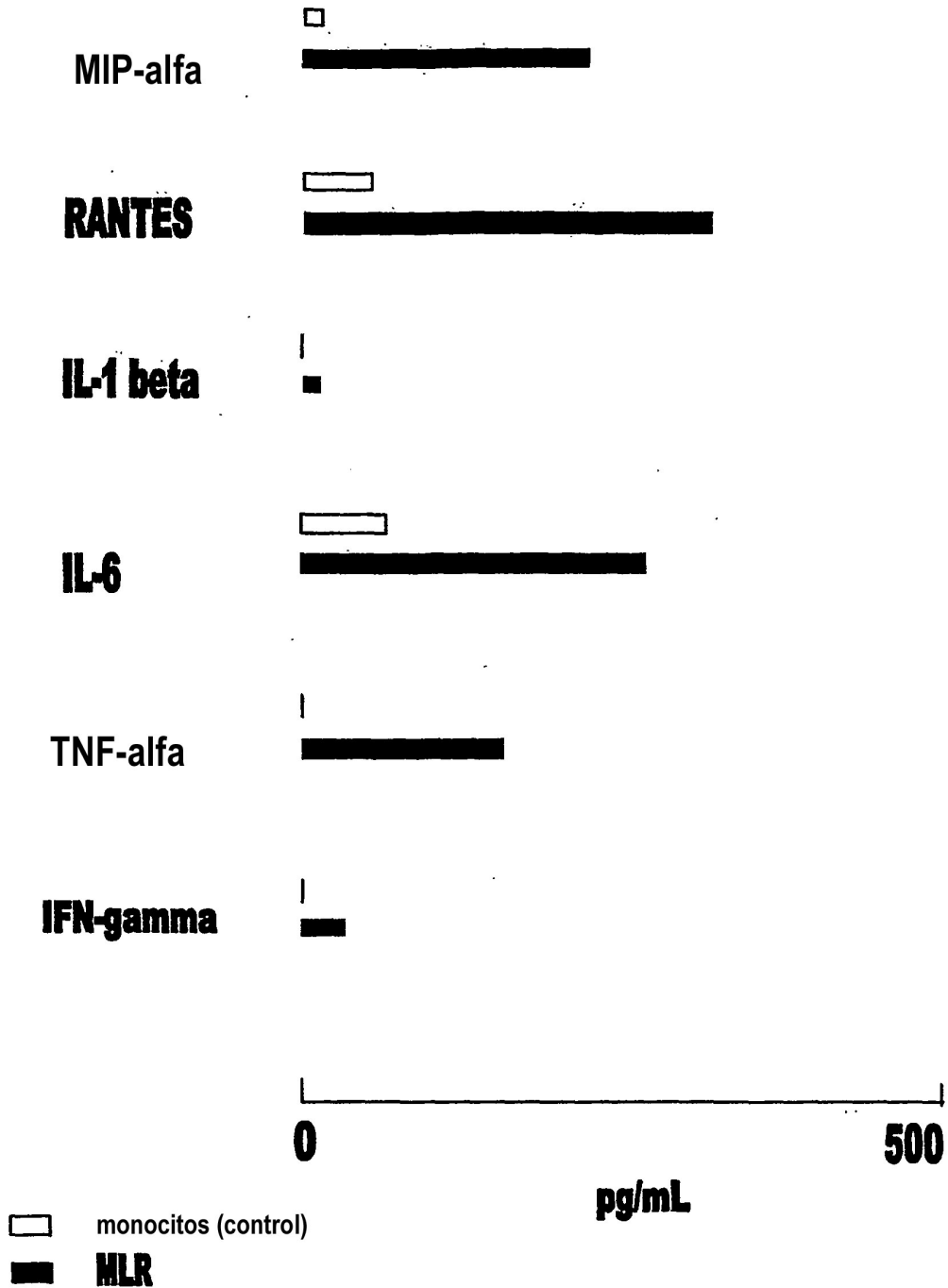
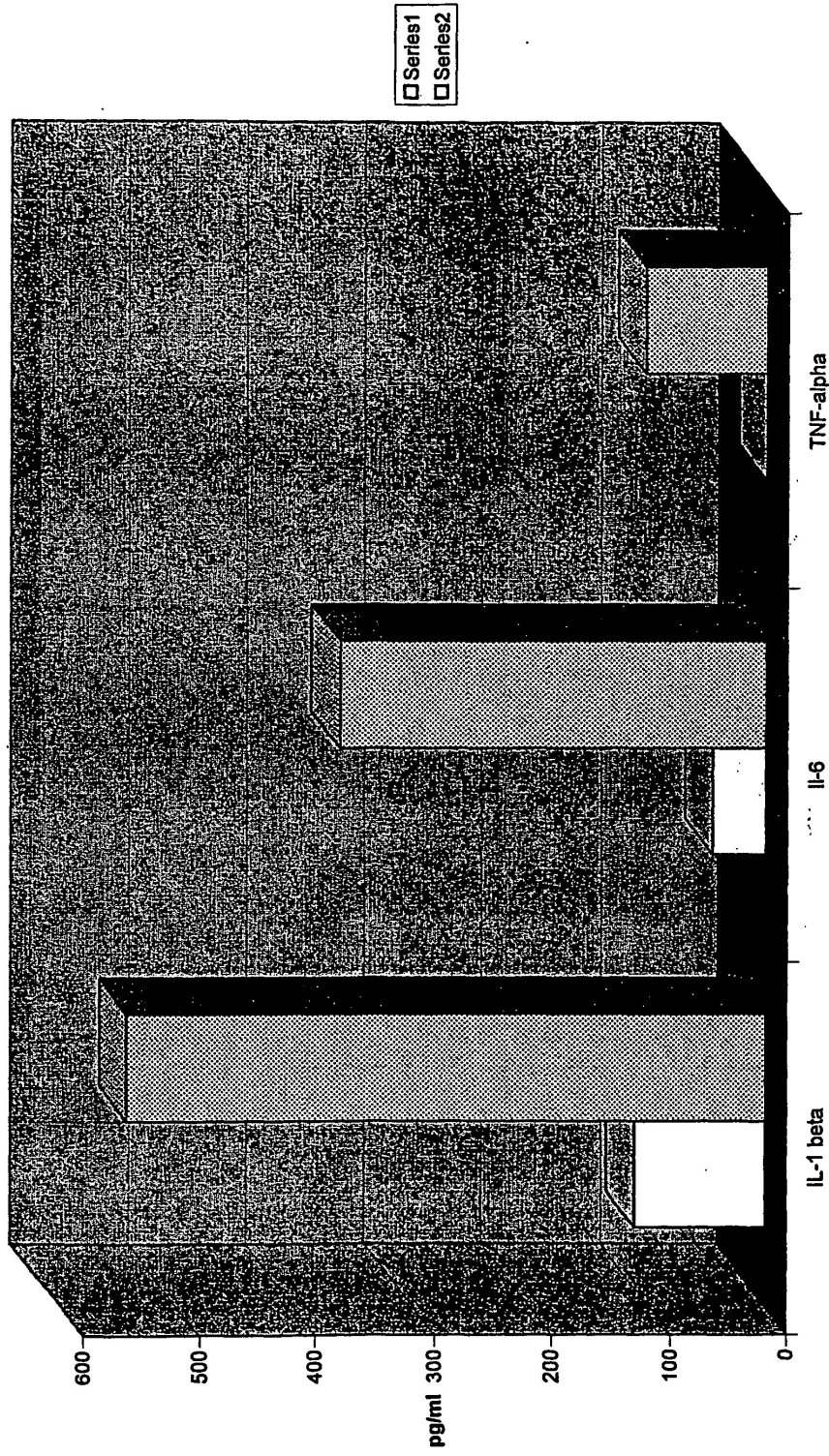


Figura 7

**Impacto de NAS en células tumorales alogénicas y producción de quimioquinas de APCs tumorales alogénicas durante MLR**



**Figura 8**

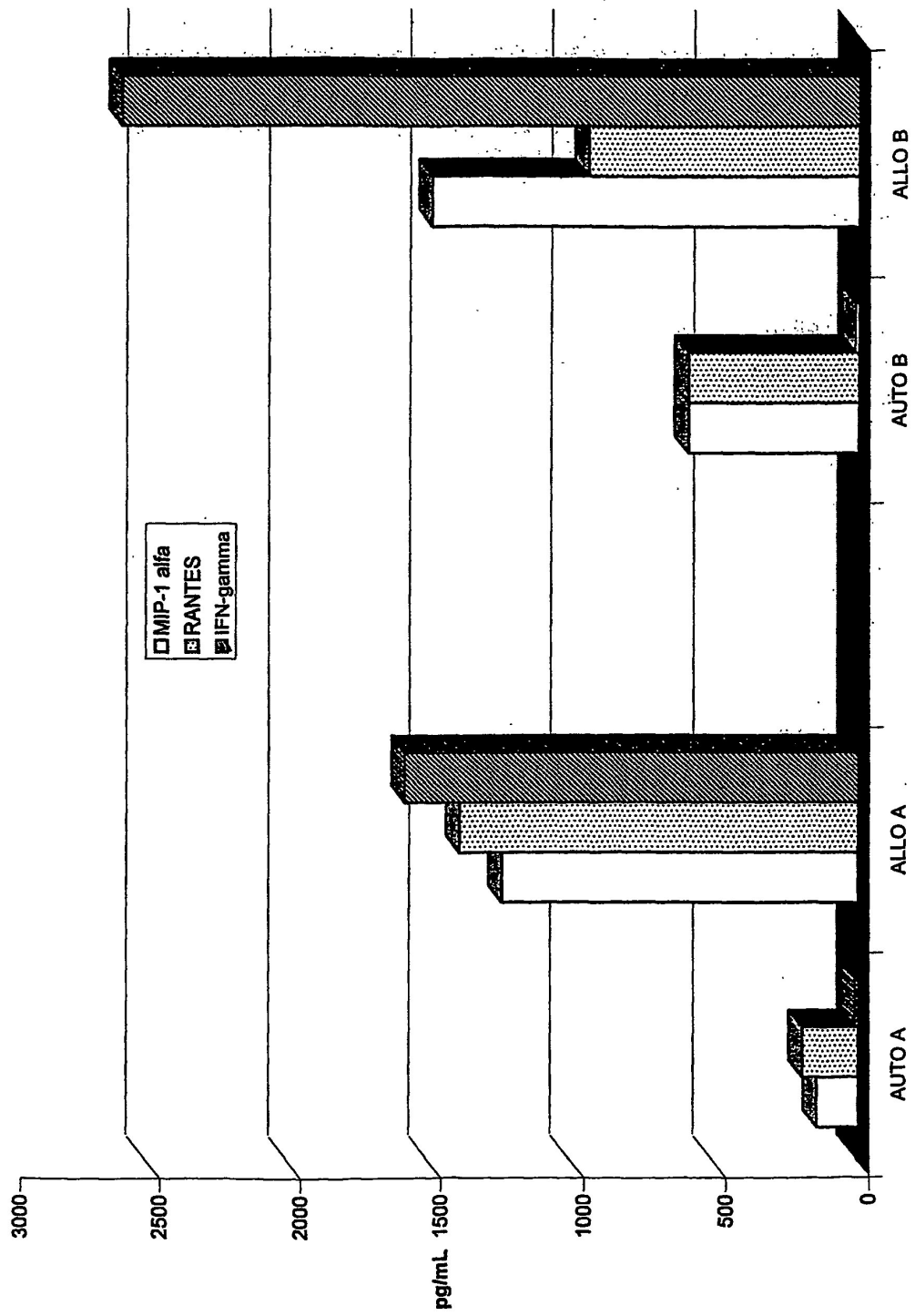


Figura 9

Impacto del tratamiento con NAS en la producción de quimioquinas de APC

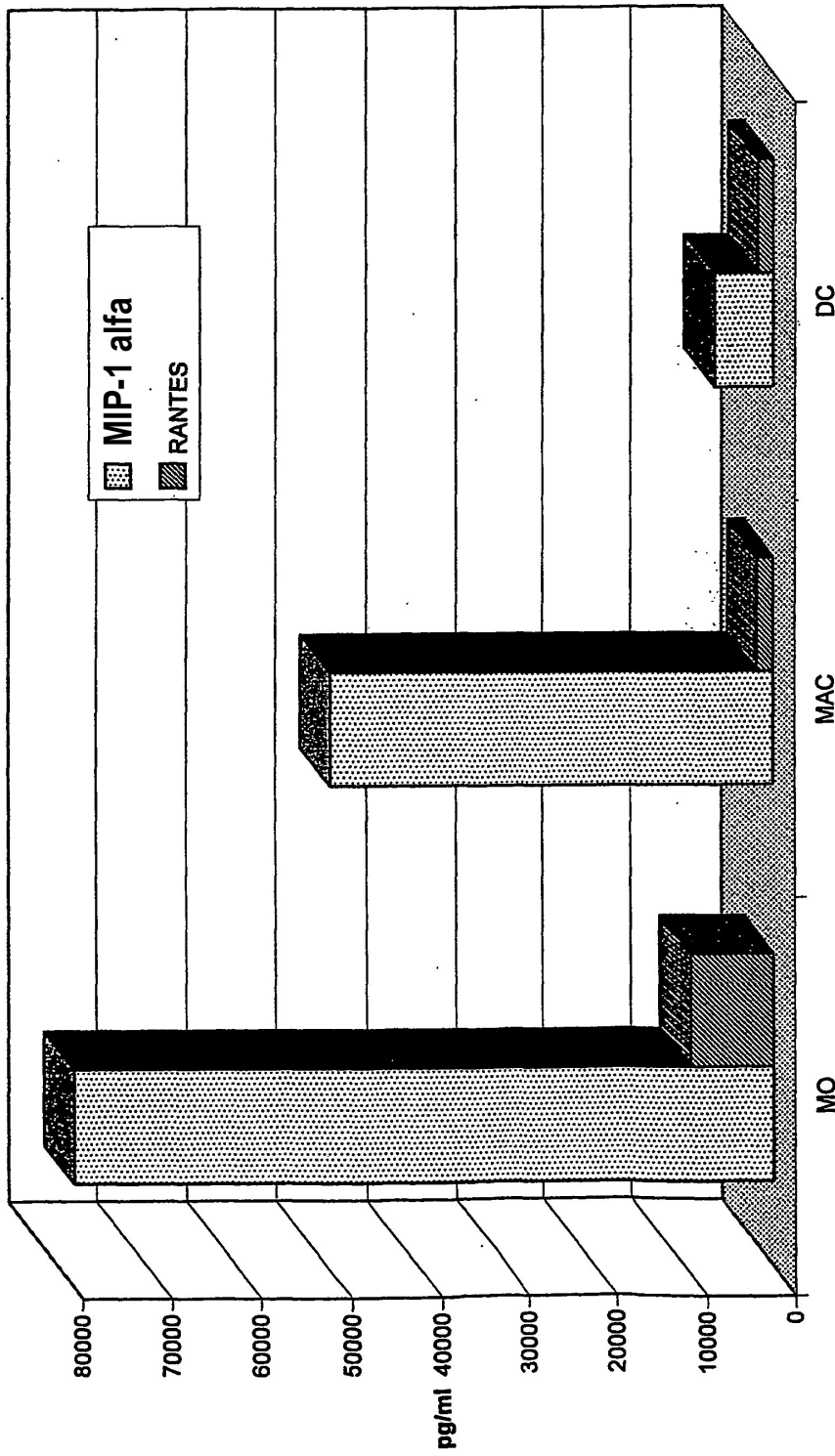


Figura 10

Impacto de anti-CD43 en la producción de quimioquinas de monocitos

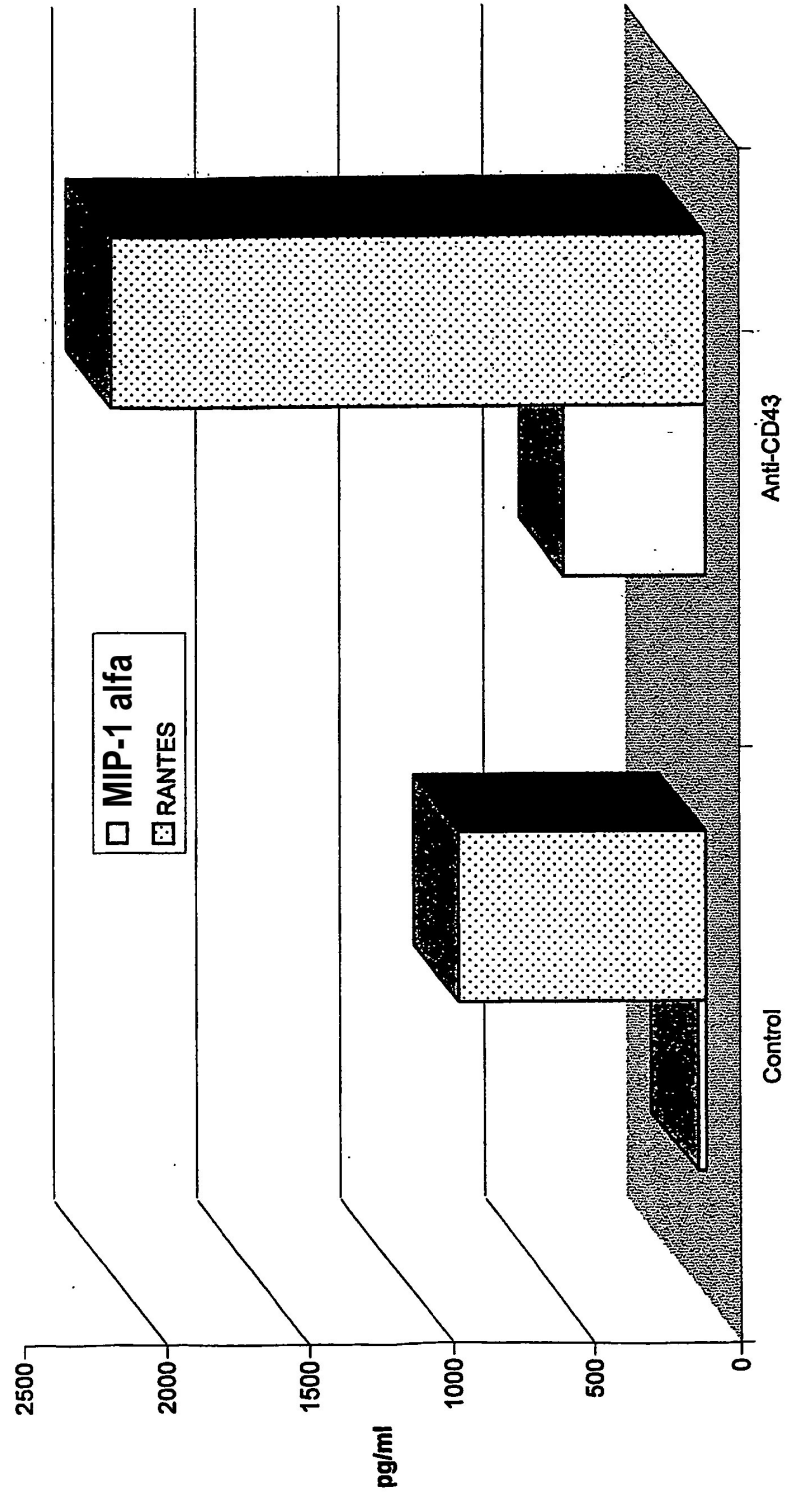


Figura 11