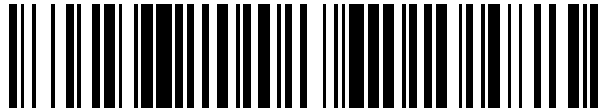


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 759**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2012 E 12734884 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2691110**

54 Título: **Medios y métodos para inmunoterapia celular activa de cáncer usando células tumorales destruidas por alta presión hidrostática y células dendríticas**

30 Prioridad:

**05.07.2011 EP 11172622**

**05.07.2011 US 201161504387 P**

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

**30.12.2014**

73 Titular/es:

**SOTIO A.S. (100.0%)**

**Jankovcova 1518/2**

**170 00 Prague 7, CZ**

72 Inventor/es:

**BARTUNKOVÁ, JIRINA y**

**SPÍSEK, RADEK**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 525 759 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

Medios y métodos para inmunoterapia celular activa de cáncer usando células tumorales destruidas por alta presión hidrostática y células dendríticas

5

**Antecedentes de la presente invención**

Las enfermedades provocadas por diferentes tumores aún son problemas importantes en la medicina y la salud humana. La combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia han mejorado en gran medida el pronóstico de pacientes con cáncer. A pesar de que este enfoque da como resultado frecuentemente una reducción significativa de la masa tumoral, una población pequeña de células tumorales precursoras o células madre de cáncer con frecuencia sobrevive y da lugar posteriormente a una nueva población de células tumorales que conduce a una recaída. Incluso si el tumor principal se retira por tratamientos quirúrgicos y/u otros, cantidades menores de células tumorales en circulación pueden provocar tumores metastásicos en diferentes áreas del cuerpo. Por lo tanto, existe una necesidad permanente de medicamentos y métodos de tratamiento alternativos que pueden usarse solos o preferentemente combinarse con otros métodos de tratamiento del tumor.

10

15

**Técnica anterior**

El documento WO 2006/095330 describe métodos para inhibir el crecimiento de poblaciones celulares dañando térmica, mecánica y/o químicamente células portadoras de antígenos e introduciendo dichas células como agregado con células presentadoras de antígenos en pacientes.

20

Frank *et al.* "Harnessing Naturally Occurring Tumor Immunity; A Clinical Vaccine Trial in Prostate Cancer", PLOS ONE, vol. 5, N° 9, 1 de enero de 2010 (01/01/2010), página E12367, desvela una vacuna tumoral que comprende células dendríticas autólogas y células LNCaP irradiadas con UV apoptóticas.

25

Minarik *et al.* "Phase I/II of Clinical Study of Prostate Cancer Immunotherapy Using Dendritic Cell Vaccination Strategy - First Results", European Urology Supplements, vol. 9, N° 6, 1 de septiembre de 2010, página 629, desvela el resultado preliminar de un estudio clínico de fase I/II de inmunoterapia de cáncer de próstata usando células dendríticas pulsadas con células LNCaP apoptóticas destruidas por irradiación UVA.

30

Weiss *et al.* "Ex vivo- and in vivo-induced dead tumor cells as modulators of antitumor responses", Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 1209, N° 1, 1 de octubre de 2010 (01-10-2010), páginas 109-117, desvela el tratamiento de alta presión hidrostática de células tumorales. Las células tumorales muertas se usan directamente como vacunas de cáncer en modelos animales.

35

Weiss *et al.* "High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogenic features", Journal of Immunotoxicology, vol. 7, N° 3, 1 de septiembre de 2010, páginas 194-204, desvela que el tratamiento con alta presión hidrostática induce apoptosis en la que las células tumorales son inactivas e inmunogénicas. Se han producido anticuerpos dirigidos contra células tumorales y se han identificado en un modelo de ratón.

40

El documento US 2008/0286314 desvela vacunas de cáncer que comprenden células presentadoras de antígenos cargadas con células cancerosas sometidas a choque térmico que son no apoptóticas que pueden usarse para tratar a pacientes con cáncer.

45

**La presente invención**

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que pueden usarse para la inducción de respuesta inmunitaria antitumoral, en particular en vacunación tumoral que provoca que el cuerpo produzca una reacción inmunogénica contra células tumorales. La invención se define por las reivindicaciones.

50

Las células tumorales destruidas por modalidades convencionales tales como irradiación son normalmente no inmunogénicas. Si se usan para la generación de productos de inmunoterapia de cáncer, no es necesario administrar las células tumorales irradiadas en combinación con un potente adyuvante. Cuando se usan para pulsado de células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas, las células tumorales destruidas irradiadas no proporcionan una señal activadora. Es necesario por lo tanto activar células dendríticas por otra sustancia, tal como moléculas derivadas de patógenos.

55

60

Se desvela un nuevo proceso que induce una muerte inmunogénica de células tumorales humanas, en particular, células de cáncer ovárico y de próstata y células de leucemia linfoblástica aguda de origen humano. Las células tumorales destruidas por alta presión hidrostática (en lo sucesivo también: HHP) proporcionan un estímulo de activación potente para células dendríticas, en particular para células dendríticas inmaduras, incluso en ausencia de estímulos adicionales. Las células tumorales destruidas por este método expresan altos niveles de marcadores de muerte celular inmunogénica y células dendríticas cargadas con las células tumorales inmunogénicas inducen altos

65

números de linfocitos T específicos de tumor sin expandir linfocitos T reguladores no deseables. Los datos experimentales de la presente invención muestran que la combinación de células tumorales destruidas por la aplicación de alta presión hidrostática y células dendríticas da como resultado la fagocitosis y presentación eficaz de antígenos tumorales y la inducción de fuertes respuestas inmunitarias antitumorales.

5 Las células tumorales no son o son solamente débilmente inmunogénicas y habitualmente no tienen la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria específica de tumor si se usan en ausencia de un adyuvante potente. Los recientes estudios han demostrado que las células tumorales destruidas por algunos productos quimioterapéuticos, tales como bortezomib, oxaliplatino y antraciclinas, pueden inducir una respuesta inmunitaria específica de tumor. Esta muerte celular inmunogénica se caracteriza por acontecimientos moleculares compartidos por todos los productos quimioterapéuticos descritos. En un período de horas después del inicio de la muerte celular inmunogénica, las células de tumor preapoptótico traslocan la calreticulina y proteínas de choque térmico del retículo endoplásmico a la superficie celular junto con otras moléculas que actúan como señales de alimentación (fosfatidilserina).

15 Al mismo tiempo, las células tumorales que experimentan muerte celular tumoral inmunogénica regulan negativamente la expresión de señales de no alimentación (tales como CD47 de superficie) para facilitar el reconocimiento de células tumorales y captura por células dendríticas. Adicionalmente, después de la permeabilización de la membrana plasmática, las células liberan el marcador de apoptosis tardío caja de grupo de alta movilidad 1 (HMGB1) al medio extracelular. El HMGB1 puede unirse con varios receptores de reconocimiento de patrones (PRR), tales como receptor de tipo Toll 2 (TLR2), TLR4 y receptor para productos finales de glucosilación avanzada (RAGE). La liberación de esta proteína parece requerirse para la presentación óptima de antígenos de células tumorales moribundas, sensibilización de linfocitos T por células dendríticas y posterior eliminación mediada por linfocitos T del tumor.

25 El uso de células tumorales destruidas de tal manera que se hagan inmunogénicas es extremadamente importante para el diseño de estrategias inmunoterapéuticas de cáncer. La administración de células tumorales inmunogénicas puede inducir una respuesta inmunitaria específica de tumor que controlará después el crecimiento de células tumorales. Esto ralentizará o incluso estabilizará la progresión de la enfermedad y mejorará el pronóstico de pacientes con cáncer. También se supone que la distribución de células tumorales que circulan en el cuerpo y la formación de metástasis pueden reducirse al menos sustancialmente.

#### Realizaciones preferidas de la presente invención

35 Se desvelan un método nuevo y composiciones farmacéuticas que inducen una muerte celular inmunogénica de tumores humanos, en particular células de cáncer ovárico y de próstata y células de la leucemia linfoblástica aguda en un grado mucho mayor que los productos quimioterapéuticos recientemente descritos. Las células tumorales destruidas por este método y capturadas por células dendríticas expresan altos niveles de marcadores de muerte celular inmunogénicos e inducen altos números de linfocitos T específicos de tumor sin inducir linfocitos T reguladores que podrían inhibir la respuesta inmunitaria antitumoral. Se ha descubierto que el grado de la respuesta inmunitaria antitumoral obtenida por la combinación de células tumorales tratadas de acuerdo con la presente invención y las células dendríticas es aproximadamente 10 veces mayor que la respuesta inmunitaria inducida por células tumorales inmunogénicas solamente.

45 El principio general de un protocolo de inmunoterapia de cáncer preferido basado en la administración de células dendríticas maduras (DC) cargadas con células tumorales muertas se muestra en la Figura 1. Todas las etapas de la generación de la composición farmacéutica final se realizan según las condiciones de buena práctica de fabricación en las instalaciones de GPM.

50 En una realización preferida la primera etapa en el proceso de generación de la composición farmacéutica para cada paciente es una leucoféresis realizada con el fin de recoger grandes números de monocitos de la sangre periférica. En una realización preferida, el producto leucoferético se diluye después en un tampón adecuado, tal como PBS+EDTA 1 mM (Lonza, Vierviers, Bélgica) y se separan células mononucleares por centrifugación en caliente de Premium Ficoll Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). Después las células mononucleares recogidas (PBMC) se lavan [por ejemplo, en PBS+EDTA 1 mM (Lonza)], se resuspenden en medio Cell Gro y se siembran en matraces triples (por ejemplo, Nunc, Roskilde, Dinamarca) a  $1 \times 10^6$  células por  $\text{cm}^2$  de área de superficie. Después de dos horas las células no adherentes se lavan con PBS (Lonza). Se cultivan monocitos adherentes durante 6 días en medio Cell Gro con IL-4 20 ng/ml (Gentaur) y GM-CSM 500 U/ml (Gentaur), se añaden nuevas citocinas el día 3. Las DC inmaduras se recogen el día 6 y se cargan con células tumorales muertas (por ejemplo línea celular de cáncer de próstata, línea celular de cáncer ovárico, línea celular de leucemia linfoblástica aguda). Se suministran a DC inmaduras, recién descongeladas (día 3-6) células tumorales a una relación de DC: célula tumoral fija de 5:1 durante 4 horas. La relación de células dendríticas y células tumorales tratadas está preferentemente dentro de un intervalo entre 1:1 hasta 10:1, más preferentemente entre aproximadamente 4:1 y 6:1.

65 De acuerdo con la presente invención se pueden usar células dendríticas que están en diversos estadios de diferenciación, maduración y/o activación. El estadio de maduración de las células dendríticas puede verse influido

por factores de maduración.

Después se maduran preferentemente DC pulsadas con células tumorales por poli I: C 25 µg/ml durante una incubación durante una noche y se crio-conservan y almacenan en nitrógeno líquido. Antes de la administración, se resuspenden  $1 \times 10^7$  DC maduras pulsadas con células tumorales en NaCl al 0,9 % (Baxter) y se inyectan por vía subcutánea en el área inguinal y braquial en un periodo de 12 horas preferentemente desde 30 minutos hasta 12 horas. La administración de esta forma de inmunoterapia de cáncer se repite preferentemente en intervalos regulares de 2-6 semanas para reforzar continuamente la respuesta inmunitaria. Se supone que el método desvelado en el presente documento evita el restablecimiento de tolerancia inmunitaria inducida por tumor. La eficacia terapéutica de esta forma de inmunoterapia se ha documentado en pacientes con cáncer de próstata en estadios clínicos distintos, recaída bioquímica del cáncer de próstata y cáncer de próstata metastásico resistente a la castración, supuestamente también en estadio sensible a hormonas metastásicas.

La realización preferida anteriormente descrita no es, sin embargo, de ningún modo limitante. En el ámbito más amplio la invención puede realizarse de maneras alternativas dependiendo de las necesidades específicas del tratamiento tumoral. La realización preferida anteriormente identificada describe la invención por la que las células tumorales se obtienen del paciente para tratar o de líneas celulares tumorales o bancos de líneas celulares tumorales. Las células dendríticas se obtienen también preferentemente del paciente para tratar.

De una manera más general, sin embargo, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para inducir una respuesta inmunitaria contra las células tumorales que comprende

- a) células tumorales que son apoptóticas, en las que se provoca apoptosis por tratamiento con presión hidrostática y
- b) células dendríticas.

Es un aspecto importante de la presente invención que las células tumorales que se usan en la composición farmacéutica sean células apoptóticas y no células necróticas. El experto en la materia es consciente de las diferencias entre la apoptosis frente a necrosis. La muerte celular y posteriores cambios post mortem, denominados necrosis, son partes integrales del desarrollo normal y del ciclo de maduración. A pesar de la importancia de este proceso el mecanismo que subyace a la muerte celular apenas se entiende aún aunque hay varias publicaciones con respecto a los mecanismos que suceden cuando una célula está muriendo. La apoptosis en el sentido de la presente invención se entiende como una forma programada, controlada, de muerte celular, mientras que la necrosis es una forma desordenada y accidental de muerte celular.

En la presente invención se entiende la apoptosis como un modo de muerte celular que sucede en condiciones fisiológicas normales y la célula es un participante activo de su propia destrucción. Las células que experimentan apoptosis muestran elementos morfológicos y bioquímicos característicos. Estos elementos incluyen agregación de cromatina, condensación nuclear y citoplasmática, partición del citoplasma y el núcleo en vesículas rodeadas de membrana (cuerpos apoptóticos) que contienen ribosomas, mitocondrias morfológicamente intactas y material nuclear. Ya que estos cuerpos apoptóticos *in vivo* se reconocen normalmente y se fagocitan por macrófagos o células epiteliales adyacentes es importante que las células tumorales usadas en el presente método se asemejen tan estrechamente como sea posible a células tumorales apoptóticas. La Apoptosis habitualmente se limita a células individuales y no provoca respuestas inflamatorias.

Por otro lado la necrosis se produce cuando las células se exponen a condiciones fisiológicas extremas que pueden dar como resultado daño a la membrana plasmática. La necrosis comienza con una alteración de la capacidad de las células para mantener la homeostasia, lo que conduce a una entrada de agua y iones extracelulares. Los orgánulos intracelulares, más notablemente las mitocondrias y la célula completa se hinchan y se rompen. Debido a la degradación última de la membrana plasmática los contenidos citoplasmáticos, incluyendo enzimas lisosómicas, se liberan al fluido extracelular. Por lo tanto, la muerte celular necrótica *in vivo* con frecuencia se asocia con daños tisulares extensivos que dan como resultado una respuesta inflamatoria intensa. Es importante que las células tumorales usadas en las composiciones farmacéuticas sean apoptóticas y no necróticas.

De acuerdo con la presente invención, las células apoptóticas se producen por un tratamiento con alta presión hidrostática. Una alta presión hidrostática como se entiende en la presente invención se define como una altura de presión igual a o mayor de 100 Mpa [1 MPa = 10 bares = 9,86923 atmosferas = 145,0377 psi]. La alta presión hidrostática puede producirse por un equipamiento que se describe por ejemplo en Weiss *et al.*, Journal of Immunotoxicology, 2010, pp 194 a 209, en particular en la Figura 1.

El tratamiento de alta presión hidrostática de las células tumorales se realiza preferentemente en una autoclave de presión. Las células tumorales se sitúan en viales criogénicos adecuados que se llenan completamente con suspensión celular y se cierran estrechamente de modo que se debe evitar la aparición de burbujas de aire. Posteriormente los viales se sellan con una película flexible (por ejemplo, parafilm®) y los viales preparados se sitúan en la cámara de presión que se llena con un medio transmisor de presión. A continuación se produce la alta presión por un dispositivo adecuado y las células se mantienen durante un tiempo suficiente en dicha alta presión.

La alta presión hidrostática se mantiene durante al menos 10 minutos a una presión de al menos 100 MPa. Las células tumorales se mantienen durante un intervalo temporal de 10 minutos a 2 horas, preferentemente de 10 minutos a 1 hora y especialmente preferentemente de 10 a 30 minutos a una presión preferentemente en el intervalo de 200-300 MPa, más preferentemente de 200-250 MPa.

5 Las células tumorales para usar en la composición farmacéutica pueden derivar de diferentes fuentes. En una realización particular, las células tumorales derivan de un tumor primario o de un tumor metastásico del paciente para tratar. Las células tumorales pueden obtenerse por biopsia o cirugía. El tejido se disgrega y las células tumorales separadas y purificadas pueden usarse inmediatamente. También se prefiere establecer una línea celular del tumor primario y usar las células obtenidas de este modo para la vacunación tumoral. Como alternativa las células tumorales pueden obtenerse de líneas de células tumorales adecuadas. Dichas líneas celulares tumorales pueden prepararse a partir del tumor autólogo. Como alternativa, pueden usarse células tumorales que están disponibles en el mercado de instituciones depositarias tales como por ejemplo ATCC.

15 El otro componente de la composición farmacéutica son células dendríticas. De acuerdo con la presente invención pueden usarse células dendríticas en diversos estadios. Es posible usar células dendríticas que pueden obtenerse directamente del paciente separando las células dendríticas de la sangre. Sin embargo, también es posible clasificar adicionalmente las células dendríticas dependiendo de su estadio. En una realización de la presente invención se usan células dendríticas diferenciadas de los monocitos de sangre periférica para la preparación de la vacuna tumoral.

25 Se sabe que hay tres tipos principales de células presentadoras de antígenos en los órganos linfoides periféricos que pueden activar linfocitos T, concretamente células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Las más potentes de estas son células dendríticas cuya función conocida es presentar antígenos ajenos a linfocitos T. Las células dendríticas inmaduras se localizan en tejidos por todo el cuerpo, incluyendo la piel, el intestino y el tracto respiratorio. Las células dendríticas existen en dos estadios funcional y fenotípicamente distintos, células dendríticas inmaduras y maduras. Las células dendríticas inmaduras tienen alta actividad endocítica, están especializadas en la captura de antígenos y su procesamiento y residen en tejidos periféricos *in vivo*. Las células dendríticas inmaduras desempeñan un papel crucial en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia periférica. Tras la exposición a productos derivados de patógenos o señales pro inflamatorias innatas, las células dendríticas pierden su actividad fagocítica y migran a ganglios linfáticos de drenaje convirtiéndose en células dendríticas maduras. Las células dendríticas maduras tienen una alta capacidad de presentación de antígenos y capacidad estimuladora de linfocitos T debido a la expresión de altos niveles de moléculas presentadoras de antígenos, de adhesión y co-estimuladoras así como otros marcadores específicos de células dendríticas tales como CD83 y DC-LAMP.

35 Las células dendríticas inmaduras para usar en la composición farmacéutica pueden obtenerse de diferentes fuentes. En una realización preferida las células dendríticas inmaduras se diferencian de los monocitos del paciente para tratar. Como alternativa, sin embargo, las células dendríticas inmaduras pueden obtenerse de otras fuentes tales como productos de sangre disponibles en el mercado que pueden obtenerse de agencias de recogida de sangre.

40 Para la preparación de una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se preparan células dendríticas inmaduras adecuadas. Pueden prepararse células dendríticas (DC) por diferentes métodos y pueden mostrar diferentes propiedades. En una realización preferida de la presente invención se obtienen células dendríticas de monocitos aislados por leucoféresis.

45 Las DC comprenden menos del 1 % de las células mononucleares en la sangre periférica. Puede usarse leucoféresis para aislar aproximadamente  $10^6$  a  $10^7$  células dendríticas y puede combinarse con técnicas de selección positiva o negativa. Aunque el aislamiento directo de células dendríticas de sangre periférica permite una preparación rápida de células dendríticas, puede requerir leucoféresis repetida si se requieren múltiples inmunizaciones en un protocolo.

50 En una realización preferida de la presente invención los monocitos se enriquecen a partir de la leucoféresis por adherencia en material plástico. Las células dendríticas se diferencian en presencia de citocinas, preferentemente un cóctel de diversas citocinas, por lo que se prefiere un factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) combinado con interleucina 4.

55 Un método particularmente preferido para preparar células dendríticas es generarlas *ex vivo*. Los monocitos son precursores de células dendríticas que pueden enriquecerse a partir de células mononucleares de sangre periférica por técnicas tales como leucoféresis, adherencia a plástico, centrifugación en gradiente de densidad, selección positiva de células CD14+, selección negativa de linfocitos B y T y combinaciones de los mismos. Las DC pueden cultivarse y diferenciarse tratando una población de células precursoras enriquecidas durante aproximadamente 3-7, preferentemente 7 días con citocinas, en particular con factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) + interleucina 4 o interleucina 13. Una ventaja de esta realización es que pueden prepararse más de  $10^9$  DC a partir de un único producto de leucoféresis y dicha preparación puede usarse para múltiples vacunaciones adicionales crio-conservando la preparación de DC preferentemente en nitrógeno líquido. Aunque pueden cultivarse

DC en diversos medios se prefiere usar medios sin suero o medios que contienen suero autólogo. Para la preparación industrial de la composición farmacéutica se prefiere particularmente preparar las células dendríticas inmaduras a una gran escala de tal manera que se evite la aparición de reacciones anafilácticas (por ejemplo debido a suero de ternera fetal) o la contaminación de virus.

En la siguiente etapa de la preparación de la composición farmacéutica las células dendríticas inmaduras se cargan con las células tumorales apoptóticas que se obtienen por tratamiento con alta presión hidrostática. En una realización preferida, las células dendríticas inmaduras que se pusieron en contacto con las células tumorales apoptóticas se maduran usando diversos estímulos tales como la adición del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) o lipopolisacárido o poli I:C.

La composición farmacéutica obtenida puede conservarse para la administración, preferentemente por criopreservación. La criopreservación de una muestra de ensayo biológica se practica ampliamente en la medicina clínica y la investigación biomédica. Sin embargo, el impacto de este proceso en la viabilidad celular y particularmente en la función en ocasiones puede subestimarse. Por lo tanto, el método usado para congelar la preparación celular antes de su uso en la vacuna de cáncer debería verse con precaución. El efecto de la criopreservación depende con certeza de las células específicas usadas y tiene que examinarse antes de que se altere la actividad biológica de la composición farmacéutica por la criopreservación. Puede requerirse añadir componentes protectores como polisacáridos no inmunogénicos o DMSO.

La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía intravenosa (IV), por vía intradérmica, por vía subcutánea o por vía intralinfática de las que se prefiere particularmente por vía subcutánea.

La dosis y frecuencia óptimas de inmunización de la composición farmacéutica depende del tipo de tumor, la edad y la condición del paciente y el estadio de progresión de la enfermedad tumoral. En una realización preferida se aplica en primer lugar una dosis inmunizadora de la composición farmacéutica que puede seguirse de administración a largo plazo de las inyecciones de refuerzo aplicadas en intervalos que varían de 2 a 8 semanas.

La vacunación tumoral como se describe en el presente documento puede aplicarse a todas las formas de tumores con éxito. En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas son para su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer que están en un estadio tardío del cáncer, pero también en el estadio temprano del cáncer. En una realización especialmente preferida la vacunación tumoral se aplica a pacientes en un estadio tardío de cáncer de próstata con cáncer de próstata metastásico resistente al tratamiento con hormonas. Por "estadio temprano de cáncer" se entienden dichas formas de cáncer en las que es posible el diagnóstico. Frecuentemente los pacientes no muestran señales de la enfermedad. En "estadios tardíos de cáncer" el paciente padece frecuentemente consecuencias graves de la enfermedad como dolor o debilidad.

Aunque se conoce en la técnica el uso de agentes adyuvantes en vacunación de terapia de tumoral se prefiere en el transcurso de la presente invención no usar ningún adyuvante adicional tales como lipopolisacáridos, adyuvante incompleto de Freund o proteínas de choque térmico.

Es un aspecto importante de la presente invención que las células tumorales tratadas con alta presión hidrostática estén en un estadio tal que no puedan crecer y formar un tumor metastásico después de la aplicación al paciente. Esto se ha demostrado por varios enfoques experimentales, incluyendo los ensayos clonogénicos.

La composición farmacéutica como se describe en el presente documento puede usarse para el tratamiento de un ser humano por inmunoterapia del cáncer (vacunación). Las células tumorales que pueden derivar de un paciente para tratar se llevan a un estadio de apoptótico con el tratamiento de alta presión hidrostática descrito anteriormente. Como alternativa se usan líneas celulares tumorales adecuadas. Se obtienen células dendríticas inmaduras preferentemente por leucoféresis del mismo paciente y las células se cultivan *ex vivo* por tratamiento con citocinas. Se carga una cantidad adecuada de dichas células dendríticas inmaduras (por ejemplo,  $10^7$ - $10^8$  células con las células tumorales apoptóticas siendo el intervalo óptimo de células dendríticas inmaduras: células tumorales apoptóticas de 10:1 a 1:1, preferentemente de 5:1 a 3:1.

Después de la maduración de las células dendríticas la composición farmacéutica puede aplicarse al paciente. Pueden usarse células dendríticas que han capturado células tumorales destruidas por alta presión hidrostática directamente para la vacunación tumoral. Es posible, sin embargo, activar adicionalmente o madurar las células, por ejemplo por tratamiento con citocinas antes de su administración al paciente.

De acuerdo con la presente invención se usan preferentemente los siguientes materiales y métodos:

Se ha demostrado que un tratamiento de células de cáncer ovárico y de próstata y células de leucemia linfoblástica aguda durante 10 minutos con alta presión hidrostática (200 MPa) a aproximadamente 21 °C conduce a la inducción de una muerte celular inmunogénica de células tumorales. Las células tumorales destruidas por HHP (alta presión hidrostática) son inmunogénicas en mucho mayor grado que las células tumorales destruidas por antraciclinas, los únicos citostáticos que se sabe que inducen muerte celular

5 inmunogénica., o por irradiación UV. Las células tumorales inmunogénicas destruidas por HHP se fagocitan con avidéz por células presentadoras de antígenos e inducen su maduración incluso en ausencia de estímulos derivados de patógenos adicionales, tales como LPS. Las células presentadoras de antígenos cargadas con células tumorales destruidas por HHP inducen respuestas de linfocitos T específicas de tumores mediadas por CD4 y CD8 robustas y no inducen linfocitos T reguladores potencialmente perjudiciales. Las células tumorales destruidas por HHP representan por lo tanto una potente herramienta para enfoques de inmunoterapia de cáncer clínica.

10 A pesar de la introducción continua de nuevos fármacos y mejoras adicionales de los protocolos de quimioterapia, es probable que, en algún momento, la quimioterapia alcance a sus límites, y la eficacia clínica se estanque. Además, a pesar del innegable éxito en el tratamiento de algunos tumores malignos, en algunos tumores, particularmente en tumores sólidos, la quimioterapia es pocas veces curativa. Una combinación de modalidades de tratamiento ha sido una estrategia convencional para el tratamiento del cáncer, siendo la combinación de cirugía con quimio o radioterapia un ejemplo clásico. Deberían realizarse intentos no solamente para diseñar estrategias inmunoterapéuticas modernas sino también para incorporar enfoques de inmunoterapia en los protocolos de quimioterapia actuales. La quimioterapia y la inmunoterapia no deberían considerarse en lo sucesivo formas antagonistas de terapia, y es concebible que su combinación racional mejore sustancialmente el pronóstico de los pacientes con cáncer.

20 Líneas celulares preferidas: líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda, (REH, DSMZ, Braunschweig, Alemania), células de cáncer ovárico (OV90, ATCC, Teddington, Reino Unido), células de cáncer de próstata (LNCap, ATCC, Teddington, Reino Unido). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco). Todos los medios se complementaron con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Lonza), penicilina 100 U/ml y L-glutamina 2 mmol/l.

25 Aislamiento de células tumorales primarias: se obtuvieron células de cáncer ovárico y de próstata primario de pacientes que se sometieron a cirugía. Se obtuvieron blastos leucémicos de pacientes con leucemia linfoblástica aguda de la médula ósea de pacientes (ALL) por centrifugación en gradiente de Ficoll.

30 Inducción y detección de apoptosis: Se indujo muerte celular tumoral por tratamiento de 10 minutos con alta presión hidrostática. Para ensayos comparativos se indujo muerte de células tumorales por exposición a luz UV. En este caso se aplicó una energía de 7,6 J/cm<sup>2</sup> durante 10 minutos. Se evaluó la muerte celular por tinción con isotiocianato de fluoresceína anexina V. Brevemente, se recogieron 2x10<sup>5</sup> células por muestra, se lavaron en PBS, se sedimentaron, y se resuspendieron en un tampón de incubación que contenía anticuerpo de isotiocianato de fluoresceína anexina V. Las muestras se mantuvieron en la oscuridad y se incubaron durante 15 minutos antes de la adición de otros 400 µl de tampón de incubación de yoduro de propidio 0,1 % y posterior análisis en un separador de células activado por fluorescencia Aria (BD Bioscience) usando software FlowJo.

40 Análisis citométrico de flujo de hsp70, hsp90 y CRT (calreticulina) en la superficie celular: Se sembraron un total de 10<sup>5</sup> células en placas de 12 pocillos y se trataron al día siguiente con los agentes indicados, o se irradiaron con UV (7,6 J/cm<sup>2</sup>), como control, durante 6, 12 o 24 horas o se trataron durante 10 minutos con alta presión hidrostática a 21 grados centígrados. Las células se recogieron y se lavaron dos veces con PBS. Las células se incubaron durante 30 minutos con anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo frío (suero bovino fetal al 2 % en PBS), seguido de lavado e incubación con el anticuerpo secundario monoclonal conjugado con Alexa 648 en una solución de bloqueo. Cada muestra se analizó después por FACScan (BD Bioscience) para identificar hsp70, hsp90 y CRT en superficie celular.

50 Detección de la liberación de HMGB1: se obtuvieron kits de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas HMGB1 II de SHINO-TEST CORPORATION (Tokio, Japón). Se sembraron células REH, células OV90, células LNCap, células ováricas primarias y blastos leucémicos (10<sup>5</sup>) en placas en 1 ml de medio completo apropiado para el tipo celular. Los sobrenadantes se recogieron en diferentes puntos temporales, se retiraron las células tumorales moribundas por centrifugación y los sobrenadantes se aislaron y se congelaron inmediatamente. Se evaluó la cuantificación de HMGB1 en los sobrenadantes por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 Microscopía de fluorescencia: Inmunofluorescencia: Para la detección en superficie de CRT, las células se situaron en hielo, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron en paraformaldehído al 0,25 % en PBS durante 5 minutos. Las células se lavaron después dos veces en PBS, y se añadió un anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo frío durante 30 minutos. Después de dos lavados en PBS frío, las células se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa 648 apropiado. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos, se lavaron en PBS durante 20 minutos y se montaron en portaobjetos.

65 Para fagocitosis, las DC se tiñeron con solución de marcaje celular DiO Vybrant® (Invitrogen). Las células tumorales se tiñeron con solución de marcaje celular Dil Vybrant® (Invitrogen) y se cultivaron en presencia de antraciclina, exposición a luz UV o tratamiento de 10 minutos con alta presión hidrostática a 21 grados de centígrados. Se suministró a DC inmaduras (día 5) células tumorales a una relación de DC/célula tumoral de 1:5: Las células se

fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos, se lavaron en PBS durante 20 minutos y se montaron en portaobjetos con reactivo antidecoloración ProLong Gold (Invitrogen).

5 Generación de DC cargadas con tumor e inducción de muerte celular tumoral: se generaron DC por cultivo de células CD14<sup>+</sup> purificadas aisladas de capas leucocíticas en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Gentaur, Bruselas, Bélgica) e interleucina-4 (IL-4) (Gentaur, Bruselas, Bélgica). Las células tumorales se destruyeron por tratamiento de 10 minutos con alta presión hidrostática a 21 grados centígrados o, como controles, por irradiación UV o por antraciclinas. El alcance de la apoptosis se controló por tinción con anexina V/PI. Las células se lavaron exhaustivamente antes de su suministro a DC. Se suministraron a DC inmaduras (día 5) células tumorales a una relación de DC/células tumorales de 1:5. En algunos experimentos, se estimularon DC pulsadas con 100 ng/ml de lipopolisacáridos (LPS) (Sigma) durante 12 horas o 25 µg/ml de poli I:C (obtenido de Invitrogen).

15 Análisis de FACS del fenotipo de DC después de interacción con células tumorales muertas: El fenotipo de DC cultivadas con células tumorales se controló por citometría de flujo. Las células tumorales se destruyeron por un agente citostático seleccionado o irradiación UV (ejemplos comparativos) o tratamiento de 10 minutos con alta presión hidrostática a 21 grados centígrados (de acuerdo con la presente invención) y se co-cultivaron durante 24 horas con DC inmaduras. Para algunos experimentos, las células DC y tumorales se marcaron con colorante antes del co-cultivo para controlar la fagocitosis. Se usaron anticuerpos monoclonales (mAb) contra las siguientes moléculas: CD80-FITC, CD83-FITC, CD86-PE, CD14-PE (Immunotech, Marsella, Francia), CD11c-PE, HLA-DR (BD Biosciences, San Jose, CA).

20 Las DC se tiñeron durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se analizaron usando FACS Aria (BD Biosciences) utilizando software FlowJo. Las DC se seleccionaron de acuerdo con las propiedades de FSC y SSC. Se incluyeron los controles de isotipo apropiados, y se adquirieron 50.000 DC viables para cada experimento.

25 Evaluación de linfocitos T específicos de tumor productores de IFN-γ: se añadieron DC no pulsadas o cargadas con células tumorales a linfocitos T autólogos a una relación de 1:10 los días 0 y 7 de cultivo. Se añadió IL-2 (25 a 50 unidades internacionales/ml; PeproTech) los días 2 y 7 de cultivo. Los cultivos se ensayaron con respecto a la presencia de linfocitos T específicos de tumor de 7 a 9 días después de la última estimulación con DC. La inducción de linfocitos T productores de interferón (IFN)-γ sensibles a tumor de linfocitos T sensibles a antígeno específico de próstata (PSA) por DC cargadas con tumor se determinó por citometría de flujo. Los linfocitos T se tiñeron con anti-CD8 humano/IFN-γ. Se realizó la frecuencia de linfocitos T reguladores en cultivo tiñendo CD4/CD25 y FoxP3. Se identificaron linfocitos T reguladores por citometría de flujo como CD4 positivos, CD25 positivos y FoxP3 positivos.

La invención y los resultados obtenidos por los experimentos se ilustran por las Figuras:

**Figura 1**

40 El dibujo esquemático muestra cómo puede obtenerse una composición farmacéutica de la presente invención. Las células tumorales obtenidas del paciente o de líneas celulares se tratan con alta presión de modo que las células se vuelven apoptóticas.

45 Se aíslan células dendríticas mediante leucoféresis. Se combinan células dendríticas inmaduras y células tumorales apoptóticas de modo que se producen células dendríticas maduras que pueden usarse como vacuna.

**Figura 2**

50 La alta presión hidrostática induce la expresión de proteínas de choque térmico en células tumorales humanas. Se muestra el sumario de un total de 5 experimentos. \* P valor para comparación con células tumorales irradiadas, P <0,05. Se muestra la expresión dependiente del tiempo de los marcadores HSP70, HSP90 y calreticulina en dos líneas celulares tumorales (OV90 y LNCap) provocado por diferentes tratamientos.

**Figura 3**

55 La alta presión hidrostática induce la liberación de HMGB1 (proteína de grupo de alta movilidad B1) de células tumorales tratadas (OV90 y LNCap). La HMGB1 es una citocina mediadora de inflamación. Se muestra el sumario de un total de 5 experimentos. \* P valor para comparación con células tumorales irradiadas, P <0,05. La Figura 3 muestra que con respecto a la liberación dependiente del tiempo de HMBG1 el tratamiento con HHP es mucho más eficaz que otros tratamientos convencionales.

**Figura 4**

65 La cinética de la fagocitosis de células tumorales tratadas por alta presión hidrostática por DC inmaduras. Se muestra el sumario de 5 experimentos independientes y los resultados representativos. En el experimento se usaron



células tumorales bien OV90 o bien LNCap. El tratamiento con HHP se compara con el tratamiento con UV a 0 °C y 37 °C.

**Figura 5**

5 Se muestra el fenotipo de células dendríticas basado en los marcadores OD86 y HLA-DR después de interacción con células tumorales destruidas por alta presión hidrostática (OV90 y LNCap). Se cultivaron DC inmaduras de día 5 durante 24 horas con células tumorales destruidas por HHP o irradiación. Después de 24 horas, la expresión de las moléculas asociadas con maduración en DC se analizó por citometría de flujo. Se usó LPS como control. Se muestra la intensidad de fluorescencia media (IFM). \* P valor para comparación con DC cargadas con células tumorales irradiadas, P <0,05.

**Figura 6**

15 Se compara la inducción de linfocitos T específicos de tumor por células dendríticas cargadas con células tumorales destruidas por presión hidrostática (LNCap y OV90) con células dendríticas cargadas con células tumorales destruidas por irradiación UV. Los datos muestran un sumario de cinco experimentos independientes. \* P valor para comparación con células tumorales irradiadas, P <0,05.

**Figura 7**

20 La Figura 7 demuestra la superioridad del tratamiento de células tumorales con alta presión hidrostática (HHP) en comparación con células tumorales destruidas por irradiación UV (IRR UV). Los ensayos se han realizado con la línea celular de cáncer de próstata (LNCap) y con la línea celular de cáncer ovárico (OV90). Se han realizado controles con células dendríticas solamente y células estimuladas con poli I:C.

25 Los resultados resumidos en la Figura 7 muestran la inducción de linfocitos T específicos de antígeno específico de próstata (PSA) por células dendríticas cargadas con células tumorales destruidas por alta presión hidrostática (LNCaP y OV90, respectivamente). Se realizó una comparación entre las células tumorales destruidas por alta presión hidrostática solas y células dendríticas cargadas con células tumorales destruidas por irradiación UV. Los datos presentados en la Figura 7 muestran un resumen de cinco experimentos independientes. \* P valor para comparación con células tumorales irradiadas, P <0,05. La Figura 7 resume los resultados obtenidos en el ejemplo 7.

**Figura 8**

35 La inducción de linfocitos T reguladores por células tumorales destruidas por alta presión hidrostática se compara con la inducción de Treg por células tumorales irradiadas con UV. Los datos muestran un sumario de cinco experimentos independientes.

40 Los experimentos resumidos en la Figura 8 muestran que la enseñanza de la presente invención puede aplicarse a diferentes tipos de tumores. La parte superior de la Figura 8 muestra los experimentos realizados con células de cáncer ovárico (OV90). La parte inferior muestra los experimentos realizados con la línea celular de cáncer de próstata (LNCap). En los experimentos se ha determinado la concentración de Fox P3 (Caja Forkhead P3) para diferenciar adicionalmente los linfocitos T reguladores (Treg). Los experimentos muestran que las células tumorales tratadas de acuerdo con la invención con HHP inducen números menores de linfocitos T reguladores que las células tumorales irradiadas con UV.

**Figura 9**

50 Se muestran los resultados de un estudio *in vivo* en el que los pacientes se trataron con una vacunación tumoral como se desvela en el presente documento. Todos los pacientes tuvieron prostatectomía radical o radioterapia. Como parámetro relevante se ha determinado el tiempo de duplicación de PSA. De acuerdo con Antonarakis *et al.*, BJU Int. 2011, 108 (3), p. 378-385, el tiempo de duplicación de PSA es el determinante más fuerte del tiempo de supervivencia sin metástasis y tiempo de supervivencia general de pacientes con cáncer de próstata recurrente de antígeno específico de próstata (PSA). El tiempo de duplicación de PSA significa la diferencia temporal en la que se duplica el valor de PSA. Cuanto mayor sea el tiempo de duplicación de PSA, mejores serán las posibilidades de supervivencia para el paciente tratado. Aplicando la vacunación tumoral de la presente invención se podría prolongar sustancialmente el tiempo de duplicación de PSA.

60 \* P valor para comparación con células tumorales irradiadas, P <0,05.

**Figura 10**

65 La Figura 10 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes en un estadio tardío de cáncer de próstata que se trataron de acuerdo con la presente invención.

En la curva de supervivencia de Kaplan-Meier cada muerte de un paciente provoca una caída del porcentaje de supervivencia comenzando desde 100 % a valores menores. El nomograma de Halabi es la reducción normalmente esperada de supervivientes en la que el tiempo de supervivencia medio es de 12 meses.

- 5 La inmunoterapia de cáncer activa usando la vacuna de cáncer como se describe en el presente documento da como resultado una prolongación del tiempo de supervivencia medio a 23 meses.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que son, sin embargo, no limitantes:

#### 10 **Ejemplo 1**

##### **Expresión de marcadores de muerte celular inmunogénica hsp70, hsp90 y calreticulina por líneas celulares de cáncer humano y células tumorales primarias humanas después del tratamiento con alta presión hidrostática**

15 Se trataron líneas celulares de cáncer leucémico, ovárico y de próstata y células tumorales primarias durante 10 minutos con alta presión hidrostática (HHP, 200 MPa) a 21 grados centígrados y se controló la expresión de los marcadores de muerte celular inmunogénicos hsp70, hsp90 y calreticulina a las 6, 12 y 24 horas. Se detectó una expresión significativa de calreticulina, hsp70 y hsp90 6, 12 y 24 horas después del tratamiento con HHP para todos  
20 los modelos tumorales ensayados. La expresión de moléculas inmunogénicas fue significativamente mayor que la expresión inducida por antraciclinas, los únicos inductores conocidos de muerte celular inmunogénica (Figura 2). La expresión aumentada de calreticulina y proteínas de choque térmico después del tratamiento con HHP se vio acompañada de su translocación a la superficie celular. El tratamiento con HHP también indujo una liberación rápida y sustancial de HMGB1, un marcador-soluble de muerte celular inmunogénica. La liberación de HMGB1 fue mucho  
25 mayor que en el caso de irradiación con UV o antraciclinas (Figura 3).

La liberación máxima de proteína nuclear HMGB1 se detectó 48 horas después de la inducción de muerte celular tumoral.

#### 30 **Ejemplo 2**

##### **El tratamiento de células tumorales por alta presión hidrostática aumenta su fagocitosis por células presentadoras de antígenos**

35 A la vista del papel establecido de la calreticulina como una señal de 'alimentación', se investigó la tasa de fagocitosis de células tumorales destruidas por alta presión hidrostática por células dendríticas (DC), las células presentadoras de antígenos más eficaces que son cruciales para el inicio de una respuesta inmunitaria. Las células tumorales tratadas por alta presión hidrostática se fagocitaron a una velocidad mayor y en un mayor grado que las células tumorales destruidas por otras modalidades, tales como antraciclinas o irradiación UV. Después de 12 horas,  
40 el alcance de la fagocitosis de células leucémicas tratadas con HHP fue 4 veces mayor que el de células destruidas por irradiación UV (figuras 4a y 4b).

#### **Ejemplo 3**

##### **La fagocitosis de células tumorales tratadas con alta presión hidrostática induce la maduración de DC**

La capacidad de las DC para activar la respuesta inmunitaria depende de su estado de activación y la expresión de moléculas co-estimuladoras. En circunstancias normales la maduración más eficaz de DC se induce por moléculas derivadas de patógenos, tales como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram negativas. Solamente las DC  
50 activadas (maduras) que expresan altos niveles de moléculas co-estimuladoras pueden iniciar la respuesta inmunitaria. Los inventores analizaron el fenotipo de DC que fagocitaron células tumorales destruidas por la HHP. La interacción de DC con células tumorales tratadas con HHP indujo la regulación positiva de moléculas co-estimuladoras (CD86, CD83) y moléculas asociadas con la maduración (HLA-DR) en un grado similar a la activación por LPS (Figura 5). De este modo las células tumorales destruidas por HHP pueden inducir una maduración de DC  
55 comparable a los LPS derivados de patógenos.

#### **Ejemplo 4**

##### **Las DC que presentan células tumorales tratadas con alta presión hidrostática inducen linfocitos T específicos de tumor e inducen bajos números de linfocitos T reguladoras inhibidores**

Para investigar si las células tumorales tratadas con HHP y que expresan marcadores de muerte celular inmunogénica inducen inmunidad anti-tumoral, los inventores evaluaron la capacidad de las DC cargadas con células tumorales para activar respuestas de linfocitos T específicas de células tumorales. Se co-cultivaron células tumorales destruidas por HHP con DC inmaduras con o sin maduración posterior con LPS. Estas DC se usaron  
65 después como estimuladores de linfocitos T autólogos, y se analizó la frecuencia de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$

una semana después tras la re-estimulación con DC cargadas con células tumorales. Las DC pulsadas con células tumorales destruidas por HHP indujeron un mayor número de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  específicos de tumor en comparación con DC pulsadas con células irradiadas, incluso en ausencia de estímulo de maduración adicional (LPS).

Adicionalmente, también se ensayó la frecuencia de linfocitos T reguladores (Treg) inducidos en co-cultivos de linfocitos T y DC. La inducción de Treg es indeseable en el caso de inmunoterapia tumoral ya que los Treg inhiben la respuesta inmunitaria dirigida contra el tumor. Las DC pulsadas con células tumorales destruidas por HHP tenían una menor capacidad de expandir linfocitos T reguladores en comparación tanto con DC inmaduros como con DC activados por LPS (Figura 8). El marcador de superficie FoxP3 es específico para linfocitos T reguladores.

### Ejemplo 5

La inmunoterapia celular activa puede administrarse como una única modalidad de tratamiento en el caso de enfermedad residual mínima después del tratamiento primario del tumor por cirugía o radioterapia. En el cáncer de próstata puede afectar a pacientes con señales de recaída bioquímica (niveles crecientes de antígeno específico de próstata PSA en la sangre periférica medidos por el método ultrasensible).

Los mejores resultados de la presente invención pueden obtenerse cuando el tumor primario se retira del paciente por cirugía. La composición farmacéutica como se describe en la presente solicitud puede producirse a partir de las células tumorales que se han aislado del tejido tumoral o de líneas celulares tumorales.

Un paciente (de 68 años de edad) que padecía cáncer de próstata se diagnosticó en un estadio temprano del desarrollo tumoral. El tumor se retiró pero pocos meses después de la cirugía se detectaron niveles crecientes de PSA. El paciente se sometió por lo tanto a leucoféresis y se diferenciaron células dendríticas inmaduras de monocitos aislados. Se sometieron células tumorales de la línea celular de cáncer de próstata a tratamiento apoptótico con alta presión hidrostática como se describe en el presente documento y las células tumorales apoptóticas se pusieron en contacto con las células dendríticas inmaduras para preparar la composición de vacuna.

La composición farmacéutica se dividió en alícuotas que se congelaron en el nitrógeno líquido hasta su uso. La primera aplicación de la vacunación tumoral se produjo 4 semanas después de la detección de la recaída bioquímica del cáncer de próstata. Se continuaron aplicaciones de refuerzo cada cuatro semanas durante un período de un año.

La vacunación indujo una respuesta inmunitaria contra el pequeño número de células tumorales supervivientes lo que ha conducido a una ralentización sustancial de la regeneración de células tumorales y dio como resultado la prolongación de la supervivencia del paciente.

### Ejemplo 6

En pacientes con cáncer avanzado, la inmunoterapia celular activa debería combinarse con quimioterapia (es decir docetaxel en cáncer de próstata) de acuerdo con el concepto de la quimioinmunoterapia.

Un paciente (de 76 años de edad) que padecía cáncer de próstata avanzado se trató de acuerdo con la presente invención. La quimioterapia habitual se combinó con la inmunoterapia celular activa como se desvela en el presente documento. El paciente se ha tratado a la edad de 65 años con tumor de próstata. Después de la retirada del tumor por cirugía y el tratamiento hormonal el nivel de PSA (antígeno específico de próstata) se mantuvo a un nivel bajo mostrando que las células de cáncer de próstata no crecían. Después de 12 meses de terapia de hormonas se desarrolló cáncer de próstata metastásico en varias posiciones en el cuerpo (en particular en los huesos) y el tumor se hizo refractario a las hormonas. El paciente se aprobó para el tratamiento de cáncer de próstata refractario a hormonas con docetaxel en combinación con inmunoterapia celular activa basada en células dendríticas.

Antes de la comenzar la quimioterapia, se generaron células dendríticas inmaduras a partir de monocitos obtenidos durante leucoféresis. Se trataron células tumorales de líneas celulares de cáncer de próstata con presión hidrostática durante 30 minutos a una presión de 210 MPa a 21 °C. Se usaron  $10^9$  células tumorales tratadas de acuerdo con la presente invención para pulsar  $10^9$  células dendríticas inmaduras y alícuotas de las células dendríticas maduras que se habían pulsado antes con las células tumorales se ultracongelaron en nitrógeno líquido y se usaron para aplicaciones posteriores.

Se administró inmunoterapia de cáncer activa cada 4-6 semanas en ciclos alternos con quimioterapia convencional por docetaxel y sola (después del final del tratamiento de docetaxel) durante un período de un año. La quimioinmunoterapia combinada condujo a la estabilización de la enfermedad, reducción de la intensidad de metástasis de médula ósea y supervivencia mayor de lo esperado. El paciente sobrevive en la actualidad durante más de tres años, en comparación con la supervivencia esperada de 6 meses al comienzo de la terapia.

**Ejemplo 7**

**Experimento *in vitro* que muestra la superioridad de células tumorales destruidas por HHP frente a células tumorales destruidas por UV**

En los experimentos *in vitro* se comprobó la capacidad de las células dendríticas inmaduras, células dendríticas maduras activadas por poli I:C y células dendríticas cargadas con células tumorales que se habían tratado con HHP o irradiado con UV con respecto a su capacidad para inducir inmunidad específica tumoral. La inmunidad específica tumoral se midió como porcentaje de linfocitos T específicos de tumor.

Las células dendríticas con células tumorales destruidas por HHP se compararon directamente con células tumorales destruidas por HHP solas y células dendríticas cargadas con células tumorales destruidas por irradiación UV. Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 7.

Para ensayar la capacidad para inducir linfocitos T específicos de tumor no pulsados o cargados con células tumorales se añadieron células dendríticas a linfocitos T autólogos a una relación de 1:10 los días 0 y 7 de cultivo. Se añadieron 25-50 unidades internacionales/ml de IL2 (PeproTech) los días 2 y 7 al cultivo. Los cultivos se ensayaron con respecto a la presencia de linfocitos T específicos de tumor 7-9 días después de la última estimulación con DC. La inducción de linfocitos T productores de interferón (IFN)- $\gamma$ , sensibles a tumor, de linfocitos T sensibles a antígeno específico de próstata (PSA) por DC cargadas con tumor se determinó por citometría de flujo. Los linfocitos T se tiñeron con anti-CD8 humano/IFN- $\gamma$ .

La inducción de linfocitos T específicos de antígeno específico de próstata (PSA) por células dendríticas cargadas con células tumorales destruidas por alta presión hidrostática (LNCap) se compara con células tumorales destruidas por alta presión hidrostática solas y con células dendríticas cargadas con células tumorales destruidas por irradiación UV.

Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 7. La parte superior de la Figura 7 muestra que las DC cargadas con células tumorales destruidas por HHP pueden inducir linfocitos T específicos de tumor, incluso en ausencia de una señal de maduración. Las DC cargadas con células tumorales destruidas por tratamiento con UV o células tumorales destruidas por HHP solas no inducen inmunidad tumoral. Es sorprendente que solamente las células tumorales tratadas con HHP (de acuerdo con la invención) y células dendríticas inmaduras pueden inducir respuesta inmunitaria específica de tumor mientras que este resultado no puede obtenerse por células tumorales tratadas con UV y células dendríticas inmaduras. Sin desear quedar ligado a una teoría, parece que solamente las células tumorales tratadas con HHP pueden junto con células dendríticas inmaduras inducir la respuesta inmunitaria de linfocitos T específica de tumor. Las células tumorales tratadas con HHP parecen actuar como un tipo de activador de las células dendríticas inmaduras mientras que las células tumorales tratadas con UV no tienen este efecto.

La parte inferior de la Figura 7 muestra que cuando se aplica tratamiento de Poli I:C las células tumorales tratadas con HHP pueden inducir mejor linfocitos T específicos que las células tumorales irradiadas con UV.

**Ejemplo 8**

**Datos *in vivo* obtenidos con la vacunación tumoral de acuerdo con la presente invención**

Se obtuvieron células dendríticas de una cohorte de pacientes similares a los descritos anteriormente. Las células dendríticas se pulsaron con células tumorales muertas como se ha descrito anteriormente y se administró la vacunación tumoral repetidas veces en hasta 12 dosis en intervalos de 4-6 semanas a pacientes con una recaída bioquímica del cáncer de próstata después de prostatectomía radical o radioterapia. La progresión de la enfermedad en cada paciente individual se ha evaluado por el tiempo de duplicación de PSA. Por el tiempo de duplicación de PSA se entiende el periodo de tiempo que se requiere para que se duplique el valor de PSA. Se ha mostrado que el tiempo de duplicación de PSA es el determinante más fuerte y más fiable de la supervivencia general y supervivencia sin metástasis en hombres con cáncer de próstata. El tiempo de duplicación de PSA corto se correlaciona con una supervivencia acortada y con un tiempo acortado hasta la aparición de metástasis (Antonarakis *et al.*, BJU Int, 2012, 108 (3); pp 378-385).

Como se muestra en la Figura 9 la administración continua de la vacunación tumoral de acuerdo con la presente invención en pacientes con recaída bioquímica del cáncer de próstata después de prostatectomía radical o radioterapia conduce a una prolongación significativa del tiempo de duplicación de PSA. Se ha descubierto que usando la vacunación tumoral como se desvela en el presente documento el tiempo de duplicación de PSA medio aumenta en 5 meses antes del inicio de la inmunoterapia de cáncer hasta 30 meses después de 12 meses de inmunoterapia. Esto representa un beneficio significativo a pacientes con la recaída bioquímica del cáncer de próstata.

**Ejemplo 9**

**Ensayo clínico con pacientes en estadio tardío de cáncer de próstata**

5 En este ensayo clínico se pulsaron células dendríticas con células tumorales muertas como se describe en el presente documento. La vacunación tumoral se administró repetidas veces a pacientes en un estadio tardío del cáncer de próstata. Dichos pacientes padecieron cáncer de próstata metastásico resistente a castración. En estos pacientes se administró inmunoterapia de cáncer en un programa de dosificación alterna con quimioterapia de docetaxel.

10 La supervivencia de la cohorte tratada se comparó con la cohorte histórica o con la supervivencia estimada por nomograma de Halabi. Se ha mostrado que la administración continua de inmunoterapia de cáncer activa prolonga significativamente el tiempo de supervivencia de pacientes tratados (mediana de supervivencia de 23 meses) en comparación con la cohorte de los controles históricos basándose en la supervivencia esperada calculada por el nomograma de Halabi (13 meses).

15 Este experimento demuestra que la vacunación tumoral de la presente invención extiende sustancialmente el tiempo de supervivencia de pacientes que están en un estadio tardío de cáncer de próstata. La expectativa de supervivencia promedio de dichos pacientes es de 13 meses sin tratamiento en comparación con 23 meses después del tratamiento con vacunación tumoral de acuerdo con la presente invención. Esto representa una mejora sustancial para dichos pacientes que son extremadamente difíciles de medicar con éxito.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Composición farmacéutica para inducir una respuesta inmunitaria contra células tumorales que comprende
  - 5 a) células tumorales que son apoptóticas provocado por el tratamiento con alta presión hidrostática igual a o mayor de 100 MPa durante 10 minutos a 2 horas y
  - b) células dendríticas.
- 10 2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las células tumorales se trataron con presión hidrostática durante al menos 10 minutos a una presión de al menos 200 MPa.
3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las células tumorales se trataron con presión hidrostática de 200-300 MPa.
- 15 4. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizada por que** las células tumorales apoptóticas no son necróticas.
5. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** las células tumorales derivaron de líneas celulares tumorales.
- 20 6. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizada por que** las células tumorales derivaron de un tumor aislado del paciente a quien tratar.
7. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizada por que** las células dendríticas inmaduras se cargaron con células tumorales apoptóticas que se habían tratado con alta presión hidrostática.
- 25 8. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada por que** las células dendríticas inmaduras se obtuvieron por leucoféresis.
- 30 9. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada por que** las células dendríticas inmaduras se obtuvieron por leucoféresis y cultivo *in vitro* en presencia de citocinas.
10. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en pacientes que padecen tanto un estadio temprano como uno tardío de cáncer.
- 35 11. Composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en el tratamiento de cáncer que comprende cáncer de próstata, cáncer ovárico o leucemia linfoblástica aguda.
- 40 12. Método para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, **caracterizado por que** se cargan células dendríticas inmaduras con células tumorales apoptóticas que se han tratado con alta presión hidrostática igual a o mayor de 100 MPa y posterior maduración de las células dendríticas.
- 45 13. Método para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en vacunación de cáncer humano, que comprende la carga de células dendríticas inmaduras con células tumorales de modo que dichas células tumorales se convierten en un estadio apoptótico por tratamiento durante 10 minutos a 2 horas con alta presión hidrostática igual o mayor de 100 MPa, de modo que las células dendríticas maduran opcionalmente antes de aplicarse la composición farmacéutica.
- 50 14. Método para preparar una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 para uso en vacunación de cáncer humano, que comprende la carga de células dendríticas inmaduras con células tumorales obtenidas de una línea celular tumoral que se convierten a un estadio apoptótico por tratamiento durante 10 minutos a 2 horas con alta presión hidrostática igual a o mayor de 100 MPa de modo que las células dendríticas maduran opcionalmente antes de aplicarse la composición farmacéutica.

Figura 1

Diseño de inmunoterapia de cáncer

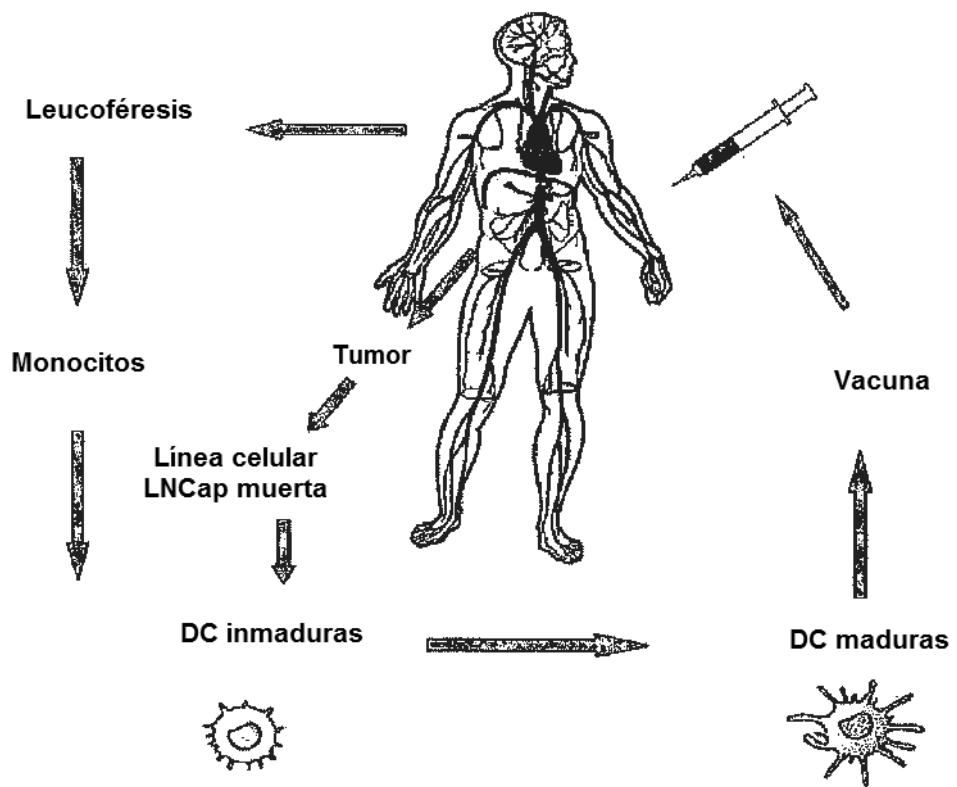


Figura 2

Expresión de marcadores de muerte celular inmunogénica después de tratamiento con HHP

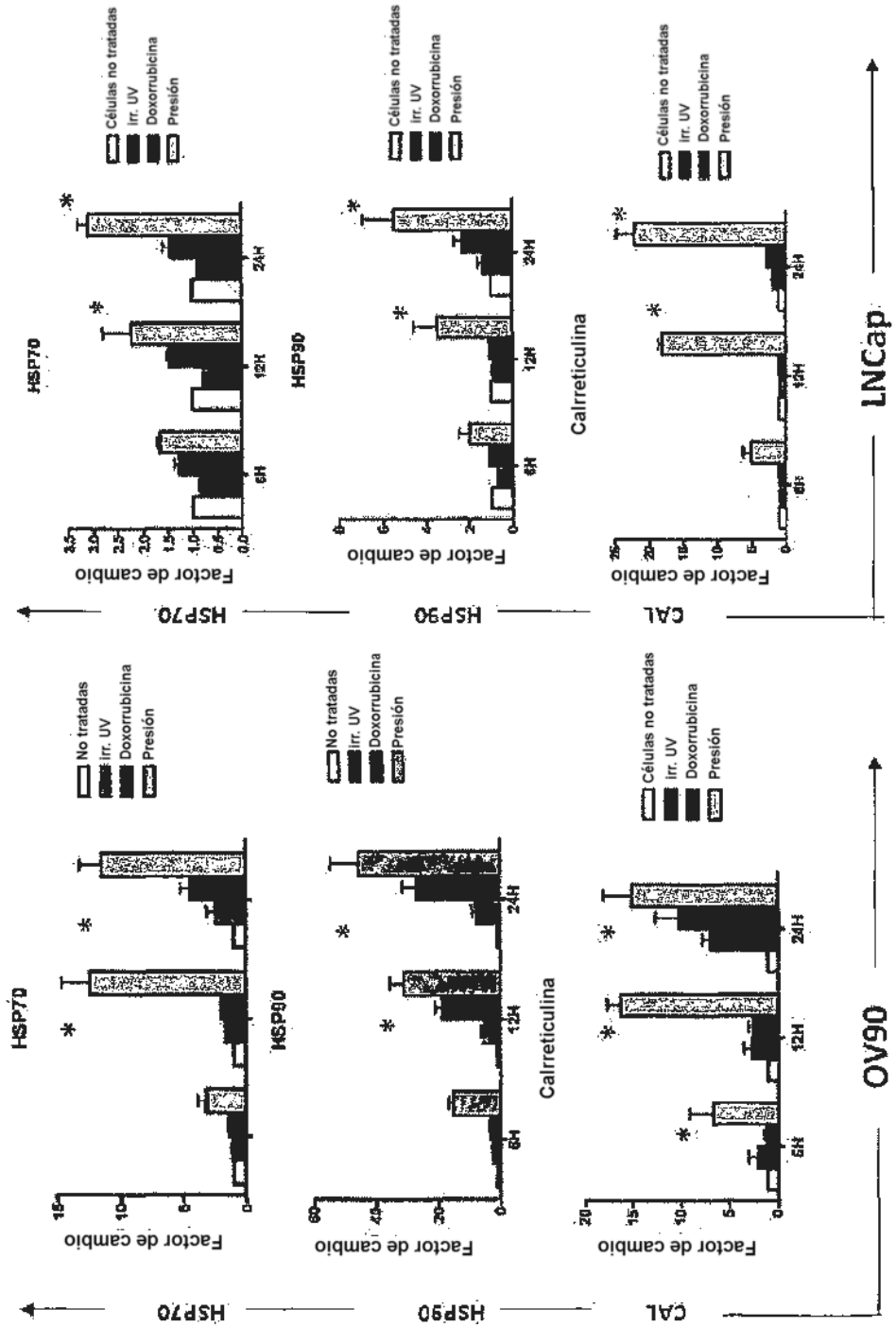




Figura 3

Detección de la liberación de HMGB1 después del tratamiento con HHP

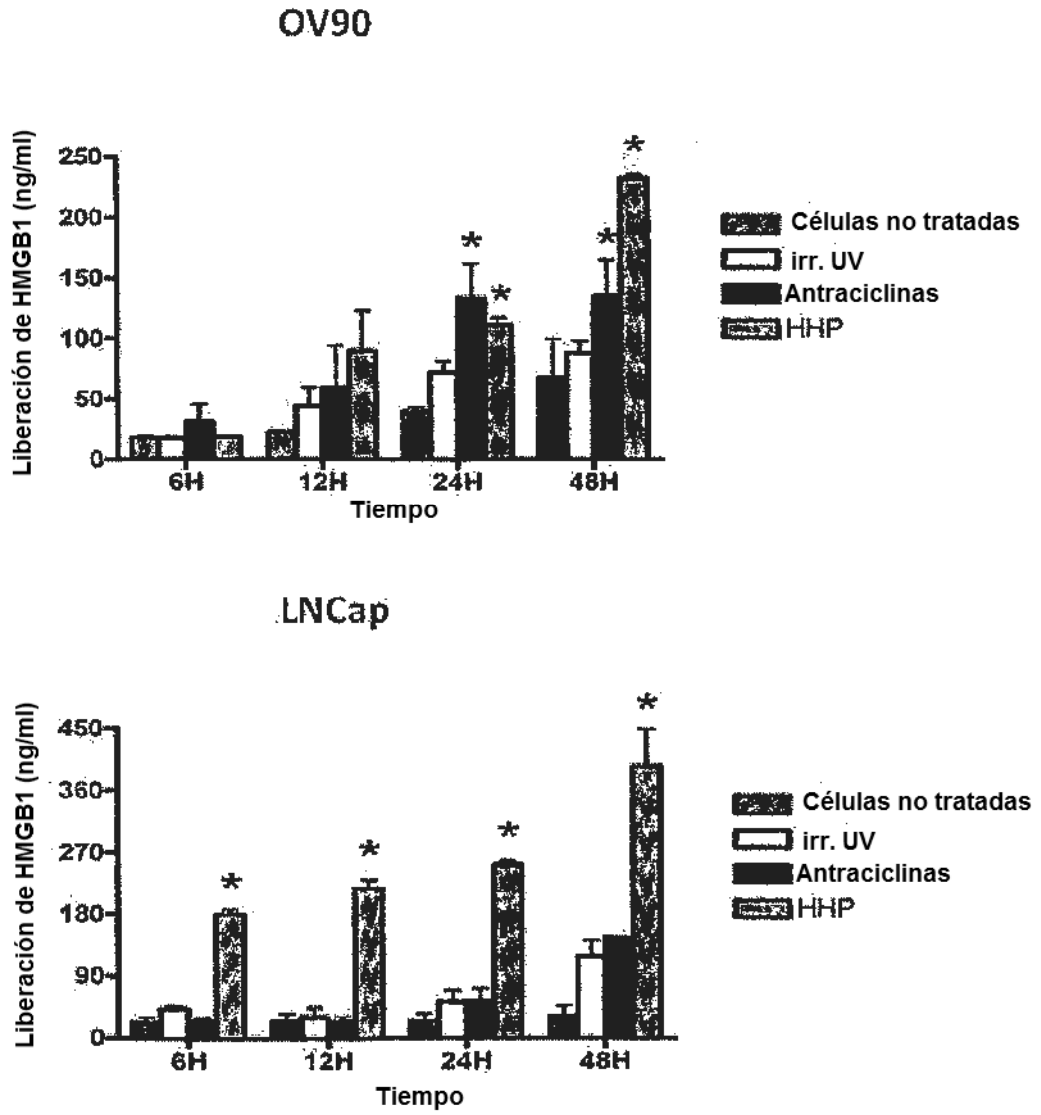


Figura 4

El tratamiento con HHP potencia la fagocitosis de células tumorales muertas por DC

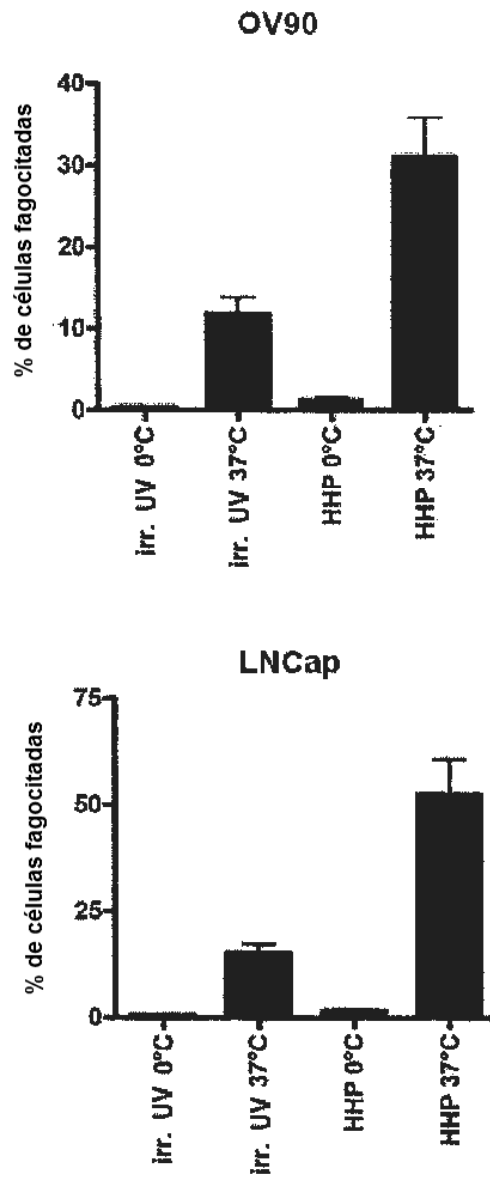


Figura 5

La interacción con células tumorales destruidas por HHP induce la expresión de marcadores de activación en células dendríticas

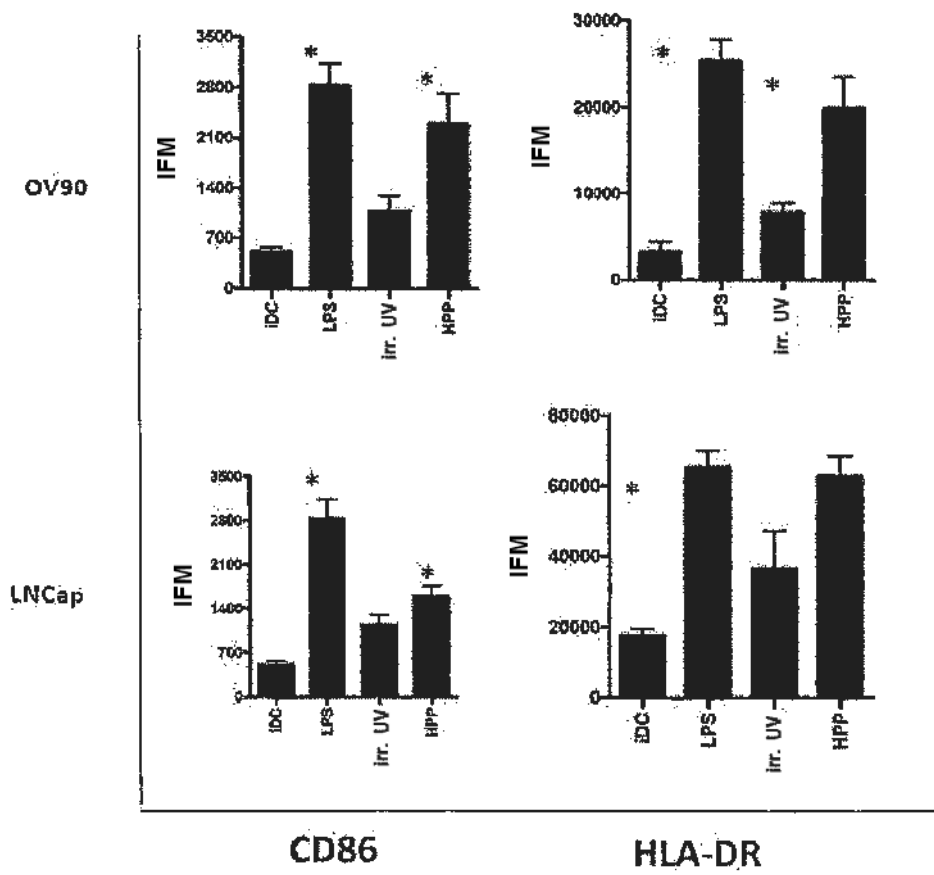


Figura 6

La combinación de células tumorales destruidas por HHP y células dendríticas induce una respuesta inmunitaria específica de células de cáncer de próstata y ovárico

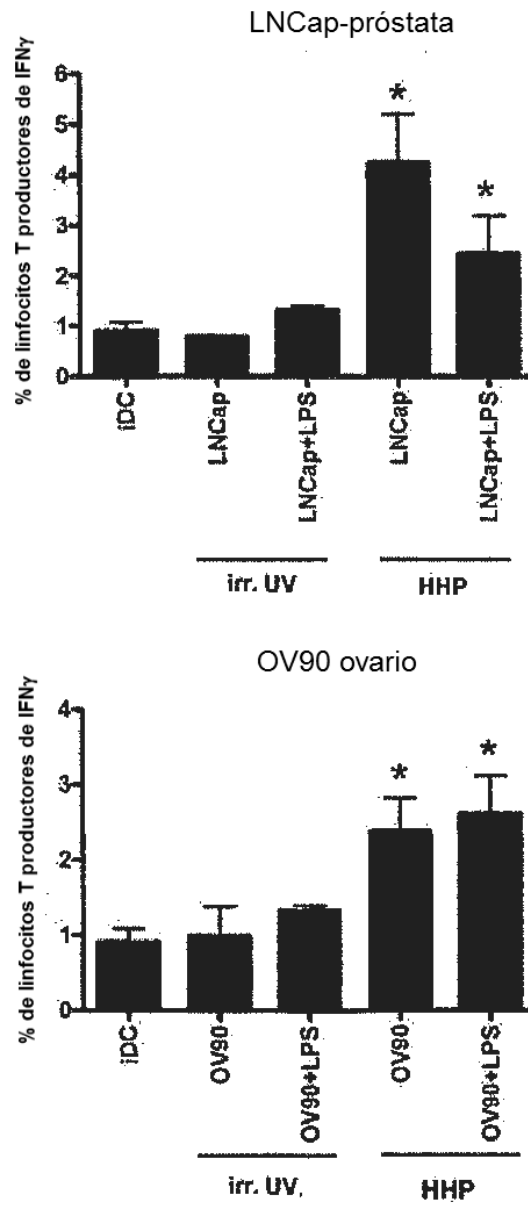


Figura 7

La combinación de células tumorales destruidas por HHP y células dendríticas induce una respuesta inmunitaria específica de PSA

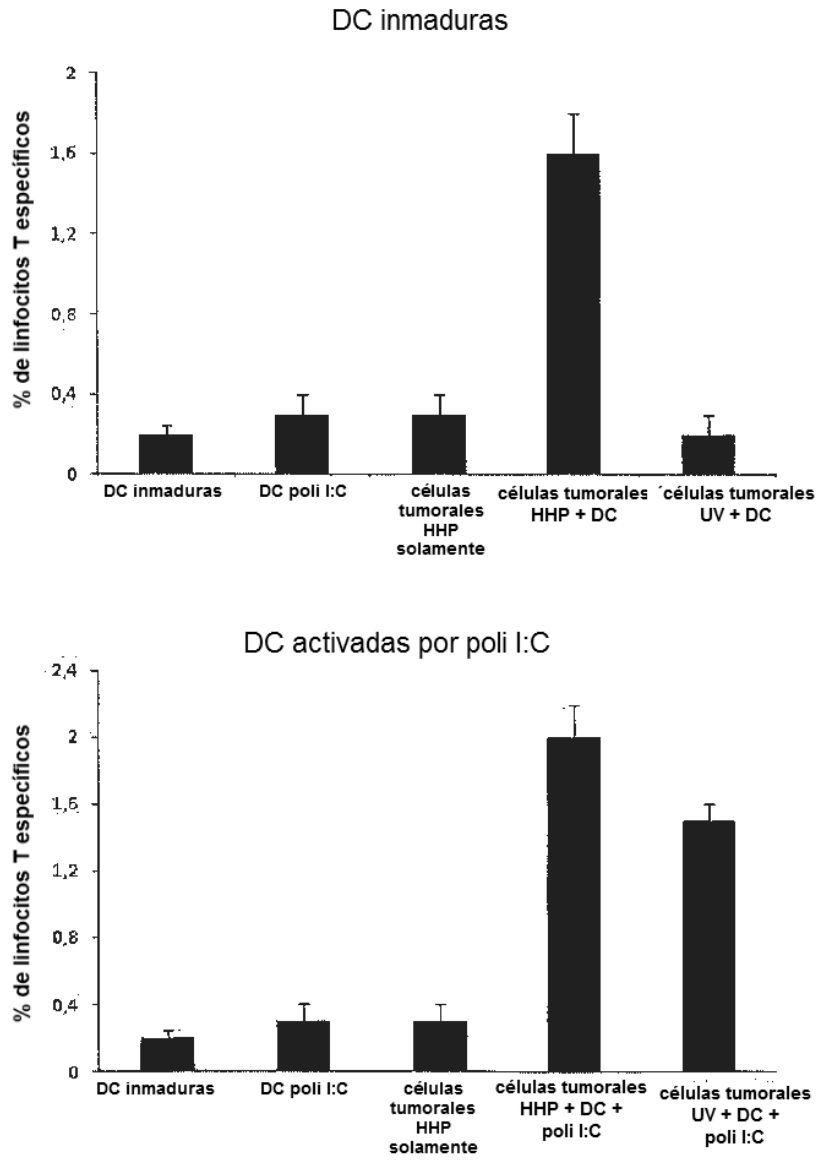


Figura 8

La combinación de células tumorales destruidas por HHP con células dendríticas induce números bajos de linfocitos T reguladores

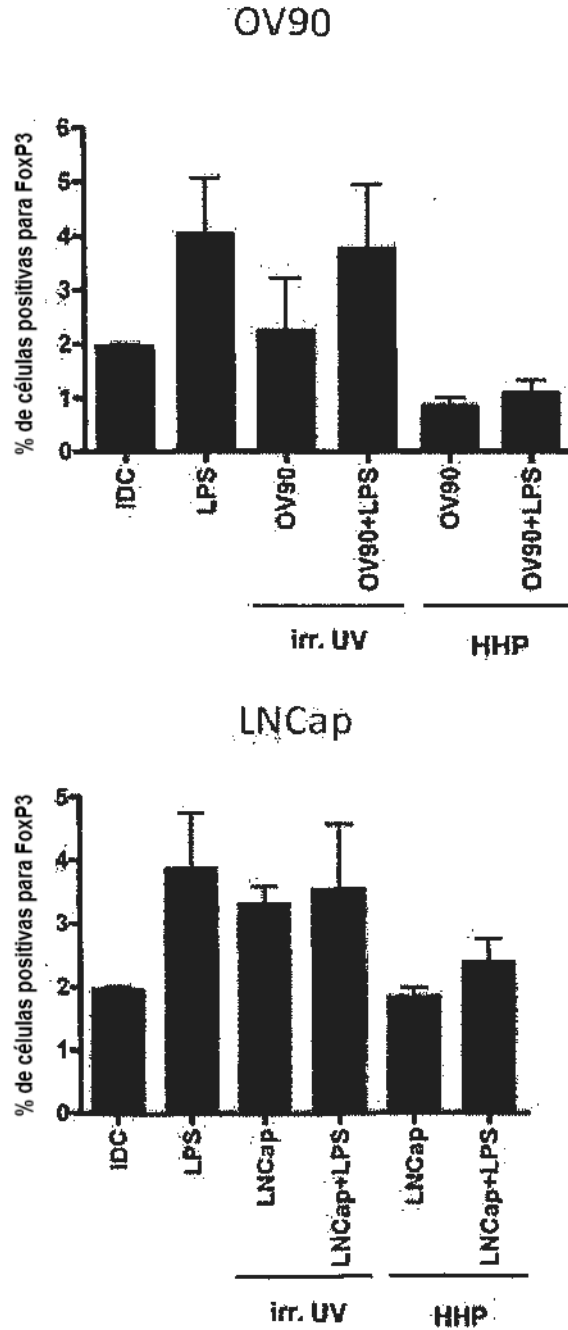


Figura 9

La administración repetida de combinación de células tumorales destruidas por HHP con células dendríticas prolonga significativamente el tiempo de duplicación de PSA en pacientes con la recaída bioquímica del cáncer de próstata,  $p < 0,0001$

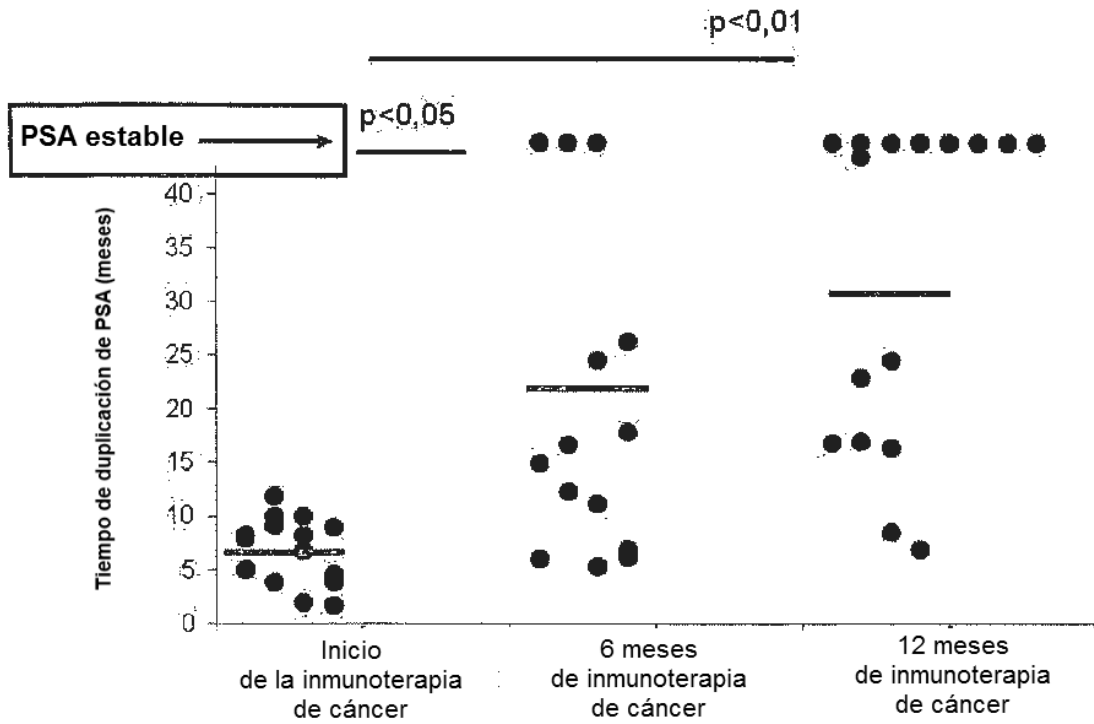
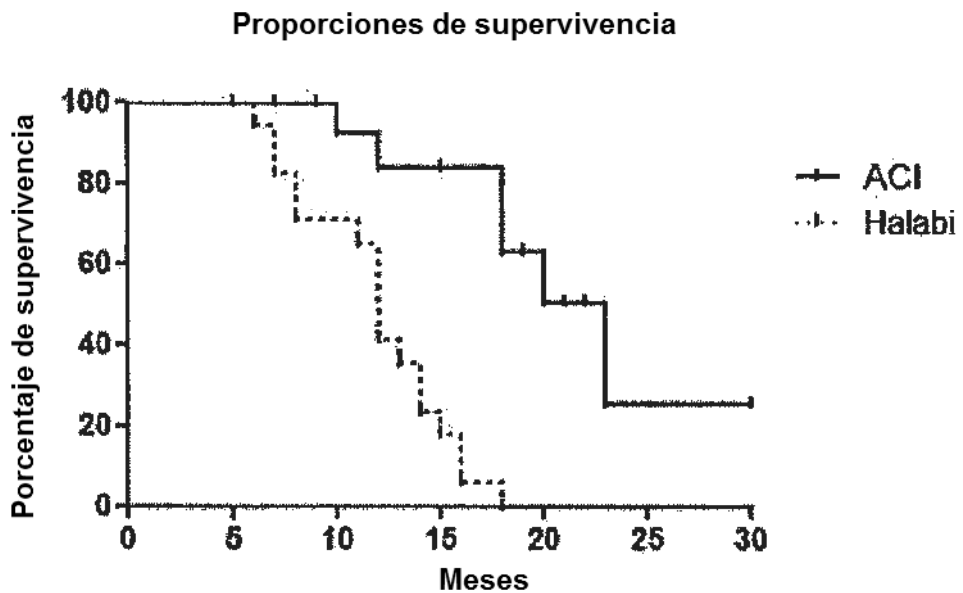


Figura 10

Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de pacientes tratados con inmunoterapia de cáncer activa (ACI) frente a la supervivencia esperada calculada usando nomograma de Halabi,  $p < 0,0001$



Mediana de la supervivencia:  
 Inmunoterapia de cáncer activa: 23 meses  
 Nomograma de Halabi: 12 meses