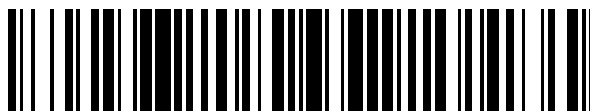


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 958**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2007** **E 11184308 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015** **EP 2404614**

54 Título: **Vacuna de célula tumoral universal para utilización terapéutica y profiláctica anticancerígena**

30 Prioridad:

**20.12.2006 US 876222 P**

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

**09.10.2015**

73 Titular/es:

**NOVARX (100.0%)  
6828 Nancy Ridge Drive, Suite 100  
San Diego CA 92121-2635, US**

72 Inventor/es:

**FAKHRAI, HABIB y  
SHAWLER, DANIEL L.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**Observaciones :**

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

**ES 2 547 958 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**

Vacuna de célula tumoral universal para utilización terapéutica y profiláctica anticancerígena

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a terapia cancerígena y más específicamente a vacunas contra tumores.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las vacunas son inyecciones de sustancias diseñadas para activar el sistema inmunitario del paciente con el fin de atacar un objetivo específico, tal como una célula tumoral. Los científicos han experimentado con el uso de células tumorales como vacunas durante los 30 años anteriores. La teoría es simple; vacunar un paciente con cáncer con células tumorales y la vacuna inducirá una respuesta inmunitaria que destruye las células tumorales a través del cuerpo. Desafortunadamente una barrera principal denominada inmunosupresión limita la eficacia de esta tecnología. La inmunosupresión sucede porque la mayor parte de las células tumorales producen moléculas que permite que las células se oculten del sistema inmunitario, evitando el desarrollo de respuestas inmune clínicamente efectivas. La tecnología NovaRx patentada ayuda a superar esta barrera inmunosupresora. Se observa que una molécula denominada factor de crecimiento de transformación beta (TGF-[beta]) es una de las moléculas inmunosupresoras más potentes producidas por células tumorales. Nuestra tecnología bloquea los efectos inmunosupresores de TGF-[beta] en la vacuna, haciendo la vacuna más potente.

25 El documento WO 96/02143 describe un método para estimular una repuesta inmunitaria en un sujeto al administrar al sujeto células tumorales que son sustancialmente similares a las células cancerígenas del sujeto y que se modifican genéticamente para reducir o inhibir la expresión de uno o más agentes inmunosupresores. El documento WO 01/54716 se refiere a una composición para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene adenocarcinoma que comprende una célula tumoral alogénica.

30 Nuestros científicos fueron los primeros en el mundo en demostrar la innovación del bloqueo TGF- $\beta$  que hace a las vacunas de células tumorales más efectivas. En un estudio publicado en el diario científico prestigioso Proceedings of the National Academy of Sciences, se demuestra que esta tecnología fue capaz de erradicar completamente y rápidamente el crecimiento de tumores en un modelo de animal. Después extendieron este hallazgo al tratamiento de pacientes con glioma (cáncer cerebral) y cáncer de pulmón. En otro trabajo, los investigadores de NovaRx también han demostrado que la inoculación de pacientes con cáncer colorrectal con células tumorales alogénicas indujo respuestas inmunitarias que reconocen y activan las células tumorales de pacientes individuales. Sin embargo debido a la expresión de la supresión inmunitaria en las células de vacuna no ocurren efectos terapéuticos.

40 Resumen de la invención

45 La invención proporciona una composición para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene adenocarcinoma, cáncer espinocelular, u otras formas de cánceres y que comprende una combinación de células tumorales alogénicas y/o células madre tumorales que se seleccionan sobre las bases de secretar por lo menos un agente inmunosupresor, por ejemplo, TGF- $\beta$ , y que se modifican genéticamente para reducir o inhibir la expresión de por lo menos un agente inmunosupresor, por ejemplo, TGF- $\beta$ , y que colectivamente expresan un espectro de tumor asociado con antígenos que representan carcinoma de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides y otros carcinomas de tejidos glandulares, así como tumores del sistema nervioso central, melanoma, linfoma y un portador fisiológicamente aceptable. El adenocarcinoma puede ser, por ejemplo, de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como tumores del sistema nervioso central, melanoma y linfoma. La invención también proporciona una composición que tiene dicha combinación de células tumorales alogénicas y una célula alogénica que expresa una citoquina o que expresa un anticuerpo que bloquea las moléculas específicas. La invención adicionalmente proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como tumores del sistema nervioso central, melanoma, linfoma y administrar al paciente dicha combinación de células tumorales alogénicas, en donde la combinación estimula una respuesta inmunitaria para células tumorales autólogas en el paciente. El método además puede incluir una célula alogénica tal como un fibroblasto genéticamente modificado para expresar una citoquina o expresar un anticuerpo que bloquea las moléculas específicas.

60 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica al cual pertenece esta invención. Ver, por ejemplo, Singleton P and Sainsbury D., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 3a. ed., J. Wiley & Sons, Chichester, New York, 2001.

5 El término transitorio “comprende” es sinónimo de “incluye”, “contiene”, o “caracterizado por” es inclusivo o abierto y no excluye etapas de métodos o elementos no mencionados, adicionales.

10 La frase transitoria “consiste esencialmente de” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o etapas especificadas y aquellos que no afectan fundamentalmente las características básicas y novedosas de la invención reivindicada.

15 La invención proporciona composiciones y su uso en métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene un adenocarcinoma u otros cánceres utilizando células tumorales alogénicas y/o células madre tumorales. Las composiciones y su uso en métodos de la invención son particularmente útiles para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene por ejemplo, cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, del sistema nervioso central y linfoma. Las células tumorales alogénicas y/o las células madre tumorales se pueden modificar genéticamente para potenciar una respuesta inmunitaria. La vacuna alogénica además puede incluir una célula alogénica genéticamente modificada para expresar una citoquina o expresar un anticuerpo que bloquea otras moléculas inhibitoras inmunitarias. La invención también proporciona uso de las composiciones en los métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene cánceres de diferentes tipos que incluyen un adenocarcinoma, que incluye a un paciente que tiene por ejemplo cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma del sistema nervioso central, y linfomas a través de la administración de una o más células tumorales alogénicas, y/o células madre tumorales en donde la célula tumoral alogénica estimula una respuesta inmunitaria para una célula tumoral autóloga en el paciente.

25 El uso de las composiciones en los métodos de la invención son ventajosos porque utilizan una o más células tumorales alogénicas y/o células madre tumorales que expresan antígenos que se expresan en un paciente que tiene un adenocarcinoma, por ejemplo, cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro adenocarcinoma del tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central, y linfoma estimulando por lo tanto una respuesta inmunitaria a los antígenos. El uso de células tumorales alogénicas y/o células madre tumorales proporciona una fuente genérica de antígeno que puede administrarse a una variedad de pacientes, en contraste con el uso de células tumorales autólogas, que pueden aislarse de cada paciente individual. El uso de las composiciones en los métodos de la invención es ventajoso porque las células alogénicas y/o los células madre tumorales son adecuados como una vacuna cancerígena y pueden estimular una respuesta inmunitaria contra células tumorales autólogas de un paciente con cáncer.

30 Como se utiliza en la presente, una “célula autóloga” se refiere a una célula derivada de un individuo específico. En el uso de las composiciones en los métodos de la invención, el individuo específico a partir del cual se deriva una célula autóloga se refiere a un individuo al que se le administra una vacuna alogénica de la invención.

35 Como se utiliza en la presente una “célula tumoral autóloga” se refiere a una célula derivada de un tumor en el individuo.

40 Como se utiliza en la presente una “célula alogénica” y/o “células madre tumorales” se refiere a una célula que no se deriva de un individuo al que se le administra una vacuna de la invención, es decir, tiene una constitución genética diferentes de la del individuo. Una célula alogénica y/o células madre tumorales generalmente se obtienen de la misma especie que el individuo al que se le administra una vacuna de la invención. En particular, una célula alogénica humana puede utilizarse para estimular una respuesta inmunitaria en un individuo humano que tiene cáncer. Como se utiliza en la presente, una “célula tumoral alogénica y/o células madre tumorales” se refiere a una célula tumoral que no se deriva del individuo al cual la célula alogénica se va a administrar. Una célula tumoral alogénica y/o las células madre tumorales expresan por lo menos un antígeno de tumor que es común para una célula tumoral autóloga en el paciente. Generalmente, la célula alogénica y/o la célula madre tumoral se derivan de un tipo del tumor similar o diferente al que se está utilizando en tratamiento del paciente. Por ejemplo, como se describe aquí, un paciente que se está tratando de, por ejemplo, cáncer de colon, mama, pulmón, riñón, endometrio, cuello uterino, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfoma se pueden administrar una célula tumoral alogénica derivada de, por ejemplo, un colón, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como un tumor espinocelular, melanoma, del sistema nervioso central, y linfomas que comparten antígenos o células madre tumorales comunes aisladas de un tumor guiadas para diferenciarse en un tipo diferente de tumor mediante el uso de factores de célula de tallo y medios condicionado para tumores similares al tumor objetivo. La utilización del procedimiento anterior puede dar como resultado la personalización de la vacuna para un individuo.

Aunque una célula tumoral alogénica y/o célula madre tumoral pueden derivarse de un, por ejemplo, tumor de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas, los métodos de la invención también pueden utilizar una célula alogénica y/o células madre tumorales que expresan uno o más antígenos de tumor. Por ejemplo, una célula alogénica y/o célula madre tumoral puede enviarse o modificarse para expresar uno o más antígenos de tumores específicos para un tumor particular. Por ejemplo, para tratar un, carcinoma de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas, una célula puede genéticamente modificarse para expresar antígenos de tumores expresados en un, por ejemplo, carcinoma de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas, incluyen, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), MUC-1, Ep-CAM, HER-2/neu, p53, y MAGE, que incluye MAGE 1, 2, 3, 4, 6 y 12. Los antígenos de tumores también pueden expresarse en una célula alogénica y utilizarse en una vacuna alogénica de la invención. Los antígenos de tumores adicionales pueden identificarse utilizando métodos de clasificación bien conocidos para antígenos de tumores utilizando, por ejemplo, anticuerpos específicos de tumor. Los antígenos de tumores adicionales pueden clonarse y expresarse en una célula alogénica. Los métodos para modificar genéticamente una célula para expresar un gen particular son bien conocidos por un experto en la técnica (ver, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2a. ed., Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y. (1989); Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology* (Suplemento 47), John Wiley & Sons, New York (1999)).

Por ejemplo, además del cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas, se puede utilizar una vacuna de la invención para tratar un individuo que tiene otro tipo de cáncer. Debido a que muchos adenocarcinomas comparten antígenos, como se describe con mayor detalle más adelante, una vacuna de la invención utilizada para tratar un tipo de adenocarcinoma también se puede utilizar para tratar otros tipos de adenocarcinomas si los tumores comparten antígenos con la célula tumoral alogénica de una vacuna de la invención. En forma similar, otros tipos de tumor que comparten antígenos pueden tratarse con una vacuna de la invención. Como se utiliza en la presente, un "paciente que tiene un adenocarcinoma" se refiere a un individuo que tiene signos o síntomas asociados con un adenocarcinoma. Un adenocarcinoma es un neoplasma maligno de células epiteliales en el patrón glandular o del tipo glándula. Los adenocarcinomas ilustrativos incluyen aquellos de tejidos de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros cánceres de tejido glandular.

Como se utiliza en la presente, un "paciente que tiene un cáncer de tejido de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfoma" se refiere a un individuo que tiene signos o síntomas asociados con cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas. Existe una amplia variedad de pruebas médicas que se utilizan para detectar el cáncer y que utilizan diferentes métodos para reconocer y localizar el cáncer. Algunas técnicas en la detección del cáncer, tales como mamografía y colonoscopia, se utilizan para detectar tipos de cáncer específicos. Otros son más generales y son capaces de detectar una variedad de diferentes tipos de cáncer. Un experto en la técnica puede fácilmente determinar si un individuo tiene signos o síntomas de cáncer de tejido glandular de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas.

Como se utiliza en la presente, una "respuesta inmunitaria" se refiere a una respuesta medible para un antígeno mediada por una o más células del sistema inmunitario. Una respuesta inmunitaria puede incluir una respuesta humoral o celular. Como se utiliza en la presente, una respuesta inmunitaria para un antígeno de célula tumoral autóloga se refiere a una respuesta inmunitaria medible a por lo menos un antígeno expresado en una célula tumoral autóloga. Del mismo modo, una respuesta inmunitaria para una célula tumoral autóloga se refiere a una respuesta inmunitaria que se detecta y es específica para una célula tumoral autóloga. Como se describe aquí, el uso de la vacuna alogénica de la invención en un paciente con carcinoma de tejido glandular de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas da como resultado una respuesta inmunitaria detectable para células tumorales autólogas.

Como se utiliza en la presente, una "respuesta para linfocito T citotóxica" o "respuesta CTL" se refiere a una respuesta inmunitaria en donde se activan las células T citotóxicas. Una respuesta CTL incluye activación del CTL precursores así como los CTL diferenciados. Por ejemplo, como se describe aquí, la administración de una vacuna que contiene células de carcinoma alogénicas incrementa la frecuencia del CTL precursor específico para antígenos de tumores de las células alogénicas. La vacuna también estimula la frecuencia de los CTL para células tumorales autólogas.

5 Como se utiliza en la presente, una respuesta CTL pretende incluir cualquier respuesta CTL medible para un antígeno particular. Preferiblemente, la respuesta CTL incluye por lo menos un CTL que es específico para un antígeno expresado en una célula tumoral autóloga. El nivel de la respuesta CTL puede estar en un intervalo de una respuesta modesta a una respuesta intermedia así como una respuesta CTL fuerte. Aún una respuesta modesta puede ser efectiva en el tratamiento en un paciente con cáncer si el tratamiento estimula una respuesta inmunitaria contra las células tumorales autólogas en el paciente.

10 Como se describe aquí, una vacuna de células tumorales alogénica incrementa la frecuencia del CTL precursor en un paciente al cual se administra la vacuna. La vacuna alogénica estimula un incremento de 5 a 10 veces la frecuencia de los CTL precursores. Se entiende que cualquier incremento en la respuesta CTL se considera una respuesta CTL estimulada mientras la respuesta CTL está contra por lo menos un antígeno asociado con un tumor autólogo en el paciente.

15 Como se utiliza en la presente, una citoquina exógena se refiere a una citoquina que se administra a un individuo. Por ejemplo, una citoquina exógena puede administrarse como una composición de citoquina o la citoquina puede administrarse como una célula que expresa una citoquina.

20 La vacuna de célula tumoral alogénica de la invención puede administrarse con una célula alogénica que expresa una citoquina. La célula alogénica que expresa la citoquina puede ser una célula no de tumor tal como un fibroblasto o una célula tumoral. Por ejemplo, como se describe aquí, la célula de fibroblasto alogénica que expresa citoquina genéticamente modificada para expresar IL-2 se administra como un componente una vacuna de célula tumoral alogénica. Las citoquinas útiles en el método de la invención son aquellas que mejoran una respuesta inmunitaria a un antígeno de tumor. Las citoquinas ilustrativas incluyen interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, interferón gama, y factor estimulador de colonia de macrófagos (GM-CSF). Si se desea, la citoquina se puede expresar en varias formas funcionales mientras la citoquina retenga la actividad para potenciar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, una citoquina tal como GM-CSF puede funcionar en una forma enlazada a membrana o soluble. Las citoquinas particularmente útiles para utilizarse en una vacuna contra la célula tumoral alogénica de la invención, son IL-2 y GM-CSF. Los métodos para modificar células para expresar una citoquina para estimular una respuesta inmunitaria son bien conocidos por los expertos en la técnica. El ejemplo de la expresión de un anticuerpo en la vacuna contra tumores o la vacuna de célula madre tumoral es un anticuerpo que inhibe PGE2 o CTLA4. Estas moléculas se pueden expresar en células de vacuna modificadas o en diferentes grupos de células alogénicas tales como un fibroblasto alogénico que se mezclan con la vacuna de célula tumoral.

35 Una célula alogénica que expresa citoquinas puede ser cualquier célula portadora que proporciona un nivel suficiente de expresión de citoquina para potenciar una respuesta inmunitaria. Como se utiliza en la presente, una respuesta inmunitaria mejorada es cualquier incremento medible en una respuesta inmunitaria. Esencialmente cualquier tipo de célula que proporciona la suficiente expresión en la citoquina para potenciar una respuesta inmunitaria puede utilizarse en los métodos de la invención. Las células alogénicas particularmente útiles para expresar una citoquina incluyen células de fibroblastos y células tumorales alogénicas. Los métodos para modificar genéticamente una célula alogénica para expresar una citoquina son bien conocidos por los expertos en la técnica (Sambrook y otros, supra, 1989, Ausubel y otros, 1999). Por ejemplo, una célula de fibroblasto se modifica genéticamente para expresar IL-2.

40 Adicionalmente, las células tumorales alogénicas y/o células madre tumorales se pueden modificar para expresar una citoquina. Una célula tumoral alogénica o célula madre tumoral que expresa antígenos comunes para un tumor en un paciente se pueden modificar genéticamente para expresar una citoquina o un anticuerpo que bloquea inhibidores inmunes. Por ejemplo, en cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas, un cáncer de tejido glandular de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas respectivamente, la célula tumoral se puede modificar genéticamente para expresar una citoquina o un anticuerpo que bloquea los inhibidores inmunitarios, con los antígenos que expresan células alogénicas comunes a un tumor en un paciente. Si se desea, la citoquina que expresa la célula tumoral y/o los células madre tumorales se pueden modificar genéticamente con moléculas adicionales para estimular o potenciar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, B7.1 y B7.2. Las citoquina expresada en la célula alogénica puede ser cualquier citoquina que potencia una respuesta inmunitaria, incluyendo aquellas descritas en la presente. Las citoquinas particularmente útiles para utilizarse en los métodos de la invención incluyen IL-2 y GM-CSF, y los anticuerpos particulares son los anticuerpos que inhiben PGE2 o CTLA4. En el caso en donde la citoquina y/o anticuerpo se expresa en una célula tumoral alogénica, GM-CSF puede expresarse en la forma enlazada de membrana para potenciar una respuesta inmunitaria para antígenos de tumores de células tumorales alogénicas.

60 Como se utiliza en la presente, un portador fisiológicamente aceptable útil en las vacunas de la invención se refiere a cualquiera de los componentes bien conocidos y útiles para inmunización. Los componentes del portador fisiológico

pretenden facilitar o potenciar una respuesta inmunitaria para un antígeno administrado en una vacuna. Las formulaciones pueden contener reguladores de pH para mantener un intervalo de pH preferido, sales u otros componentes que presenta el antígeno para un individuo en una composición que estimula una respuesta inmunitaria al antígeno. El portador fisiológicamente aceptable también puede contener uno o más adyuvantes que mejoran la respuesta inmunitaria al antígeno. Las formulaciones pueden administrarse subcutáneamente, intramuscularmente, intradérmicamente, o en cualquier forma aceptable para la inmunización.

Como se utiliza en la presente, el término “adyuvante” se refiere a una sustancia a la cual, cuando se adiciona a un agente inmunogénico tal como una de tumor alogénica, mejora o potencia no específicamente una respuesta inmunitaria para el agente en el anfitrión receptor después de la exposición a la mezcla. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, emulsiones de aceite en agua, emulsiones agua en aceite, alúmina (sales de aluminio), liposomas y micropartículas, tales como poliestireno, almidón, polifosfaceno y polilactida/poliglicósidas. Los adyuvantes también pueden incluir, por ejemplo, mezcla de escualeno (SAF-I), muramil péptido, derivado de saponina, preparaciones de pared celular de micobacterias, el monofosforil lípido A, derivados de ácido micótico, agentes surfactantes de copolímero de bloques no iónicos, Quil A, subunidad de la toxina B del cólera, polifosfaceno y derivados, y complejos de inmunoestimulación (ISCOM). Para uso veterinario y para la producción de anticuerpos en animales, se pueden utilizar componentes mitogénicos del adyuvante de Freund (tanto completo como incompleto). En los humanos, el adyuvante de Freund incompleto (IFA) es un adyuvante preferido. Los varios adyuvantes son bien conocidos en la técnica. Los adyuvantes adicionales, por ejemplo, el bacilo de Calmett-Gerin (BCG), DETOX (que contiene el esqueleto de pared celular de Mycobacterium phlei (CWS) y el lípido A de monofosforilo de Salmonella Minnesota (MPL), y similares.

Adicionalmente, se puede utilizar una citoquina o un anticuerpo que bloquea los inhibidores inmunes también como un adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria, como se describe aquí. En particular, los métodos de la invención pueden ventajosamente utilizar una vacuna que contiene células tumorales alogénicas y una célula alogénica genéticamente modificada para expresar una citoquina tal como IL-2, GM-CSF, u otras citoquinas, así como anticuerpos tales como anticuerpos que inhiben PGE2 o CTLA4, como se describe aquí. El uso de células que expresan la citoquina permite la mejora de la respuesta inmunitaria a los antígenos de las células tumorales alogénicas, como se describe aquí. Se entiende que más de una citoquina puede administrarse, si se desea, ya sea directamente administrando una o más citoquinas, o administrando citoquinas como una célula que expresa múltiples citoquinas, o múltiples citoquinas que expresan múltiples citoquinas, o combinación de éstas.

La invención proporciona una composición para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene un adenocarcinoma. Por ejemplo, la invención proporciona una composición para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros cánceres de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas. La composición contiene una o más células tumorales o alogénicas y/o célula madre tumoral y un portador fisiológicamente aceptable. La invención también proporciona una composición de materia que contiene las células solas. La invención además proporciona una composición que contiene una o más células tumorales alogénicas, una célula de fibroblasto alogénica genéticamente modificada para expresar una citoquina tal como IL-2 o GM-CSF, y un portador fisiológicamente aceptable. Adicionalmente, otras células tumorales alogénicas, como las descritas en la presente, pueden incluirse en una composición de la invención para estimular una respuesta inmunitaria.

Como se describe aquí, las células tumorales alogénicas y/o las células madre tumorales se pueden modificar genéticamente para expresar moléculas que mejoran una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, las células alogénicas pueden modificarse para expresar B7.1 y B7.2. Adicionalmente, como se describió anteriormente, las células tumorales alogénicas pueden modificarse para expresar una citoquina.

Las células tumorales alogénicas y/o las células madre tumorales se administran en una dosis suficiente para estimular una respuesta inmunitaria para uno o más antígenos de la célula tumoral alogénica que es común para un tumor autólogo en un paciente. Un experto en la técnica puede fácilmente determinar un intervalo de dosis apropiado para administrar suficientes células tumorales alogénicas para provocar una respuesta inmunitaria. La dosis puede ser de por lo menos  $1 \times 10^1$  a la  $2 \times 10^1$  células, de aproximadamente  $1 \times 10^1$  a la  $3 \times 10^1$  células, aproximadamente  $1 \times 10^1$  a la  $4 \times 10^1$  células, aproximadamente  $1 \times 10^1$  a la  $5 \times 10^1$  células, aproximadamente  $1 \times 10^1$  a la  $6 \times 10^1$  células, aproximadamente  $1 \times 10^1$  a la  $7 \times 10^1$  células, aproximadamente  $1 \times 10^1$  a la  $8 \times 10^1$  células, aproximadamente  $1 \times 10^1$  a la  $9 \times 10^1$  células, o aproximadamente  $1 \times 10^1$  a la  $10 \times 10^1$  células, o más. Por ejemplo, como se describe aquí, las células tumorales alogénicas administradas a una dosis total de aproximadamente  $6 \times 10^1$  a la  $7 \times 10^1$  células es suficiente para estimular una respuesta CTL. Si se administra más de una célula tumoral alogénica, cada célula puede administrarse en una dosis individual de tal forma que se administra una dosis total apropiada de células.

La invención también proporciona composiciones para uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene un adenocarcinoma. Por ejemplo la invención proporciona un método para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino,

ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas. El método puede incluir la etapa de administrar al paciente una o más células tumorales alogénicas en donde la célula alogénica estimula una respuesta inmunitaria a una célula tumoral autóloga en el paciente. La administración de las células tumorales alogénicas es ventajosa para estimular una respuesta inmunitaria contra un tumor en un paciente sin la necesidad de aislar células de paciente para generar dicha vacuna contra el tumor.

La invención adicionalmente proporciona composiciones para uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene un adenocarcinoma, que incluye un paciente que tiene cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas. El método incluye la etapa de administrar al paciente una o más células tumorales alogénicas en donde las células alogénicas estimulan una respuesta de linfocito T citotóxico (CTL) para las células tumorales autólogas en el paciente.

La invención adicionalmente proporciona composiciones para uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria anti-cancerígena profiláctica en individuos vacunados con la célula tumoral modificada y/o la vacuna de la célula madre tumoral que los protegerá contra el desarrollo de adenocarcinoma, que incluye un paciente que tiene un cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas. El método incluye la etapa de administrar a los individuos una o más células tumorales alogénicas modificadas y/o células madre tumorales, en donde las células alogénicas estimulan una respuesta de linfocito T citotóxico (CTL) para las células tumorales que pueden surgir en los individuos.

La invención adicionalmente proporciona composiciones para uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria anti-cancerígena profiláctica en los individuos vacunados con célula tumoral modificada y/o la vacuna del célula madre tumoral que lo protegerán contra los tumores ocultos o que puede estar en riesgo de desarrollar adenocarcinoma, que incluye un paciente que tiene cáncer de colon, mama, pulmón, ovario, próstata, Tiroides páncreas, riñón, endometrio cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas. El método incluye la etapa de administrar al individuo una o más células tumorales alogénicas modificadas y/o células madre tumorales, en donde las células alogénicas estimulan una respuesta al linfocito T citotóxico (CTL) para las células tumorales que pueden surgir en los individuos o estar presentes en un estado oculto.

El número de diferentes células tumorales alogénicas a administrarse puede variar dependiendo de las necesidades particulares de la vacuna. Por ejemplo, una respuesta CTL puede estimularse a través de una más tumorales alogénicas, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, o aún 10 o más células tumorales alogénicas, si se desea. El número de diferentes células tumorales alogénicas que se van a administrar puede fácilmente determinarse por un experto en la técnica mediante la administración de un número variable de células tumorales y estirpes y determinar si se estimula una respuesta inmunitaria o se potencia la respuesta inmunitaria.

Las células tumorales alogénicas y/o las células madre tumorales ilustrativos útiles en la invención incluyen aquellos obtenidos de estirpes celulares cancerígenas establecidas y de estirpes de células tumorales establecidas de biopsias de cáncer.

La invención proporciona composiciones para uso en un método para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene diferentes cánceres incluyendo un paciente que tiene un adenocarcinoma, por lo cual se minimiza una respuesta CTL a las células no tumorales autólogas. Por ejemplo, un método de la invención puede utilizarse para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente con cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros cánceres de tejido glandular. Los métodos de la invención son ventajosos porque la vacuna alogénica estimula una respuesta CTL contra las células tumorales autólogas del paciente mientras minimiza una respuesta CTL a las células no tumorales. En particular, la vacuna alogénica de la invención da como resultado una respuesta CTL mínima a las células mononucleares sanguíneas periféricas (PRMC). Como se utiliza en la presente, una respuesta CTL "minimizada", cuando se utiliza en referencia a células no tumorales autólogas, se refiere a una respuesta CTL contra células no tumorales autólogas que son indetectables o que tienen poco o ningún efecto adverso en el paciente.

Los métodos de la invención se dirigen a tratar un individuo que tiene un adenocarcinoma, incluyendo a un paciente que tiene cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros cánceres de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas. Es decir, las células tumorales alogénicas útiles en la invención son generalmente células de adenocarcinoma ya que las células expresan una variedad de antígenos de adenocarcinoma. Por ejemplo, las células tumorales alogénicas pueden ser células de cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros cánceres de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas respectivamente.

El carcinoma de colon que es una de las formas más comunes de cáncer, es un candidato ideal para el desarrollo de métodos inmunoterapéuticos adyuvantes. Ya que la mayor parte de los pacientes con cáncer de colon se tratan a través de la resección del tumor y no exhiben una enfermedad clínicamente detectable inmediatamente después de la cirugía, muchos eventualmente recaen en la enfermedad hepática o en el abdomen debido a la presencia de metástasis microscópica diseminada, indetectable. La resistencia a la quimioterapia relativa de estas metástasis de cáncer de colon recurrentes además enfatiza la necesidad de nuevas modalidades de tratamientos, tales como la inmunoterapia adyuvante.

Como se describe aquí, un cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como cáncer espinocelular, melanoma, del sistema nervioso central y linfomas genéticamente modificados se desarrolla y caracteriza la vacuna de estirpe celular para reducir o inhibir la expresión de por lo menos un agente inmunosupresor secretado de otra forma, por ejemplo, TGF- $\beta$ . Las estirpes y células tumorales seleccionadas para inclusión en la vacuna se seleccionan sobre las bases de su secreción de por lo menos un agente inmunosupresor, por ejemplo, TGF- $\beta$ , modificación genética para reducir o inhibir la expresión de por lo menos un agente inmunosupresor, por ejemplo, TGF- $\beta$ , y la expresión de un espectro de antígenos asociados a tumores (TAA) representantes de carcinomas de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros carcinomas de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas. En otra realización, la vacunación contra el cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros cánceres de tejido glandular, así como pacientes con cáncer espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas con estas células tumorales y/o estirpes de células madre tumorales, combinadas con IL-2 que secretan células autólogas, inducen CTL reactivo con el tumor autólogo del paciente.

Además de los pacientes que tienen cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas los principios de una vacuna de célula tumoral alogénica se pueden aplicar en forma similar a otros tipos de cánceres tales como melanoma, de cerebro y similares. Los métodos de la invención son particularmente útiles para tratar los adenocarcinomas, que incluyen colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros cánceres de tejido glandular, así como carcinoma espinocelular, melanoma, de sistema nervioso central y linfomas. Para cada tipo de cáncer que se va a tratar, la vacuna puede contener células tumorales alogénicas y/o células madre tumorales que expresan antígenos comunes para el tipo de cáncer que se va a tratar. Adicionalmente, una vacuna puede contener células tumorales alogénicas de un tipo de tumor diferente al del paciente que se está tratando. Por ejemplo, una vacuna que contiene células de carcinoma de colon alogénicas, tales como aquellas descritas en la presente se pueden utilizar en una vacuna para estimular una respuesta inmunitaria en un paciente que tiene un adenocarcinoma, por ejemplo, de mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, cuello uterino, ovario, tiroides u otro adenocarcinoma de tejido glandular, y similares. Dicha vacuna es útil porque las células tumorales alogénicas comparten antígenos comunes en diferentes tipos de tumor. Por ejemplo, los adenocarcinomas de mama y de pulmón, así como el carcinoma de colon, expresan CEA, como se describe aquí.

Además de una vacuna que contiene células tumorales alogénicas solas, la invención también proporciona composiciones para uso en métodos en donde las células tumorales alogénicas se administran con un adyuvante de citoquinas. La vacuna de célula tumoral alogénica puede incluir la administración de una citoquina tal como IL-2 GM-CSF u otras citoquinas, o un anticuerpo que inhibe las moléculas supresoras inmunes, tales como PGE2 y CTLA4 como se describió anteriormente. Adicionalmente, se puede administrar adyuvante de citoquina en la forma de una célula alogénica tal como un fibroblasto o célula tumoral genéticamente modificada para secretar una citoquina tal como IL-2, GM-CSF, u otras citoquinas inmunoestimuladoras. La cantidad de citoquina que se va administrar se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica administrando varias cantidades de citoquina y determinando si se potencia una respuesta inmunitaria, preferiblemente sin el inicio de efectos secundarios graves o letales. Las células pueden administrarse en varias cantidades para proporcionar una dosis deseada de citoquina. Generalmente, una citoquina se administra en una dosis de por lo menos aproximadamente 50 unidades, aproximadamente 100 unidades, aproximadamente 200 unidades, aproximadamente 300 unidades, aproximadamente 400 unidades, aproximadamente 500 unidades, aproximadamente 600 unidades, aproximadamente 700 unidades, aproximadamente 800 unidades, aproximadamente 900 unidades, aproximadamente 1000 unidades, aproximadamente 2000 unidades, 3000 unidades, aproximadamente 4000 unidades, aproximadamente 5000 unidades, o más si dicha dosis potencia una respuesta inmunitaria sin provocar efectos secundarios graves o letales al paciente. Como se describe aquí, una estirpe celular de fibroblasto alogénica se puede modificar genéticamente para secretar IL-2 y administrar en varias cantidades para proporcionar un intervalo de dosis de 0 a 4000 unidades de IL-2.

Para terapia de inmunógeno, el uso de células alogénicas para inmunizaciones obvia la necesidad de establecer y genéticamente modificar fibroblastos primarios y adenocarcinomas tales como cultivos de tumor de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros cánceres de tejido glandular para cada paciente. El fundamento para utilizar células tumorales alogénicas se pronostica después de la expresión de antígenos compartidos asociados con el tumor (TAA) expresados por ambas células tumorales utilizadas para inmunización y las células tumorales del paciente. En el carcinoma de colon, la reactividad CTL de clon se ha utilizado para definir una serie de TAA compartidos.



Como se describe aquí, una vacuna de célula tumoral alogénica práctica se desarrolla para terapia de inmunógeno de colón, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, u otro cáncer de tejido glandular con base en los perfiles inmunológicos de colón, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro tejido glandular, respectivamente, las estirpes celulares de carcinoma comparadas con tejidos frescos de colón, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro cáncer de tejido glandular fresco, respectivamente, inician cultivos de carcinoma a partir del material de biopsia. La vacuna se compone de células tumorales o estirpes que se identifican sobre la base de su secreción de por lo menos un agente inmunosupresor, por ejemplo, TGF- $\beta$ , se modifica genéticamente para reducir o inhibir la expresión de por lo menos un agente inmunosupresor, por ejemplo, TGF- $\beta$ , y colectivamente expresan un espectro de antígenos asociados a tumor (TAA) representativo de carcinomas de colón, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otros cánceres de tejido glandular.

La vacunación contra el cáncer es la administración de antígenos de tumor, ya sea en la forma de células tumorales inactivadas o lisadas de células tumorales a partir de las que se recolectan antígenos de tumor mediante las células que presentan antígeno (APC) y el tráfico a los tejidos linfoides para estimular los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) o las células auxiliares CD4+ (Th) del sistema inmunitario. Con la identificación de antígenos de tumor específicos, las vacunaciones por lo general se llevan a cabo a través de células dendríticas (DC) cargadas con la proteína o péptido relevante o DC transfectados con el vector de ADN o ARN. Cada una de estas estrategias producirá efectos particulares en el sistema inmunitario. Los antígenos tumorales reconocidos de células T se pueden clasificar ya sea como antígenos específicos de tumor (TSA), en donde los genes que codifican TSA se encuentran solamente en las células tumorales y no en los tejidos normales, o antígenos asociados con el tumor (TAA), en donde los genes que codifican TAA se sobre-expresan en células tumorales pero sin embargo están presentes a bajos niveles en tejidos normales.

TSA representan quizás los objetivos más deseables para vacunación anti-cancerígena o terapia adoptiva. Su expresión específica de tumor previene cualquier autotolerancia inmunológica preexistente como se podría encontrar con antígenos normalmente expresados, aún a bajos niveles, y de esta forma respuestas inmunitarias contra TSA probablemente no dañarán los tejidos normales. Los ejemplos de TSA incluyen los antígenos de los virus transformantes que provocan que las células infectadas se vuelvan cancerígenas, tales como los productos de gen del virus del papiloma humano (HPV) o el virus Epstein-Barr (EBV), y los productos de genes mutados expresados solamente en células tumorales, tales como RAS oncogénicos y la proteína de fusión BCR/ABL.

Dada la mala presentación de los antígenos mutados específicos de tumor como objetivo CTL, resulta que la mayor parte de péptidos implicados en la respuesta CTL en pacientes con cáncer son antígenos asociados al tumor. Esto ofrece muchos objetivos viables ya que la mayor parte de los tumores se derivan de tejidos normales, y de esta forma los niveles de expresión de "auto" proteínas se encuentran en tejidos normales que pueden convertirse en elevados, contribuyendo a un crecimiento del cáncer y proporcionando objetivos CTL convenientes. No existe ningún problema con la presentación de estas TAA a través de los alelos HLA comunes.

Los carcinomas de tejido colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides u otro carcinoma de tejido glandular son conocidos por expresar una variedad de TAA compartido. Los TAA incluyen oncoproteínas conocidas tales como HER-2/Neu y c-MYC (Ben- Mahrez, K. y otros 1988 Br. J. Cancer 57, 529 -534; Disis, M. L. y otros 1994 Cancer Res. 54, 16 -20; Disis, M. L. And Cheever, M. A. 1996 8, 637 -642; Yamamoto, A. y otros 1996 Int. J. Cancer 69, 283 - 289); proteínas supresoras de tumor tales como p53 (Soussi, T. 2000. Cancer Res. 60, 1777 1788); proteínas sobrevivientes tales como survivina y factor de crecimiento derivado de epitelio lens (LEDGF/p75) (Daniels, T. Y otros 2005 Prostate 62, 14 -26; Rohayem, J. y otros 2000 Cancer Res. 60, 815 -817); proteínas reguladoras del ciclo celular tales como la ciclina B1 (Covini, G. Y otros 1997 Hepatology 25, 75 80); proteínas asociadas con mitosis tales como una proteína F centrómero (CENP- F) (Covini, G. y otros 1997 J. Hepatol. 26, 255 -265; Casiano, C. A. y otros 1995 J. Autoimmun. 8, 575-586; Rattner, J. B. Y otros 1997 Clin. Invest Med. 20, 308 19); proteínas asociadas a cromatina tales como topoisomerasas (Fernandez Madrid, F. 2005 Cancer Lett. 230, 187-198; Imai, H. y otros 1995 Clin. Cancer Res. 1, 417-424); proteínas de unión a mARN tales como p62, IMP1, Y Koc (Himoto, T. y otros 2005 Int. J. Oncol. 26, 311-317; Zhang, J. Y. Y otros 2001 Clin. Immunol. 100, 149-156); y antígenos de diferenciación y de cáncer de testículo tales como NY-ESO-1 (Stockert, E. Y otros 1998 J. Exp. Med. 187/ 1349-1354) y Melan-A SXX2, MAGE-I, MAGE-3, Tirosinasa, y anhídrida carbónica.

Diversos grupos han utilizado "el análisis de proteoma serológica" (SERPA) para identificar los TAA candidato asociados con cáncer de mama, incluyendo la subunidad reguladora de proteína de unión a ARN (RS), el oncogen DJ-1 glucosa 6-fosfato de deshidrogenasa (G6PD)/proteína 1 de 70 kDa de choque térmico (HS 71), y deshidrogenasa de dihidrolipoamida (DLHD) (Canelle, L. Y otros 2005 J. Immunol. Methods 299, 77-89; Fernandez Madrid, F. 2005 Cancer Lett. 230/ 187-198; Klade, C. S. 2001 Proteomics 1, 890-898; Naour, F. L. y otros 2002 Technol. Cancer Res. Treat. 1, 257-262). El método SERPA también ha sido utilizado para identificar calreticulina y proteína de caja DEAD 48 (DDX48) como antígenos objetivo en cáncer pancreático (Hong, S. H. y otros 2004 Cancer Res. 64, 5504- 5510; Xia, Q. y otros 2005 Biochem. Biophys. Res.

Commun. 330, 526-532) y el inhibidor de la disociación Rho GDP 2 como un candidato principal TAA en leucemia (Cui, J. W. y otros 2005 Mol. Cell. Proteomics 4, 1718- 1724).

5 Como se define en la presente, tanto los cultivos frescos celulares de carcinoma de colon como las estirpes celulares de carcinoma de colon establecidas expresan una serie de TAA previamente caracterizadas que incluyen CEA, MUC-1, Ep-CAM, HER-2 /neu, la familia MAGE, y la sobreexpresión de p53. Shawler, D. L. y otros 2002 Clin Exp Immunol. 129, 99-106. CEA es quizás el antígeno asociado con carcinoma de colon mejor caracterizado. Se expresa en 80% de cánceres de colon, se ha demostrado que es el objetivo de respuestas inmunitarias celulares y humorales, y contiene epítomos de unión HLA-A2.

10 Ep-CAM es un antígeno de superficie celular asociado con carcinoma de colon que se ha demostrado es un objetivo importante tanto para inmunidad humoral como celular. MUC-1 es un antígeno inusual que puede mediar citotoxicidad restringida por MHC y no restringida por MHC, presumiblemente a través del entrelazamiento de los receptores de células T a través de secuencias de aminoácidos repetitivas. HER-2/neu es una TAA bien caracterizada que puede funcionar como un antígeno para CTL dirigido a HLA-A2.

15 El gen supresor de tumor p53 está anormalmente expresado en la mitad de los carcinomas de colon. Ha sido recientemente identificado un epítomo p53 de unión a HLA-A2 correspondiente a la secuencia de aminoácido de tipo natural. El CTL humano puede activar este epítomo compartido en células tumorales que sobreexpresan p53.

20 Como se describe aquí, la familia de genes MAGE frecuentemente se expresa en carcinomas de colon. MAGE-I se caracterizó inicialmente como un antígeno asociado con tumor en melanoma reconocido por CTL. Esta observación inicial ha sido extendida para incluir una familia de proteínas MAGE expresadas por tumores de tipos histológicos variables. Los productos de gen MAGE han demostrado que inducen CTL restringido por HLA-A2 potente.

25 Los carcinomas de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides y otros cánceres de tejido glandular se sabe que expresan una variedad de TAA compartidos. Como se describe aquí, tanto los cultivos celulares recientes de carcinoma de colon como las estirpes celulares de carcinoma de colon establecidas expresan una serie de TAA previamente caracterizados que incluyen CEA, MUC-1, Ep-CAM, HER-2/neu, la familia MAGE y sobreexpresión de p53. El CEA es quizás el antígeno asociado con carcinoma de colon mejor caracterizado. Se expresa en 80% de los cánceres de colon, se ha demostrado que es el objetivo de respuestas inmunitarias humorales y celulares, y contiene epítomos de unión a HLA-A2.

30 Ep-CAM es un antígeno de superficie celular asociado con carcinoma de colon que se ha demostrado es un objetivo importante tanto para inmunidad humoral como celular. MUC-1 es un antígeno inusual que puede mediar citotoxicidad restringida por MHC y no restringida por MHC, presumiblemente a través del entrelazamiento de los receptores de células T a través de secuencias de aminoácidos repetitivas. HER-2/neu es una TAA bien caracterizada que puede funcionar como un antígeno para CTL dirigido a HLA-A2.

35 El gen supresor de tumor p53 está anormalmente expresado en la mitad de los carcinomas de colon. Un epítomo p53 de unión a HLA-A2 que corresponde a una secuencia de aminoácidos tipo natural ha sido recientemente identificado. El CTL humano puede activar este epítomo compartido en células tumorales que sobreexpresan p53.

40 Como se describe aquí, la familia de genes MAGE se expresa en carcinomas de colon. MAGE-1 se caracterizó inicialmente como un antígeno asociado con tumor en melanoma reconocido por CTL. Esta observación inicial ha sido extendida para incluir una familia de proteínas MAGE expresadas por tumores de tipos histológicos variables. Los productos de gen MAGE han demostrado que inducen CTL restringido por HLA-A2 potente.

45 PGE2 es una molécula expresada por células tumorales en una molécula inhibidora inmunitaria que permite que las células tumorales se escapen de la vigilancia inmunitaria.

50 El antígeno de linfocito de T citotóxico CTLA4 es una molécula inhibidora inmunitaria que ejerce un efecto supresor en la inducción de las respuestas inmunitarias.

55 Como se utiliza en la presente, el término "agente inmunosupresor" se refiere a un producto de gen que tiene un efecto inhibidor sobre las funciones de las respuestas inmunitarias. Un agente inmunosupresor puede interferir, por ejemplo, con la función de una citoquina o puede inhibir o suprimir la respuesta inmunitaria a través de otros mecanismos. Los agentes inmunosupresores son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el factor  $\beta$  de crecimiento de transformación (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento endotelial vascular, prostaglandina E2 (PGE2), interleucina (IL) 10, e IL-6. También, la proteína, p15E, las mucinas, el receptor supresor E, la proteína ácida inmunosupresora, y las moléculas de adhesión. Se reconoce, por ejemplo, que varias isoformas de TGF- $\beta$  existen, y que el efecto inmunosupresor de una o más de estas isoformas de

TGF- $\beta$  dependen, por ejemplo, de la célula objetivo. El término "TGF- $\beta$ " se utiliza generalmente en la presente para significar cualquier isoforma de TGF- $\beta$ , siempre que la isoforma tenga actividad inmunosupresora.

Como se utiliza en la presente, el término "secreta un agente inmunosupresor" significa que las células tumorales secretan un agente inmunosupresor medible. En las estirpes celulares establecidas de biopsias de carcinoma de colon, el TGF- $\beta$  se secreta con un promedio de 480 pg/10 a la 6 células/24 horas, y que varía hasta aproximadamente 1400 pg/10 a la 6 células/24 horas. Como se utiliza en la presente, el término "reduce o inhibe la expresión de un agente inmunosupresor" se utiliza en su más amplio sentido para significar que el nivel de una molécula de ARN que codifica un agente inmunosupresor o el nivel o actividad del agente inmunosupresor, mismo, se reduce a un nivel que es menor que el nivel expresado antes de la modificación genética. Los términos "reduce" e "inhibe" ambos se utilizan porque en algunos casos, el nivel de expresión de un agente inmunosupresor puede reducirse a un nivel que está por debajo del nivel detectable por un ensayo particular y, por consiguiente, no puede determinar si la expresión del agente inmunosupresor se reduce o inhibe completamente. El uso del término "reduce o inhibe" evita cualquier ambigüedad potencial debido, por ejemplo, a las limitaciones de un ensayo particular.

#### Factor de crecimiento de transformación beta

El papel de los miembros de la familia del factor beta de crecimiento de transformación (TGF- $\beta$ ) en la carcinogénesis es complejo. Originalmente denominado por su actividad de transformación en ensayos in Vitro, los TGF- $\beta$  ahora inequívocamente demuestran actividades tanto supresoras de tumor como oncogénicas. En el paradigma actual, las actividades supresoras dominan en el tejido normal, pero durante la tumorigénesis, cambios en la expresión de TGF- $\beta$  y las respuestas celulares trastornan el balance a favor de sus actividades oncogénicas.

La ruta de señalización de TGF- $\beta$  ha sido el foco de varias revisiones en la literatura científica. Tres isoformas TGF- $\beta$  se expresaron en mamíferos TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, y TGF- $\beta$ 3, y cada una se codificó a través de un gen único y se expresó tanto en forma específica de tejido como regulada en su desarrollo. Ver, por ejemplo, la secuencia de ADNc humana para TGF- $\beta$ 1 (X02812), TGF- $\beta$ 2 (M19154), y TGF- $\beta$ 3 (X14149). TGF- $\beta$ 1 es la isoforma más abundante y universalmente expresada; la mayor parte de los estudios se han realizado o examinado con TGF- $\beta$ 1 exógeno. TGF- $\beta$  se secreta en la matriz extracelular como un complejo de proteína latente enlazado a una proteína asociada con latencia y una de las cuatro isoformas de la proteína de unión TGF- $\beta$  latente. La activación de TGF- $\beta$ , que se requiere para actividad biológica, ocurre a través de mecanismos pobremente entendidos que probablemente involucran el procesamiento proteolítico de las proteínas asociadas y liberan el ligando TGF- $\beta$ . Una vez que se activan, los ligandos TGF- $\beta$  regulan los procedimientos celulares mediante la unión a tres receptores de superficie celular de alta afinidad: el receptor del tipo I TGF- $\beta$  (T $\beta$ RI), el receptor de tipo II TGF- $\beta$  (T $\beta$ RII), y el receptor de tipo III TGF- $\beta$  (T $\beta$ RIII, también denominado como un betaglicano). Cuando se expresan, T $\beta$ RIII es el receptor TGF- $\beta$  más abundante y clásicamente funciona a través del enlace de ligando TGF- $\beta$  y transfiere sus receptores de señalización T $\beta$ RI y T $\beta$ RII. T $\beta$ RI y T $\beta$ RII contienen proteínas quinasas de serina/treonina en sus dominios intracelulares. T $\beta$ RI inicia la señalización intracelular a través de la fosforilación de una familia de factores de transcripción, los Smads. Smad2 y Smad3 son los Smads activados con receptor para TGF- $\beta$  porque se fosforilan a través de T $\beta$ RI. Smad4 es un socio común para todos los Smads activados del receptor. Smad6 y Smad7 son Smads inhibidores que bloquean la fosforilación de Smad2 o Smad3, inhibiendo de esta forma la señalización TGF- $\beta$ .

Un mecanismo general para la señalización de TGF- $\beta$  ha sido explicado. El ligando TGF- $\beta$  se une a T $\beta$ RIII, que presenta TGF- $\beta$  para T $\beta$ RII, o se une a T $\beta$ RII directamente. Una vez que se une a TGF- $\beta$ , T $\beta$ RII, une y transfosforila T $\beta$ RI, por lo tanto estimulando su actividad de proteína quinasa. El T $\beta$ RI activado fosforila Smad2 o Smad3, que se une a Smad4. El complejo Smad resultante se desplaza dentro del núcleo e interactúa de una forma específica de célula con los factores de transcripción para regular específicamente la transcripción de una multitud de genes sensibles a TGF- $\beta$ . La señalización de TGF- $\beta$  se regula por el nivel y duración de la activación del receptor TGF- $\beta$ , con transporte nucleocitoplásmico continuo de Smads que les permite monitorear los niveles de receptores activados continuamente. Adicionalmente, la señalización de TGF- $\beta$  puede regularse mediante la internalización de los receptores, con algunos estudios que sugieren que la internalización del receptor se requiere para la señalización y otros sugieren una función para internalización en regulación descendente de la señalización. Aunque T $\beta$ RI, T $\beta$ RII, Smad2, Smad3, y Smad4 comprenden la trayectoria de señalización de Smad dependiente de TGF- $\beta$  central, han sido reportadas la señalización independiente de Smad a través de las trayectorias de señalización de proteínas quinasa activas con mitógeno (MAPK), la guanosina trifosfatasa Rho, quinasa/Akt PI -3, y la proteína fosfatasa 2A.

#### Estrategias de antígeno

Se pueden utilizar por lo menos dos métodos diferentes para activación directa del gen. El "estándar de oro" es el gen "modificado" logrado a través de la recombinación homóloga (Bronson SK, Smithies O. J Biol Chem 1994; 269:27155-27158). Este método da como resultado la interrupción física actual del gen activado como un resultado de los eventos cruzados que ocurren durante la división celular entre el vector de activación y el gen seleccionado para destrucción. La

recombinación homóloga es extremadamente poderosa, pero la técnica se obstaculiza por el hecho de que permanece inherentemente ineficiente, consume tiempo, y es costosa. Sin embargo, se ha logrado la mejora en eficiencia de este procedimiento.

5 Una segunda opción para dirigir el gen utiliza oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN) capaces de hibridar con ADN de hebra doble. Dichos híbridos típicamente se forman dentro de la ranura principal de la hélice, a través de hibridación dentro de la ranura menor que ha sido reportada. En cualquier caso, se produce una molécula de tres hebras, de ahí el origen del término oligonucleótido formador de tres hélices (TFO). Los TFO no destruyen un gen pero evitan su transcripción ya sea evitando el desenrollado de núcleos o evitando unión de los factores de transcripción del promotor de gen. Los  
10 requerimientos de la secuencia TFO se basan en la necesidad de cada base que comprende el TFO para formar dos enlaces de hidrógeno (enlaces Hoogsteen) con su base complementaria en el núcleo. Esto restringe a los TFO de hibridación con bases de purina que componen pistas de polipurina-polipirimidina dentro del ADN. La eficiencia al dirigir los TFO se restringe adicionalmente mediante una serie de factores, incluyendo la necesidad de cationes divalentes, y quizás de manera más importante, a través del acceso al ADN compactado dentro de la estructura del cromosoma. Los recientes  
15 experimentos de los investigadores han proporcionado evidencia de que puede ocurrir formación de tres hélices en células vivas, sugiriendo que estas dificultades pueden finalmente superarse.

Métodos para la desactivación específica de la secuencia de mRNA

20 Oligonucleótidos antisentido

La noción de que los oligonucleótidos antisentido pequeños (ODN) podrían utilizarse para inhibir específicamente la expresión del gen primero se estableció en 1978 por Stephenson and Zamecnik, Proc Natl Acad Sci USA 75: 285 (1978), y Zamecnik and Stephenson, Proc Natl Acad Sci USA 75:280 (1978). Sus estudios demostraron que un ODN tridecámero (13-  
25 mer) complementario a la secuencias terminalmente repetidas en la repetición de la terminal larga (LTR) del virus del Sarcoma de Rous (RSV) inhibieron tanto la traducción RSV en un sistema sin células como la replicación vírica en células cultivadas. Después de estos experimentos a los investigadores les tomó varios años darse cuenta completamente del potencial de inhibición de genes antisentido. Con la automatización de la síntesis de ODN a principios de la década de los 80, se hizo relativamente sencillo obtener el ODN de cualquier secuencia y probar su capacidad para bloquear la expresión  
30 génica a través del emparejamiento base antisentido.

Poco tiempo después de la demostración de que los ODN de estructura de fosfodiéster fueron efectivos como agentes específicos de objetivo para bloquear la expresión génica, se desarrollaron diversas y nuevas modificaciones de estructura para mejorar la estabilidad de los ODN, y para mejorar su efectividad. La modificación más ampliamente utilizada es una en la cual el oxígeno no puenteado está reemplazado por un átomo de azufre, creando ODN de fosfortioato. Este tipo de estructura formó las bases para el fármaco antisentido aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, Rockville, MD, USA), Vitravene (Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA, USA), que dirige el mRNA IE2 de citomegalovirus y se utiliza para tratar retinitis asociada con citomegalovirus. Un segundo ODN, Genasense, que dirige Bc12 (Genta, Berkely Heights, NJ, USA), recientemente ha completado un ensayo clínico de fase III para melanoma metastásico en donde se está  
35 utilizando junto con quimioterapia estándar, que potencia el antisentido. Varios otros ODN antisentido de fosfortioato están en las etapas anteriores de los ensayos clínicos para una variedad de cánceres y enfermedades inflamatorias.

Los mecanismos de acción de ODN con respecto a la función del gen de bloqueo varían dependiendo de la estructura del ODN. Los ODN, netos cargados negativamente, tales como fosfodiésteres y fosfortioatos, provocan una división mediada por H ARNsa del mRNA objetivo. Otras modificaciones de estructura que no incorporan H ARNsa, debido a su falta de carga o al tipo de hélice formada con ARN objetivo, pueden clasificarse como ODN de obstaculización estérica. Los miembros popularmente utilizados de este grupo anterior incluyen morfolinós, 2'-O-metilos, 2'-O-alilos, ácidos nucleicos bloqueados y ácidos nucleicos de péptido (PNA). Estos ODN pueden bloquear el corte y empalme, traducción, transporte y desplazamiento nuclear-citoplásmico, entre otros objetivos de inhibición. Estará bien más allá del alcance de esta descripción ahondar más en los mecanismos de acción de este arreglo diverso de modificación ODN y para información  
45 más detallada, se debe referir al lector a revisiones específicas sobre este asunto, que describen cada una de estas modificaciones en detalle.

55 Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN que actúan como enzimas, aún en la ausencia completa de proteínas. Estas tienen actividad catalítica para separar y/o formar enlaces covalentes con especificidad extraordinaria, por lo tanto acelerando los índices espontáneos de reacciones activadas a través de muchas órdenes de magnitud. La habilidad del ARN para servir como un catalizador primero se demostró para el intrón del grupo I de auto-división de tetrahimena termófila y la unidad estructural de ARN de RNAsa P. Después del descubrimiento de estas dos enzimas de ARN, se ha encontrado que la catálisis mediada por ARN está asociada con los intrones del grupo II de auto-división de mitocondrias de levadura, hongo y  
60

plantas (así como cloroplastos), viroides y ARN de virus de plantas de estructura de hebra sencilla, virus delta de hepatitis, y ARN satélite de mitocondria de *Neurospora crassa*. Las ribozimas existen naturalmente, pero también se pueden modificar artificialmente para expresión y orientación de secuencias específicas en cis (en la misma estructura de hebra del ácido nucleico) o trans (un ácido nucleico no covalentemente enlazado). Las nuevas actividades bioquímicas se están desarrollando utilizando protocolos de selección in Vitro así como la generación de nuevos motivos de ribozima que actúan sobre los sustratos diferentes del ARN.

La RNasa P de endorribonucleasa se encuentra en organismos a través de la naturaleza. Esta enzima tiene ARN y uno más componentes de proteína que dependen del organismo del cual se aíslan. El componente de ARN de las enzimas de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* puede actuar como un agente de división específico del sitio en la ausencia de la proteína bajo ciertas condiciones de sal e iónicas. Los estudios de los requerimientos del sustrato para enzimas humanas y bacterianas han demostrado que los sustratos mínimos para cualquier enzima se asemejan a un segmento de una molécula de ARN de transferencia. Esta estructura puede imitarse por ARN antisentido inequívocamente designado, como par para el ARN objetivo, y sirven como sustratos para división específica del sitio mediada por RNasa P, tanto en el tubo de ensayo como en las células. También se ha demostrado que el componente antisentido se puede unir covalentemente al ARN RNasa P por lo tanto dividiendo la enzima solamente hacia el ARN objetivo de interés. Los investigadores han tomado ventaja de esta propiedad en el diseño del ARN antisentido, cuyo par con mARN de interés estimula la división específica del sitio del objetivo y la inhibición dirigida del virus de herpes simple y el citomegalovirus en el cultivo celular.

Un número de ARN patogénicos de planta pequeños (viroides, ARN satélite y virusoides), un transcripto del plásmido de ADN de mitocondria *N. crassa* y el virus delta de hepatitis animal experimentaron una reacción de auto-división in Vitro en la ausencia de proteína. Las reacciones requieren un pH neutro y  $Mg^{2+}$ . La reacción de auto-división es una parte integral del mecanismo del círculo rodante in vivo de la replicación. Estos ARN de auto-división se pueden subdividir en grupos dependiendo de la secuencia y estructura secundaria formada alrededor del sitio de división. Las ribozimas pequeñas se han derivado de un motivo encontrado en un ARN de viroide y de virusoide de planta de estructura de hebra sencilla. Sobre la base de una estructura secundaria compartida y un grupo de nucleótidos conservados, el término "cabeza de martillo" se ha dado a un grupo de este dominio de auto-división. La ribozima de cabeza de martillo se compone de 30 nucleótidos. La simplicidad del dominio catalítico de cabeza de martillo ha hecho popular la elección en el diseño de ribozimas de transacción. La utilización del emparejamiento base Watson-Crick, la ribozima de cabeza de martillo se puede diseñar para dividir cualquier ARN objetivo. Los requerimientos en el sitio de división son relativamente simples, y prácticamente pueden activar cualquier motivo de secuencia UH (en donde H es U, C o A).

Un segundo motivo auto-dividido, derivado de planta, inicialmente identificado en la hebra negativa del ARN de satélite del virus de mancha anular del tabaco ha sido denominado la 'horquilla' o 'sujetador de papel'. Las ribozimas de horquilla dividen los sustratos de ARN en una reacción reversible que genera 2',3' -fosfato cíclico y el terminal 5'-hidroxilo. Las versiones modificadas de este motivo catalítico también dividen y pasan las múltiples copias de una variedad de objetivos en trans. Los requerimientos del sustrato para la horquilla incluyen un GUC, con la división que ocurre inmediatamente en dirección 5' del G. La ribozima de horquilla también cataliza una reacción de ligación, aunque se utiliza más frecuentemente para reacciones de división.

Ha habido numerosas aplicaciones tanto de ribozimas de cabeza de martillo como de horquilla en células para regular de manera descendente los objetivos celulares y virales específicos. Haseloff and Gerlach, *Nature* 334: 585 (1988) diseñó un motivo de cabeza de martillo en 1988 que se puede modificar para dividir cualquier objetivo al modificar los brazos del par base en el objetivo. Otro laboratorio demostró que este motivo de ribozima de cabeza de martillo tiene una aplicación terapéutica potencial con base en un estudio de las células modificadas para expresar una ribozima gag del virus de inmunodeficiencia anti-humano (VIH) en donde prácticamente se completó la inhibición de la expresión y replicación del gen viral. A partir de este estudio, se han presentado literalmente miles de aplicaciones de ribozimas que orientan los objetivos celulares y virales. Se ha escrito un número de revisiones comprensibles que examinan estas aplicaciones, y se remite al lector a éstas para un tratamiento adicional de este sujeto.

#### ADNzimas

Una categoría de agentes nucleicos de división específicos del sitio que ha recibido considerable atención en los pasados años es aquella de los ADN catalíticos. Los ADN pequeños capaces de dividir objetivos de ARN específicamente en el sitio se han desarrollado a través de una evolución in vitro (ya que no se conocen enzimas de ADN de origen natural). Dos motivos catalíticos diferentes, con especificidades del sitio de división diferente, se encontraron a través de esta búsqueda. Las 10-20 enzimas comúnmente más utilizadas se unen a sus sustratos de ARN a través del emparejamiento base Watson-Crick y dividen específicamente el sitio para el ARN objetivo, como lo hacen las ribozimas de cabeza de martillo y de horquilla, dando como resultado fosfato 2',3'-cíclico y terminal 5'-OH. La división de los mARN objetivo da como resultado su destrucción y el reciclado de las ADNzimas y divide sustratos múltiples. Los ADN catalíticos son relativamente económicos para síntesis y tienen buenas propiedades catalíticas, convirtiéndolos en sustitutos útiles para ADN antisentido o ribozimas.

Se han publicado varias aplicaciones de ADNzimas en cultivos celulares incluyendo la inhibición de mRNA veg F y la consecuente prevención de la angiogénesis y la inhibición de expresión del transcripto de fusión bcr/abl característico de la leucemia mielógena crónica. Un inconveniente de los ADN catalíticos en comparación con las ribozimas es que solo se pueden suministrar exógenamente, pero se pueden modificar en cuanto a estructura principal, quizás permitiéndoles ser suministrados sistemáticamente en la ausencia de un portador.

#### iARN y siARN

iARN se refiere a un grupo de mecanismos de silenciamiento de gen relacionados que comparten muchos componentes bioquímicos comunes en los que la molécula efectora terminal es un ARN antisentido de 21 a 23 nucleótidos pequeños. Un mecanismo utiliza un 'activador' de dsARN, relativamente largo, que se procesa por un Dicer de enzima celular en dsARN de 21 a 23 nucleótidos corto denominado como siARN. La hebra del siARN complementaria al ARN se incorpora en el complejo multi-proteína denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), en donde sirve como una guía de división endonucleolítica de la hebra del mRNA dentro del sitio objetivo. Esto conduce a la degradación del mRNA completo. Luego se puede reciclar el siARN antisentido. En organismos inferiores, la polimerasa de ARN dependiente de ARN también utiliza el siARN guía híbrido como el cebador, generando más dsARN del objetivo, que sirve a su vez como un sustrato Dicer, que genera más siARN y amplifica la señal de siARN. Esta ruta es comúnmente utilizada como un mecanismo de defensa viral en plantas.

El término siARN ahora se utiliza generalmente siempre que la hebra antisentido sea completamente complementaria al sitio objetivo del mRNA. El siARN puede consistir de dos hebras sencillas híbridas, separadas, de 21 nucleótidos, en donde dos 3'-nucleótidos terminales se desemparejan (3' protuberante). Alternativamente el siARN puede estar en la forma de una horquilla sencilla, a menudo denominada como un ARN de horquilla corta (shARN). Normalmente, pero no siempre, la hebra antisentido del siARN también es completamente complementaria a la hebra compañera codificante del si/sh ARN.

Los recientes experimentos indican que en una levadura de fisión, el dsARN codificado por el ADN centromérico, también media el silenciamiento de la heterocromatina centromérica, y es dependiente de los componentes de la ruta del iARN. Los mecanismos de tipo iARN similares están involucrados en el silenciamiento del emparejamiento de Schizosaccharomyces pombe tipo locus. El silenciamiento de la cromatina de un gen *ura4+* endógeno en trans se inicia por una horquilla de tallo largo *ura4+* (pares bases 280) codificado en un plásmido extra-cromosómico que requiere ambos componentes de iARN y Ctr4 (una histona metilasa); la propagación de la heterocromatina a través de la eucromatina requiere el ortólogo de *S. pombe* de Swi6. Más aún, el mismo mecanismo, que utiliza siARN de origen natural derivado de transposones endógenos, ha estado implicado en la regulación normal de la expresión génica anfitrión en *S. pombe* durante meiosis.

En células de mamífero, los dsARN largos (usualmente mayores de 30 nucleótidos en longitud) activan la ruta del interferón, que activa la proteína cinasa R y 2',5'-oligoadenilato sintetasa 2. La activación de la ruta del interferón puede llevar a la regulación descendente global de la traducción así como la degradación del ARN global. Sin embargo, se ha reportado que los siARN más cortos exógenamente introducidos en células de mamífero desvían la ruta del interferón, aunque la evidencia sugiere que este no puede ser siempre el caso.

El producto antisentido de siARN también se puede derivar de micro ARN endógeno. Los datos extraídos de los experimentos en varios sistemas de paradigma, tales como la ruta *C.elegans* *lin4/lin14* sugieren que la siguiente ruta para biogénesis de micro ARN y regulación de genes en células de animales. Los extremos de un transcripto se eliminan en el núcleo a través de un ARNasa exo III (Drosha, en células humanas), formando un intermediario de pliegue posterior de ARN pre-micro de 70 nucleótidos. Los ARN pre-micro pueden ser multi-cistrónicos, que contienen múltiples horquillas dirigidas contra diferentes ARN objetivos. El ARN pre-micro se exporta activamente al citoplasma en donde el procesamiento Dicer recorta el tallo de la horquilla y retira el bucle y la hebra codificante para crear el efector de iARN antisentido de 21-23 nucleótidos final. En contraste con los si/sh ARN prototípicos, las hebras compañeras codificantes de tallo codificante y antisentido no son completamente complementarias, ya que contienen burbujas o protuberancias; la estructura y las propiedades termodinámicas de los pares bases son críticos para el procesamiento apropiado. Más aún, la hebra antisentido contiene emparejamientos incorrectos en uno más sitios en la región no traducida 3' del mRNA objetivo, en donde la unión media la represión de traducción en lugar de la degradación del mRNA. Los micro ARN extendidos ampliamente de forma filogenética y conservados en algunos casos; también exhiben regulación temporal y espacial. Un estimado reciente del número de micro ARN humanos es de 200-250.

En células humanas, los experimentos con siARN y micro ARN indican que, independientemente de la forma inicial o ruta de procesamiento, un ARN antisentido de 21-23 nucleótidos maduro final que es completamente homólogo al mRNA dirigirá la división de mRNA. En general, el efecto de los emparejamientos incorrectos entre los siARN y los sitios objetivos puede variar desde casi nada hasta abrogación completa de la actividad, por razones que solo se entienden parcialmente; sin embargo, en por lo menos un caso, la homología parcial dio como resultado la inhibición de la traducción de mRNA. En este

informe, un siARN con emparejamientos incorrectos objetivos diseñado para imitar grados variables mediados por la interacción objetivo de micro ARN prototípico de represión de traducción, dependiendo tanto de interacción específica como del número de sitios objetivos en el mARN. En consecuencia, es probable que las características estructurales típicas de los siARN o micro ARN sean importantes para el procesamiento y selección de la hebra antisentido en RISC y tengan implicaciones importantes para el diseño de agentes que inducen iARN.

El iARN se puede activar ya sea a través de suministro exógeno de siARN preformado o través de expresión con base en el promotor de siARN o shARN. De esta forma, el iARN ha emergido como un mecanismo potente para desactivar específicamente transcritos de mARN a un bajo porcentaje de sus niveles originales mediante métodos principales de detección. El iARN parece ser más potente que los ARN antisentido, la ribozima o las ARNzimas para la destrucción del mensaje activado, presumiblemente debido a que explota la maquinaria celular que eficientemente dirige el componente antisentido al ARN objetivo para la división dirigida al sitio.

#### Aptámeros

Los oligonucleótidos no pueden ser solo productos terapéuticos potenciales al unirse en una forma complementaria al ARN, sino también pueden evolucionar mediante el procedimiento de selección a través de la evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) con colecciones de ácido nucleico de combinación para unirse a un gran número de objetivos. Tales oligonucleótidos se denominan aptámeros. Estos han sido seleccionados no solamente dirigidos contra proteínas, sino también contra péptidos y moléculas no péptidos. Su especificidad y afinidad a los objetivos puede compararse con la de los anticuerpos. El potencial para el desarrollo de aptámeros como productos terapéuticos ha sido revisado en la literatura científica.

#### Señuelos

Un señuelo es un oligonucleótido designado de acuerdo con la secuencia de consenso del ácido nucleico reconocida por una proteína particular tal como factores de transcripción para interferir con la interacción con el objetivo de ADN genómico. Los señuelos del factor de transcripción son moléculas que imitan los sitios de unión para transcripción de proteínas factor de, y compiten con las regiones promotoras para absorber su actividad de unión en el núcleo celular. Las proteínas de factor de transcripción regulan la expresión génica a través de la unión a secuencias de ADN específicas encontradas en las regiones promotora/potenciadora de los genes que controlan. Aunque la mayor parte de la unión del factor de transcripción ha estado asociada con un incremento en la expresión génica, también se ha descrito la supresión génica. Al bloquear la interacción de ADN cromosómico de factor de transcripción, los señuelos proporcionan medios poderosos para manipular la regulación de la expresión génica, particularmente como factores de transcripción que de manera en aumento entienden como alterar la activación del gen durante el curso de procedimientos patológicos y normales en la biología celular.

#### Anticuerpos intracelulares

La especificidad exquisita de combinación y la alta afinidad de unión al antígeno, los intracuerpos han sido utilizados como una herramienta biotecnológica para interrumpir, modular o definir las funciones de un amplio rango de antígenos objetivo en el nivel de post-traducción. Un intracuerpo es un anticuerpo que ha sido diseñado para ser expresado intracelularmente y puede dirigirse hacia un antígeno objetivo específico presente en varias ubicaciones sub-celulares incluyendo citosol, núcleo, retículo endoplásmico (ER), mitocondria, peroxisoma, membrana de plasma y red trans-Golgi (TGN) a través de fusión en marco con secuencias de péptido de tráfico/localización intracelular. Aunque los intracuerpos han sido expresados en diferentes formas, el formato más comúnmente utilizado es un anticuerpo de hebra sencilla (scFv Ab) creado a través de la unión de los dominios variables de unión a antígeno de la hebra ligera y pesada con un enlazador de interhebra (ICL), más regularmente con el enlazador de 15 aminoácidos (GGGGS) (3) entre las hebras pesada variable (VH) y ligera variable (VL). Los intracuerpos han sido utilizados en la investigación del cáncer, VIH, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad neurodegenerativa, y trasplante. Tomando la ventaja de la alta especificidad y la afinidad de un anticuerpo para su antígeno, y la diversidad prácticamente ilimitada de los dominios variables de unión a antígeno disponibles para activación molecular, las técnicas de intracuerpo están emergiendo como herramientas prometedoras para generar modificaciones fenotípicas, para manipular procedimientos biológicos, y para obtener un mejor entendimiento de la genómica funcional.

#### Proteínas de unión a TGF- $\beta$

El receptor de tipo III TGF- $\beta$ , también conocido como betaglicano, es un proteoglicano anclado a la membrana que presenta TGF- $\beta$  para el receptor de señalización de tipo II. La región extracelular de este receptor puede ser liberada por las células en el medio. El betaglicano soluble se une a TGF- $\beta$ , pero no mejora la unión a los receptores de membrana. En efecto, el betaglicano soluble recombinante actúa como un potente inhibidor de la unión de TGF- $\beta$  a los receptores de membrana y bloquea la acción de TGF- $\beta$ . Este efecto es particularmente pronunciado con la isoforma TGF- $\beta$ 2. El tratamiento con el receptor tipo III TGF- $\beta$  recombinante (RIII soluble) inhibió la angiogénesis y el crecimiento de tumor en xenoinjertos de

cáncer de mama humano y redujo significativamente el número de metástasis en los pulmones y ganglios linfáticos axilares en este modelo. El receptor II de TGF- $\beta$  soluble parece que tiene propiedades similares y ha demostrado que suprime la tumorigenicidad en un modelo de tumor de murino. La expresión constitucional de un antagonista TGF- $\beta$  soluble, que incorpora en su estructura el dominio celular del receptor de tipo II, protege contra la metástasis en un modelo de murino. Los inhibidores dirigidos cinasa serina-treonina del receptor de tipo I TGF- $\beta$  parece que tienen efectos similares.

#### Estrategias de terapia de gen de tumor

Los avances en biología molecular y de tumor han contribuido de gran manera en nuestro entendimiento de las alteraciones genéticas asociadas con la transformación de tumor. De esta forma, las estrategias de terapia de gen han sido propuestas, las cuales activan alteraciones específicas para células tumorales y patofisiología de tumor. Estas estrategias de tratamiento incluyen la compensación de la mutación y la inmunopotenciación, entre otras.

#### Compensación de mutación

La compensación de mutación involucra la corrección de las lesiones genéticas que son etiológicas para la transformación neoplásica. Esta estrategia de terapia de gen también es conocida como terapia correctiva de genes y se enfoca en la ablación funcional de los oncogenes desregulados en expresión, el reemplazo o aumento de expresión de los genes supresores de tumor o interferencias con rutas de señalización de algunos factores de crecimiento u otros procedimientos bioquímicos que contribuyen a la iniciación o al avance del tumor. Los ejemplos más puros de esta estrategia de terapia de gen son la restauración de la función normal de los genes supresores de tumor y bloqueo de la actividad del oncogén. Se han utilizado varios métodos en la estrategia de terapia génica de compensación de mutación. Estos incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas y oligonucleótidos pequeños, la mutación del gen negativa dominante y más recientemente, la tecnología de ARN pequeños de interferencia (siARN).

#### Inmunopotenciación

La modulación de la respuesta inmunitaria es particularmente atractiva como una modalidad para terapia de gen de cáncer. El enfoque clave de la terapia de gen de tumor es la potenciación de la capacidad del sistema inmunitario para destruir células tumorales. La inmunopotenciación pasiva implica reforzar la respuesta inmunitaria natural para hacerla más efectiva. La inmunopotenciación activa requiere la iniciación de una respuesta inmunitaria contra un tumor previamente no reconocido. La terapia de gen de inmunopotenciación capitaliza sobre estrategias tales como la expresión de los genes de citoquina que pueden mejorar la actividad de las células que presentan el antígeno y células T, la expresión de las moléculas co-estimuladoras, tales como B7.1 y B7.2, que facilitan el reconocimiento y la aniquilación de las células tumorales o la distribución de inmunógenos exógenos, que generan reacciones inflamatorias locales que incrementan la capacidad de las células que presentan el antígeno para reconocer antígenos asociados a tumor.



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición para uso en la estimulación de una respuesta inmune en un paciente que tiene cáncer, o para uso en la estimulación de una respuesta inmune en un individuo en riesgo de desarrollar cáncer con lo cual dicha composición estimula una respuesta CTL a células tumorales que pueden surgir en dicho individuo,
- dicha composición comprende una mezcla de dos o más células tumorales alogénicas diferentes en donde por lo menos una de dichas células de tumor alogénicas comprende células progenitoras de tumores,
- 10 cada una de dichas células de tumor secretan naturalmente un agente inmunosupresor que es TGF-beta o PGE-2 y ha sido modificada genéticamente para inhibir la expresión o actividad de dicho agente inmunosupresor,
- en el que las diferentes células en dicha mezcla expresan colectivamente antígenos asociados a tumores de tal manera que se presenta un espectro de antígenos asociados a tumores representativos de cáncer de colon, mama, pulmón, próstata, páncreas, riñón, endometrio, cuello uterino, ovario, tiroides, u otros carcinomas de tejidos glandulares o melanomas, cáncer del sistema nervioso central o linfoma.
- 15 2. La composición para uso de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una célula alogénica genéticamente modificada para expresar una citoquina.
- 20 3. La composición para uso de la reivindicación 2, en la que dicha citoquina es IL-2-
4. La composición para uso de la reivindicación 2 o 3, en donde dicha citoquina que expresa células alogénicas es un fibroblasto.
- 25 5. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha modificación genética es mediante recombinación homóloga, o
- en el que dicha modificación genética es mediante antisentido, o
- 30 en el que dicha modificación genética genera una ribozima, o
- en el que dicha modificación genética genera un ARN1 o siARN, o
- en el que dicha modificación genética genera anticuerpos intracelulares.
- 35 6. La composición para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha mezcla de células de tumor alogénicas comprende tres o más células de tumor alogénicas diferentes, preferiblemente cuatro o más células de tumor alogénicas diferentes, preferiblemente siete o más células de tumor alogénicas diferentes, preferiblemente ocho o más células de tumor alogénicas diferentes.