

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 706**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2006 E 06774696 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1917029**

54 Título: **Un método de tratar células cancerosas para crear una célula cancerosa modificada que provoca una respuesta inmunogénica**

30 Prioridad:

27.07.2005 US 702691 P

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

23.04.2013

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
LILLY CORPORATE CENTER
INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**KITABWALLA, MOIZ y
AKEEFE, HASSIBULLAH**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 401 706 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

Un método de tratar células cancerosas para crear una célula cancerosa modificada que provoca una respuesta inmunogénica

CAMPO DEL INVENTO

- 5 El presente invento proporciona un método de deslipidación que emplea un sistema de disolventes que es útil para extraer lípidos a partir de células cancerosas, creando de esta manera una partícula de célula cancerosa modificada. Después de una deslipidación de las células cancerosas, algunos de los antígenos de las células cancerosas permanecen intactos. Estos antígenos expuestos, o epítomos, alientan y promueven la producción de anticuerpos. La resultante célula cancerosa modificada con un contenido reducido de lípidos, o algunas porciones de la célula cancerosa, inician una respuesta inmunogénica positiva cuando se administran a un animal o ser humano y ayudan a tratar, prevenir o retrasar el comienzo o la progresión de un cáncer. El presente invento proporciona unas composiciones de vacunas autólogas y heterólogas que comprenden la célula cancerosa modificada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10
- 15 Se describe además un método de administrar estas vacunas, con el fin de tratar, prevenir o retrasar el comienzo o la progresión de un cáncer.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

Introducción

- 20 Ciertos cánceres, de etiología variada, afectan a miles de millones de animales y seres humanos cada año e imponen una enorme carga económica sobre la sociedad. Los cánceres se pueden definir como un bulto anormal, una masa de tejido, o células cancerosas generadas a partir de una división celular excesiva, que es o bien benigna o maligna. Los cánceres incluyen todos aquellos cánceres que son conocidos para los médicos con experiencia ordinaria en las especialidades médicas, particularmente médicos con experiencia en oncología. Los cánceres incluyen, pero no se limitan a, los que proceden de células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas, e incluyen los cánceres del sistema inmunitario, del sistema endocrino, del sistema nervioso central, del sistema respiratorio, del sistema reproductor, del sistema gastrointestinal y del integumento. Dichos cánceres incluyen los generados por cánceres relacionados con el SIDA, un cáncer adrenocortical, un cáncer anal, un cáncer de vejiga, un cáncer de intestinos, unos cánceres del cerebro y del sistema nervioso central, un cáncer de mama, unos cánceres carcinoides, un cáncer cervical, un condrosarcoma, un coriocarcinoma, un cáncer colorrectal, unos cánceres endocrinos, un cáncer del endometrio, un sarcoma de Ewing, un cáncer de ojo, un cáncer gástrico, un cáncer gastrointestinal, unos cánceres genitourinarios, un glioma, un cáncer ginecológico, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer hepatocelular, una enfermedad de Hodgkin, un cáncer hipofaríngeo, un cáncer de células de los islotes, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, un cáncer de laringe, una leucemia, un cáncer de hígado, un cáncer de pulmón, un linfoma, un melanoma, un carcinoma de células basales, un mesotelioma, un mieloma, un cáncer nasofaríngeo un neuroblastoma, un linfoma no de Hodgkin, un cáncer de esófago, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer pancreático, un cáncer de la pituitaria, un carcinoma de células renales, un cáncer de próstata, un retinoblastoma, un rhabdomyosarcoma, un sarcoma, un cáncer de piel, un carcinoma de células escamosas, un cáncer de estómago, un cáncer testicular, un cáncer de timo, un cáncer de la tiroides, un cáncer de células transicionales, un cáncer trofoblástico, un cáncer uterino, un cáncer vaginal, una macroglobulinemia de Waldenstrom, un cáncer de Wilms, entre otros tumores y otras formas de cánceres.
- 25
- 30
- 35
- 40

- 45 Tal como con células normales, las células cancerosas contienen lípidos como una parte componente principal de la membrana plasmática que las rodea. Aunque no se conoce plenamente la razón por la que se forman células cancerosas, en general, los cánceres manifiestan ser causados por la regulación anormal de la división celular. Esto podría ser causado por anomalías del sistema inmunitario, anomalías genéticas, mutaciones causadas por radiaciones, los virus, la luz solar y agentes que provocan el cáncer tales como tabaco, benceno y otros compuestos químicos. Cuando un paciente está castigado con un cáncer, él incurre en un cierto número de síntomas, incluyendo fiebres, escalofríos, sudores nocturnos, pérdida de peso, pérdida de apetito, fatiga, indisposición, deficiencia respiratoria, dolor de pecho, diarrea, sangre en las heces o en la orina, entre otras dolencias.
- 50

- 55 El hecho de eliminar un cáncer desde el cuerpo de un paciente constituye un desafío puesto que, aunque algunas células cancerosas proliferan de una manera incontrolada, las células no necesariamente aparecen como que son "ajenas" para el cuerpo y, por lo tanto son difíciles de establecer como dianas. Los tratamientos existentes de cánceres tienen a ser dirigidos de una manera insuficiente hacia las células cancerosas y, por lo tanto, son muy destructivos para un tejido sano de un paciente. Dichos tratamientos incluyen rayos X, una quimioterapia, una terapia con protones, una intervención quirúrgica o combinaciones de éstos. Se preferiría que el sistema inmunitario del cuerpo pudiera ser incitado a exhibir una respuesta inmunitaria positiva contra estas células cancerosas.

El sistema inmunitario humano se compone de diversos tipos de células que protegen colectivamente al cuerpo con respecto de diferentes agentes ajenos. El sistema inmunitario proporciona múltiples medios para dirigirse hacia y eliminar elementos ajenos, incluyendo respuestas inmunitarias humorales y celulares, que participan principalmente en el reconocimiento y la eliminación de antígenos. Una respuesta inmunitaria a elementos ajenos requiere la presencia de linfocitos B (células B) o de linfocitos T (células T) en combinación con unas células presentadoras de antígenos (APC acrónimo de Antigen Presenting Cells) que son usualmente macrófagos o células dendríticas. Las APC's son unas células inmunitarias especializadas que capturan antígenos. Una vez que están dentro de una APC, los antígenos son desmenuzados para dar fragmentos más pequeños denominados epítomos - los marcadores singulares llevados por la superficie de los antígenos. Estos epítomos son subsiguientemente desplegados sobre la superficie de las APC's y son responsables del desencadenamiento de una respuesta de anticuerpos en defensa contra agentes ajenos.

En una respuesta inmunitaria humoral, cuando se reconocen unos antígenos que despliegan APC's (en la forma de marcadores de epítomos singulares) que son ajenos para el cuerpo, las células B son activadas, se proliferan y producen anticuerpos. Estos anticuerpos se fijan específicamente a los antígenos presentes en la APC. Después de que se ha fijado el anticuerpo, la APC traga al antígeno entero y lo aniquila. Este tipo de respuesta inmunitaria de anticuerpos está implicado principalmente en la prevención de diversas infecciones.

En una respuesta inmunitaria celular, al reconocer la APC que despliega un antígeno ajeno, las células T son activadas. Hay dos etapas en la respuesta inmunitaria celular. La primera etapa implica la activación de células T (linfocitos) citotóxicas/os (CTL acrónimo de Cytotoxic T Lymphocytes) o células T asesinas CD8+ que proliferan y aniquilan a células dianas que representan específicamente a los antígenos presentados por las APC. La segunda etapa implica a células T ayudadoras (HTL acrónimo de Helper T Lymphocytes) o células T CD4+ que regulan la producción de anticuerpos y la actividad de las células CD8+. Las células T CD4+ proporcionan factores de crecimiento a las células T CD8+ lo que permite que éstas proliferen y funcionen de una manera eficiente.

Aunque se conoce ahora que las células cancerosas expresan antígenos asociados con un cáncer, ellas son frecuentemente capaces de evadir a una respuesta inmunitaria a causa de su capacidad de ocultar antígenos de cáncer con respecto del sistema inmunitario y/o puesto que los antígenos expuestos son unas moléculas o proteínas de diferenciación no mutadas, normales, que el sistema inmunitario humano reconoce o tolera normalmente. Para usar de una manera eficaz una inmunoterapia para tratar un cáncer, un paciente debe de tener, o ser provisto de, un número suficiente de linfocitos reactivos con el cáncer, que pueden tanto llegar al sitio del cáncer como tener unos mecanismos efectores para destruir a las células cancerosas.

Hasta la fecha, las respuestas inmunitarias generadas por vacunas contra el cáncer han sido incapaces de superar los mecanismos de escape de los cánceres, incluyendo la capacidad de dirigirse hacia cánceres e infiltrarse en ellos, de ocuparse de la pérdida de expresión antigénica causada por el cáncer, de manejar la incapacidad del cáncer para activar a precursores anti-cáncer, y de enfrentarse a la presencia local de factores inmunosupresores. Se ha observado algún éxito en unas terapias por transferencia celular, en donde unos linfocitos autólogos son sensibilizados *ex vivo* para células cancerosas y luego son infundidos de retorno dentro del paciente.

Un adyuvante para una inmunoterapia por vacunación contra el cáncer usa células dendríticas (DC acrónimo de Dendritic Cells) que son unas células presentadoras de antígenos muy potentes para provocar una respuesta inmunitaria positiva anti-cáncer en pacientes. Las células dendríticas expresan moléculas MHC de la clase I y MHC de la clase II, moléculas concomitantemente estimulantes y moléculas de adhesión que proporcionan señales para la estimulación de células T inexpertas, células T ayudadoras CD4+, linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL's), células asesinas naturales (NK acrónimo de Natural Killer) y células NK derivadas del timo (NKT acrónimo de Natural Killer T). Las DC tienen la capacidad de recoger diferentes tipos de moléculas. Consiguientemente, las DC pueden ser cargadas con antígenos asociados con tumores (TAA's acrónimo de Tumor Associated Antigens) en diversas formas, y administradas como vacunas.

Un enfoque basado en las DC usa unos híbridos de DC y células cancerosas, generados por fusión de células cancerosas con DC con el fin de combinar una expresión prolongada de antígenos de cáncer con las capacidades de presentación de antígenos y de estimulación del sistema inmunitario de las DC. En unos modelos en animales, una inmunización con híbridos de DC y células cancerosas puede proporcionar una cierta forma de protección contra el cáncer o de erradicar una enfermedad establecida. Se ha mostrado que unos híbridos de DC autólogas, que se componen de linajes de células cancerosas o de células cancerosas humanas primarias (incluyendo células de carcinoma de mama), inducen *in vitro* respuestas de CTL contra tipos de células cancerosas autólogas. Una recientes pruebas clínicas en la fase I para el tratamiento de carcinomas de células renales y de gliomas han demostrado que una vacunación con híbridos de DC y células cancerosas puede inducir con seguridad unas respuestas inmunitarias contra el cáncer en pacientes. Una tecnología de fusión tradicional que usa un polietilén glicol (PEG) es obstaculizada por una falta de reproducibilidad y unas dificultades en la normalización de los métodos. Como una alternativa, se ha usado una electrofusión para la producción de híbridos de DC y células cancerosas. Véase la cita de Akporiaye, y colaboradores, Pre-Clinical Studies of Dendritic Cell-Tumor Cell

Fusion Vaccines to Treat Breast Cancer [Estudios preclínicos de vacunas de fusión de células dendríticas y células tumorales para tratar un cáncer de mama]”.

5 Correspondientemente, lo que se necesita es un procedimiento de deslipidación eficaz por medio del cual una célula cancerosa sea modificada, en vez de destruida, e invoca una respuesta inmunitaria autóloga o heteróloga con el fin de impedir una proliferación adicional de cánceres.

Lo que se necesita es un método y un sistema terapéuticos para proporcionar a los pacientes células cancerosas modificadas que sean capaces de iniciar una respuesta inmunitaria protectora.

10 Lo que se necesita además es una vía para identificar y revelar unos antígenos asociados con tumores que se puedan usar con las existentes técnicas de terapias con DC y células cancerosas con el fin de provocar una respuesta inmunitaria positiva en un paciente.

Lo que se necesita es un método para promover la producción de anticuerpos, que comprenda administrar a un paciente una célula cancerosa modificada capaz de iniciar una respuesta inmunitaria protectora.

15 Nestle y colaboradores (Nature Medicine (1998), 4, 328-332) describen la vacunación de pacientes con melanoma usando células dendríticas pulsadas con péptidos o materiales lisados de tumores para el suministro de antígenos. Con esta finalidad, las células dendríticas son generadas en la presencia de un factor estimulante de colonias de granulocitos / macrófagos (GM-CSF) y de interleucina 4 (IL-4) y son pulsadas con un material lisado de tumor o un cóctel de péptidos del que se sepa que es reconocido por linfocitos T citotóxicos.

20 Trotter y colaboradores (Journal of the Neurological Sciences (1999), 166, 23-27) examinaron la respuesta proliferativa de células mononucleares derivadas de pacientes con esclerosis múltiple e individuos testigos normales, a unas membranas con mielina intactas y deslipidadas. En este contexto, se propone que la presentación de formas deslipidadas de proteínas de membranas puede acrecentar *in vivo* la respuesta a antígenos de la mielina.

25 Jamasbi y colaboradores (Cancer Immunology Immunotherapy (1994), 38, 99-106) discuten un mecanismo potencial para el escape de células tumorales desde respuestas inmunitarias de anfitriones. De acuerdo con este mecanismo, la fosfatidilcolina, la fosfatidilserina, la esfingomiélin y los gangliósidos modifican la superficie de un antígeno asociado con un tumor de carcinoma esofágico de rata y de esta manera protegen a células de tumores B2T con respecto a la destrucción del sistema inmunitario del anfitrión.

30 Skomick y colaboradores: (Cancer Letters (1984), 25, 153-161) informan acerca de la inhibición del crecimiento y de las metástasis en ratones por inmunización de los mismos con células tumorales enriquecidas con hemisuccinato de colesterol. De acuerdo con esta publicación, la incorporación del hemisuccinato de colesterol dentro de las membranas de células de tumores 3LL rigidiza a la capa de lípidos, expone antígenos crípticos y de esta manera aumenta la inmunogenicidad.

SUMARIO DEL INVENTO

35 En un aspecto, el presente invento se refiere a una composición de vacuna que comprende: una célula cancerosa deslipidada que tiene (i) una concentración total de lípidos de menos del 80 % de la concentración total de lípidos de la célula cancerosa original y (ii) por lo menos un antígeno de células cancerosas; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 En otro aspecto, el presente invento se refiere al uso de una célula cancerosa deslipidada que tiene (i) una concentración total de lípidos de menos del 80 % de la concentración total de lípidos de la célula cancerosa original y (ii) por lo menos un antígeno de células cancerosas en la preparación de un medicamento útil para inducir una respuesta inmunogénica en un animal o ser humano.

45 En otro aspecto, el presente invento se refiere a un método *in vitro* para producir una composición de vacuna, que comprende:
poner en contacto una célula cancerosa en un fluido con un primer disolvente de extracción;
mezclar el fluido y el primer disolvente de extracción durante un período de tiempo suficiente para extraer lípidos desde la célula cancerosa, produciendo de esta manera una célula cancerosa deslipidada que tiene (i) una
45 concentración total de lípidos de menos del 80 % de la concentración total de lípidos de la célula cancerosa original y (ii) por lo menos un antígeno de células cancerosas;
extraer la capa de disolvente desde el fluido;
recoger el fluido que contiene la célula cancerosa deslipidada; y
50 añadir un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente estimulante de la inmunidad.

En otro aspecto, el presente invento se refiere a un método *in vitro* para la deslipidación de células cancerosas, que comprende:

5 exponer una célula cancerosa a un procedimiento de deslipidación, que comprende tratar a la célula cancerosa con uno o más disolventes de extracción, de tal manera que se produzca una célula cancerosa deslipidada que tenga una concentración total de lípidos de menos del 80 % de la concentración total de lípidos de la célula cancerosa original, en donde la célula cancerosa deslipidada retiene por lo menos a un antígeno de células cancerosas.

En otro aspecto, el presente invento se refiere al uso de la composición de vacuna del invento para producir un agente destinado a promover la producción de anticuerpos.

10 En otro aspecto, el presente invento se refiere a un método *in vitro* para producir una composición de vacuna, que comprende:

pulsar la célula cancerosa deslipidada, preparada de acuerdo con el método de deslipidación del invento, con una célula dendrítica para formar un híbrido de células cancerosas; y, añadir un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente estimulante de la inmunidad.

15 El presente invento resuelve los problemas más arriba descritos al proporcionar un método simple, efectivo y eficiente para tratar un cáncer, prevenir un cáncer, retrasar el comienzo de un cáncer o retrasar la progresión de un cáncer por medio de la administración de la vacuna que aquí se describe. El método del presente invento es efectivo para modificar la estructura lipídica de una célula cancerosa por utilización de un sistema de disolventes que no tenga efectos perjudiciales sobre la estructura de antígenos asociados con un cáncer. El presente invento emplea un
20 óptimo sistema de disolventes y de energía para crear, por la vía de una deslipidación, una célula cancerosa modificada que tiene su envoltura lipídica por lo menos parcialmente eliminada, exponiendo o modificando de esta manera a unos antígenos asociados con un cáncer que, o bien a solas o en la forma de un híbrido de DC y células cancerosas, pueden generar una respuesta inmunológica positiva en un paciente, proporcionando a ese paciente un cierto grado de protección contra el cáncer en fase de proliferación, impidiendo la aparición o reaparición del cáncer o retrasando el comienzo del cáncer.
25

El presente invento es también efectivo para producir una vacuna autóloga, específica para el paciente, contra el cáncer, por tratamiento de un fluido biológico que contiene la célula cancerosa de tal manera que la célula cancerosa esté presente en una forma modificada. Para crear la vacuna, una muestra de cáncer es extraída desde el paciente (es decir, se realiza una biopsia o se extrae sangre u otra muestra que contiene las células cancerosas),
30 las células cancerosas son aisladas y deslipidadas parcialmente usando un óptimo sistema de disolventes que retiene la integridad estructural de antígenos de células cancerosas. En una forma de realización, una célula cancerosa, tratada de esta manera con el fin de crear una célula cancerosa modificada con un contenido reducido de lípidos, es luego administrada a un organismo receptor, tal como un animal o ser humano, juntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante, con el fin de iniciar una respuesta inmunitaria en el animal o ser humano y crear unos anticuerpos que se fijan a los epítomos expuestos de la célula cancerosa deslipidada. En otra forma de realización, una célula cancerosa, tratada de esta manera con el fin de crear una célula cancerosa modificada, se usa, por ejemplo, para crear un híbrido de DC y células cancerosas que luego es administrado a un organismo receptor tal como un animal o ser humano, juntamente con un vehículo farmacológicamente aceptable, y opcionalmente un adyuvante, con el fin de iniciar una respuesta inmunitaria en el
40 animal o ser humano y crear unos anticuerpos que se fijan a los epítomos expuestos de la célula cancerosa deslipidada.

De esta manera se proporciona un método efectivo, mediante el cual se pueden desarrollar nuevas vacunas a partir de células cancerosas que contienen lípidos, por eliminación parcial de la envoltura lipídica y por exposición o modificación de antígenos proteínicos ocultos por debajo de la envoltura, generando a su vez una respuesta
45 inmunitaria positiva cuando se introducen renovadamente, por diversos medios, dentro del paciente.

Los cánceres que pueden ser tratados con el presente invento incluyen todos aquellos cánceres que son conocidos para los médicos con experiencia ordinaria en las especialidades médicas, particularmente médicos con experiencia en oncología. Los cánceres incluyen, pero no se limitan a, los que proceden de células ectodérmicas, mesodérmicas y endodérmicas, e incluyen unos cánceres del sistema inmunitario, del sistema endocrino, del sistema nervioso central, del sistema respiratorio, del sistema reproductor, del sistema gastrointestinal y del integumento. Dichos cánceres incluyen los generados por cánceres relacionados con el SIDA, un cáncer adrenocortical, un carcinoma de células basales, un cáncer anal, un cáncer de vejiga, un cáncer de intestinos, unos cánceres del cerebro y del sistema nervioso central, un cáncer de mama, unos cánceres carcinoides, un cáncer cervical, un condrosarcoma, un coriocarcinoma, un cáncer colorrectal, unos cánceres endocrinos, un cáncer del endometrio, un sarcoma de Ewing, un cáncer de ojo, un cáncer gástrico, un cáncer gastrointestinal, unos cánceres genitourinarios, un glioma, un cáncer ginecológico, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer hepatocelular, una enfermedad de Hodgkin, un cáncer hipofaríngeo, un cáncer de células de los islotes, un sarcoma de Kaposi, un cáncer de riñón, un cáncer de laringe, una leucemia, un cáncer de hígado, un cáncer de pulmón, un linfoma, un melanoma, un mesotelioma, un mieloma, un cáncer nasofaríngeo un neuroblastoma, un linfoma no de Hodgkin, un
60 cáncer de esófago, un osteosarcoma, un cáncer de ovario, un cáncer pancreático, un cáncer de la pituitaria, un

- 5 carcinoma de células renales, un cáncer de próstata, un retinoblastoma, un rhabdomioma, un sarcoma, un cáncer de piel, un carcinoma de células escamosas, un cáncer de estómago, un cáncer testicular, un cáncer de timo, un cáncer de la tiroides, un cáncer de células transicionales, un cáncer trofoblástico, un cáncer uterino, un cáncer vaginal, una macroglobulinemia de Waldenstrom, un cáncer de Wilms, entre otros tumores y otras formas de cánceres.
- Correspondientemente, un objetivo del presente invento es proporcionar una composición de vacuna que comprenda una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y que contenga por lo menos un antígeno de células cancerosas en un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente estimulante de la inmunidad.
- 10 Otro objetivo del presente es proporcionar una composición de vacuna que comprenda una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y que contenga por lo menos un antígeno de células cancerosas, y una célula dendrítica, en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un agente estimulante de la inmunidad.
- Todavía otro objetivo del presente invento es usar una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y por lo menos un antígeno en la preparación de un medicamento útil para inducir una respuesta inmunogénica en un animal o ser humano. El medicamento puede comprender además un agente estimulante de la inmunidad o células dendríticas.
- 15 Todavía otro objetivo del presente invento es usar una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y por lo menos un antígeno en la preparación de un medicamento útil para inducir una respuesta inmunogénica en un animal o ser humano, en donde la respuesta inmunogénica trata o previene un cáncer en el animal o ser humano. El medicamento puede comprender además un agente estimulante de la inmunidad o células dendríticas.
- 20 Correspondientemente, un objetivo del presente invento es proporcionar un método para tratar unas células cancerosas con el fin de modificar las células cancerosas contenidas allí para reducir su contenido de lípidos.
- Otro objetivo del presente invento es proporcionar un método para tratar un cáncer por administración de células cancerosas con un contenido reducido de lípidos y que contienen por lo menos un antígeno de células cancerosas a un animal o ser humano.
- 25 Otro objetivo del presente invento es proporcionar un método para prevenir un cáncer o retrasar el comienzo de un cáncer por administración de células cancerosas con un contenido reducido de lípidos y que contienen por lo menos un antígeno de células cancerosas, a un animal o ser humano.
- Un objetivo adicional del presente invento es proporcionar un método para tratar un cáncer usando un híbrido de DC y células cancerosas que exhibe antígenos de células cancerosas, en donde la célula cancerosa tiene un contenido reducido de lípidos y contiene por lo menos un antígeno de células cancerosas.
- 30 Un objetivo adicional del presente invento es proporcionar un método para prevenir un cáncer o retrasar el comienzo de un cáncer usando un híbrido de DC y células cancerosas que exhibe antígenos de células cancerosas.
- Otro objetivo del presente invento es proporcionar un método para exponer determinantes antigénicos sobre una célula cancerosa.
- 35 Un objetivo adicional del presente invento es deslipidar completa o parcialmente a la célula cancerosa, creando de esta manera una célula cancerosa modificada con un contenido reducido de lípidos y que contiene por lo menos un antígeno de células cancerosas.
- Un objetivo adicional del presente invento es deslipidar parcialmente, sustancialmente o por completo a la célula cancerosa, al mismo tiempo que retiene a las proteínas estructurales o a los antígenos de la célula cancerosa.
- 40 Todavía otro objetivo del presente invento es tratar a seres humanos y animales con cáncer usando el método del presente invento y usando una vacuna que comprende un híbrido de DC y células cancerosas, en el que la célula cancerosa es una célula cancerosa modificada, parcialmente deslipidada. El tratamiento se puede administrar a un animal o ser humano juntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un compuesto estimulante de la inmunidad.
- 45 Todavía otro objetivo del presente invento es tratar a seres humanos y animales con un cáncer usando el método del presente invento y usando una vacuna que comprende una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y que contiene por lo menos un antígeno de células cancerosas. El tratamiento se puede administrar a un animal o ser humano juntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un compuesto estimulante de la inmunidad.
- 50

5 Aún otro objetivo del presente invento es tratar a seres humanos y animales en riesgo de desarrollar un cáncer con el método del presente invento por administración de una vacuna que comprende un híbrido de DC y células cancerosas en donde la célula cancerosa tiene un contenido reducido de lípidos y contiene por lo menos un antígeno de células cancerosas. El tratamiento se puede administrar a un animal o ser humano juntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un compuesto estimulante de la inmunidad.

Todavía otro objetivo del presente invento es tratar a seres humanos y animales en riesgo de desarrollar un cáncer con el método del presente invento por administración de una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y que contiene por lo menos un antígeno de células cancerosas.

10 Aún otro objetivo del presente invento es tratar a seres humanos y animales con cáncer usando el método del presente invento por administración de una vacuna que comprende antígenos asociados con células cancerosas a partir de una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos, que puede ser administrada a un animal o ser humano juntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un compuesto estimulante de la inmunidad, para iniciar una respuesta inmunogénica en el animal o ser humano.

15 Todavía otro objetivo del presente invento es tratar a seres humanos y animales en riesgo de desarrollar un cáncer usando el método del presente invento, por administración de una vacuna que comprende una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y que contiene por lo menos un antígeno de células cancerosas, que se puede administrar a un animal o ser humano juntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un compuesto estimulante de la inmunidad, para iniciar una respuesta inmunogénica en el animal o ser humano.

20 Todavía otro objetivo del presente invento es proporcionar un método para promover la producción de anticuerpos, que comprende administrar al animal o ser humano una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y que contiene por lo menos un antígeno de células cancerosas juntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable con el fin de iniciar una respuesta inmunogénica, dando como resultado la producción de anticuerpos en el animal o ser humano.

25 La presente solicitud describe también una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y que contiene por lo menos un antígeno de células cancerosas, en donde esta célula cancerosa inicia una respuesta inmunitaria cuando se administra a un paciente e incita una protección contra un cáncer.

30 La presente solicitud describe también unas células cancerosas modificadas de una manera específica para el paciente, que comprenden una célula cancerosa parcialmente deslipidada, en donde la célula parcialmente deslipidada es producida exponiendo una célula cancerosa no deslipidada a un procedimiento de deslipidación y en donde la célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos comprende por lo menos un antígeno expuesto o específico para el paciente, modificado, que no había sido expuesto o modificado en la célula cancerosa no deslipidada.

35 La presente solicitud describe también un método para producir una vacuna, que comprende: poner en contacto una célula cancerosa que contiene lípidos en un fluido con un primer disolvente orgánico capaz de extraer lípidos desde la célula cancerosa que contiene lípidos; mezclar el fluido y el primer disolvente orgánico durante un período de tiempo suficiente para extraer lípidos desde la célula cancerosa que contiene lípidos; permitir que se separen las fases orgánica y acuosa; y recoger la fase acuosa que contiene una célula cancerosa modificada con un contenido reducido de lípidos, en donde la célula cancerosa modificada es capaz de provocar una respuesta inmunitaria positiva cuando se administra a un paciente.

40 La presente solicitud describe también un método para provocar una respuesta inmunitaria positiva en un paciente que tiene una pluralidad de células cancerosas que contienen lípidos, que comprende las etapas de obtener un fluido que contiene las células cancerosas que contienen lípidos, a partir del paciente; poner en contacto el fluido que contiene las células cancerosas que contienen lípidos con un primer disolvente orgánico capaz de extraer lípidos desde las células cancerosas que contienen lípidos; mezclar el fluido y el primer disolvente orgánico; permitir que se separen las fases orgánica y acuosa; recoger la fase acuosa que contiene partículas de células cancerosas modificadas con un contenido reducido de lípidos; e introducir la fase acuosa que contiene las células cancerosas modificadas con un contenido reducido de lípidos dentro del animal o ser humano en donde la célula cancerosa modificada con un contenido reducido de lípidos provoca una respuesta inmunitaria positiva en el animal o ser humano.

50 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los dibujos adjuntos que se incorporan en la memoria descriptiva y forman una parte de ella, ilustran unas formas preferidas de realización del presente invento.

La Figura 1 describe la recogida de células cancerosas B16-F10 deslipidadas por células dendríticas inmaduras tal como se determina por una clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS acrónimo de Fluorescent Activated Cell Sorting) (marcada con ficoeritrina (PE)).

5 La Figura 2 describe la recogida de células cancerosas B16-F10 deslipidadas por células dendríticas inmaduras tal como se determina por una FACS (marcada con isotiocianato de fluoresceína) (FITC).

La Figura 3 describe una vacunación terapéutica y una reducción del crecimiento de un cáncer.

La Figura 4 es similar a la Figura 3 y describe una vacunación terapéutica usando DC's pulsadas con células cancerosas B16-F10 deslipidadas.

La Figura 5 describe una vacunación preventiva usando células cancerosas B16-F10 deslipidadas.

10 La Figura 6 es similar a la Figura 5 y describe una vacunación preventiva usando DC's y células cancerosas B16-F10 deslipidadas.

La Figura 7 describe una vacunación terapéutica usando células cancerosas B16-F10 deslipidadas para inducir una respuesta específica para antígenos.

15 La Figura 8 describe una vacunación terapéutica usando células cancerosas B16-F10 deslipidadas para inducir una respuesta específica para antígenos

La Figura 9 describe una vacunación terapéutica usando DC's y células B16-F10 deslipidadas para inducir una respuesta específica para antígenos.

La Figura 10 describe una vacunación terapéutica usando DC's y células B16-F10 deslipidadas para inducir una respuesta específica para antígenos.

20 La Figura 11 es un esquema del plan experimental de vacunación terapéutica.

La Figura 12 es un esquema del plan experimental de vacunación preventiva.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

Definiciones

25 Por el término "fluido" se entiende cualquier fluido que contenga células cancerosas incluyendo, pero sin limitarse a, un fluido biológico obtenido a partir de un organismo tal como un animal o ser humano. Los fluidos que pueden ser tratados con el método del presente invento incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: un plasma; un suero; un fluido linfático; un fluido cerebroespinal, un fluido peritoneal, un fluido pleural; un fluido pericárdico, diversos fluidos del sistema reproductor que incluyen, pero no se limitan a, semen, fluidos de eyaculación, un fluido folicular y un fluido amniótico; reactivos de cultivos de células tales como sueros normales, suero de ternero fetal o un suero derivado de cualquier otro animal o ser humano; y reactivos inmunológicos tales como diversas preparaciones de anticuerpos y citocinas. Dichos fluidos biológicos obtenidos a partir de un organismo incluyen, pero no se limitan a, otros fluidos contenidos dentro del organismo. Otros fluidos pueden incluir unas muestras de laboratorio que contienen células cancerosas suspendidas en cualquier fluido escogido. Otros fluidos incluyen reactivos de cultivos de células, muchos de los cuales incluyen unos compuestos biológicos tales como los fluidos obtenidos a partir de organismos vivos, que incluyen, pero no se limitan a, "sueros normales" obtenidos a partir de diversos animales y usados como medio de crecimiento en aplicaciones de cultivos de células y tejidos.

40 Por el término "primer disolvente de extracción" se entiende un disolvente, que comprende uno o más disolventes, usado(s) para facilitar la extracción de lípidos a partir de una célula que contiene lípidos o de un fluido. El término "primer disolvente de extracción" se usa de manera intercambiable con un primer disolvente orgánico" en la presente solicitud. Este disolvente entrará en el fluido y permanecerá en este fluido hasta ser eliminado. Unos apropiados primeros disolventes de extracción incluyen unos disolventes que extraen o disuelven a lípidos que incluyen, pero no se limitan a, alcoholes, hidrocarburos, aminas, éteres y combinaciones de estos compuestos. Los primeros disolventes de extracción pueden ser unas combinaciones de alcoholes y éteres. Unos primeros disolventes de extracción incluyen, pero no se limitan a, n-butanol, éter di-isopropílico (DIPE), éter dietílico y combinaciones de los mismos. En otra forma de realización, el primer disolvente de extracción puede incluir opcionalmente un detergente.

50 El término "segundo disolvente de extracción" es definido como uno o más disolventes que se puede(n) emplear para facilitar la eliminación de una porción del primer disolvente de extracción. Unos apropiados segundos disolventes de extracción pueden incluir cualquier disolvente que facilite la eliminación del primer disolvente de extracción desde el fluido. Los segundos disolventes de extracción incluyen cualquier disolvente que facilite la eliminación del primer disolvente de extracción incluyendo, pero sin limitarse a, éteres, alcoholes, hidrocarburos, aminas y combinaciones de estos compuestos. Unos preferidos segundos disolventes de extracción incluyen éter dietílico y éter di-isopropílico, que facilitan la eliminación de unos alcoholes, tales como n-butanol, desde el fluido. El término "agente desemulsionante" se refiere a un segundo disolvente de extracción que ayuda a la eliminación del primer disolvente de extracción que puede estar presente en una emulsión en una capa acuosa. Por el término "agente desemulsionante" se entiende un agente que ayuda a la eliminación del primer disolvente de extracción que puede estar presente en una emulsión en una capa acuosa.

60 Unos detergentes y agentes tensioactivos conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad se pueden emplear en combinación con el por lo menos un primer disolvente de extracción en el presente invento.

Dichos detergentes y agentes tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, diversos detergentes iónicos y no iónicos. Tales detergentes y agentes tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, diversas formas de Triton o Tween.

5 Los términos “célula cancerosa modificada” y “partícula de célula cancerosa” se usan de una manera intercambiable y describen a una célula cancerosa modificada, a una partícula de célula cancerosa modificada o a fragmentos de ella, que resultan de la aplicación del procedimiento del presente invento a células cancerosas con el fin de reducir su contenido de lípidos.

El término “deslipidación” se refiere al procedimiento de eliminar por lo menos una porción de una concentración total de lípidos desde una célula cancerosa.

10 El término “lípidos” se define como una cualquiera o más de un grupo de grasas o sustancias similares a grasas que se presentan en seres humanos o animales. Las grasas o sustancias similares a grasas son caracterizadas por su insolubilidad en agua y su solubilidad en disolventes orgánicos. El término “lípidos” es conocido para los que poseen experiencia ordinaria en la especialidad e incluye, pero no se limita a, lípidos polares, lípidos no polares, un lípido complejo, un lípido simple, triglicéridos, ácidos grasos, glicerofosfolípidos (fosfolípidos), esfingolípidos, grasas verdaderas tales como ésteres de ácidos grasos, glicerol, cerebrósidos, ceras, y unos esteroides tales como colesterol y ergosterol. Los lípidos que pueden ser eliminados desde una célula cancerosa incluyen, pero no se limitan a, la eliminación de lípidos polares, lípidos no polares, esfingolípidos, colesterol, fosfolípidos o una combinación de éstos. En una forma de realización, la concentración total de lípidos que quedan en la célula cancerosa modificada es de menos que un 80 % de la concentración total de lípidos en la célula cancerosa original. En otras formas de realización, la concentración total de lípidos que quedan en la célula cancerosa modificada es de menos de un 50 % de la concentración total de lípidos en la célula cancerosa original. En una forma preferida de realización, la concentración total de lípidos que quedan en la célula cancerosa modificada es de menos que un 30 % de la concentración total de lípidos en la célula cancerosa original. En otra forma de realización, la concentración total de lípidos que quedan en la zona cancerosa modificada es de menos de un 20 % de la concentración total de lípidos en la célula cancerosa original. En otra forma de realización, la concentración total de lípidos que quedan en la célula cancerosa modificada es de menos de un 10 % de la concentración total de lípidos en la célula cancerosa original. En otra forma de realización, la concentración total de lípidos que quedan en la célula cancerosa modificada es de menos de un 5 % de la concentración total de lípidos en la célula cancerosa original. En otra forma de realización, la concentración total de lípidos que quedan en la célula cancerosa modificada está situada entre un 1 % y un 80 % de la concentración total de lípidos en la célula cancerosa original.

30 Adicionalmente, las células cancerosas y las partículas de células cancerosas modificadas pueden poseer, en una forma de realización, unas tasas de recuperación de proteínas situadas por encima de un 50 % del contenido total de proteínas en comparación con una célula cancerosa no deslipidada.

35 Los términos “vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente farmacéuticamente aceptable” se usan en el presente contexto para significar cualquier líquido, que incluye pero no se limita a, agua o una solución salina, un gel, un emplasto, un disolvente, un diluyente, una base de ungüento fluido, un liposoma, una micela, una micela gigante, y similares, que se adecua para su uso en contacto con un tejido de animal o ser humano vivo sin causar respuestas fisiológicas desfavorables, y que no interactúa con los otros componentes de la composición de una manera perjudicial.

El término “paciente” se refiere a un animal o ser humano.

40 El término “antígeno específico para el paciente” se refiere a un antígeno que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica para el paciente cuando se introduce en ese paciente. Dichos antígenos específicos para el paciente pueden ser antígenos asociados con un cáncer o antígenos asociados con un tumor. Un antígeno específico para el paciente incluye cualquier antígeno, por ejemplo un antígeno asociado con un cáncer.

45 El término “antígeno asociado con un tumor (TAA = acrónimo de Tumor Associated Antigen) o antígeno asociado con una célula cancerosa” se refiere a un antígeno conocido para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad por estar asociado con una célula de tumor o de cáncer. Ejemplos no limitativos de TAA's englobados por el presente invento se pueden encontrar en la Tabla 1. Resultará evidente para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad que un TAA puede comprender un antígeno de superficie celular, unido por una membrana con una célula cancerosa. Muchos de tales antígenos están glicosilados, por ejemplo el GP-100. En otra forma de realización, los TAA's pueden comprender también antígenos específicos para un cáncer intracelular. Tal como se demuestra aquí, las DC's pueden recoger y procesar células cancerosas deslipidadas.

Correspondientemente, la presente solicitud describe un método para la presentación de antígenos específicos para un cáncer intracelular al sistema inmunitario mediado por células.

ES 2 401 706 T3

Tabla 1: Antígenos asociados con un tumor/un cáncer (TAA's) realizados por la presente solicitud

	AFP	alfa (α)-fetoproteína
	AIM-2	proteína 2 inducible por interferón ausente en un melanoma
	ALL	leucemia linfoblástica aguda
5	AML	leucemia mieloide aguda
	707-AP	707 alanina prolina
	APL	leucemia promielocítica aguda
	ART-4	antígeno 4 de adenocarcinoma reconocido por células T 4
	BAGE	antígeno B
10	bcr-abl	región de racimo en punto de rotura - Abelson
	CAMEL	antígeno reconocido por CTL en un melanoma
	CAP-1	péptido-1 de antígeno carcinoembrionario
	CASP-8	caspara 8
	CDC27	ciclo de división celular 27
15	CDK4	cinasa dependiente de ciclina 4
	CEA	antígeno carcinoembrionario
	CLCA2	canal de cloruro activado por calcio 2
	CML	leucemia mielógena crónica
	CT	testículo con cáncer (antígeno)
20	CTL	linfocitos T citotóxicos
	Cyp-B	ciclofilina B
	DAM	melanoma con antígenos de diferenciación
	ELF2	factor de elongación 2
	Ep-CAM	molécula de adhesión a células epiteliales
25	EphA2, 3	receptor 2, 3 de efrina del tipo A
	Ets	específico para transformación E-26
	ETV6-AML1	gen variante 6 Ets/gen ETS de leucemia mieloide aguda 1
	FGF-5	factor de crecimiento de fibroblastos 5
	FN	fibronectina
30	G250	glicoproteína 250
	GAGE	antígeno G
	GnT-V	N-acetilglucosaminiltransferasa V
	GP100	glicoproteína de 100 kDa
	HAGE	antígeno de helicasa
35	HER-2/neu	receptor epidémico humano 2/neurológico
	HAL-A*0201-	intercambio de arginina (R) por isoleucina (I) en el residuo 170 de la R170I
	H/N	hélice α del dominio $\alpha 2$ en el gen de HLA-2
	HSP70-2M	cabeza y cuello
40	HST-2	proteína de choque por calor 70-2 mutada
	hTERT	tumor con anillo de sello humano 2
	iCE	transcriptasa inversa de telomerasa humana
	IL-13R $\alpha 2$	carboxil esterasa intestinal
	KIAA0205	cadena $\alpha 2$ de receptor de interleucina 13
45	LAGE	nombre del gen tal como aparece en bases de datos
	LDLR/FUT	antígeno L
	MAGE	receptor de lípidos de baja densidad/ GDP-L-fucosa: β -D-galactosidasa 2- α -L-fucosiltransferasa
	MART-1/Melan-A T	antígeno de melanoma
50	MART-2	antígeno de melanoma reconocido por células T -1/antígeno de melanoma A
	MCIR	antígeno de melanoma reconocido por células T -2
	M-CSF	receptor de melanocortina 1
	MHC	gen del factor estimulante de colonias y macrófagos
	MSI	complejo de histocompatibilidad mayor
55	MUC1,2	inestabilidad de microsatélite
	MUM-1,-2,-3	mucina 1,2
	NA88-A	melanoma ubicuo mutado 1, 2, 3
	Neo-PAP	clon de ADNc de NA del paciente M88
	NPM/ALK	neo-poli(A)polimerasa
60	NSCLC	proteína de fusión de nucleofosmina y cinasa de linfoma anaplásico
	NY-ESO-1	carcinoma de pulmón de células no pequeñas
	OA1	esofágico1 de Nueva York
	OGT	proteína de albinismo ocular del tipo 1
	ORF	gen de N-glucosamina transferasa enlazada por O
65	OS-9	marco de lectura abierto
		nombre del gen tal como aparece en las bases de datos

	P15	proteína 15
	p190 mnor bcr-abl	proteína de bcr-abl de 190 kDa
	Pml/RAR α	leucemia promielocítica/receptor α de ácido retinoico
5	PRAME	antígeno de melanoma expresado preferentemente
	PSA	antígeno específico para la próstata
	PSMA	antígeno de membrana específico para la próstata
	PTPRK	proteína tipo de receptor - tirosina fosfatasa kappa
	RAGE	antígeno renal
	RCC	carcinoma de células renales
10	RU1, 2	renal ubicuo 1, 2
	SAG	antígeno de sarcoma
	SART-1, -2, -3	tumor que rechaza a antígenos escamosos 1, 2, 3
	SCC	carcinoma de células escamosas
	SSX-2	sarcoma sinovial, punto de rotura X 2
15	Survivin-2B	survivina que retiene al intrón 2
	SYT/SSX	proteína de fusión X de sinaptotagmina 1 / sarcoma sinovial
	TEL/AML1	translocación de leucemia de la familia Ets / leucemia mieloide aguda 1
	TGF β RII	receptor 2 de factor de crecimiento transformante β
	TPI	triosafosfato isomerasa
20	TRAG-3	proteína asociada resistente a taxol 3
	TRG	gen relacionado con testina
	TRP-1	proteína relacionada con tirosinasa 1, o gp75
	TRP-2	proteína relacionada con tirosinasa 2
	TRP-2/INT2	TRP-2/intrón 2
25	TRP-2/6B	TRP-2/nuevo exón 6b
	TSTA	antígenos de trasplante específicos para tumores
	WT1	gen de tumor de Wilms

Métodos de producción de la célula cancerosa modificada

30 Una persona con experiencia ordinaria en la especialidad podría apreciar que se pueden emplear múltiples procedimientos de deslipidación.

En una forma preferida de realización, se usa un sistema de disolventes conjuntamente con un sistema mezclador mecánico para deslipidar sustancialmente a la célula cancerosa. El procedimiento de deslipidación es dependiente de la cantidad total de disolvente y de la entrada de energía en un sistema. Se pueden usar diversos niveles de disolventes y diversos métodos de mezcladura, tal como se describen seguidamente, dependiendo del marco global del procedimiento. La práctica del método del presente invento para reducir el contenido de lípidos de una célula cancerosa crea una célula cancerosa o una partícula de célula cancerosa modificada. Estas células cancerosas modificadas tienen unos más bajos niveles de lípidos y son inmunogénicas. Los presentes métodos exponen o modifican a unos epítomos que no son presentados usualmente al sistema inmunitario por células cancerosas no tratadas. Se cree que una deslipidación no solamente expone a los epítomos sino que también aumenta el procesamiento de antígenos y la presentación de antígenos asociados con tumores a causa de la forma conformacional que presenta el antígeno después de una deslipidación. Los métodos del presente invento resuelven numerosos problemas encontrados con los métodos de la técnica anterior. Disminuyendo sustancialmente el contenido de lípidos de la envoltura lipídica de la célula cancerosa, y manteniendo intacta a la célula cancerosa modificada, el método del presente invento expone o modifica a antígenos adicionales. El sistema inmunitario de un anfitrión reconoce como ajena a la célula cancerosa modificada. Usando el método del presente invento, lo que se crea es una célula cancerosa o una partícula de célula cancerosa modificada en la que son expuestos unos antígenos adicionales, usando de esta manera los epítomos de la célula cancerosa existente para iniciar una respuesta inmunogénica positiva en el paciente a continuación de una administración.

50 Las células cancerosas o partículas, parcialmente deslipidadas, modificadas, obtenidas con algunas formas de realización de los métodos aquí descritos constituyen, en algunos aspectos, nuevas composiciones de vacunas terapéuticas para la inmunización terapéutica y la inducción de una respuesta inmunitaria en animales o seres humanos. En un aspecto, una célula cancerosa parcialmente deslipidada, modificada, obtenida con los métodos aquí descritos es útil para una inmunización terapéutica y la inducción de una respuesta inmunitaria en animales o seres humanos afligidos con cáncer. En otra forma de realización, las células cancerosas modificadas, obtenidas con los métodos aquí descritos, son útiles para la inmunización de animales y seres humanos que no tienen el cáncer, con el fin de provocar una respuesta inmunitaria cuando se pueden desarrollar cánceres.

60 La administración de las células cancerosas parcialmente deslipidadas, modificadas, y de las composiciones que comprenden dichas células proporciona un nuevo método de tratamiento, alivio o represión del crecimiento de un cáncer, o de condiciones o síntomas clínicos asociados con el cáncer.

Las células cancerosas y las partículas de células cancerosas parcialmente deslipidadas, obtenidas de acuerdo con algunos de los aspectos del presente invento, poseen por lo menos algunas características estructurales que las distinguen con respecto de las células cancerosas convencionales. Dichas características incluyen, pero no se limitan a, un contenido reducido de lípidos, un contenido modificado de proteínas o la relación del contenido de lípidos al contenido de proteínas. Por ejemplo, una célula cancerosa o partícula de célula cancerosa parcialmente deslipidadada, de acuerdo con algunas formas de realización del presente invento, tiene un contenido de colesterol más bajo que el contenido de colesterol de la célula cancerosa no deslipidadada. En una forma de realización, el más bajo contenido de colesterol de la partícula de célula cancerosa parcialmente deslipidadada puede ser por lo menos un 70 % a 99 % más bajo que el contenido de colesterol de las células cancerosas no deslipidadas. En otras formas de realización, el contenido de colesterol en la partícula de célula cancerosa parcialmente deslipidadada, modificada, se reduce, por ejemplo, en aproximadamente un 99 %, 90 %, 70 %, 50 %, 30 % o 20 % en comparación con la célula cancerosa no modificada. Ha de entenderse que el colesterol es solamente una forma de lípido que puede ser reducido a continuación del tratamiento de las células cancerosas, y que se pueden reducir otros lípidos como aquí se definen, o unas combinaciones de estos lípidos.

Una célula cancerosa parcialmente deslipidadada, modificada, puede también ser caracterizada, por ejemplo, por retener > 50 % del contenido total de proteínas de la célula cancerosa. En una forma de realización del presente invento los TAA's que son retenidos en la célula cancerosa modificada incluyen, pero no se limitan a, los TAA's que se encuentran en la Tabla 1. En otra forma de realización los TAA's comprenden GP 100 y TRP-2. No obstante, se apreciará por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad que los TAA's retenidos por la célula cancerosa modificada variarán del tipo de cáncer que esté presente.

Sistemas de disolventes ilustrativos para su uso en la eliminación de lípidos a partir de células cancerosas con el fin de producir células cancerosas o partículas deslipidadas que sean útiles para la producción de vacunas

El disolvente o las combinaciones de disolventes que se ha(n) de emplear en el procedimiento de deslipidación parcial o completa de células cancerosas que contienen lípidos y en la producción de vacunas, puede(n) ser cualquier disolvente o cualesquiera combinaciones de éstos que sea(n) efectivo(as) para solubilizar a lípidos al mismo tiempo que se retengan componentes de antígenos de la célula cancerosa, que se pueda(n) medir en una forma de realización, a través de la recuperación de proteínas. Este procedimiento de deslipidación que mantiene intactos a unos componentes de antígenos de la célula cancerosa es una cuestión de definir a los sistemas de disolventes y energías correctos. Unos disolventes apropiados comprenden hidrocarburos, éteres, alcoholes, fenoles, ésteres, hidrocarburos halogenados, halocarburos, aminas y mezclas de los mismos. Se pueden usar también hidrocarburos aromáticos, alifáticos o alicíclicos. Otros disolventes apropiados, que se pueden usar con el presente invento, incluyen aminas y mezclas de aminas. Una preferida combinación de disolventes comprende alcoholes y éteres. Un sistema de disolvente es el DIPE, ya sea concentrado o diluido en agua o un tampón tal como un tampón aceptable fisiológicamente. Una combinación de disolventes comprende alcoholes y éteres. Otro disolvente preferido comprende un éter o unas combinaciones de éteres, ya sea en la forma de éteres asimétricos o de éteres halogenados.

Los sistemas de disolventes óptimos son los que cumplen dos objetivos: en primer lugar, deslipidar por lo menos parcialmente a la célula cancerosa y en segundo lugar, proporcionar pocos o ningunos efectos perjudiciales a las proteínas antigénicas de las células cancerosas. Además, el sistema de disolventes debería de mantener la integridad de la partícula de célula cancerosa de tal manera que ella se pueda usar para iniciar una respuesta inmunitaria en el paciente. Se deberá hacer observar, por lo tanto, que ciertos disolventes, ciertas combinaciones de disolventes o ciertas concentraciones de disolventes pueden ser demasiado difíciles para usarse en el presente invento, puesto que ellos/ellas dan como resultado una degradación inaceptable de proteínas de células cancerosas.

Se prefiere que el disolvente o la combinación de disolventes tenga un punto de ebullición relativamente bajo para facilitar la eliminación por medio de un vacío y posiblemente del calor, sin destruir a los antígenos de la célula cancerosa. Se prefiere también que el disolvente o la combinación de disolventes se emplee a una baja temperatura puesto que el calor puede tener efectos perjudiciales sobre las proteínas. Se prefiere también que el disolvente o la combinación de disolventes deslipide por lo menos parcialmente a la célula cancerosa.

La eliminación de disolventes a partir de células cancerosas deslipidadas se puede conseguir mediante el uso de un segundo disolvente de extracción o de un agente desemulsionante. Por ejemplo, se pueden usar agentes desemulsionantes tales como ciertos éteres, con el fin de eliminar un primer disolvente, tal como un alcohol, desde una emulsión. La eliminación de disolventes se puede conseguir también a través de otros métodos, que no emplean disolventes adicionales, que incluyen, pero no se limitan al uso de carbón vegetal. El carbón vegetal se puede usar en una suspensión o, de manera alternativa, en una columna a la que se aplica una mezcla. El uso de carbón vegetal representa un método preferido de eliminar disolventes. Se puede emplear también una pervaporación para eliminar uno o más disolventes a partir de mezclas de células cancerosas deslipidadas.

Ejemplos de aminas apropiadas para usarse en la eliminación de lípidos a partir de células cancerosas que contienen lípidos en el presente invento son las que son sustancialmente inmiscibles en agua. Unas típicas aminas

son aminas alifáticas - las que tienen una cadena de carbonos de por lo menos 6 átomos de carbono. Un ejemplo no limitativo de una de dichas aminas es $C_6H_{13}NH_2$.

5 Los alcoholes preferidos para usarse en el presente invento, cuando se usan a solas, incluyen los alcoholes que no son apreciablemente miscibles con un plasma o con otros fluidos biológicos. Tales alcoholes incluyen, pero no se limitan a, alcoholes de cadena lineal y de cadena ramificada, incluyendo los pentanoles, hexanoles, heptanoles, octanoles y los alcoholes que contienen unos números más altos de carbonos. Los alcoholes se pueden usar a solas o en combinación con otro disolvente, por ejemplo un éter. Ciertas concentraciones de alcoholes se pueden emplear para eliminar lípidos cuando se usan a solas y no en combinación con otros disolventes. Por ejemplo, un intervalo de concentraciones de alcoholes incluye las de 0,1 % a 99,9 %. Por ejemplo, las concentraciones de alcoholes que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: 0,1 %, 1,0 %, 2,5 %, 5 %, 10,0 % y 25 % o más altas.

15 Cuando los alcoholes se usan en combinación con otro disolvente, por ejemplo un éter, un hidrocarburo, una amina, o una combinación de estos compuestos, se pueden usar unos alcoholes que contienen de 1 C a 8 C. Unos alcoholes preferidos para usarse en combinación con otro disolvente incluyen alcoholes que contienen de 4 C a 8 C. Correspondientemente, unos alcoholes preferidos de acuerdo con el presente invento son butanoles, pentanoles, hexanoles, heptanoles y octanoles y las formas iso de los mismos. En particular se prefieren alcoholes de 4 C o butanoles (1-butanol y 2-butanol). La elección del alcohol específico es dependiente del segundo disolvente que se emplee. En una forma preferida de realización, unos alcoholes más bajos son combinados con unos éteres más bajos.

20 Un éter, cuando se usa ya sea a solas o en combinación con otros disolventes (preferiblemente con alcoholes), es otro disolvente preferido para usarse en el método del presente invento. Son particularmente preferidos los éteres que contienen de 4 C a 8 C, incluyendo, pero sin limitarse a éter etílico, éter dietílico y éteres propílicos (incluyendo pero sin limitarse a éter di-isopropílico (DIPE)). Se pueden emplear también éteres asimétricos. Se pueden emplear también éteres halogenados simétricos y asimétricos.

25 Se pueden emplear bajas concentraciones de disolventes, tales como éteres, para eliminar lípidos cuando se usan a solas y no en combinación con otros disolventes. Por ejemplo, un intervalo de bajas concentraciones de éteres incluye el de 0,5 % a 30 %. Por ejemplo, unas concentraciones de éteres que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: 0,625 %, 1,0 %, 1,25 %, 2,5 %, 3 %, 5,0 % y 10 % o más altas. Se ha observado que ciertas soluciones diluidas de éteres son eficaces para eliminar lípidos a partir de células. Dichas soluciones pueden ser soluciones acuosas o soluciones en tampones acuosos, tales como una solución salina tamponada con fosfato (PBS, acrónimo de Phosphate Buffered Saline). Se pueden usar otros tampones fisiológicos, que incluyen, pero no se limitan a, los de bicarbonato, citrato, Tris, Tris/EDTA y Trizma. Unos éteres preferidos son éter di-isopropílico (DIPE) y éter dietílico (DEE). Ciertos éteres se pueden usar también en combinación en el presente invento - tal como una mezcla de disolventes a base de DIPE y DEE. Unas bajas concentraciones de éteres se pueden usar también en combinación con alcoholes, por ejemplo, n-butanol.

35 Cuando se usan éteres y alcoholes en combinación como un primer disolvente para eliminar lípidos desde células cancerosas que contienen lípidos, se puede usar cualquier combinación de un alcohol y un éter, con la condición de que esta combinación ha de ser eficaz para eliminar por lo menos parcialmente lípidos desde la célula cancerosa, sin tener un efecto perjudicial sobre las proteínas inmunogénicas. Cuando unos alcoholes y éteres se combinan como un primer disolvente para tratar a las células cancerosas contenidas en un fluido, unas relaciones útiles de alcohol a éter en este disolvente varían entre aproximadamente 0,01 partes de alcohol por 99,99 partes de éter y 60 partes de alcohol por 40 partes de éter, con un intervalo específico de relaciones de aproximadamente desde 10 partes de alcohol por 90 partes de éter hasta 5 partes de alcohol por 95 partes de éter, con un intervalo específico de relaciones de aproximadamente desde 10 partes de alcohol y 90 partes de éter hasta 50 partes de alcohol y 50 partes de éter, con un intervalo específico de relaciones de aproximadamente desde 20 partes de alcohol por 80 partes de éter hasta 45 partes de alcohol por 55 partes de éter, con un intervalo específico de aproximadamente 25 partes de alcohol por 75 partes de éter, uno con respecto a otro. En una forma de realización, la relación de un alcohol a un éter es de 1 parte de alcohol por 1 parte de éter y 98 partes de un fluido que contiene las células cancerosas.

50 Una combinación especialmente preferida de un alcohol y un éter es la combinación de butanol y DIPE. Cuando se combinan butanol y DIPE como un primer disolvente para tratar a cánceres contenidos en un fluido, unas relaciones útiles de butanol a DIPE en este disolvente son las de aproximadamente desde 0,01 partes de butanol por 99,99 partes de DIPE hasta 60 partes de butanol por 40 partes de DIPE, con un intervalo específico de relaciones de aproximadamente desde 10 partes de butanol por 90 partes de DIPE hasta 5 partes de butanol por 95 partes de DIPE, con un intervalo específico de relaciones de aproximadamente desde 10 partes de butanol por 90 partes de DIPE hasta 50 partes de butanol por 50 partes de DIPE, con un intervalo específico de relaciones de aproximadamente desde 20 partes de butanol por 80 partes de DIPE hasta 45 partes de butanol por 55 partes de DIPE, con un intervalo específico de aproximadamente 25 partes de butanol por 75 partes de DIPE, uno con respecto a otro. En otra forma de realización, un intervalo de relaciones de un disolvente combinado a un fluido que contiene células tumorales es el de aproximadamente desde 0,5 partes del disolvente combinado por 99,5 partes de un fluido

que contiene células tumorales hasta 2 partes del disolvente combinado por 1 parte de fluido que contiene células cancerosas.

Otra combinación de un alcohol y un éter es la combinación de butanol con DEE. Cuando se usa butanol en combinación con DEE en un primer disolvente, unas relaciones útiles de butanol a DEE son las de aproximadamente desde 0,01 partes de butanol por 99,99 partes de DEE hasta 60 partes de butanol por 40 partes de DEE, con un intervalo específico de relaciones de aproximadamente desde 10 partes de butanol por 90 partes de DEE hasta 5 partes de butanol por 95 partes de DEE, con un intervalo específico de relaciones de aproximadamente 10 partes de butanol por 90 partes de DEE hasta 50 partes de butanol por 50 partes de DEE, con un intervalo específico de relaciones de aproximadamente desde 20 partes de butanol por 80 partes de DEE hasta 45 partes butanol por 55 partes de DEE, con un intervalo específico de aproximadamente 40 partes de butanol por 60 partes de DEE.

Adicionalmente, cuando se emplea un disolvente que contiene n-butanol, el presente invento puede usar también una relación de disolventes que proporciona aproximadamente 0,1 % - 5 % de n-butanol en la suspensión final de disolvente y células cancerosas, por ejemplo, se puede usar 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 % de n-butanol.

Los hidrocarburos líquidos disuelven a unos compuestos de baja polaridad tales como los lípidos encontrados en las células cancerosas. Son particularmente eficaces para romper la membrana lipídica de una célula cancerosa unos hidrocarburos que son sustancialmente inmiscibles con agua y líquidos a aproximadamente 37°C. Unos hidrocarburos apropiados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: hidrocarburos alifáticos de C₅ a C₂₀ tales como éter de petróleo, hexano, heptano, octano; hidrocarburos haloalifáticos tales como cloroformo 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano, 1,1,1-tricloroetano, tricloroetileno, tetracloroetileno, diclorometano y tetracloruro de carbono, hidrocarburos tioalifáticos, cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado; hidrocarburos aromáticos tales como benceno; alquilarenos tales como tolueno; haloarenos; haloalquilarenos; y tioarenos. Otros disolventes apropiados pueden incluir también unos compuestos heterocíclicos saturados o insaturados tales como piridina y derivados alifáticos con tio o halo de los mismos.

Unos ésteres apropiados para su uso en el presente invento incluyen, pero no se limitan a, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de butilo y propionato de etilo. Unos apropiados detergentes/agentes tensioactivos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: sulfatos, sulfonatos, fosfatos (incluyendo fosfolípidos), carboxilatos y sulfosuccinatos. Algunos materiales anfífilos aniónicos útiles con el presente invento incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: dodecil sulfato de sodio (SDS), decil sulfato de sodio, bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT), sulfato de colesterol y laurato de sodio.

Células cancerosas y trabamiento de las mismas para producir antígenos expuestos asociados con células cancerosas

Como se ha señalado con anterioridad, diversos cánceres pueden ser tratados con el método del presente invento, con el fin de exponer antígenos de las células cancerosas, asociados con células cancerosas. En una forma preferida de realización, unas muestras de cáncer, obtenidas a partir de un animal o ser humano, son tratadas con el método del presente invento con el fin de eliminar lípidos y exponer o modificar antígenos asociados con células cancerosas. En esta forma de realización, se pueden obtener unas muestras de cáncer, tales como biopsias, a partir de un paciente animal o humano por cualquier medio convencional, incluyendo diversas técnicas quirúrgicas, y tratar a estas muestras con el fin de aislar las células cancerosas. Algunas células cancerosas se pueden obtener a partir de unos fluidos tales como un plasma y fluidos peritoneales, pleurales, pericárdicos y cerebrospinales. Dichos métodos para escindir y aislar células cancerosas son conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad.

Una vez que una célula cancerosa se ha obtenido o bien de esta manera o, por ejemplo, a partir de unos medios de almacenamiento que alojan a muestras de células cancerosas, la célula cancerosa es puesta en contacto con un primer disolvente orgánico, como se ha descrito con anterioridad, capaz de solubilizar a lípidos en la célula cancerosa. El primer disolvente orgánico es combinado con las células cancerosas o con un medio que contiene las células cancerosas en una relación en la que el primer disolvente está presente en una cantidad eficaz para solubilizar sustancialmente a los lípidos en las células cancerosas, por ejemplo, para disolver a la envoltura lipídica que rodea a las células. Unas aceptables relaciones de un primer disolvente a un medio (expresada como una relación del primer disolvente orgánico al medio que contiene las células cancerosas) se describen en los siguientes intervalos: 0,5 - 4,0; 0,5 - 4,0; 0,8 - 3,0; 0,8 - 3,0; y 1 - 2; 0,8 - 1,5. Se pueden emplear otras relaciones, dependiendo de la naturaleza del medio y de la concentración de las células cancerosas en ese medio. Por ejemplo, en el caso de un fluido de cultivo de células, se pueden emplear los siguientes intervalos del primer disolvente orgánico al fluido de cultivo de células: 0,5 - 4,0; 0,5 - 4,0; 0,8 - 3,0; 0,8 - 3,0; y 1-2; 0,8-1,5.

Después de haber puesto en contacto el medio que contiene las células cancerosas con el primer disolvente como más arriba se ha descrito, el primer disolvente y el medio se mezclan usando un método que incluye, pero no se limita a, uno cualquiera de los siguientes métodos de mezcla apropiados: una suave agitación; una enérgica agitación, un tratamiento en torbellino; un arremolinamiento, un sacudimiento, una homogeneización y un

entrecruzamiento de rotaciones. En una primera forma de realización el primer disolvente y el medio se mezclan usando un entrecruzamiento de rotaciones. En otra forma de realización, el primer disolvente y el medio se mezclan por sacudimiento.

5 El período de tiempo requerido para mezclar adecuadamente el primer disolvente con el medio está relacionado con el método de mezclado empleado. El medio se mezcla durante un período de tiempo suficiente para permitir un contacto íntimo entre las fases orgánica y acuosa, y para que el primer disolvente solubilice por lo menos parcialmente o por completo a los lípidos contenidos en las células cancerosas. Típicamente, una mezclado se realizará durante unos períodos de tiempo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 24 horas, de 10 segundos a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 10 minutos o de 10 aproximadamente 30 segundos hasta aproximadamente una hora, dependiendo del método de mezclado que se emplee y de la cantidad de células que se estén tratado. Unos ejemplos no limitativos de duraciones de la mezclado asociadas con diferentes métodos se presentan en las siguientes frases. Una suave agitación y un entrecruzamiento de rotaciones pueden realizarse durante un período de tiempo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 24 horas. Una enérgica agitación y un tratamiento en torbellino se pueden realizar durante un período de tiempo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 30 minutos. Un arremolinamiento se puede realizar durante un período de tiempo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 2 horas. Una homogeneización puede realizarse durante un período de tiempo de aproximadamente 5 segundos a aproximadamente 10 minutos. Un sacudimiento puede realizarse durante un período de tiempo de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 2 horas.

20 *Separación de disolventes*

Después de haber mezclado el primer disolvente con el medio, este disolvente es separado con respecto del medio que está siendo tratado. Las fases orgánica y acuosa pueden ser separadas de cualquier manera apropiada conocida para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad. Puesto que el primer disolvente es típicamente inmiscible en el fluido acuoso, se permite que las dos capas se separen y la capa indeseada se elimina. La capa indeseada es la capa de disolvente que contiene lípidos disueltos y su identificación, como es conocido para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad, depende de si el disolvente es más o menos denso que la fase acuosa. Una ventaja de efectuar la separación de esta manera consiste en que los lípidos disueltos en la capa de disolvente pueden ser eliminados.

30 Además, la separación se puede conseguir mediante unos medios que incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: eliminar la capa indeseada mediante pipeteo; realizar una centrifugación seguida por una eliminación de la capa que se ha de separar; crear una trayectoria o un agujero en el fondo del tubo que contiene las capas y permitir que la capa inferior pase a su través; utilizar un recipiente con unas válvulas o lumbreras situadas en longitudes específicas en el eje largo del recipiente para facilitar el acceso a capas específicas y la eliminación de las mismas; y cualesquiera otros medios conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad. Otro método de separar las capas, especialmente cuando la capa de disolvente es volátil, se realiza mediante una destilación bajo presión reducida o una evaporación a la temperatura ambiente, combinadas opcionalmente con un suave calentamiento. En una forma de realización que emplea una centrifugación, se emplean unas fuerzas g relativamente bajas tales como 900 x g durante aproximadamente 5 a 15 minutos con el fin de separar las fases.

40 Un método preferido de eliminar el disolvente consiste en el uso de carbón vegetal, preferiblemente de carbón vegetal activado. Este carbón vegetal está contenido opcionalmente en una columna. Alternativamente, el carbón vegetal se puede usar en forma de una suspensión. Diversas formas biocompatibles de carbón vegetal se pueden usar en estas columnas. Los métodos de pervaporación y el uso de carbón vegetal para eliminar los disolventes son los métodos preferidos para eliminar estos disolventes.

45 Después de una separación del primer disolvente con respecto del medio tratado, una cierta cantidad del primer disolvente puede permanecer atrapada en la capa acuosa en forma de una emulsión. Opcionalmente, un agente desmulsionante se emplea para facilitar la eliminación del primer disolvente atrapado. Todavía otro método para eliminar un disolvente es el uso de contactores de fibras huecas. El agente desmulsionante puede ser cualquier agente eficaz para facilitar la eliminación del primer disolvente. Un agente desmulsionante preferido es un éter y un agente desmulsionante más preferido es éter dietílico. El agente desmulsionante puede ser añadido al fluido o, en una alternativa, el fluido puede ser dispersado en el agente desmulsionante. En la preparación de una vacuna, se pueden emplear como agentes desmulsionantes unos alcanos en una relación de aproximadamente 0,5 a 4,0 por aproximadamente 1 parte de emulsión (en volumen : volumen), seguido por un lavado para eliminar el alcano residual desde la célula cancerosa deslipidada remanente que se ha usado para preparar la vacuna. Unos alcanos preferidos incluyen, pero no se limitan a, pentano, hexano y alcanos de cadena lineal y ramificada de orden superior.

60 El agente desmulsionante, tal como un éter, se puede eliminar mediante unos medios conocidos para una persona con experiencia en la especialidad, que incluyen los medios que se han descrito en el párrafo anterior. Un método conveniente para eliminar el agente desmulsionante, tal como un éter, desde el sistema, consiste en permitir que el éter se evapore desde el sistema en una caperuza de humo circulante o en otro dispositivo apropiado para recoger y

eliminar el agente desmenuante desde el entorno. Además, los agentes desmenuantes se pueden eliminar mediante aplicación de unas temperaturas más altas, por ejemplo de aproximadamente 24 a 37°C con o sin unas presiones de aproximadamente 10 a 20 mbar. Otro método para eliminar el agente desmenuante implica una separación por centrifugación seguida por una eliminación del disolvente orgánico por aspiración, seguida además por una evaporación bajo presión reducida (por ejemplo de 50 mbar) o un suministro adicional de un gas inerte, tal como nitrógeno, sobre el menisco para ayudar a la evaporación.

Las células cancerosas o los fragmentos de células cancerosas tratadas/os con el método de deslipidación del presente invento se pueden recoger o concentrar usando unos métodos conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: los de centrifugación, filtración, tamizado, clasificación de células y cromatografía, por ejemplo una cromatografía por afinidad.

Métodos de tratar fluidos biológicos que contienen células cancerosas (deslipidación)

Ha de entenderse que el método del presente invento se emplea de una manera ya sea continua o discontinua. En un modo de funcionamiento discontinuo o por tandas (en inglés batch) se emplean una muestra de tejido canceroso o células dispersadas previamente obtenidas de un ser humano o animal. La muestra es tratada con el método del presente invento con el fin de producir una nueva muestra que contiene células cancerosas deslipidadas por lo menos parcialmente o por completo, o células cancerosas modificadas. Una forma de realización de esta modalidad consiste en tratar unas muestras de células cancerosas previamente obtenidas a partir de animales o seres humanos y almacenadas en un banco de células para el subsiguiente uso con el fin de crear híbridos de DC y células cancerosas. Estas muestras pueden ser administradas con el método del presente invento con el fin de eliminar cánceres o reducir al mínimo la proliferación de un cáncer.

La deslipidación de células cancerosas se puede conseguir por diversos medios. Un método discontinuo se puede usar para tratar células cancerosas recientemente recogidas o almacenadas. En este caso, se pueden usar para la deslipidación de células cancerosas una diversidad de los disolventes orgánicos descritos o mezclas de los mismos. El período de tiempo de extracción depende del disolvente o de la mezcla de tales disolventes y del procedimiento de mezclado que se emplee.

Por medio del uso de los métodos del presente invento, se reducen los niveles de lípidos en células cancerosas que contienen lípidos, y el fluido, que contiene por ejemplo las partículas de células cancerosas deslipidadas, se puede administrar al paciente. Dicho fluido que contiene partículas de células cancerosas modificadas puede actuar como una vacuna y proporcionar en el paciente protección contra el cáncer o proporcionar un tratamiento en un paciente afligido con el cáncer por generación de una respuesta inmunitaria y disminución de la gravedad del cáncer. Estas partículas de células cancerosas modificadas inducen en el organismo receptor una respuesta inmunitaria a los epítomos expuestos sobre las partículas de células cancerosas modificadas. Alternativamente, las partículas de células cancerosas modificadas pueden ser combinadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente con un adyuvante, y se pueden administrar como una composición de vacuna a un ser humano o a un animal con el fin de inducir una respuesta inmunitaria en el organismo receptor.

En otra forma de realización del presente invento, una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y de por lo menos un antígeno se usa en la preparación de un medicamento útil para inducir una respuesta inmunogénica en un animal o ser humano. El medicamento puede comprender además un agente estimulante de la inmunidad o células dendríticas.

Todavía otra forma de realización del presente invento usa una célula cancerosa con un contenido reducido de lípidos y de por lo menos un antígeno en la preparación de un medicamento útil para inducir una respuesta inmunogénica en un animal o ser humano, en donde la respuesta inmunogénica trata o previene un cáncer en el animal o ser humano.

Producción de una vacuna -- forma de realización uno

La célula cancerosa modificada, que ha sido deslipidada por lo menos parcialmente o sustancialmente por completo y tiene antígenos expuestos asociados con tumores, posee propiedades inmunogénicas y es combinada con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una composición que comprende una vacuna. Esta composición de vacuna es combinada opcionalmente con un adyuvante o un agente estimulante de la inmunidad y es administrada a un animal o ser humano. Unas vacunas tanto autólogas como no autólogas, que incluyen unas vacunas en combinación, se encuentran dentro del alcance del presente invento. Ha de entenderse que unas composiciones de vacuna pueden contener más de un tipo de células cancerosas modificadas o de componentes de las mismas con el fin de proporcionar protección contra cánceres complejos. Dichas combinaciones se pueden seleccionar de acuerdo con la inmunidad deseada.

Producción de una vacuna empleando células dendríticas y células cancerosas deslipidadas -- forma de realización dos

5 Se pueden usar células dendríticas para inducir una respuesta antitumoral dentro de un paciente. Las células dendríticas son unos leucocitos derivados hematopoyéticamente, que forman una red celular implicada en la vigilancia inmunitaria, captura de antígenos y presentación de antígenos. Existen numerosas técnicas para aislar y propagar las DC's *in vitro*, que son conocidas para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad (véase: M.B. Lutz y colaboradores J. Imm. Methods 223(1999) 9277-9279) y, por lo tanto, ellas se pueden usar en estrategias de inmunización. Hasta la fecha, unas DC's, juntamente con péptidos sintéticos que tienen antígenos de 10 cáncer conocidos, péptidos separados hasta agotamiento que se derivan de moléculas de la clase I, ARN de tumores, o materiales lisados de tumores, se han usado con el fin de mejorar la respuesta inmunogénica de los pacientes a un cáncer.

15 En una forma de realización, un tejido de tumor es extraído, deslipidado de acuerdo con el invento más arriba descrito, colocado en una solución salina tamponada con fosfato (PBS, acrónimo de phosphate-buffered saline), y usado para producir una suspensión unicelular. Las células son lisadas usando unas técnicas conocidas para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad, por ejemplo mediante múltiples, tal como de tres a cinco, ciclos de congelación en nitrógeno líquido y de descongelación a la temperatura ambiente. La lisis es preferiblemente vigilada. Las partículas grandes son eliminadas por centrifugación y los materiales sobrenadantes se hacen pasar a través de un filtro. El contenido de proteínas se determina y se almacena para un futuro uso. El objetivo de esta 20 etapa de lisis es el de producir unos componentes antigénicos que son expuestos por vía del procedimiento de deslipidación.

25 Después de haber generado células dendríticas a partir de sangre periférica, de acuerdo con métodos conocidos para las personas con experiencia ordinaria en la especialidad, las células dendríticas son cultivadas, a saber durante aproximadamente 7 días, y luego cultivadas adicionalmente con hemocianina de lapa de bocallave (KLH, acrónimo de keyhole limpet hemocyanin) y con el material lisado de células cancerosas. Una persona con experiencia ordinaria en la especialidad podría reconocer que las cantidades relativas de KLH, de material lisado de tumores y de DC's dependen de la clase de tumor que haya de ser tratado, y se relacionan con ésta. Las células resultantes son lavadas con una PBS y luego resuspendidas en RPMI-1640 para uso en el tratamiento. En una forma de realización, el preparado de vacuna con células se produce en una solución apropiada para la 30 administración a seres humanos, tal como, pero sin limitarse a, una solución salina, una PBS u otras soluciones aprobadas. Este procedimiento crea un híbrido de DC y células cancerosas.

Ha de entenderse que se pueden usar otras moléculas junto a la KLH, por ejemplo tiroglobulina o albúmina de suero, tal como es conocido corrientemente por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad.

Administración de la vacuna de la forma de realización uno, producida con el método del presente invento.

35 Cuando una célula cancerosa deslipidada se administra a un animal o ser humano, ella se combina típicamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una vacuna, y se combina opcionalmente con un adyuvante o un agente estimulante de la inmunidad, tal como es conocido para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad. Las formulaciones de vacunas se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por técnicas farmacéuticas convencionales, conocidas para una persona con 40 experiencia ordinaria en la especialidad. Dichas técnicas incluyen llevar a asociación de una manera uniforme e íntima al ingrediente activo y a los vehículos líquidos (vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s)). Unas formulaciones apropiadas para una administración por vía parenteral incluyen unas soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener agentes antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del organismo receptor pretendido; y unas suspensiones estériles 45 acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspendedores y agentes espesantes.

Las formulaciones se pueden presentar en unos recipientes de una dosis unitaria o de múltiples dosis - por ejemplo, ampollas y viales cerradas/os herméticamente - y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. La vacuna se puede almacenar a unas temperaturas de desde aproximadamente 4°C 50 hasta -100°C. La vacuna se puede almacenar también en un estado liofilizado a diferentes temperaturas, que incluyen la temperatura ambiente. Unas soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles, que corrientemente se usan por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad. La vacuna puede ser esterilizada mediante unos medios convencionales conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, filtración, radiación y calor. La vacuna del presente invento se puede combinar con agentes bacteriostáticos, tales como 55 timerosal, con el fin de inhibir el crecimiento de las bacterias.

Unas preferidas formulaciones de dosificación unitaria son las que contienen una dosis o unidad, o una apropiada fracción de la misma, del ingrediente administrado. Deberá entenderse que, además de los ingredientes, que se ha

mencionado particularmente con anterioridad, las formulaciones del presente invento pueden incluir otros agentes corrientemente usados por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad.

5 La vacuna se puede administrar por diferentes vías, tales como la oral, incluyendo la bucal y sublingual, rectal, parenteral, de aerosol, nasal, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal y tópica. La vacuna se puede administrar también en la vecindad de un tejido linfático, por medio de una administración a los nodos linfáticos tales como los nodos linfáticos axilares, inguinales o cervicales, o a través del tejido linfático de los intestinos (GALT).

10 La vacuna del presente invento se puede administrar en diferentes formas, incluyendo, pero sin limitarse a, soluciones, emulsiones y suspensiones, microesferas, partículas, micropartículas, nanopartículas y liposomas. Se espera que se puedan requerir de aproximadamente 1 a 5 dosificaciones por cada régimen de inmunización. Las inyecciones iniciales pueden variar entre aproximadamente 1 ng y 1 gramo, entre aproximadamente 0,1 mg y 800 mg, y entre aproximadamente 1 mg y 500 mg. Las inyecciones de recuerdo o refuerzo (booster) pueden variar entre 1 ng y 1 gramo, entre aproximadamente 0,1 mg y 750 mg, y entre aproximadamente 0,5 mg y 500 mg. El volumen de administración variará dependiendo de la vía de administración. Las inyecciones intramusculares pueden variar desde aproximadamente 0,01 ml hasta 1,0 ml.

15 Una persona con experiencia ordinaria en las especialidades médicas o veterinarias para administrar vacunas estará familiarizada con la cantidad de la vacuna que se haya de administrar en una inyección inicial o en inyecciones de recuerdo o refuerzo, si se requieren, tomando en consideración, por ejemplo, la edad y el tamaño de un paciente. Las inyecciones iniciales pueden variar entre aproximadamente menos de 1 ng y 1 gramo, basado en las proteínas totales de células cancerosas. Un intervalo no limitativo puede ser el de 1 ml a 10 ml. El volumen de la administración puede variar dependiendo de la vía de administración.

20 Las vacunas del presente invento se pueden administrar después de haberse detectado un cáncer. La vacuna del presente invento se puede administrar ya sea a seres humanos o a animales. En una forma de realización, la proliferación de un cáncer puede ser reducida introduciendo células cancerosas deslipidadas. En otra forma de realización, el tamaño del cáncer es reducido realmente por introducción de células cancerosas deslipidadas.

25 En otra forma de realización, las vacunas del presente invento se pueden administrar a un individuo sin ningún cáncer o en alto riesgo de desarrollar un cáncer, con el fin de prevenir o retrasar el comienzo de un cáncer. Por ejemplo las mujeres que tienen madres y/o abuelas que habían padecido de un cáncer de ovario y/o un cáncer de mama son más susceptibles de desarrollar un cáncer de ovario o un cáncer de mama. Otros cánceres vinculados con el sexo son conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad, y los oncólogos avisan rutinariamente a los pacientes de que ellos pueden ser más susceptibles de desarrollar un cáncer basándose en la historia de la familia o en la interacción de la historia de la familia y los factores ambientales o del estilo de vida predisponentes. La administración de las vacunas del presente invento, por ejemplo de una vacuna contra el cáncer de ovario, a un individuo que está en riesgo de desarrollar un cáncer de ovario, retrasa o previene la aparición de un cáncer de ovario en ese individuo.

Administración de una vacuna de la forma de realización dos, producida con el método del presente invento

30 Después de haber generado los materiales lisados del híbrido de DC y células cancerosas, como se ha descrito más arriba, éstos se combinan típicamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para producir una vacuna, y se combinan opcionalmente con un adyuvante o un agente estimulante de la inmunidad, como es conocido para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad. Las formulaciones de vacunas se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por técnicas farmacéuticas convencionales conocidas para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad. Dichas técnicas incluyen llevar a asociación de una manera uniforme e íntima al ingrediente activo y a los vehículos líquidos (vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s)). Unas formulaciones apropiadas para una administración por vía parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener agentes antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del organismo receptor pretendido; y unas suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden incluir agentes suspendedores y espesantes.

35 Un enfoque preferido para administrar una terapia con DC incluye una administración por vía intradérmica o una administración directamente dentro de los nodos linfáticos. En una forma de realización ilustrativa, los pacientes reciben las DC's pulsadas con un material lisado canceroso autólogo cada 3 semanas por un mínimo de una inmunización y un máximo de 10 inmunizaciones. Por ejemplo, los pacientes reciben cuatro vacunaciones a intervalos de 3 semanas. Las inmunizaciones continúan dependiendo de la respuesta clínica. En una forma de realización, los números de células dendríticas inyectadas por cada vacunación varían entre 10×10^5 y 32×10^6 células. Sin embargo, se apreciará por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad que el número de células es variable dependiendo del tipo de cáncer y de la inmunidad requerida. Los pacientes son vigilados en cuanto a las toxicidades y otras respuestas clínicas.

Adyuvantes

Se pueden administrar una diversidad de adyuvantes conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad como una parte componente de las composiciones de vacuna. Dichos adyuvantes, pero no se limitan a, los siguientes: polímeros, copolímeros tales como copolímeros de poli(oxietileno) y poli(oxipropileno), incluyendo copolímeros de bloques; el polímero P1005; el monotide ISA72; un adyuvante completo de Freund (para animales); un adyuvante incompleto de Freund; monooleato de sorbitán; escualeno; el adyuvante CRL-8300; alumbre; QS 21, muramil dipéptido; trehalosa, extractos de bacterias, incluyendo extractos de micobacterias, endotoxinas desintoxicadas; lípidos de membranas, mezclas del tipo de agua en aceite, mezclas del tipo de agua en aceite en agua o combinaciones de las mismas;

10 *Fluidos y vehículos suspendedores*

Una diversidad de fluidos o vehículos suspendedores conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad se pueden emplear para suspender las composiciones de vacunas. Dichos fluidos incluyen, sin ninguna limitación: agua estéril, una solución salina, un tampón o unos fluidos complejos derivados de un medio de crecimiento u otros fluidos biológicos. Se pueden emplear en la composición de vacuna los agentes conservantes, estabilizadores y antibióticos que son conocidos para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad.

Se hace referencia a las siguientes citas bibliográficas:

Jocham y colaboradores Lancet 2004: 363, 594-599; Rosenberg, N.E. Journ. Med. 2004: 350, 14-1461-1463; Yamanaka y colaboradores Brit. J. Cancer 2003: 89, 1172-1179; Brossart, Transfusion & Apheresis Sci. 2002: 27, 183-186; O'Rourke y colaboradores Cancer Immunol. Immunother. 2003: 52, 387-395; Lotem y colaboradores Brit. J. Cancer 2004: 90, 773-780 ; Hersey y colaboradores Cancer Immunol. Immunother. 2004: 53, 125-134; Limuna y colaboradores J. Clin. Invest. 2004: 113, 1307-1317.

Los siguientes Ejemplos experimentales son ilustrativos en mostrar que se había producido un procedimiento de deslipidación de células cancerosas y en particular que la célula cancerosa había sido modificada y señalada para exhibir una respuesta inmunogénica positiva en la forma de especie de la que ella se derivaba.

25 *Ejemplo 1**Protocolo de deslipidación*

La deslipidación de células cancerosas se puede conseguir de la siguiente manera: se añadieron unas células cancerosas mostradas en la Tabla 2, por ejemplo a razón de aproximadamente 8×10^5 células en una solución salina tamponada con fosfato (PBS), hasta un volumen final de 0,05 % de Triton X-100 más 3 % de éter diisopropílico (DIPE). Las células cancerosas fueron resuspendidas en 1 ml de una solución salina. Se añadió 0,05 % de Triton X-100 y DIPE hasta una concentración final de 3 %. El DIPE se añadió en una forma al 100 % (30 μ l de DIPE puro) a la suspensión de células cancerosas y se añadieron también 5 μ l de Triton puro (al 100 %) para proporcionar un volumen final de 1 ml de la suspensión de células cancerosas. La mezcla de disolventes se puede también producir independientemente y luego añadir a la suspensión de células cancerosas. La suspensión de células cancerosas se mezcló con entrecruzamiento a la temperatura ambiente durante 20 minutos. La muestra se centrifugó subsiguientemente a 1.000 rpm durante 1 minuto. Los disolventes residuales se eliminaron a través de una columna de carbón vegetal. Después de la etapa de eliminación del disolvente, la suspensión de células fue diluida hasta un volumen final de 2,5 ml. Una parte alícuota del sedimento resuspendido se usó para detectar el contenido total de colesterol o el contenido total de proteínas para confirmar la deslipidación de las células cancerosas, tal como se describe más adelante.

Resultará fácilmente evidente para una persona con experiencia ordinaria en la especialidad, que el procedimiento anterior se puede modificar dependiendo de la escala de la deslipidación. Por ejemplo en un procedimiento de deslipidación a gran escala o posiblemente en una diferente relación de los disolventes a la suspensión de células, la capa de disolvente a granel se puede retirar y los disolventes residuales son o bien absorbidos mediante el uso de carbón vegetal o eliminados mediante centrifugación.

*Ejemplo 2**Contenido total de colesterol y de proteínas*

Una parte alícuota de la solución de resuspensión procedente del Ejemplo 1 se usó en un ensayo para determinar el contenido de total de colesterol. Otra parte alícuota de la solución de resuspensión procedente del Ejemplo 1 se usó en un ensayo para la determinación del contenido total de proteínas usando unos estuches comercialmente disponibles. Por ejemplo, 50 μ l de la solución de resuspensión procedente del Ejemplo 1 se usaron en un ensayo Amplex Red Total Cholesterol Assay (de Molecular Probes, Eugene, Oregón). Otros 50 μ l de la solución de resuspensión se usaron en un ensayo para determinar las proteínas totales usando el ensayo BioRad Total Protein Assay (de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los resultados de estos estudios se presentan en la Tabla 3 que

demuestran que todos los linajes de células cancerosas deslipidadas, independientemente de su fuente, fueron deslipidados satisfactoriamente, tal como se pudo observar por la reducción en la concentración de colesterol. Dicho con claridad, el protocolo de 3 % de DIPE y 0,05 % de Triton X-100 descrito en el Ejemplo 1 elimina eficazmente los lípidos desde una diversidad de células cancerosas, incluyendo el linaje de células cancerosas murinas B16-F10. La Tabla 3 demuestra que hay un agotamiento de > 99 % del colesterol, mientras que se retiene > 50 % de las proteínas. Dicho con claridad, los linajes de células B16-F10 y TF-1 fueron deslipidados de una manera muy eficaz. Además, se pone de manifiesto que la estructura de las células es mantenida, a causa de las buenas tasas de recuperación de proteínas que se consiguieron.

Tabla 2

Linaje celular	Fuente	Descripción
TF-1	Humana	Linaje de células con eritroleucemia
MT-2	Humana	Linaje de células T CD4
CEMx174	Humana	Linaje de células T CD4/células B
JAWS-II	Murina - C57BL/6	Linaje de células dendríticas inmaduras
B16-F10	Murina - C57/BL/6	Linaje de células de melanoma

Tabla 3

	LINAJE DE CÉLULAS		CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS (µg/ml)		CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL (µg/ml)
no deslipidadas	TF-1	125,3	recuperación de proteínas 78%	8,36	eliminación de colesterol 97 %
deslipidadas		98,3		0,28	
no deslipidadas	MT-2	108,8	recuperación de proteínas 33 %	4,09	eliminación de colesterol >99%
deslipidadas		36,1		0	
no deslipidadas	CEMX174	100,8	recuperación de proteínas 34 %	4,54	eliminación de colesterol >99 %
deslipidadas		34		0	
no deslipidadas	JAWS-II	138,8	recuperación de proteínas 21 %	12,76	eliminación de colesterol 93 %
deslipidadas		29,6		0,83	
no deslipidadas	B16-F10	118,7	recuperación de proteínas 50 %	6,05	eliminación de colesterol 99 %
deslipidadas		68,7		0,06	

Ejemplo 3

15 Recogida de células dendríticas inmaduras.

Las células dendríticas (DC) inmaduras son unas clásicas células presentadoras de antígenos (APC). Estas DC's recogen eficientemente patógenos enteros, procesan células cancerosas y antígenos y presentan epítopos a células B para la producción de anticuerpos y a células T para obtener respuestas inmunitarias mediadas por células. En este experimento, unas DC's inmaduras fueron marcadas con un tinte ("A" en la Figura 1) que lee el canal de isotiocianato de fluoresceína (FITC) de una máquina clasificadora de células activada por fluorescencia (FACS). Unos melanomas B16-F10 deslipidados fueron marcados con un tinte separado ("C" en la Figura 1) que lee en el canal de ficoeritrina (PE) de la máquina de FACS. De modo correspondiente, si unas células B16-F10 deslipidadas son recogidas por las DC's, entonces disminuirá la fluorescencia de las células B16-F10 mientras que permanecerá intacta la fluorescencia de las DC.

El protocolo de recogida de células dendríticas comprendía brevemente marcar células B16-F10 deslipidadas usando el PKH26-GL (de Red Dye Sigma-PE), incubadas con células JAWS-II inmaduras marcadas con PKH67-GL (de Green Dye Sigma-FITC), en una relación de 1: 1 (1×10^7 : 1×10^7). Después de una incubación durante 24 horas, se realizó un análisis citométrico de flujo, y la fagocitosis se definió por el número de células doblemente positivas.

30 Con el fin de teñir a unas concentraciones finales de 2×10^{-6} M del tinte PKH26 y 1×10^7 células/ml en un volumen de 2 ml, se realizaron las siguientes etapas usando unas técnicas asépticas:

1. Las células adherentes o fijadas fueron extraídas usando enzimas proteolíticas (a saber tripsina/EDTA) para formar una suspensión unicelular.
2. Todas las etapas se realizaron a 25°C. Un total de aproximadamente 2×10^7 células individuales se colocaron en un tubo de polipropileno de fondo cónico y se lavaron una vez usando un medio sin suero.
3. Las células fueron centrifugadas (con 400 x g) durante 5 minutos para dar un sedimento descohesionado.

4. Después de una centrifugación, el material sobrenadante fue aspirado cuidadosamente dejando no más de 25 µl del material sobrenadante sobre el sedimento.

5. Se añadió 1 ml del Diluyente C (suministrado con el estuche de tinción), y la solución (PKH67-GL (Green Fluorescent Cell Linking Dye), y PKH-GL (Red Fluorescent Cell Linking Dye), de Sigma. St. Louis, MO) se resuspendió por pipeteo para asegurar una dispersión completa.

6. Inmediatamente antes de la tinción, se prepararon 4×10^{-6} M del tinte PKH26 (como un material original 2x) en tubos de polipropileno usando el Diluyente C Con el fin de reducir al mínimo los efectos del etanol, la cantidad del tinte añadido es menor que 1% del volumen de una muestra individual. Si es necesaria una dilución mayor del material original del tinte, se prepara un material adicional intermedio diluyendo con 100 % de etanol. El preparado permanece a la temperatura ambiente (25°C).

7. 1 ml de células (2×10^7) se añadió rápidamente a 1 ml del tinte PKH26 (1×10^7 células/ml). La muestra se mezcló por pipeteo

8. La solución se incubó a 25°C durante 2 hasta 5 minutos. Periódicamente, el tubo fue invertido suavemente para asegurar una mezcladura durante este período de tinción a 25°C.

9. Para detener la reacción de tinción, se añadió un volumen igual de un suero o de una solución de proteína compatible (a saber, BSA al 1 %) y se incubó durante 1 min.

10. La muestra detenida con un suero fue diluida con un volumen igual de un medio completo.

11. Las células fueron centrifugadas a 400 x g durante 10 minutos a 25°C para retirar las células desde la solución de tinción.

12. El material sobrenadante se retiró y el sedimento de células se transfirió a un nuevo tubo para el lavado ulterior.

13. 10 ml de un medio completo se añadieron para lavar las células, que luego fueron centrifugadas y resuspendidas hasta la concentración deseada.

Las Figuras 1 y 2 ilustran que las DC's recogen eficientemente a células B16-F10 deslipidadas.

Ejemplo 4

Estudios in vivo - vacunación terapéutica

Para ensayar si la recogida eficiente de células B16-F10 por las DC's, que se había observado en el Ejemplo 3, daba como resultado algún efecto de vacunación terapéutica, unos ratones con cánceres B16 fueron vacunados una vez con DC's autólogas pulsadas con células B16-F10 deslipidadas.

Dicho brevemente, la pulsación de células dendríticas comprendía pulsar 1×10^6 células dendríticas inmaduras derivadas de médula ósea (BMDDC) con 1×10^6 células B16-F10 deslipidadas y 100 ng/ml del Lípido A durante 24 horas. Las células fueron incubadas durante 24 h adicionales antes de añadir el Lípido A. Las células maduras se alimentaron con GM-CSF y el Lípido A, retirando 2 ml del medio y añadiendo de retorno 2 l del medio que contenía GM-CSF (10 ng/ml de GM-CSF murino) y el Lípido A.

El preparado de antígeno de cáncer que requería que se utilizasen las células cancerosas, por ejemplo las células B16-F10, se componía de células B16-F10 que fueron deslipidadas usando el método del presente invento, por ejemplo una mezcla de disolventes a base de 3 % de DIPE y 0,05 % de Triton X-100.

Unos ratones fueron primeramente estimulados inyectando 2×10^5 células B16-F10 (50 µl) en una PBS por vía subcutánea. Luego se realizaron unas inoculaciones de ratones *in vivo* usando los siguientes grupos de ensayo (5 ratones por grupo): A. ratones no inmunizados (con PBS); B. ratones inmunizados con 2×10^5 BMDDC solamente; C. ratones inmunizados con 2×10^5 células B16-F10 deslipidadas solamente; D. ratones inmunizados con BMDDC pulsadas con células B16-F10. El plan experimental se muestra en la Figura 11.

El objetivo del experimento fue presentar un modelo de cáncer terapéutico. Muchos pacientes de cáncer tienen un cáncer previamente existente, y una meta es la de reprimir el crecimiento del cáncer y por lo tanto aumentar la supervivencia de los pacientes. Las Figuras 3 y 4 ilustran que, después de solamente un refuerzo de la vacuna, se observó una represión del crecimiento del cáncer en el grupo vacunado, en comparación con el grupo testigo. En el experimento más arriba descrito, el grupo testigo fue vacunado con DC's autólogas solamente. Nosotros creemos que este grupo testigo resulta más exacto que usar un grupo testigo con PBS, puesto que las DC's vacunadas podrían potencialmente recoger células cancerosas autólogas y aumentar una respuesta inmunitaria contra el cáncer. Una característica importante del experimento consiste en que los resultados se observaron después de solamente un ciclo de vacunación. Muchos procedimientos de vacunación requieren múltiples rondas de vacunación para producir una respuesta inmunitaria. Aunque una vacunación con células B16-F10 deslipidadas redujo el crecimiento del cáncer en comparación con el testigo con PBS (Figura 3), la reducción no es tan drástica como cuando los ratones fueron vacunados con DC's pulsadas con células B16-F10 deslipidadas (Figura 4). La ligera reducción podría ser debida a las DC's presentes en la zona localizada de vacunación, que recogen a las células B16-F10 deslipidadas y las procesan (tal como se demuestra en las Figuras 1 y 2). De un modo global, este

experimento demostró que una vacunación con células B16-F10 deslipidadas a solas o en la forma de un híbrido con células dendríticas, protegía contra un melanoma B16 previamente existente en diferentes grados.

Ejemplo 5

5 *Estudios in vitro - vacunación preventiva*

Para ensayar si las DC's pulsadas con células B16-F10 deslipidadas proporcionaban cualquier beneficio en impedir que los ratones desarrollasen cánceres B16, los ratones fueron vacunados una vez como se describe seguidamente e incitados con células cancerosas B16-F10.

10 Dicho brevemente, las células cancerosas que se habían de utilizar, por ejemplo las células B16-F10, se componían de:

- a) unas células deslipidadas usando el método del presente invento, por ejemplo con una mezcla de disolventes a base de 3 % de DIPE y 0,05 % de TRITON X-100; o
- b) unas células B16-F10 que habían sido lisadas usando múltiples ciclos de congelación y descongelación.

15 Unas inoculaciones de ratones *in vivo* se realizaron luego usando los siguientes grupos de ensayo (5 ratones por grupo): A. ratones no inmunizados (con PBS); B. ratones inmunizados con 2×10^5 BMDDC solamente; C. ratones inmunizados con 2×10^5 células B16-F10 deslipidadas solamente; D. ratones inmunizados con BMDDC pulsadas con células B16-F10 deslipidadas. Los ratones fueron incitados en el día 6º después de la inmunización inyectando 5×10^5 células B16-F10 por vía subcutánea en el flanco opuesto. El plan experimental se muestra en la Figura 12.

20 Los experimentos indicaron que una vacunación con DC's pulsadas con células B16-F10 deslipidadas no protege adecuadamente a los ratones con respecto de una incitación con células cancerosas B16-F10 (Figuras 5 y 6). Sin embargo, hemos observado que los melanomas B16-F10 son considerados un mal modelo de tumor inmunogénico, puesto que ellos no provocan eficientemente una respuesta inmunitaria. Por lo tanto nosotros especulamos que múltiples rondas de vacunación pueden ser efectivas en un modelo preventivo de cáncer.

25 Ejemplo 6

Vacunación terapéutica y respuesta inmunitaria específica para un antígeno de cáncer

30 Para determinar si una vacunación o bien con células B16-F10 deslipidadas o con DC's pulsadas con células B16-F10 deslipidadas generaba una respuesta inmunitaria específica para antígenos de tumores, se midieron los títulos de anticuerpos para antígenos de tumores específicos para B16, GP 100 yTRP-2.

Un ensayo ELISA se realizó con muestras de suero de ratones de la siguiente manera:

35 Para revestir a las placas, unos péptidos fueron diluidos hasta 5 µg/ml en un tampón de revestimiento (50 mM de Tris, pH 9,5). Cada pocillo fue revestido con 100 µl/pocillo sobre unas placas de ELISA Nunc Immulon HBX de 96 pocillos. Cada placa fue cerrada herméticamente e incubada durante una noche. La proteína fue retirada de los pocillos golpeando ligeramente la placa y emborronando sobre unas toallas de papel.

Para bloquear las placas, se añadieron a todos los pocillos 200 µl de un tampón de bloqueo (2 % de FBS, 1x PBS). Cada placa fue cerrada herméticamente e incubada durante 1-2 horas a 37°C. Cada pocillo fue lavado seis veces con 150 µl de un tampón de lavado (1x PBS, 0,05 % de Tween-20).

40 Un Anticuerpo Primario se preparó de la siguiente manera. Dicho brevemente, se preparó una dilución a 1:20 de una muestra de suero de ratón en un tampón para dilución de muestras (1x PBS, 5 % de un suero normal de cabra (Normal Goat Serum (NGS)). Se prepararon unas diluciones a 1:200, 1:400, 1:1.000 y 1:2.000. Las placas fueron revestidas con 50 µl del suero diluido e incubadas a la temperatura ambiente durante 60 minutos. Las placas fueron lavadas seis veces con 150 µl de un tampón de lavado.

45 Un Anticuerpo Secundario se preparó de la siguiente manera: Dicho brevemente, el anticuerpo secundario (HRP Fc de cabra anti-ratón específico procedente de Sigma) se diluyó a 1:10.000 en un tampón de dilución de muestra. Cada pocillo fue revestido con 100 µl/pocillo e incubado a la temperatura ambiente durante 45 minutos. Los pocillos fueron lavados seis veces con 150 µl de un tampón de lavado.

50 El revelado de un ELISA requería añadir 100 µl de un Substrato TMB (de Sigma) a cada pocillo, e incubar a la temperatura ambiente durante 5 minutos. La reacción fue detenida con 100 µl de H₂SO₄ 1 N. Las placas se leyeron en un aparato lector de placas con una absorbencia de 450 nm.

Se observó que una vacunación con células B16-F10 deslipidadas genera unos títulos de anticuerpos más altos que el grupo testigo vacunado con PBS (Figuras 7 y 8). Sin embargo, las DC's pulsadas con células B16-F10 deslipidadas tenían un título más alto de anticuerpos totales (Figuras 9 y 10), indicando que las DC's pulsadas con células B16-F10 deslipidadas aumentaban sustancialmente el procesamiento y la presentación de antígenos. Los títulos de anticuerpos en unos animales que recibieron DC's pulsadas con células B16-F10 deslipidadas eran mucho más altos que los títulos en animales vacunados con las DC's a solas. Los resultados demuestran que las células B16-F10 deslipidadas son eficientemente procesadas y presentadas por las DC's, lo que conduce a una respuesta inmunitaria aumentada. Se observó también que una vacunación con DC's a solas aumenta las respuestas a anticuerpos (Figuras 9 y 10), debido posiblemente a que las DC's entrantes recogen a las células cancerosas ya existentes y las procesan para generar una respuesta inmunitaria. Sin embargo, las tasas de recogida, procesamiento y/o presentación eran más bajas que en los animales que recibían las DC's pulsadas con células B16-F10 deslipidadas. Globalmente, hemos observado que una vacunación con células B16-F10 deslipidadas aumentaba los anticuerpos para los antígenos de tumores B16, TRP-2 y GP 100 (Figuras 7 y 8). Además, hemos observado que los animales que recibieron una vacunación de DC's pulsadas con células B16-F10 deslipidadas presentaron unos títulos de anticuerpos grandemente aumentados para los antígenos de tumores B16, TRP-2 y GP 100 (Figuras 9 y 10). Aunque hemos observado que las DC's que recogen células cancerosas ya existentes a partir de ratones, las procesan y las presentan al sistema inmunitario, este procedimiento no es tan eficiente como cuando las DC's son pulsadas con las células B16-F10 deslipidadas.

Ejemplo 7

Protocolo experimental in vivo para la cosecha y el crecimiento de células dendríticas derivadas de médula ósea.

A continuación se describe un método para la cosecha *in vivo* y el crecimiento de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDDC). En este experimento, la especie usada de ratón era la C57BL/6, con una edad de aproximadamente 8-16 semanas. Cinco ratones fueron asignados a cada grupo. El modelo de cáncer en este experimento era un melanoma B16-F10 (en ratones C57BL/6), que es conocido por ser un modelo de tumor escasamente inmunogénico. La médula ósea se cosechó a partir de fémures y tibias a través de un tamiz de células de nylon de 100 μ m Falcon.

Preparado de médula ósea: Los fémures y las tibias de ratones C57BL/6 hembras de 4-12 semanas de edad se extirparon y purificaron con respecto del tejido muscular circundante por frotamiento con tisús Kleenex. Los huesos intactos se dejaron en etanol al 70 % durante 2-5 minutos para la desinfección y se lavaron con una PBS. Ambos extremos de los huesos fueron cortados con unas tijeras y la médula fue inundada con una PBS usando una jeringa con una aguja de 0,45 mm de diámetro. Un pipeteo vigoroso se usó para desintegrar los racimos dentro de la suspensión de médula. Luego la suspensión fue lavada una vez con una PBS. Las células fueron resuspendidas en (R10) RPMI-1640 (de GIBCO BRL) suplementado con penicilina (100 U/ml, de Sigma), estreptomycin (100 U/ml, de Sigma), L-glutamina (2 mM, de Sigma), 2-mercaptoetanol (50 μ M, de Sigma), suero de ternera fetal al 10 % desactivado por calor y filtrado, todo esto se filtró a través de un filtro (Millipore o Corning de 0,22 μ M)

Día 0: Siembra de médula ósea. Los leucocitos fueron sembrados a razón de 2×10^6 por plato de 100 mm en 10 ml de un medio R10 que contenía 200 U/ml (=20 ng/ml) de rmGM-CSF.

Día 3: Se añadieron otros 10 ml de un medio R10 que contenía 200 U/ml de rmGM-CSF.

Día 6: Se recogió la mitad del material sobrenadante del cultivo; el material sobrenadante del cultivo retirado fue centrifugado y el sedimento fue resuspendido en 10 ml de un medio R10 de nueva aportación, que contenía 200 U/ml de rmGM-CSF. La suspensión fue sembrada en placas de retorno sobre la placa original.

Día 7: Las DC'S inmaduras fueron alimentadas con células B16-F10 lisadas o deslipidadas. Se añadieron 1×10^6 DC y 1×10^6 células B16-F10 deslipidadas durante 24 horas.

Maduración completa:

Día 8: Las DC y las células B16-F10 se maduraron usando el Lípido A a razón de 100 ng/ml o un lipopolisacárido (LPS) a razón de 1 μ g/ml + 30-100 U/ml de GM-CSF rm (murino recombinante). Las células fueron incubadas durante 24 horas adicionales antes de la inyección.

Evaluación del rendimiento de células: Las células cultivadas fueron lavadas una vez. Una parte alícuota de las células se mezcló a 1:1 (volumen : volumen) con una Solución de azul de Trypan (Sigma). Los leucocitos grandes, negativos para azul de Trypan (eritrocitos excluidos por el tamaño y la forma) se recontaron como viables bajo el microscopio.

Análisis por FACS

1×10^5 células fueron teñidas con 50 ml de materiales sobrenadantes de un cultivo de hibridoma que contenía 0,1 % de aziduro de sodio o unos anticuerpos de primera y segunda etapa purificados, véase *M.B. Lutz y colaboradores*

Journal of Immunological Methods 223(1999)77-92 79. Las células y los anticuerpos primarios y secundarios (5-20 µg/ml) se incubaron durante 30 min sobre hielo. Los reactivos tanto primarios como secundarios fueron diluidos en una PBS que contenía 5 % de suero de ternero fetal (FCS, fetal calf serum) y 0,1% de aziduro de sodio, que servía también como medio de lavado. Las muestras fueron analizadas con un FACScan (de Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

5

Los siguientes anticuerpos se usaron para la tinción superficial y citoplasmática como materiales sobrenadantes de cultivo, recopilados en la cita de Leenen y colaboradores, 1997: moléculas de MHC: H-2 K-FITC_M1r42, IgG2a de rata; (de Pharmingen, San Diego, CA); moléculas de adhesión concomitantemente estimulantes: CD80_B7-1-PE, 16-10A1, IgG de hámster, (de Pharmingen), CD86_B7-2-FITC, GL1, IgG2a de rata, (de Pharmingen); CD40-PE-HM40-3, IgG2b de rata, (de Pharmingen). Marcadores de DC: CD25_IL-2Ra 7D4, IgM de rata, NLDC-145 DEC- 205, IgG2a de rata, CD11c PE_BL3, IgG-PE de hámster, G235-2356 (de Pharmingen).

10

La capacidad de endocitosis de las BMDDC fue investigada tal como se describe con detalle en otro lugar, véanse Sallusto y colaboradores, 1995, y Lutz y colaboradores, 1997. Dicho brevemente, 2×10^5 células fueron incubadas con fijación con FITC-DX a razón de 1 mg/ml sobre la superficie de hielo pero no había endocitosis o con fijación sobre la superficie a 37°C y un baño de agua para endocitosis durante 30 min. Las células fueron lavadas con una PBS enfriada con hielo y teñidas para determinar moléculas de MHC de superficie de la clase II, tal como se ha descrito anteriormente..

15

Unas células enteras de médula ósea fueron sembradas en unas placas de seis pocillos en un IMDM completo (2 mM de glutamax, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 50 µM de 2-MB, y 5 % de FCS) suplementado con 10 ng/ml de GM-CSF murino, y 20 ng/ml de IL-4 murina. Los cultivos fueron alimentados cada 2-3 días por retirada de un 50% del medio desde cada pocillo y por adición de retorno de una cantidad igual de factor de crecimiento de nueva aportación suplementado con cIMDM. Los cultivos fueron mantenidos durante 6-8 días. Las células no adherentes y adherentes en forma suelta fueron cosechadas, lavadas y usadas para experimentos *in vitro* e *in vivo*.

20

25

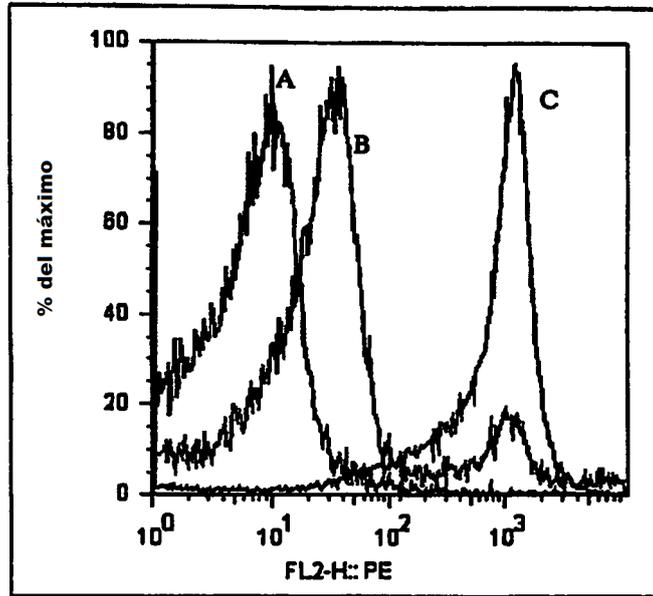
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna que comprende:
una célula cancerosa deslipidada que tiene (i) una concentración total de lípidos de menos que un 80 % de la concentración total de lípidos de la célula cancerosa original y (ii) por lo menos un antígeno de células cancerosas; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, que comprende además una célula dendrítica.
3. La composición de vacuna de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además un agente estimulante de la inmunidad.
- 10 4. Uso de una célula cancerosa deslipidada que tiene (i) una concentración total de lípidos de menos que un 80 % de la concentración total de lípidos de la célula cancerosa original y (ii) por lo menos un antígeno de células cancerosas, en la preparación de un medicamento útil para inducir una respuesta inmunogénica en un animal o ser humano.
- 15 5. El uso de la reivindicación 4, en el que la respuesta inmunogénica trata un cáncer, alivia un cáncer o detiene el crecimiento de un cáncer, las condiciones o los síntomas clínicos asociados con dicho cáncer en el animal o ser humano.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que el medicamento comprende además una célula dendrítica.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 ó 6, en el que el medicamento comprende además un agente estimulante de la inmunidad.
- 20 8. Un método in vivo para preparar una composición de vacuna, que comprende:
poner en contacto una célula cancerosa en un fluido con un primer disolvente de extracción;
mezclar el fluido y el primer disolvente de extracción durante un período de tiempo suficiente para extraer lípidos desde la célula cancerosa, produciendo de esta manera una célula cancerosa deslipidada que tiene (i) una
25 concentración total de lípidos de menos que un 80 % de la concentración total de lípidos de la célula cancerosa original y (ii) por lo menos un antígeno de célula cancerosa;
extraer la capa de disolvente desde el fluido;
recoger el fluido que contiene la célula cancerosa deslipidada; y
añadir un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente estimulante de la inmunidad.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en el que el primer disolvente de extracción es un éter, un alcohol o una combinación de éstos.
- 35 10. Un método in vitro para la deslipidación de células cancerosas, que comprende:
exponer una célula cancerosa a un procedimiento de deslipidación, que comprende tratar la célula cancerosa con uno o más disolventes de extracción de manera tal que se produce una célula cancerosa deslipidada que tiene una
concentración total de lípidos de menos que un 80 % de la concentración total de lípidos de la célula cancerosa original, en el que la célula cancerosa deslipidada retiene por lo menos a un antígeno de células cancerosas.
- 40 11. El método de la reivindicación 10, que comprende:
poner en contacto la célula cancerosa en un fluido con uno o más disolventes de extracción;
mezclar el fluido y el uno o los más disolventes de extracción durante un período de tiempo suficiente para extraer
lípidos desde la célula cancerosa;
extraer la capa de disolvente desde el fluido; y
recoger el fluido que contiene la célula cancerosa deslipidada.
12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que el uno o los más disolventes de extracción es/son un éter, un alcohol o una combinación de éstos.
- 45 13. El método de las reivindicaciones 9 ó 12, en el que el éter es éter diisopropílico y el alcohol es butanol.
14. Uso de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 3 para la producción de un agente destinado a la promoción de la producción de anticuerpos.
15. El uso de la reivindicación 14 en el que la respuesta a anticuerpos es dirigida hacia el por lo menos un antígeno de célula cancerosa en la célula cancerosa deslipidada.

16. Un método in vitro para la producción de una composición de vacuna, que comprende:
pulsar la célula cancerosa deslipidada preparada de acuerdo con el método de la reivindicación 10 con una célula dendrítica para formar un híbrido de célula cancerosa; y
añadir un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un agente estimulante de la inmunidad.
- 5 17. Una composición de vacuna preparada de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 hasta 13 y 16.

Figura 1

Recogida en DC inmaduras de células B16-F10 (marcadas con PE)



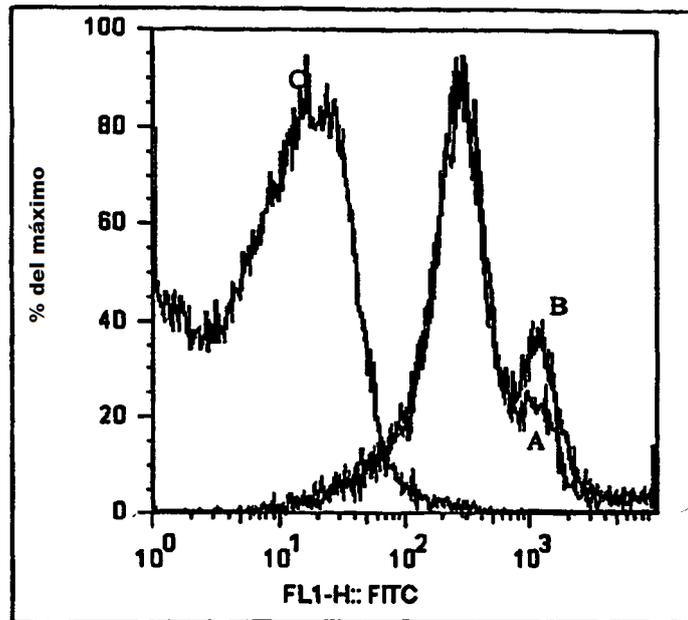
A = células dendríticas

B = células dendríticas + células cancerosas B16-F10 deslipidadas

C = células cancerosas B16-F10 deslipidadas

Figura 2

Recogida en DC inmaduras de células B16-F10 (marcadas con PE)



A = células dendríticas

B = células dendríticas + células cancerosas B16-F10 deslipidadas

C = células cancerosas B16-F10 deslipidadas

Figura 3

La vacunación terapéutica de un tumor deslipidado conduce a un crecimiento reducido del tumor

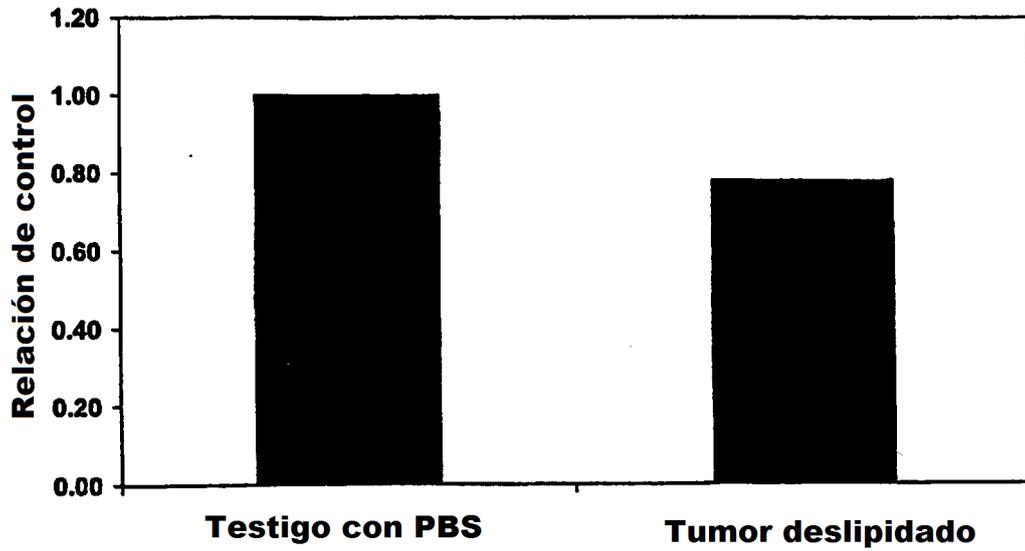


Figura 4

La vacunación terapéutica de un tumor deslipidado + células dendríticas conduce a una reducción en el crecimiento del tumor

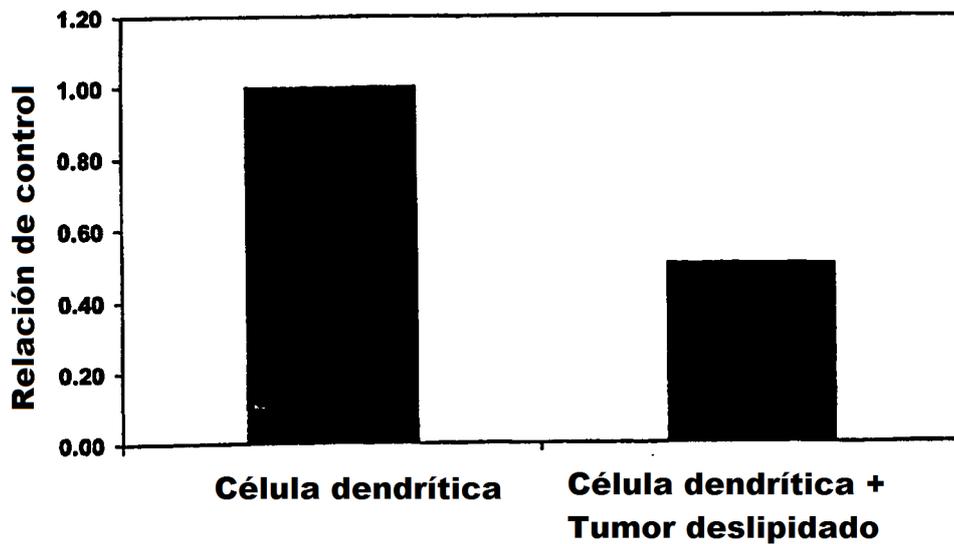


Figura 5
Vacunación preventiva con tumores deslipidados

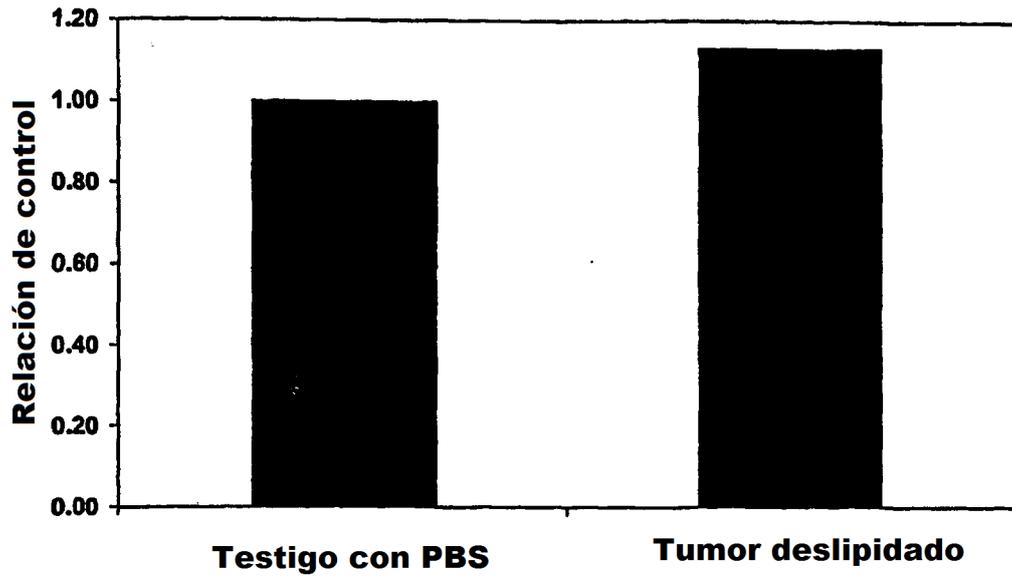


Figura 6
Vacunación preventiva con un tumor deslipidado + células dendríticas

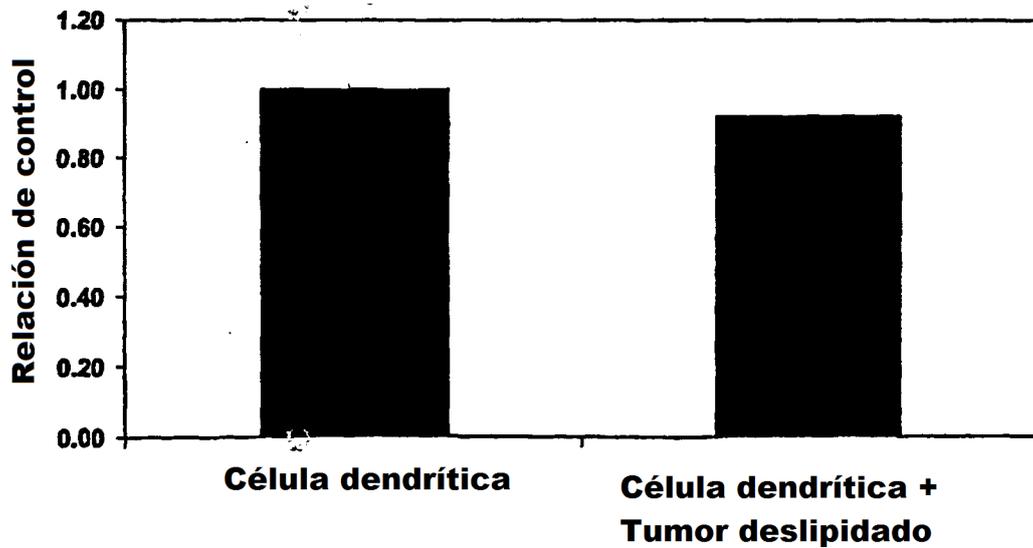


Figura 7

La vacunación terapéutica con un tumor deslipidado conduce a una respuesta de antígeno específico TRP2 en B-16

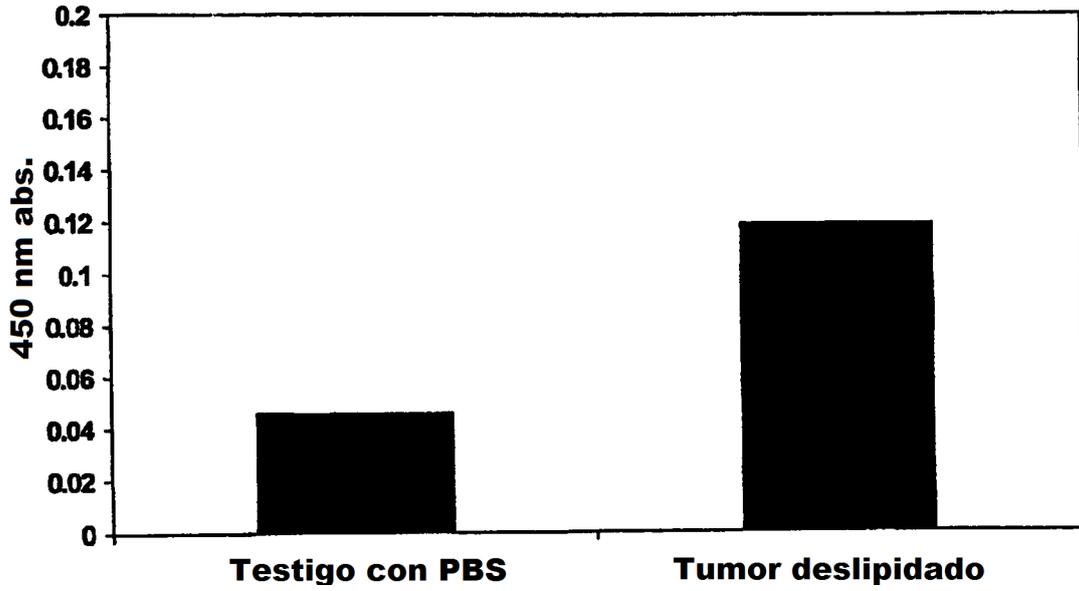


Figura 8

La vacunación terapéutica con un tumor deslipidado conduce a una respuesta de antígeno específico GP100 en B-16

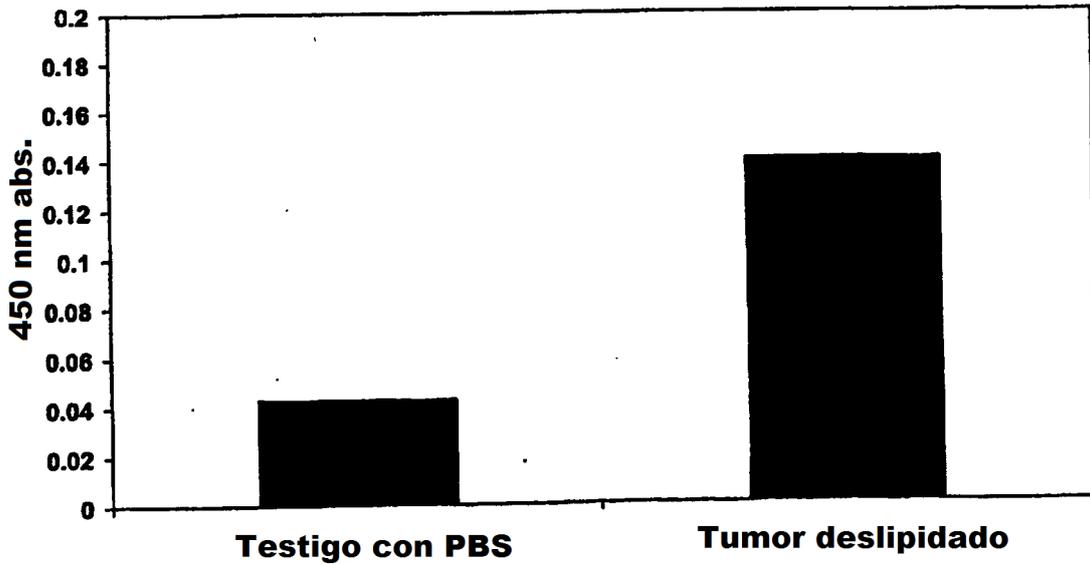


Figura 9

La vacunación terapéutica con un tumor deslipidado + células dendríticas conduce a una respuesta de antígeno específico TRP2 en B-16

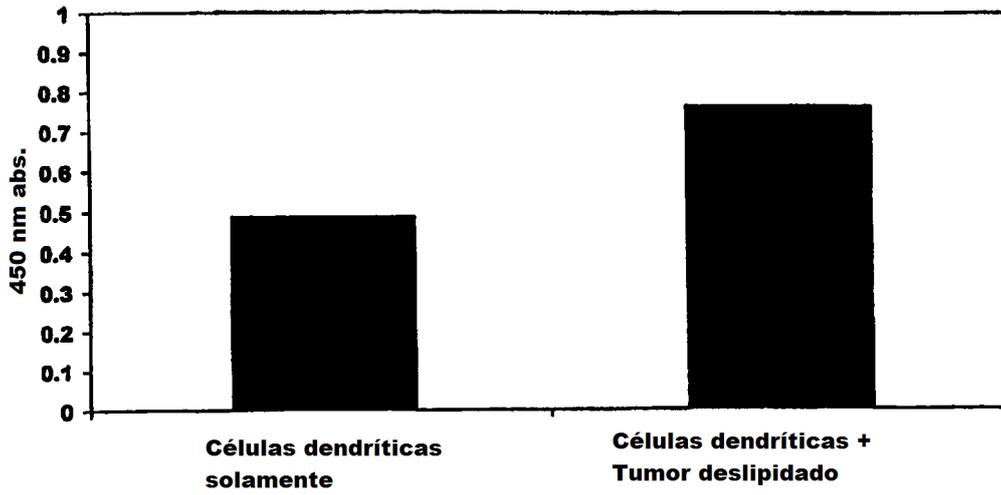


Figura 10

Vacunación terapéutica con un tumor deslipidado + células dendríticas conduce a una respuesta de antígeno específico GP100 en B-16

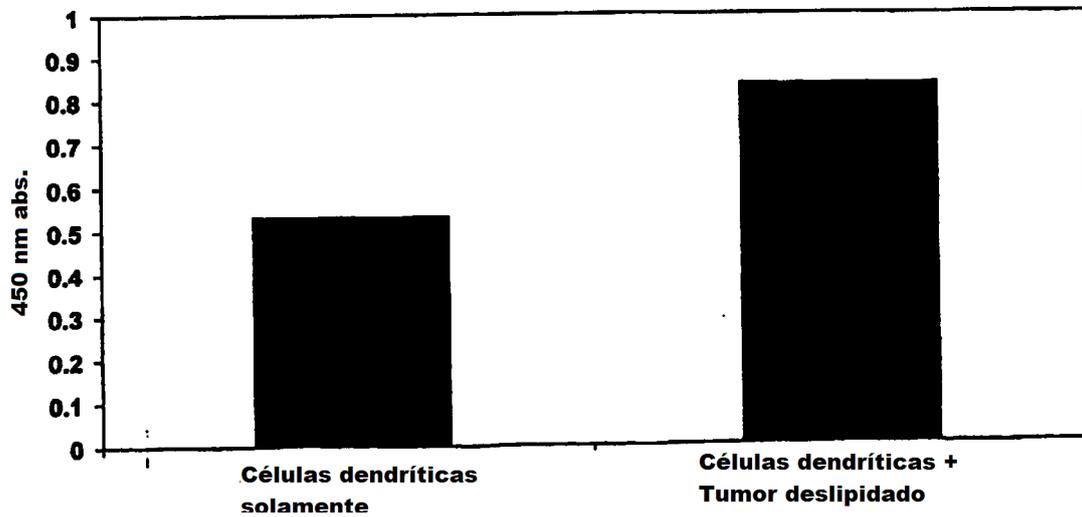


Figura 11

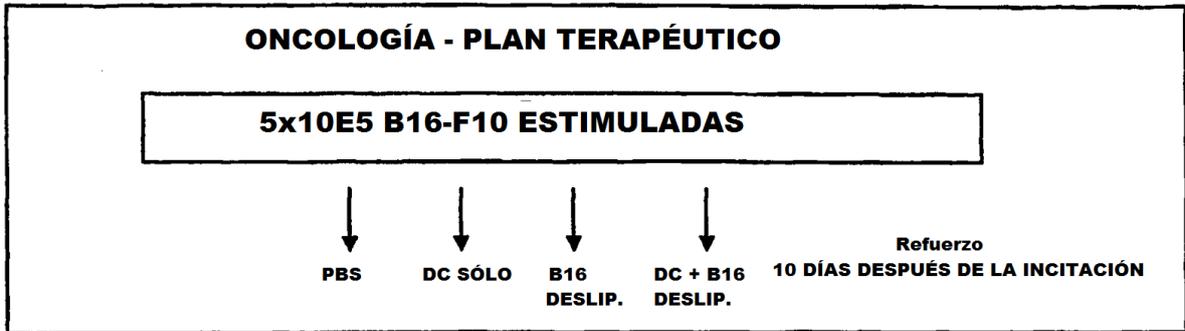


Figura 12

