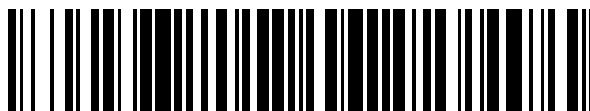


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 435**

51 Int. Cl.:

A61K 31/365 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/09 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2007** **E 07754097 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2004219**

54 Título: **Reactivos y métodos para el tratamiento y la prevención del cáncer**

30 Prioridad:

27.03.2006 US 389695

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

16.10.2015

73 Titular/es:

**THE BUCK INSTITUTE FOR AGE RESEARCH
(100.0%)
8001 REDWOOD BOULEVARD
NOVATO, CA 94945, US**

72 Inventor/es:

**NIAZI, KAYVAN R.;
RABIZADEH, SHAHROOZ y
BREDESEN, DALE E.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 548 435 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

Reactivos y métodos para el tratamiento y la prevención del cáncer

5 Campo de la invención

La invención se refiere en general al tratamiento de cáncer, y, más concretamente, al tratamiento de tumores, incluyendo tumores sólidos y sus metástasis, sin radiación o agentes quimioterapéuticos convencionales. En una realización preferida, la invención se refiere a la prevención y el tratamiento del cáncer mediante el uso de una vacuna contra el cáncer.

Antecedentes

La terapia moderna del cáncer implica en gran medida el uso de radiación, cirugía y agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, los resultados de estas medidas, si bien son beneficiosas en algunos tumores, han tenido sólo efectos marginales o nulos en muchos otros. Además, estos enfoques a menudo tienen una toxicidad inaceptable.

Tanto la radiación como la cirugía adolecen del mismo inconveniente teórico. Se ha reconocido que, dado que una única célula maligna clonogénica puede dar lugar a la progenie suficiente para matar al anfitrión, toda la población de células neoplásicas debe ser erradicada. Véase, en general, Goodman y Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics (Pergamon Press, 8ª Edición) (págs.1202-1204). Este concepto de "destruir todas las células" implica que la escisión total de un tumor es necesaria para un enfoque quirúrgico, y que se necesita la destrucción completa de todas las células cancerosas en un enfoque de radiación, si se quiere lograr una cura. En la práctica esto raramente es posible; de hecho, donde hay metástasis, es imposible.

Por otra parte, los tratamientos quimioterapéuticos tradicionales del cáncer también rara vez dan como resultado una remisión completa del tumor, y los niveles de dosificación significativos requeridos para generar incluso una respuesta moderada suelen ir acompañados de una toxicidad inaceptable. Los agentes contra el cáncer normalmente tienen efectos hematológicos negativos (p. ej., el cese de la mitosis y la desintegración de elementos formados en la médula y los tejidos linfoides), y acción inmunosupresora (p. ej., recuentos reducidos de células), así como un impacto severo sobre los tejidos epiteliales (p. ej., la mucosa intestinal), los tejidos reproductivos (p. ej., deterioro de la espermatogénesis) y el sistema nervioso. P. Calabresi y B.A. Chabner, En: Goodman y Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics (Pergamon Press, 8ª Edición) (págs.1209-1216). Los altos niveles de dosificación, y la toxicidad resultante, son en gran parte necesarios por la falta de especificidad hacia la diana de los propios agentes anticancerígenos. Es necesario que el fármaco distinga entre las células del anfitrión que son cancerosas y las células del anfitrión que no son cancerosas. La gran mayoría de los fármacos contra el cáncer no discriminan a este nivel, y tienen una toxicidad inherente significativa.

El éxito con los agentes quimioterapéuticos convencionales como agentes anticáncer también se ha visto obstaculizado por el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos, la resistencia a una amplia gama de compuestos anticancerígenos citotóxicos no relacionados estructuralmente. J. H. Gerlach et al, Cancer Surveys., 5: 25-46 (1986). La causa subyacente de la resistencia a fármacos progresiva puede ser debida a una pequeña población de células resistentes a los fármacos dentro del tumor (p. ej., células mutantes) en el momento del diagnóstico. J. H. Goldie y Andrew J. Coldman, Cancer Research, 44: 3643-3653 (1984). El tratamiento de un tumor de este tipo con un único fármaco da como resultado primero una remisión, en la que el tumor se reduce de tamaño como resultado de la destrucción de las células sensibles a fármacos predominantes. Con las células sensibles a fármacos ausentes, las células resistentes a los fármacos restantes siguen multiplicándose y, finalmente, dominan la población de células del tumor.

El tratamiento al principio con una combinación de fármacos fue propuesto como una solución, dada la pequeña probabilidad de que dos o más resistencias a fármacos diferentes surgieran espontáneamente en la misma célula. V. T. DeVita, Jr., Cáncer, 51: 1209-1220 (1983). Sin embargo, ahora se sabe que la resistencia a fármacos se debe a una proteína de transporte de membrana, la "glicoproteína P", que puede conferir resistencia a fármacos en general. M.M. Gottesman e I. Pastan, Trends in Pharmacological Science, 9: 54-58 (1988). Fenotípicamente, las células tumorales muestran, con el tiempo, una acumulación celular reducida de todos los fármacos. En resumen, la quimioterapia combinada no parece ser la respuesta.

Se ha propuesto la inmunoterapia celular adoptiva como una metodología de tratamiento alternativa, que utiliza el propio sistema inmunitario del organismo en un intento de mejorar la especificidad hacia la célula diana al tiempo que reduce la toxicidad. La activación y proliferación de diversas poblaciones de linfocitos con linfoquinas tanto *in vivo* como *in vitro* han sido investigadas, con grados variables de satisfacción. Por ejemplo, se han utilizado células asesinas activadas por linfoquinas (LAK) y linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) combinados con interleuquina-2 (IL-2) en el tratamiento de la enfermedad metastásica. Véase Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 316: 889-97 (1987); Belldegrun et al., Cancer. Res. 48: 206-14 (1988).

Desafortunadamente, la inclusión de altos niveles de IL-2 para activar y expandir las poblaciones de células se asocia por sí misma con toxicidad significativa para el paciente. Por otra parte, las poblaciones de células específicas de células diana han sido difíciles de expandir *in vitro*, ya que los linfocitos cultivados en altos niveles de IL-2 eventualmente desarrollan una falta de respuesta a la IL-2, y, posteriormente, muestran una disminución importante en la proliferación y la citotoxicidad. Véase Schoof et al., Cancer Res. 50:1138/43 (1990). El último problema también ha obstaculizado los esfuerzos para utilizar con éxito los linfocitos como vehículos celulares para la terapia génica en el ser humano.

Denmeade et al., J. Nat. Cancer Inst. 2003, Vol. 95, Núm. 13, págs 990-1000 describen taspigargina acoplada a un portador peptídico que es un sustrato para la proteasa antigénica específica de próstata para proporcionar una terapia dirigida para el cáncer de próstata. Sohoel et al, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2006, 14, 2810-2815 describen análogos de taspitargina de segunda generación. Eliopoulos et al., Current Opinion in Pharmacology, 2004, 4: 360-367 discuten el papel de la ruta de CD40 en la patogénesis y el tratamiento del cáncer. El documento WO2004/037321 describe un aparato y un método para la inmunoterapia del cáncer, que comprende tomar una muestra de tumor de un paciente, lisar la muestra y devolver el tejido lisado al paciente.

Lo que se necesita es un enfoque específico contra el cáncer que sea un tumoricida fiable para una amplia variedad de tipos de tumores. Es importante destacar que el tratamiento debe ser eficaz con una toxicidad mínima para el anfitrión.

Compendio de la invención

La invención se refiere en general a la prevención y/o el tratamiento del cáncer, y, más concretamente, al tratamiento de tumores, incluyendo tumores sólidos y sus metástasis, sin radiación o agentes quimioterapéuticos convencionales. En una realización, la invención proporciona un método de preparación de un agente anticanceroso que comprende

1. (a) exponer *ex vivo* una porción de células obtenidas a partir de una línea celular de cáncer o una porción de células tumorales obtenidas de un paciente a un agente seleccionado entre taspigargina y taspigargicina, con el fin de crear células tumorales tratadas;
2. (b) lisar dichas células tumorales tratadas para crear fragmentos de células, en donde dichos fragmentos son adecuados para generar un efecto terapéutico contra el cáncer.

Las células tratadas se pueden lavar para reducir al mínimo la cantidad de agente transportado en la siguiente etapa. No se pretende que la presente invención esté limitada por ningún tiempo de exposición/tratamiento concreto. Se contempla una variedad de tiempos de exposición, incluyendo tiempos de exposición entre 1 segundo y 72 horas, más preferiblemente entre 30 segundos y 1 hora, aún más preferiblemente 1 minuto y 30 minutos. No se pretende que la presente invención esté limitada por la naturaleza de la lisis en la etapa (b). En una realización, las células tumorales tratadas se lisan mediante congelación /descongelación de las células. En otra realización, se usa un agente de lisis; los agentes de lisis pueden ser detergentes (p. ej., dodecil sulfato de sodio), enzimas (p. ej., un tampón de digestión con enzimas compuesto por 1 ml de Tampon B1 Qiagen, 20 μ l de la lisozima, 45 μ l de proteasa y 0,35 ml de Tampón B2 Qiagen), o soluciones simples (p. ej., solución salina tamponada con fosfato) o soluciones más complejas para lisar las células osmóticamente, p. ej., en tampón de lisis hipotónico (fosfato de sodio 5 mM, pH 7,4, cóctel inhibidor de proteasa, DTT 5 mM). En otra realización, las células se someten a ultrasonidos. En otra realización, se elabora un extracto celular (p. ej., un extracto de membrana, un extracto citoplásmico, etc.). En otras realizaciones más, se utilizan combinaciones de estos métodos (p. ej., lisis hipotónica seguida de tratamiento con un homogeneizador, p. ej., Polytron PT 3000, Kinematica, Luzern, Suiza). La presente invención proporciona el agente contra el cáncer para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un paciente. No se pretende que la presente descripción esté limitada a cómo se introducen los fragmentos de células o componentes celulares; éstos se pueden administrarse por vía intravenosa (IV), intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), subcutánea (SC), intradérmica (ID), etc. Se puede preferir administrar los fragmentos/extractos de ciertas maneras para ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, en el caso del cáncer de piel, puede ser preferible administrar el fragmento/extractos a través de la piel (p. ej., por vía subcutánea, transdérmica, etc.) para el tratamiento de cánceres tales como el melanoma. En el caso del cáncer de próstata, puede ser preferible administrar los fragmentos/extractos por vía intraperitoneal. Por otro lado, los fragmentos/extractos se pueden administrar en un sitio que esté distante del tumor y en un tejido (p. ej., músculo, piel, etc.) que no esté relacionado con el tipo de tejido del tumor (p. ej., cáncer de mama, cáncer de pulmón, etc.).

Tampoco se pretende que la presente descripción se limite sólo a la introducción de fragmentos/extractos *in vivo*; otros compuestos (incluyendo pero no limitados a, coadyuvantes, mitógenos y similares) o componentes (incluyendo, pero no limitados a constructos de expresión que proporcionan la expresión continua o transitoria de péptidos, polipéptidos o proteínas, o constructos que proporcionan la generación continua o transitoria de moléculas de ácido nucleico). Con respecto a otros compuestos, la presente descripción contempla la administración de una o más citoquinas antes, después, o junto con los fragmentos/extractos. La Tabla 1 proporciona ejemplos ilustrativos de

citoquinas que se pueden administrar con fragmentos/extractos *in vivo*, o, alternatively, simplemente se pueden administrar junto con tpsigargina y/o agentes de tipo tpsigargina (es decir, administración de los agentes directamente sin células o productos lisados) para mejorar la respuesta inmune. En un ejemplo particularmente preferido, la citoquina administrada junto con tpsigargina (o con células tratadas con tpsigargina, fragmentos o productos lisados) es interferón-gamma.

5

Tabla 1

Nombre	Abr.	Tipo	Nombre específico
Interferones	IFN	alfa	Interferón de leucocitos
		beta	Interferón de fibroblastos
		gama	Factor de activación de macrófagos
Interleuquinas	IL-1	1 alfa	Pirógeno Endógeno
		1 beta	Factor activador linfocitos
		1 ra	Antagonista del receptor BL-1
	IL-2		Factor de crecimiento de células T
	IL-3		Factor de crecimiento de mastocitos
	IL-4		Factor de crecimiento de células B
	IL-5		Factor de diferenciación de eosinófilos
	IL-6		Factor de crecimiento de hibridoma
	IL-7		Linfopoyetina
	IL-8		Proteína quimiotáctica de granulocitos
	IL-9		Factor de crecimiento de megacarioblastos
	IL-10		Factor inhibidor de la síntesis de citoquinas
	IL-11		Citoquinas derivadas de células del estroma
	IL-12		Factor estimulador de

Nombre	Abr.	Tipo	Nombre específico
			las células asesinas naturales
Factores de necrosis tumoral	TNF	alfa	Caquectina
		beta	Linfotoxina
Factores estimuladores de colonias	CSF	GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos
		Mp-CSF	Factor de crecimiento de macrófagos
		G-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos
		EPO	Eritropoyetina
Factor de crecimiento transformante	TGF	beta 1	Factor inductor de cartílago
		beta 2	Factor inductor de virus de Epstein-Barr
		beta 3	Factor de crecimiento derivado de tejido
Otros factores de crecimiento	LIF		Factor inhibidor de leucemia
	MIF		Factor inhibidor de migración de macrófagos
	MCP		Proteína quimiotáctica de monocitos
	EGF		Factor de crecimiento epidérmico
	PDGF		Factor de crecimiento derivado de plaquetas
	FGF	alfa	Factor de crecimiento fibroblástico ácido
		beta	Factor de crecimiento fibroblástico básico

Nombre	Abr.	Tipo	Nombre específico
	ILGF		Factor de crecimiento de tipo insulínico
	NGF		Factor de crecimiento nervioso
	BCGF		Factor de crecimiento de células B

En otros ejemplos más, el paciente puede ser tratado antes, después o al mismo tiempo con uno o más fármacos que estimulan la producción de glóbulos blancos en la médula ósea, tales como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, nombre genérico sargramostim, nombre comercial Leukine) y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, nombre genérico filgrastim, nombre comercial Neupogen). Con respecto a los constructos de expresión preferidos, la presente descripción contempla la introducción de un plásmido de expresión de CD40L antes, después, o junto con el fragmento/extractos con el fin de crear un efecto de larga duración.

En una realización, se prefiere que los fragmentos/extractos estén libres de células, con el fin de evitar la reintroducción de las células cancerosas vivas en el paciente (sin embargo, puede ser posible en algunos casos para reintroducir las células, en lugar de los extractos o los extractos que contienen células, porque éstas mueren rápidamente o son rápidamente destruidas por el paciente). Dichas células tumorales se pueden obtener a partir de una biopsia y los extractos se administran al mismo paciente. En otro ejemplo, los fragmentos/extractos se introducen en un paciente diferente (de hecho, el fragmento/extractos se pueden utilizar ampliamente en una pluralidad de pacientes). En un tercer ejemplo más, las células se establecen como una línea celular para su uso continuo contra el cáncer; en otras palabras, en este tercer ejemplo, las células tumorales no se toman de un paciente cada vez que se necesitan, si no que son, en cambio, proporcionadas a partir de una línea celular (por lo general el mismo tipo de cáncer que el tumor del paciente). La línea celular se puede almacenar en recipientes apropiados en nitrógeno líquido usando técnicas convencionales (por ejemplo, DMSO, medios de cultivo, suero de ternera fetal, etc.). Por otro lado, se pueden pasar continuamente en cultivo hasta su uso. No se pretende que la presente invención esté limitada al tipo concreto de cáncer. Se contempla una variedad de tipos de cáncer, incluyendo, pero no limitados a células de cáncer de piel, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer cervical, células de cáncer de útero, células de cáncer pancreático, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de hueso y linfomas (véase la Tabla 2 para una lista de las líneas celulares ilustrativas). No se pretende que la presente descripción esté limitada a un solo tratamiento, es decir, los fragmentos/extractos (con o sin otros compuestos o componentes) se pueden administrar a intervalos (p. ej., una vez por semana, dos veces al mes, una vez al mes, una vez cada seis meses, una vez por año, etc.).

Se contempla en algunos ejemplos en los que las células tumorales se retiran del paciente, a) la utilización de cirugía convencional para la eliminación de un tumor primario (o una parte del mismo). Después b) el tratamiento de las células tumorales *ex vivo*, utilizando agentes estimulantes, incluyendo tpsigargina y/o compuestos relacionados con tpsigargina, con el fin de crear células tumorales tratadas; c) la preparación de fragmentos /extractos de células tumorales a partir de dichas células tumorales, y d) la introducción de dichos fragmentos/extractos *in vivo* en el mismo paciente, se contempla la generación de un efecto anti-metástasis. De esta manera, la presente descripción se puede combinar con procedimientos quirúrgicos convencionales. Por ejemplo, un tumor primario en la mama se puede eliminar mediante cirugía convencional (es decir, mastectomía parcial o completa), y los fragmentos/extractos se pueden administrar al paciente después de la cirugía para tratar las metástasis. En algunos ejemplos, el tratamiento se realiza sabiendo o no que el paciente tiene metástasis (o donde se han detectado metástasis pero no se conoce el alcance completo de la enfermedad metastásica). En otras palabras, el tratamiento protector se puede aplicar a los pacientes después de la cirugía convencional, así como después de la terapia aguda para la enfermedad metastásica conocida.

TABLA 2

Designación y origen de las líneas celulares y cepas humanas ¹	
Origen	Líneas o cepas celulares
Carcinoma de colon	SW1116, HCT116, SKCO-1, HT-29, KM12C, KM12SM, KMT2L4, SW480
Carcinoma pancreático	BxPC-3, AsPC-1, Capan-2, MIA PaCa-2, Hs766T
Adenoma de colon	Vaco 235
Carcinoma de pulmón	A549
Carcinoma de próstata	PC-3, DU-145
Carcinoma de mama	009P, 013T
Linfoma	Daudi, Raji
Epitelio de mama	006FA
Fibroblastos diploides	HCS (estroma corneal humano), MRC-5
¹ SW1116, HT-29, SW480, las células linfoblastoides Raji, y las líneas de páncreas se obtuvieron de la Colección de Cultivos Tipo Americana.	

5 Por otro lado, no siempre es posible eliminar el tumor primario. Se contempla en algunos ejemplos en los que las células tumorales se retiran del paciente, a) la utilización de cirugía convencional para la eliminación de una metástasis (o una porción de la misma). Después b) el tratamiento de las células tumorales *ex vivo*, utilizando agentes estimulantes, incluyendo tpsigargina y/o compuestos relacionados con tpsigargina, con el fin de crear células tumorales tratadas; c) la preparación de fragmentos/extractos de células tumorales a partir de dichas células tumorales, y d) la introducción de dichos fragmentos/extractos *in vivo* en el mismo paciente, se contempla la
10 generación de un efecto anti-tumoral contra el tumor primario (así como contra la enfermedad metastásica residual). De esta manera, la presente descripción se puede combinar con procedimientos quirúrgicos convencionales.

En otro ejemplo más, los sujetos se tratan con el fin de prevenir el cáncer. En un ejemplo preferido, se tratan sujetos con riesgo de cánceres concretos (ya sea debido a la edad, la predisposición genética, la exposición a la radiación, la exposición al humo, la inhalación de partículas, el consumo de mutágenos, la infección de VIH, etc.). En un
15 ejemplo, la presente descripción contempla un método que comprende: a) proporcionar un paciente en riesgo de desarrollar cáncer y una línea celular de cáncer, b) tratar las células de dicha línea celular de cáncer *ex vivo* con un agente seleccionado del grupo que consiste en tpsigargina y compuestos relacionados con tpsigargina, con el fin de crear células cancerosas tratadas; y c) introducir dichas células *in vivo* en dicho paciente para generar un efecto preventivo contra el cáncer. Por supuesto, la introducción de células cancerosas vivas puede ser poco atractiva (a pesar de que vayan a morir o a ser destruidas). Por lo tanto, en una realización, la presente invención contempla un método que comprende: a) proporcionar un paciente en riesgo de desarrollar cáncer y una línea celular de cáncer, b)
20 tratar las células de dicha línea celular de cáncer *ex vivo* con un agente seleccionado del grupo que consiste en tpsigargina y compuestos relacionados con tpsigargina, con el fin de crear células cancerosas tratadas; c) preparar fragmentos/extractos de células a partir de dichas células cancerosas, y d) introducir dichos fragmentos/extractos *in vivo* en dicho paciente para generar un efecto preventivo contra el cáncer. En este ejemplo concreto, las células cancerosas pueden ser de una línea celular establecida y los fragmentos/extractos pueden ser contemplados como una vacuna. No se pretende que la presente descripción se limite a un solo tratamiento, es decir, los fragmentos/extractos (con o sin otros compuestos o componentes) se pueden administrar a intervalos (p.
25

ej., una vez por semana, dos veces al mes, una vez al mes, una vez cada seis meses, una vez al año, una vez cada cinco años, una vez cada diez años, etc.). No se pretende que la presente descripción esté limitada a un tipo concreto de cáncer. Se contempla una variedad de tipos de cáncer, incluyendo, pero no limitados a células de cáncer de piel, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer cervical, células de
 5 cáncer de útero, células de cáncer pancreático, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de hueso y linfomas (véase la Tabla 2 para obtener una lista de las líneas celulares ilustrativas). En un ejemplo preferido, los sujetos con riesgo de cáncer están libres de cáncer en el momento del tratamiento.

La vacuna descrita anteriormente se puede fabricar en volumen para el tratamiento de una población. Por ejemplo,
 10 en un ejemplo, se puede administrar a seres humanos libres de la enfermedad de más de cincuenta años de edad (o más de cincuenta y cinco años de edad) la vacuna como un agente profiláctico, p. ej., como vacuna de una vez o repetidamente a intervalos en el tiempo (p. ej., cada 2-5 años o 5-10 años). De hecho, la población se puede tratar con una vacuna "cóctel" que comprende fragmentos/extractos de al menos dos tipos diferentes de cáncer (es decir, después de tratar las células cancerosas *ex vivo*, utilizar agentes estimulantes, incluyendo tpsigargina y/o
 15 compuestos relacionados con tpsigargina, con el fin de crear células cancerosas tratadas) con el fin de proporcionar un alcance más amplio de protección contra el cáncer. Los diferentes tipos de cáncer para el "cóctel" se pueden seleccionar basándose en una mayor incidencia en una población en particular después de cierta edad (p. ej., aumento en el cáncer de colon y el cáncer de próstata después de cincuenta y cinco años de edad en los hombres; aumento en el cáncer de mama y cáncer de cuello uterino después de la edad cincuenta y cinco años en las mujeres).

El método de tratamiento *ex vivo* descrito anteriormente, puede tener ventajas en algunos casos sobre la administración directa *in vivo* (p. ej., inyección intravenosa). En el caso del tratamiento *ex vivo*: 1) la tpsigargina
 25 contacta con la célula diana apropiada, es decir, las células cancerosas; 2) la exposición en cultivo permite la eliminación de los agentes antes de la reintroducción de los fragmentos/extractos en el paciente, es decir, el paciente está expuesto sólo a cantidades muy pequeñas de tpsigargina *in vivo* (lo que da como resultado una toxicidad mínima) y 3) la falta de exposición sistémica a los antígenos estimulantes reduce la probabilidad de inducir anticuerpos para la tpsigargina.

Aunque no está limitada a ningún mecanismo, se cree que la exposición de las células a la tpsigargina y/o
 30 compuestos relacionados con tpsigargina hace que las células cancerosas sean inmunoestimuladoras. Cuando se administra a sujetos que tienen tumores, los extractos inducen preferiblemente una reacción tumoricida que da como resultado una regresión del tumor. Se debe entender que el término "reacción tumoricida", según se utiliza en la presente memoria, significa que las células tumorales se destruyen, y no se pretende que esté limitado a ningún
 35 método particular por el que las células tumorales se destruyen. Por ejemplo, puede ser que las células tumorales se destruyan directamente (p. ej., interacción célula-célula) o indirectamente (p. ej., liberación de citoquinas como interferón). Con respecto a las citoquinas, se muestra en la presente memoria que los fragmentos/extractos descritos anteriormente inducen la secreción de citoquinas en las células inmunitarias.

La presente descripción contempla un análisis *in vitro* para el escrutinio de compuestos para determinar los efectos
 40 inmunitarios de tipo tpsigargina. Por ejemplo, en un ejemplo, la presente descripción contempla un método, que comprende a) proporcionar células de cáncer y una línea celular pre-monocítica, dicha línea celular pre-monocítica transfectada con un constructo de ADN que codifica un promotor NF-kB que dirige la expresión de una proteína
 45 marcadora; b) tratar dichas células cancerosas *in vitro* con un agente seleccionado del grupo que consiste en tpsigargina y compuestos relacionados con tpsigargina, con el fin de crear células cancerosas tratadas; c) introducir dichas células cancerosas tratadas en dicha línea celular pre-monocítica *in vitro*; y e) medir la cantidad de dicha proteína marcadora. En otro ejemplo, la presente descripción contempla un método, que comprende a) proporcionar células de cáncer y una línea celular premonocítica, dicha línea celular pre-monocítica transfectada con
 50 un constructo de ADN que codifica un promotor de NF-kB que dirige la expresión de una proteína marcadora; b) tratar dichas células cancerosas *in vitro* con un agente seleccionado del grupo que consiste en tpsigargina y compuestos relacionados con tpsigargina, con fin de crear células cancerosas tratadas; c) preparar extractos celulares a partir de dichas células de cáncer tratadas, d) introducir dichos extractos en dicha línea celular pre-monocítica *in vitro*; y e) medir la cantidad de dicha proteína marcadora. No se pretende que el análisis de escrutinio se limite a la utilización de líneas celulares premonocíticas solamente. También se pueden utilizar líneas de células
 55 de tipo monocito, tales como la línea celular RAW. Por otra parte, cuando se utilizan líneas celulares pre-monocíticas, no se pretende que la presente descripción se limite a la línea celular en particular; se conoce una variedad de líneas de células pre-monocíticas que incluyen ML1, HL60, y U-937. Las líneas celulares pre-monocíticas preferidas son las líneas celulares pre-monocíticas humanas THP-1 y MonoMac-6.

En una realización, se modifica adicionalmente el método *ex vivo* de tal manera que el paciente no se expone a
 60 dichos fragmentos/extractos. En lugar de eso, las células inmunitarias se exponen ya sea a células cancerosas intactas ya sea a fragmentos/extractos *ex vivo*. Por ejemplo, los linfocitos de los pacientes se retiran del paciente y se exponen a las células tumorales tratadas (es decir, tratadas con tpsigargina y/o compuestos de tpsigargina relacionados) o a fragmentos/extractos *ex vivo* con el fin de generar linfocitos estimulados; después de eso, dichos

linfocitos estimulados son reintroducidos en el paciente con un efecto terapéutico contra el cáncer. No se pretende que la invención esté limitada por el origen o la naturaleza de las células inmunitarias. Preferiblemente, son células hematopoyéticas, tales como linfocitos (p. ej., linfocitos infiltrantes de tumores), macrófagos, células dendríticas (y similares) o células capaces de desarrollarse en hasta células inmunitarias. Si bien pueden ser aisladas de una variedad de fuentes, tales como la médula ósea (p. ej., a partir de fémures por aspiración), el bazo o la sangre periférica (p. ej., recogida con heparina y separada por medio de un gradiente de Ficoll/Hypaque), así como del tumor (por ejemplo, tumor infiltrante linfocitos), se prefiere obtenerlas a partir de los ganglios linfáticos. Si bien se pueden obtener de donantes normales, libres de la enfermedad, también se prefiere obtenerlas a partir de anfitriones portadores de tumores.

DEFINICIONES

Según se utiliza en la presente memoria, un "sujeto" puede ser un ser humano o un animal. Un paciente es un ser humano bajo atención médica, ya sea en el hospital, como un paciente ambulatorio, en la clínica o en el consultorio de un médico. Un "sujeto en riesgo de cáncer" y un "paciente en riesgo de cáncer" pueden estar en riesgo por una variedad de razones (ya sea debido a la edad, la predisposición genética, la exposición a la radiación, la exposición al humo, la inhalación de partículas, el consumo de mutágenos, la infección por el VIH, etc.). Por ejemplo, una persona puede estar en riesgo debido a que él/ella pertenece a una familia con antecedentes de cáncer. Por otra parte, uno puede estar en riesgo debido a los resultados de un análisis de escrutinio genético. Con respecto a esto último, la detección de mutaciones es un área cada vez más importante en el diagnóstico clínico, incluyendo, pero no limitado a, el diagnóstico de cáncer y/o individuos predispuestos al cáncer (es decir, en situación de riesgo). La prueba de truncamiento de proteínas (PTT) es una técnica para la detección de mutaciones sin sentido y de desplazamiento del marco que conducen a la generación de productos de proteína truncada. Los genes asociados con el cáncer tales como homólogo mutL humano y el homólogo nutS humano (ambos implicados en el cáncer de colon), y BRAC1 (involucrados en el cáncer de mama familiar) ahora se pueden escrutar para determinar las mutaciones de esta manera, junto con otras. Se reconoce que los que se encuentra que tienen este tipo de mutaciones por truncamiento (así como otros tipos de mutaciones) están en situación de riesgo de cáncer.

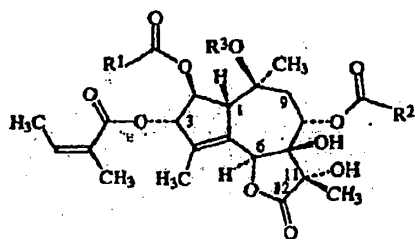
La tapsigargicina y la tapsigargina son compuestos naturales (guaianolidas estrechamente relacionadas) que pueden ser sintetizadas o (más comúnmente) extraídos de las raíces de *Thapsia garganica* L. De hecho, hay por lo menos 15 guaianolidas estrechamente relacionadas que se encuentran en *Thapsia* (véase la Tabla 3). Estos 16 compuestos naturales se dividen en dos series de moléculas diferenciadas por la presencia de un sustituyente oxígeno en la posición C-2. En la serie de compuestos trilobolida, este sustituyente está ausente. La tapsigargina se encuentra disponible comercialmente en numerosas fuentes: MP Biomedicals (Irvine CA), Sigma, Calbiochem, y Alomone Labs. La tapsigargicina también se encuentra disponible comercialmente (Calbiochem).

Tabla 3

Gama conocida de tapsigarginas encontradas en <i>Thapsia</i>			
	Compuesto	R ¹	R ²
1	Tapsigargina	O-Oct	But
2	Tapsigargicina	O-Hex	But
3	Tapsitranstagina	O-iVal	2-MeBut
4	Tapsivillosina A	O-Ang	Sen
5	Tapsivillosina B	O-Ang	2-MeBut
6	Tapsivillosina C	O-Oct	2-MeBut
7	Tapsivillosina D	O-6-MeOct	Sen

Gama conocida de tapsigarginas encontradas en <i>Thapsia</i>			
8	Tapsivillosina E	O-6-MeOct,	2-MeBut
9	Tapsivillosina G	O-6-MeHep	2-MeBut
10	Tapsivillosina H	O-Ang o Sen	Ang o Sen
11	Tapsivillosina I	O-Ang But	
12	Tapsivillosina J	O-iVal	But
13	Tapsivillosina K	O-Sen	2-MeBut
14	Trilobolida	H	2-MeBut
15	Nortrilobolida	H But	
16	Tapsivillosina F	H Sen	
Ang, angelolilo; Sen, seneciolilo; iVal, <i>iso</i> -valerolilo.			

- 5 La tapsigargina es referida a menudo como una lactona sesquiterpénica (véase la estructura 1, más abajo) o un tetraéster de lactona sesquiterpénica. Los derivados de tapsigargina han sido elaborados por medio de una variedad de estrategias. Por ejemplo, se ha realizado la hidrólisis del grupo acetilo en O-10 para dar desacetiltapsigargina (véase la estructura 2, más abajo).



1 $R^1 = (CH_2)_6CH_3$, $R^2 = (CH_2)_2CH_3$, $R^3 = OCCH_3$

2 $R^1 = (CH_2)_6CH_3$, $R^2 = (CH_2)_2CH_3$, $R^3 = H$

3 $R^1 = (CH_2)_4CH_3$, $R^2 = (CH_2)_2CH_3$, $R^3 = OCCH_3$

15 $R^1 = R^2 = (CH_2)_6CH_3$, $R^3 = H$

- 10 También se han realizado la acetilación de uno de los grupos hidroxilo y la reducción de carbonilo de la lactona a un grupo metileno. Según se utiliza en la presente memoria, los "compuestos relacionados con tapsigargina" incluyen tapsigargina y tapsigarginina.

- 15 Según se utiliza en la presente memoria, un "efecto terapéutico contra el cáncer" incluye uno o más de los siguientes: inhibición del crecimiento de células cancerosas, aumento de la muerte de células cancerosas (una reacción tumorocida), reducción de la invasividad tumoral, reducción de la carga tumoral global, reducción de la carga tumoral local, reducción en el tamaño del tumor primario, prevención de las metástasis, reducción en el número de metástasis, reducción en el tamaño de las metástasis, inhibición del progreso de la enfermedad (ya sea temporal o permanente), y vida prolongada. Si bien se desea que el tratamiento deje al sujeto libre de enfermedad, no se pretende que la presente invención esté limitada a curar el cáncer. Existe un beneficio terapéutico incluso si el cáncer simplemente se ralentiza. No se pretende que la presente invención esté limitada a la magnitud del efecto. Por ejemplo, la reducción del tamaño del tumor primario (o de una metástasis) puede ser tan pequeña como una reducción de 10% o tan grande como una reducción de 90% (o más). Tampoco se pretende que la presente invención esté limitada a la duración del efecto terapéutico contra el cáncer. El tratamiento (utilizando las diversas realizaciones descritas en la presente memoria) puede dar como resultado la inhibición sólo temporal del crecimiento de las células cancerosas, el aumento temporal de la muerte de células cancerosas, la reducción temporal de la invasividad tumoral, la reducción temporal de la carga general del tumor, la reducción temporal de la carga local del tumor, la reducción temporal del tamaño del tumor primario, la prevención temporal de las metástasis, la reducción temporal en el número de metástasis, o la reducción temporal en el tamaño de las metástasis. Los efectos

temporales pueden durar semanas o meses, o meses o años. Estos parámetros son relativamente fáciles de medir (p. ej., una reducción en el tamaño del tumor primario). Con respecto a la prevención de metástasis y la prolongación de la vida, estos parámetros pueden ser medidos frente a los datos de poblaciones de pacientes para el tipo particular del tumor, el estadio, y similares. Según se utiliza en la presente memoria, un "efecto preventivo contra el cáncer" o un "efecto protector" comprenden un efecto que reduce la incidencia de nuevos casos de cáncer. Este parámetro puede ser probado en animales y medido en seres humanos sobre una base poblacional.

Según se utiliza en la presente memoria, los "marcadores" y las "etiquetas" son compuestos o radicales detectables. Pueden ser enzimas, moléculas fluorescentes, y similares. Las enzimas ilustrativas incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, glucosa oxidasa, una luciferasa bacteriana, una luciferasa de insecto y una luciferasa de renilla (*Renilla koelikeri*), todas las cuales pueden crear una señal detectable en presencia de sustratos y condiciones de ensayo adecuados.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 presenta datos ilustrativos que muestran los efectos de diversos compuestos sobre la actividad pro-inflamatoria de las células HeLa de cáncer de cuello uterino. Eje de la X: control (-); taspigargina (TG); taxol, tunicamicina (Tunic), brefeldina (BrefA), cicloheximida (CHX) y calcimicina (A23187). Eje de la Y: TNF- α (pg/ml).

La Figura 2A presenta datos ilustrativos que muestran una comparación entre células Hela tratadas con taspigargina frente a taspigargina en la estimulación de la liberación de IL-8 humana a partir de la línea celular de monocitos THP-1. Eje de la X: concentración de taspigargina o taspigargina (μ M); Eje de la Y: concentración de interleuquina 8 (IL-8) (pg/ml). La Figura 2B muestra los resultados en donde se emplearon cuentas de butil sefarosa tratadas con taspigargina para generar la liberación de IL-8 de las células presentadoras de antígenos. En otra realización, la presente invención contempla liposomas, que también son hidrófobos, como vehículo de liberación (véase la Figura 2C).

La Figura 3 presenta una lista ilustrativa que muestra la prevalencia de líneas celulares de cáncer de diversos tejidos conocidas por secretar citoquinas tras la exposición a un compuesto relacionado con taspigargina.

La Figura 4 presenta datos ilustrativos que muestran que las inmunizaciones basadas en taspigargina reducen el crecimiento del tumor y mejoran la supervivencia en ratones C57B1/6. Panel A: Crecimiento del tumor con el tiempo. Líneas cortas: Controles salinos. Círculos vacíos: extractos de células B16 no tratadas. Círculos rellenos: extractos de células B16 + TG 2,5 μ M. Panel B: Supervivencia celular en el tiempo. Líneas cortas: Controles salinos. Círculos vacíos: extractos de células B16 no tratadas. Círculos rellenos: extractos de células B16 + TG 2,5 μ M.

La Figura 5 presenta datos ilustrativos que muestran que las inmunizaciones basadas en taspigargina no tienen ningún efecto sobre el crecimiento tumoral en ratones carentes de sistema inmunitario (Nu/Nu). Panel A (las flechas indican el lugar de inyección): Ratón 1 y Ratón 2; inflamación inducida por B16-TG. Ratón 3 y Ratón 4; Controles B16. Panel B: Supervivencia celular en el tiempo. Círculos vacíos: extractos de células B16 no tratadas. Círculos rellenos: extractos de células B16 + TG 2,5 μ M.

La Figura 6 presenta datos ilustrativos que muestran el crecimiento reducido del tumor después de la inmunización con extractos de células B16 + TG (500 μ g I.P.) de ratones C57B1/6. Eje de la X: Días después del Día 0 de la inyección células de melanoma B16-F10. Eje de la Y: Área de los Tumores (mm^2). Círculos vacíos: Dos inyecciones de extracto de células B16 + TG (Día 0 y Día 116) y dos inyecciones de células B16-F10 (Día 0 y Día 116). Cuadrados rellenos: Día 0, controles no tratados a los que se han inyectado células B16-F10. Triángulos rellenos: Día 116, controles sin tratamiento a los que se han inyectado B16-F10.

La Figura 7 presenta los datos ilustrativos que muestran el crecimiento reducido del tumor después de la inmunización con extracto de células B16 + TG (500 μ g)/plásmido de expresión de CD40L de ratones C57B1/6. Eje de la X: Días después del Día 0 de la inyección de células de melanoma B16-F10. Eje de la Y: Área de los Tumores (mm^2). Círculos vacíos: Dos inyecciones intraperitoneales de extracto de células B16 + TG/plásmido de expresión de CD40L (Día 0 y Día 116) y dos inyecciones de células de melanoma B16-F10 (Día 0 y Día 116). Cuadrados vacíos: Dos inyecciones intradérmicas de extracto de células B16 + TG/plásmido de expresión de CD40L (Día 0 y Día 116) y dos inyecciones de células de melanoma B16-F10 (Día 0 y Día 116). Rombos vacíos: Dos inyecciones subcutáneas de extracto de células B16 + TG/plásmido de expresión de CD40L (Día 0 y Día 116) y dos inyecciones de células de melanoma B16-F10 (Día 0 y Día 116). Cuadrados rellenos: Día 0 control no tratado al que se han inyectado células de melanoma B16-F10. Triángulos rellenos: Día 116 controles no tratados a los que se han inyectado células de melanoma B16-F10.

La Figura 8 presenta datos ilustrativos que muestran la inducción por extracto de células HeLa tratadas con TG de la diferenciación de los monocitos. Panel A: Monocitos no tratados tienen una morfología redondeada. Panel B: Monocitos tratados que tienen una morfología alargada y aplanada (Flechas).

La Figura 9 presenta datos ilustrativos que muestran una mejora dependiente de la dosis de la supervivencia de ratones C57B1/6 después de las formulaciones liposómicas de TG administradas en los Días 7, 8, 9, 14, 15, 16, 21, 22, y 23 (flechas). Círculos vacíos: Control no tratado después de una inyección (S.C.) el Día 0 de células B16-F10 (SC). Rombo relleno: 0,003% en moles TG (ID) después del Día de células B16-F10 0 de inyección (SC). Plaza Cerrado: 0,003% en moles de TG (I.D.) después una inyección (S.C.) el Día 0 con

células B16-F10. Triángulo relleno: 0,03% en moles de TG (I.D.) después de una inyección (S.C.) el Día 0 con células B16-F10.

La Figura 10 Panel A presenta los datos ilustrativos que muestran la respuesta de 50.000 Clones A9 de THP-1 a diversos ligandos de TLR según se determina por un sistema informador de luciferasa. Eje de la Y: Unidades Relativas de Luz (URL) generadas por las propiedades quimioluminiscentes de la proteína luciferasa de luciérnaga.

La Figura 10 Panel B presenta los datos ilustrativos que muestran una curva de respuesta a la dosis de tpsigargina (TG) utilizando 50.000 Clones A9 de THP-1 según se determina por un sistema informador de luciferasa. Eje de la Y: Unidades Relativas de Luz (URL) generadas por las propiedades quimioluminiscentes de la proteína luciferasa de luciérnaga. Barras vacías: solo TG. Barras rellenas: 30.000 células HeLa tratadas con TG. Med = Control de medio.

La Figura 11 presenta datos ilustrativos que muestran la respuesta del Clon 5 de MonoMac-6 a diversos ligandos de TLR según se determina por un sistema informador de luciferasa. Eje de la Y: Unidades Relativas de Luz (URL) generadas por las propiedades quimioluminiscentes de la proteína luciferasa de luciérnaga. TG (2,5 μ M). Medios = Control.

La Figura 12 muestra la secuencia de nucleótidos para CD40L.

La Figura 13 muestra el ADNc de CD40L preparado para el ligamiento en el sitio de restricción XbaI de pVAX1.

La Figura 14 muestra el mapa para el plásmido de expresión de pVAX1 disponible comercialmente.

Experimentación

Lo siguiente representa ciertas ilustraciones y realizaciones contempladas por la presente invención y no se pretende que sean limitantes.

Ejemplo I

Procedimientos de laboratorio básicos

Este ejemplo proporciona materiales y métodos básicos que se utilizan en los Ejemplos II - VII de más abajo. Si bien estos experimentos concretos utilizaban compuestos y técnicas específicos, otros compuestos y técnicas similares también son capaces de generar datos similares.

Líneas celulares

La línea celular de epitelio cervical humano HeLa y el melanoma B16-F10 de ratón fueron adquiridos de la American TCC y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco [D-MEM (Cellgro[®], Herndon VA)] con un suplemento de suero bovino fetal al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Todos los tratamientos relacionados con estrés/muerte celular descritos a continuación se realizaron utilizando células HeLa en escrutinios iniciales. Las células de leucemia promonocítica humana THP-1 (ATCC, Manassas VA) y MonoMac6 pro-macrófagos se utilizaron como células presentadoras de antígenos informadoras utilizadas en este estudio. Ziegler-Heitbrock et al., "Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes" Int. J. -Cancer 41:456-461 (1988). Ambas líneas se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Cellgro[®]) con un suplemento de suero bovino fetal al 10%. A menos que se indique lo contrario, todas las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora humidificada con un suplemento de 5% de CO₂.

Compuestos

La siguiente lista incluye los compuestos de molécula pequeña evaluados en este estudio:

tapsigargina, tapsigargicina (MP Biomedicals, Irvine CA), éster tetra(acetoximetílico) de ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético [BAPTA-AM, (EMD Biosciences, San Diego, CA)], éster etilenglicol-bis(β -aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacetoximetílico [EGTA-AM (EMD Biosciences)], ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), tetrandrina, KCl, péptido amiloide A β ₁₋₄₂, 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol (OAG), calcimicina A23187, difenilborinato de 2-aminoetilo (2-APB), histamina, ácido ciclopiazónico, 2,5-di-(t-butil)-1,4-hidroquinona [BHQ (EMD Biosciences)], GdCl₃, hidrocloreto de nicardipina, 1-(o-cloro- α , α -difeniilbencil)imidazol (clotrimazol), apamina, caribdotoxina, radicol, brefeldina A, tunicamicina, tamoxifeno, ionomicina, estaurosporina, dicloruro de cis-diaminoplatino (II) (cisplatino), paclitaxel, metotrexato; cicloheximida, y rapamicina. A menos que se indique lo contrario, todos los compuestos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los compuestos se disolvieron según las recomendaciones del fabricante antes de la adición a las células HeLa en un intervalo de concentraciones basado en la bibliografía publicada y se incubaron entre 1 minuto y dos días. Los mediadores conocidos de la inflamación Pam3Cys-ser-(lys)₄, hidrocloreto (Pam3Cys), flagelina bacteriana, y lipopolisacárido fueron adquiridos de Merck Biosciences.

Constructos de ADN

Los transgenes inductores de la muerte celular evaluados incluyen caspasa 8, caspasa 9, caspasa 3, dominio intracelular del receptor del factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF-1RIC), y receptor de neuroquinina-1 (NK1R) humanos, todos clonados en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Se generó el plásmido de expresión de CD40L de ratón (o CD 154) mediante la creación del ADN complementario utilizando la secuencia de nucleótidos de CD40L de ratón publicada en el NCBI (Figura 12) y los oligonucleótidos solapantes que codifican esta secuencia flanqueada por sitios de restricción XbaI (Figura 13) seguido de reacción en cadena de la polimerasa utilizando ADN polimerasa Pfu (Stratagene, San Diego CA). El ADN resultante se digirió con XbaI (New England Biolabs, Ipswich MA) y se ligó en un vector de expresión pVAX1 digerido de manera similar (Invitrogen, Carlsbad CA) (Figura 14). El constructo pVAX-CD40L se verificó por secuenciación de ADN.

Transfecciones

Todas las transfecciones se realizaron utilizando células HeLa y reactivo de transfección Lipofectamine 2000® (Invitrogen) siguiendo las sugerencias del fabricante. Las células transfectadas con NK1R se incubaron con péptido sustancia P 1 μ M (Sigma-Aldrich) para inducir la muerte un día después de la transfección.

Otras rutas de estrés/muerte celulares

La privación de suero se realizó después de la incubación de las células HeLa en DMEM sin suero durante tiempos que oscilaban entre 1 y 24 horas. El choque térmico fue inducido incubando las células a 42-45°C entre 1 y 6 horas.

Cuantificación de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias

Después de el estrés/muerte celulares, las células/desechos celulares resultantes se recogieron, se lavaron 3 veces con un exceso de solución salina tamponada con fosfato, se ciclaron rápidamente a través de congelación/descongelación (-80°C a 25°C) tres veces, y se cuantificaron por medio de espectrofotometría UV (A280). Para determinar la presencia de señales pro-inflamatorias dentro de las células estresadas/muertas, se añadieron 40 g de células estresadas/muertas a 50.000 THP-1 y se incubaron durante 18 horas. Los sobrenadantes se evaluaron para determinar la presencia de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleuquina 8 (IL-8), y la IL-12 utilizando sistemas de ELISA disponibles comercialmente.

Generación de actividad inflamatoria dependiente de taspigargina

Se cultivaron células B16-F10 se cultivaron en placas de cultivo de tejido de 150 mm hasta una confluencia de ~80% antes de la adición de taspigargina (2,5 μ M). Las células se dejaron incubando durante 48 horas antes de la recogida, tres lavados en exceso de solución salina tamponada con fosfato, ciclos de congelación-descongelación, y cuantificación como se ha descrito anteriormente. Las células no tratadas se recogieron de manera similar y ambos extractos se evaluaron in vitro para determinar la actividad inflamatoria utilizando el sistema de THP-1 descrito anteriormente, antes de su utilización in vivo.

Inmunizaciones y sensibilización tumoral en ratón

Los siguientes estudios con ratones descritos fueron aprobados todos por el Buck Institute Animal Care and Use Committee (IACUC) antes del inicio. Se adquirieron ratones C57B1/6 y *nu/nu* hembra de 6-8 semanas de edad de Charles River Laboratories (Wilmington MA). Las inmunizaciones se llevaron a cabo por medio de inyección de 500 μ g de extracto de B16-F10 (con o sin tratamiento con taspigargina) tres veces a intervalos de dos semanas por diferentes rutas de inmunización incluyendo las vías subcutánea, intraperitoneal, e intradérmica. La sensibilización con tumores vivos se realizó mediante inyección de 100.000 células B16-F10 por vía subcutánea en un sitio contralateral dos semanas después del último refuerzo.

Ejemplo II

Identificación de una señal de peligro endógena sensible a taspigargina

Se escrutó una variedad de diferentes agentes inductores de estrés celular y muerte celular potenciales. La toxina taspigargina derivada de planta inducía la secreción de TNF- α en una línea celular de cáncer cervical derivada de un paciente (HeLa) y por lo tanto fue identificada para su uso en las diversas realizaciones contra el cáncer descritas anteriormente. En contraste, otros factores estresantes celulares potenciales (es decir, p. ej., taxol, tunicamicina, brefledina A, cicloheximida, y calcimicina) se sometieron a ensayo, pero no indujeron actividad inmunoestimuladora. (Véase la Figura 1).

La taspigargina también era capaz de activar una célula presentadora de antígeno (APC) en un sistema de lectura utilizando una línea celular monocítica para secretar grandes cantidades de la citoquina inflamatoria factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). (Datos no mostrados).

Ejemplo III

Secreción de citoquinas inducida por tapsigargina

Este ejemplo ilustra que el tratamiento con tapsigargina de las células cancerosas convierte estas células inmunoestimuladoras en células presentadoras de antígenos (monocitos, macrófagos, células dendríticas, etc.) que se activan para liberar citoquinas. Aunque no es necesario entender el mecanismo de una invención, se cree que la IL-12 desempeña un papel en el desarrollo de respuestas inmunitarias mediadas por células (el tipo de respuesta inmunitaria que pueda ser necesario para el control del cáncer y la infección por patógenos intracelulares).

Un compuesto relacionado con tapsigargina, la tapsigargicina (un análogo menos hidrófobo de la tapsigargina) y la tapsigargina activan una secreción dependiente de la dosis de IL-8 de la línea celular de monocitos THP-1. (Véase la Figura 2A). La presente invención, en algunas realizaciones, contempla la administración directa de tapsigargina y/o compuestos relacionados con tapsigargina. En otras realizaciones, la tapsigargina y/o los compuestos relacionados con tapsigargina se administran a través de un vehículo tal como cuentas (véase la Figura 2B, en donde se emplearon cuentas de butil sefarosa tratadas con tapsigargina) y liposomas (véase la Figura 2C, en donde se empleó tapsigargina encapsulada en liposomas catiónicos). Estos datos muestran que los compuestos relacionados con tapsigargina son capaces de activar una reacción inflamatoria potente. El tratamiento con tapsigargina también da como resultado la secreción de IL-12, IL-8, y TNF- α en una variedad de líneas de cáncer derivadas de pacientes. (Véase la Figura 3).

Ejemplo IV

Inmunización *in vivo* con extractos B16 tratados con tapsigargina

Este ejemplo demuestra que la inmunización con células tratadas con tapsigargina confiere protección contra el progreso del cáncer.

Se trató la línea de células de melanoma de ratón poco inmunogénica B16 con tapsigargina *in vitro* para que volverla pro-inflamatoria (es decir, capaz de secretar citoquinas de acuerdo con el Ejemplo III). Posteriormente, los ratones fueron inmunizados con células B16 tratadas con tapsigargina (después de que fueran lavadas, se cuantificaron, y se lisaron por congelación y descongelación para crear una solución de fragmentos de células) (B16 + TG; 500 μ g) y las células B16 no tratadas (B16) o el tampón salino como controles, tres veces, una vez cada dos semanas. Dos semanas después de la inmunización final, se implantaron a los ratones células de cáncer B16 vivas y se controló el progreso tumoral.

B16 + TG indujeron una respuesta inflamatoria transitoria en ratones C57B1/6 en el sitio de la inmunización. Esta respuesta no se observó en los grupos con solución salina o B16. Los ratones C57B1/6 mostraron un retraso en el progreso tumoral y una vida útil significativamente mejorada tras la inmunización con B16 + TG pero no después de las inyecciones con B16 o solución salina. (Véanse las Figuras 4A y 4B, respectivamente). Los datos muestran que los animales tratados vivían, como promedio, casi el doble de tiempo después de los injertos tumorales.

Un experimento similar usando ratones carentes de sistema inmunitario (Nu/Nu) demostró que B16 + TG (de nuevo, después de que las células fueran lavadas, cuantificadas, y lisadas por congelación y descongelación para crear una solución de fragmentos de células) fue ineficaz en la mejora de la supervivencia. La inmunización con células tratadas con tapsigargina de ratones carentes de sistema inmunitario demostró una inflamación significativa *in situ*, pero esto era ineficaz en el control del progreso del tumor. (Véanse la Figura 5A y la Figura 5B, respectivamente). Aunque no es necesario para la práctica de la presente invención, estos datos son consistentes con la hipótesis de que los ratones carentes de sistema inmunitario poseen una mutación genética que interfiere en el desarrollo tímico normal, inhibiendo de este modo la generación de linfocitos T funcionales.

Aunque no es necesario entender el mecanismo de una invención, se cree que los linfocitos T, en particular, el subconjunto citotóxico CD8+, juegan un papel en la destrucción tanto de tejidos neoplásicos como infectados por patógenos intracelulares. Tomados en conjunto, estos datos indican que las células tratadas con tapsigargina activan la inflamación, lo que a su vez conduce a la generación de una respuesta protectora de las células T de una manera similar a los coadyuvantes.

Ejemplo V

Memoria inmunoprotectora inducida por inyecciones de B16 + TG

Este ejemplo proporciona una realización en la que una inmunización con B16 + TG (es decir, células B16 tratadas con TG que fueron posteriormente lavadas, cuantificadas, y lisadas mediante congelación y descongelación para crear una solución de fragmentos de células) confiere protección a largo plazo contra el melanoma inyectado.

Se inmunizaron ratones C57B1/6 con B16 + TG de acuerdo con el Ejemplo VI y posteriormente se sensibilizaron con células de melanoma B16-F10 vivas. El día 0 y el día 116 los ratones inmunizados con B16 + TG no se desarrollaron un tumor de melanoma. (Véase la Figura 6). Los ratones de control que no habían recibido el extracto de B16 + TG demostraron tasas típicas de progreso del tumor.

Alternativamente, se co-inmunizó un plásmido de expresión de CD40L de ratón con extracto de B16 + TG. Cuando la inmunización se realizó mediante inyecciones intradérmicas se observó la represión completa del tumor el día 0. Cuando se realizó la inmunización utilizando inyecciones subcutáneas o intraperitoneales se observó una represión parcial del tumor el Día 0. Cuando los animales que recibieron una inyección intradérmica el Día 0 se sensibilizaron nuevamente el Día 116, sólo se observó una represión parcial del tumor. (Véase la Figura 7).

Estos datos demuestran que los ratones inmunizados con extractos de B16 tratados con TG pueden desarrollar inmunidad de larga duración contra el melanoma B16. En este experimento, el nivel de esta inmunidad, parece algo dependiente de la ruta de administración. Por ejemplo, las vacunas administradas por vía intraperitoneal o subcutánea no suprimen completamente el crecimiento del tumor después de la inyección de células de melanoma B16, ya sea en el Día 0 o el Día 116. (Véase la Figura 7). Sin embargo, las condiciones no han sido optimizadas.

En conclusión, estos datos muestran que B16 + TG puede proteger contra una nueva sensibilización a células cancerosas vivas a lo largo de al menos un período de tres meses (es decir, 116 días) después de las inmunizaciones y sensibilización iniciales. Estos datos también sugieren que los extractos de B16 + TG pueden inducir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF- α mediante células presentadoras de antígenos que son proclives a activar una respuesta inmunitaria transitoria específica de tumor adaptativa por células B y/o T para retrasar el crecimiento del tumor in vivo.

Ejemplo VI

Diferenciación de los monocitos inducida por Extractos de B16-TG

Este ejemplo presenta datos ilustrativos en cuanto a si las células tratadas tapsigargina son capaces de conducir la diferenciación de los monocitos a otros subtipos de células presentadoras de antígeno. Estudios previos han demostrado que ciertos agentes actúan sobre las células presentadoras de antígeno que dan como resultado la diferenciación en células dendríticas maduras. Hertz et al., "Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2" J. Immunol. 166:2444-2450 (2001). Aunque no es necesario entender el mecanismo de la invención, se cree que las células dendríticas son el tipo de célula principal responsable de determinar si se activa una respuesta inmunitaria adaptativa o la tolerancia inmunológica para cualquier antígeno dado en el organismo.

Se trataron monocitos indiferenciados, redondeados (Véase la Figura 8A) con o sin extractos de células HeLa tratados con tapsigargina durante 24 horas. A continuación se evaluaron los cambios en la morfología celular (es decir, por ejemplo, elongación, y/o aplanamiento celular inducidos). Los resultados indican que las células tratadas con tapsigargina inducen un cambio en la forma celular de monocitos de principalmente redondeada a plana y alargada. (Véase la Figura 8B, indicado por flechas de color negros). Este cambio de forma se cree indicativo del proceso de maduración para los monocitos indiferenciados que son generalmente de morfología redonda a células adherentes con procesos celulares largos típicos de los macrófagos o células dendríticas inmaduras.

Ejemplo VII

Reducción del tumor inducida por una Formulación liposomal de TG

Este ejemplo presenta datos que muestran que los liposomas que contienen tapsigargina reducen el progreso del tumor de una manera dependiente de la dosis.

Los liposomas catiónicos con un contenido total de lípidos de 50 mM que contienen cantidades crecientes de tapsigargina (0,0003, 0,003, y 0,03% en moles) se formularon mediante el método de película de lípido seguido de varios ciclos de extrusión. Kuntsfeld et. al., Journal of Investigative Dermatology, 120: 476 a 482 (2003). Los liposomas se formularon utilizando diversas concentraciones de tapsigargina, suficiente 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOPC) para llevar el total a 50% en moles y 50% en moles de 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (DOTAP) en cloroformo. Las películas lipídicas se generaron después de la evaporación en un evaporador rotatorio y se re-hidrataron en el tampón de sacarosa al 5% durante la noche. Los liposomas se extruyeron utilizando una membrana de extrusión 200 nM y se almacenaron bajo gas argón a 4°C hasta su uso. A cuatro grupos de dos ratones hembra C57B1/6 se les injertaron simultáneamente 1×10^5 células vivas de melanoma B16-F10 por vía subcutánea en el flanco izquierdo el día 0. A los ratones que recibieron tapsigargina encapsulada en liposomas se les inyectaron por vía intradérmica 50 μ l de cada formulación de liposomas que contenía tapsigargina después de la implantación del tumor los días 7, 8, 9, 14, 15, 16, 21, 22, y 23 en los sitios distales que se extienden desde la base de la cola al costado derecho y se controló el progreso del tumor.

A cuatro grupos de dos ratones hembra C57B1/6 se les injertaron simultáneamente 1×10^5 células vivas de melanoma B16-F10 por vía subcutánea en el flanco izquierdo el día 0. A los ratones que recibieron tpsigargina encapsulada en liposomas se les inyectaron por vía intradérmica 50 μ l de cada formulación de liposomas que contenía tpsigargina después de la implantación del tumor los días 7, 8, 9, 14, 15, 16, 21, 22, y 23 en los sitios distales que se extienden desde la base de la cola al costado derecho y se controló el progreso del tumor. Los datos indican que la tpsigargina encapsulada en liposomas es capaz de disminuir el progreso del tumor de una manera dependiente de la dosis. (Véase la Figura 9).

Ejemplo VIII

Sistemas promotores de NE- κ B inducidos por toxina

Este ejemplo presenta una realización de un sistema informador de alto rendimiento sensible a una toxina (es decir, marcador o etiqueta).

Un constructo de ADN transfectado estable que codifica un promotor NF- κ B que dirige la expresión de luciferasa de luciérnaga se integró en: i) una línea celular pre-monocítica humana THP-1; y ii) una línea celular pre-monocítica humana MonoMac-6. Brevemente, el ADN que codifica un elemento de respuesta NF- κ B concatamerizado aguas arriba del gen de luciferasa de luciérnaga [Ting et al., "RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis" EMBO J. Nov 15;15(22):6189-96(1996)] se subclonó en la cadena principal del vector pEAK8 (Edge Biosystems, Gaithersburg MD) mediante técnicas convencionales de biología molecular. Se realizaron electroporaciones utilizando 10 μ g de ADN y 700.000 células THP-1 o MonoMac6 utilizando un electroporador Biorad Gene Pulser II (BioRad, Hercules CA), electrocubetas de 0,4 cm y 200 V, 950 mF. Después de la electroporación, a las células se les permitió recuperarse durante dos días antes de la selección con 300 ng/ml de puomicina aminonucleósido (Sigma-Aldrich) para la generación de clones transfectados de manera estable. La expresión de luciferasa se cuantificó usando un luminómetro Top Count NXT (Perkin Elmer, Wellesley MA). Brevemente, se incubaron 50.000 células informadoras con las concentraciones indicadas de los mediadores de la inflamación que aparecen durante 18 horas en placas de color blanco de 96 pocillos antes de la cosecha y el análisis.

Clon A9 de THP-1

El reconocimiento del clon A9 derivado de THP-1 de los ligandos de TLR -3 Pam Cys (señalización a través de TLR2) y la flagelina bacteriana (señalización a través de TLR5), pero no el lipopolisacárido bacteriano (señalización a través de TLR4) se determinó mediante el control de la actividad NF- κ B en análisis automáticos en placa de color blanco de 96 pocillos durante la incubación con TG. (Véase la Figura 10A)

También se utilizaron concentraciones variables de tpsigargina en presencia o ausencia de células HeLa cultivadas en placa previamente. Estos resultados demostraron que el clon A9 reconoció células HeLa tratadas con tpsigargina a niveles sinérgicamente mayores que cualquiera de las células HeLa no tratadas o tpsigargina sola. (Véase la Figura 10B).

En conjunto, estos datos apoyan el uso del Clon A9 en la identificación de compuestos y/o factores novedosos que modulan la inflamación a través de TLR2.

Clon C5MonoMac-6

Se creó un segundo transfectante de constructo informador NF- κ B estable utilizando células MonoMac-6. En contraste con el Clon A9, clon C5 derivado de MonoMac-6 demostró un mejor reconocimiento de lipopolisacáridos bacterianos. El clone C5 también reconoció Pam3Cys, flagelina y células HeLa tratadas con tpsigargina. (Véase la Figura 11).

Ejemplo IX

Pérdida del cabello inducida por Tpsigargina

Este ejemplo presenta una realización en la que la tpsigargina (TG) se utiliza en una solución tópica para inducir la pérdida de cabello. Se prepararon soluciones de aplicación mediante friegas (etanol al 75%, ciclohexano al 22%, y dimetilsulfóxido al 3%) que contenían TG a diversas concentraciones (un control a 0, y las muestras de ensayo a 40 μ M, 1,2 mM y 40 mM). Las diversas soluciones se aplicaron tópicamente a diferentes ratones. A las altas concentraciones, se podía observar rápidamente inflamación inducida in situ (datos no mostrados). La inflamación el día 3 a la mayor concentración indujo mucha inflamación que evidenció que la concentración es inapropiada. A las concentraciones más bajas, se indujo alopecia /pérdida de cabello transitoria en el sitio de las friegas (datos no mostrados). La pérdida de cabello persistió durante semanas e incluso meses, con pérdida de cabello aún visible a

los 4,5 meses (18 semanas). En algunos animales, en la zona tratada, una vez completamente sin pelo en los animales tratados con TG (un tratamiento), empezaban a volver a crecer algunos pelos en el punto de 18 semanas. Por lo tanto, esta baja dosis (UM) de TG puede ser empleada (por ejemplo, en lociones) para inducir la pérdida del cabello o para su uso en otros productos depilatorios para aplicaciones médicas cosméticas y otras.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un agente anticanceroso que comprende
 - (a) exponer *ex vivo* una porción de células obtenidas a partir de una línea celular de cáncer o una porción de células tumorales obtenidas de un paciente a un agente seleccionado entre tapsigargina y tapsigargicina, con el fin de crear células tumorales tratadas;
 - (b) lisar dichas células tumorales tratadas para crear fragmentos de células, en donde dichos fragmentos son adecuados para generar un efecto terapéutico contra el cáncer.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (b) comprende adicionalmente la preparación de extractos de células tumorales de dichas células tumorales tratadas, y en donde dicho extractos son adecuados para generar un efecto terapéutico contra el cáncer.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicho extractos están libres de células.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho tratamiento de la etapa (a) es durante un tiempo entre 1 minuto y 30 minutos.
5. El método de la reivindicación 1, en donde dichas células tumorales se seleccionan del grupo que consiste en células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer cervical, células de cáncer de útero, células de cáncer pancreático, células de cáncer de colon, células de cáncer de pulmón y células de cáncer de hueso.
6. El método de la reivindicación 1, en donde dichas células tumorales son células de cáncer de piel.
7. El método de la reivindicación 1, en donde dichas células tumorales son células de linfoma.
8. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente comprende tapsigargina.
9. El método de la reivindicación 1, en donde dicho agente comprende tapsigargicina.
10. Un agente contra el cáncer producido por un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un paciente.
11. El agente contra el cáncer para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho tratamiento comprende adicionalmente introducir un constructo de expresión de CD40L en dicho paciente.
12. El agente contra el cáncer para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho tratamiento comprende una reducción del tamaño del tumor.

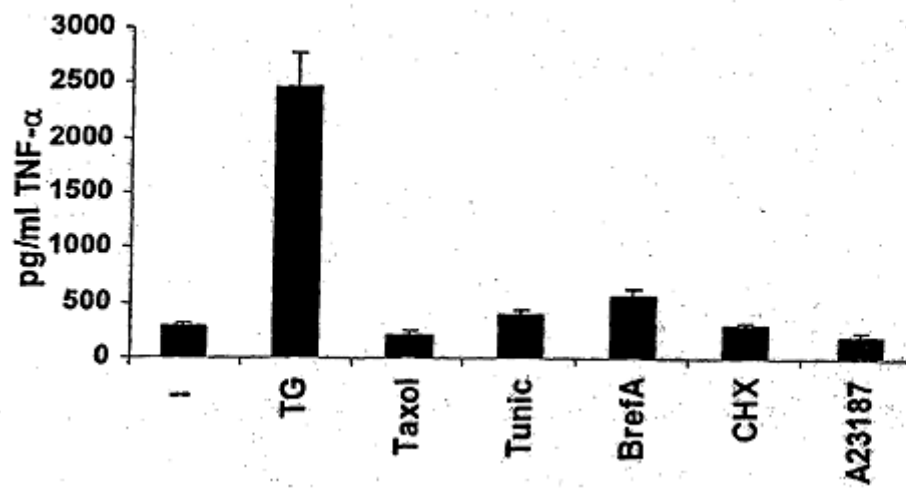


Figura 1

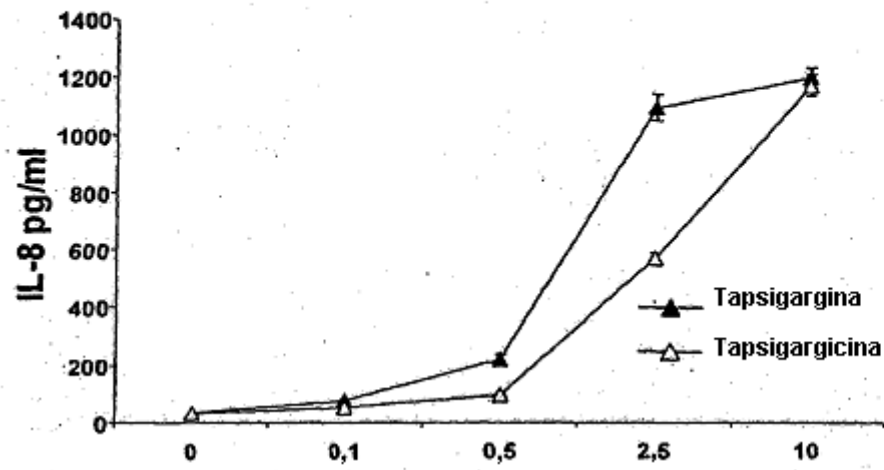


Figura 2A

**Cuentas de Butil Sefarosa Tratadas con TG
para Inducir Liberación IL-8 desde APC**

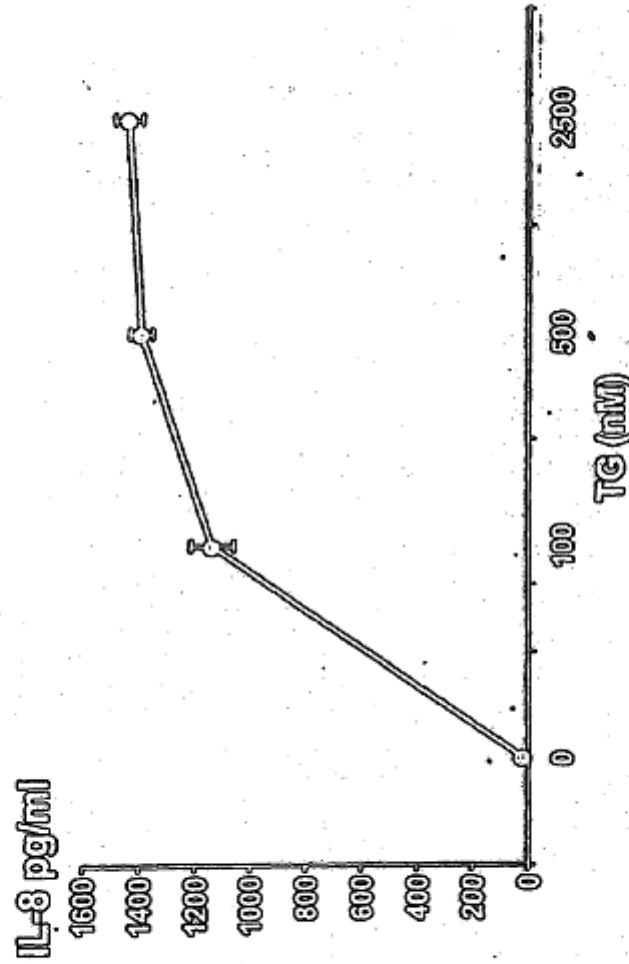


Figura 2B

La TG Encapsulada en Liposomas Catiónicos Induce la Liberación de IL-8 desde APC

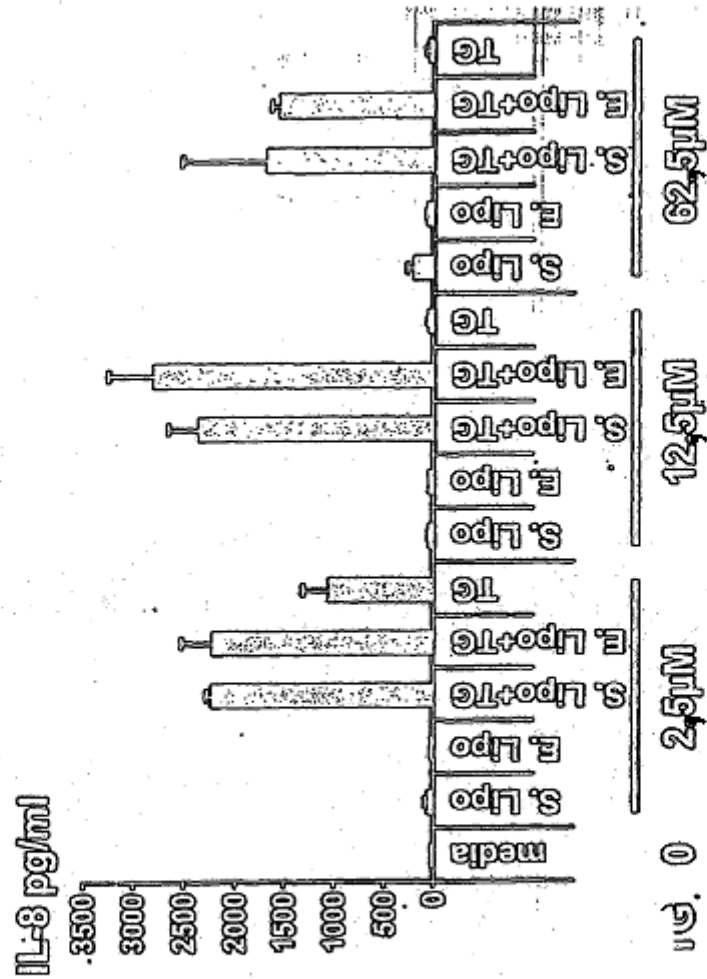
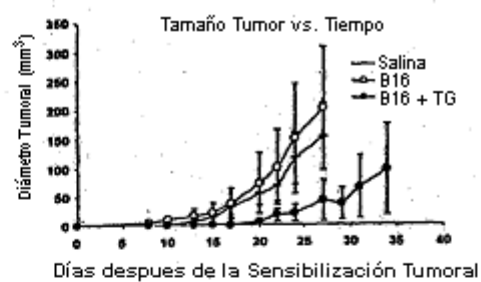


Figura 2C

Tipo de Cáncer o Tejido de Origen	Líneas que Inducen Liberación de Citoquinas Inflamatorias Significativa con Respecto al Tamaño de la Muestra
Mama	(2/2)
Colon	(5/6)
Endotelio	(1/1)
Carcinoma de Pulmón	(1/2)
Neuroblastoma	(1/1)
Osteosarcoma	(1/1)
Próstata	(3/3)

Figura 3

Panel A



Panel B

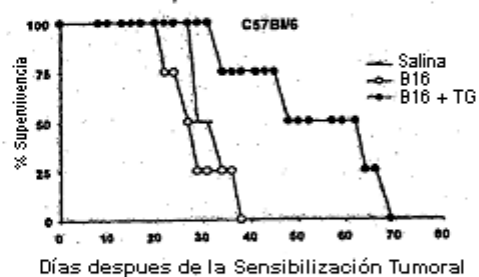


Figura 4

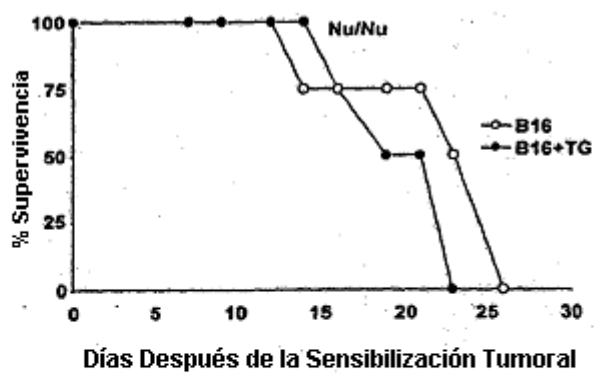
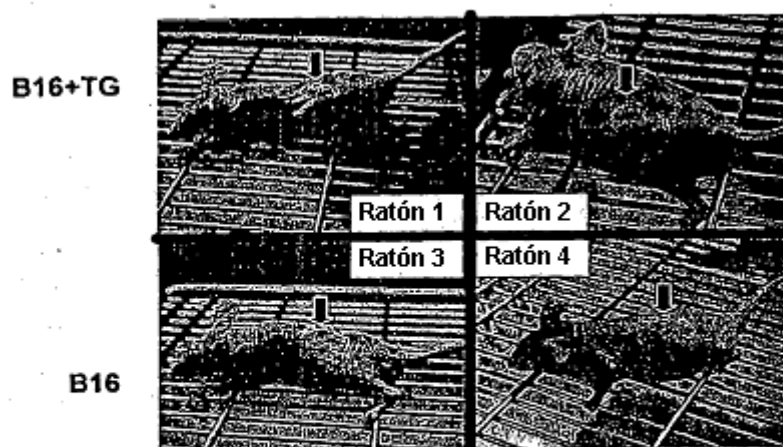


Figura 5

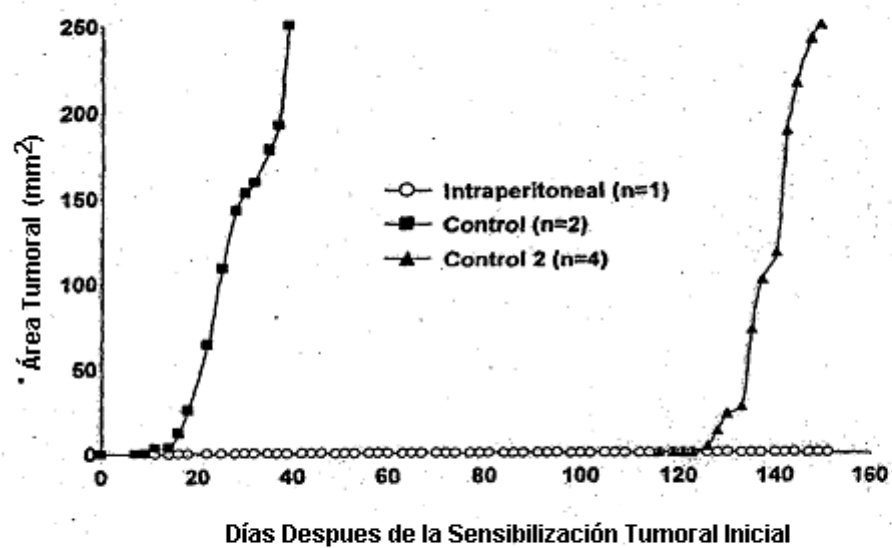


Figura 6

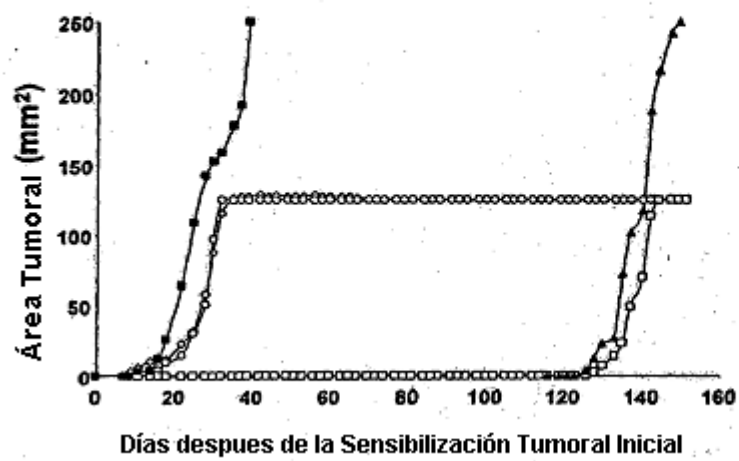
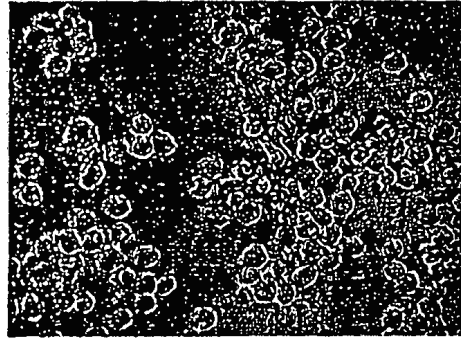


Figura 7

Panel A



Panel B

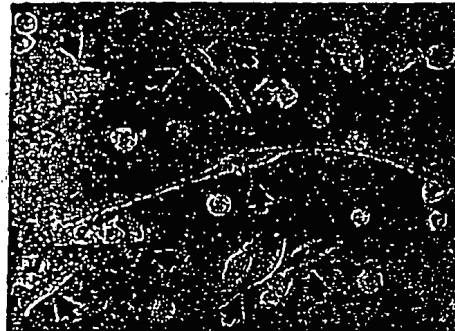


Figura 8

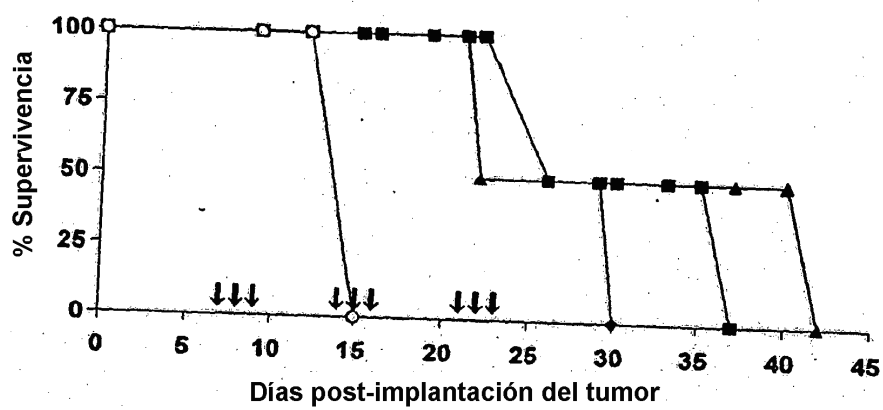
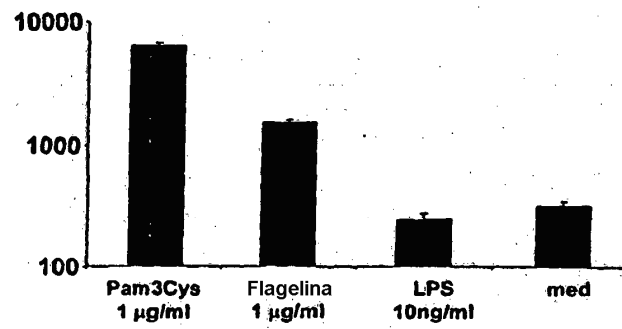


Figura 9

Panel A



Panel B

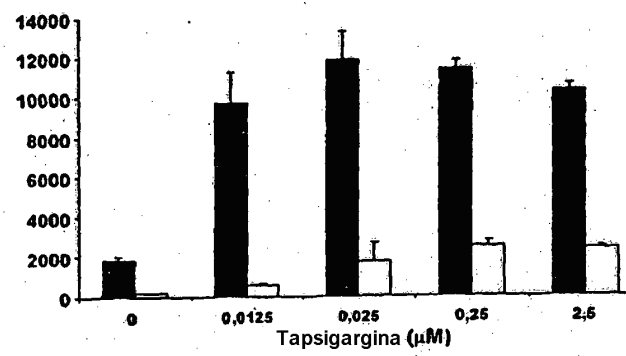


Figura 10

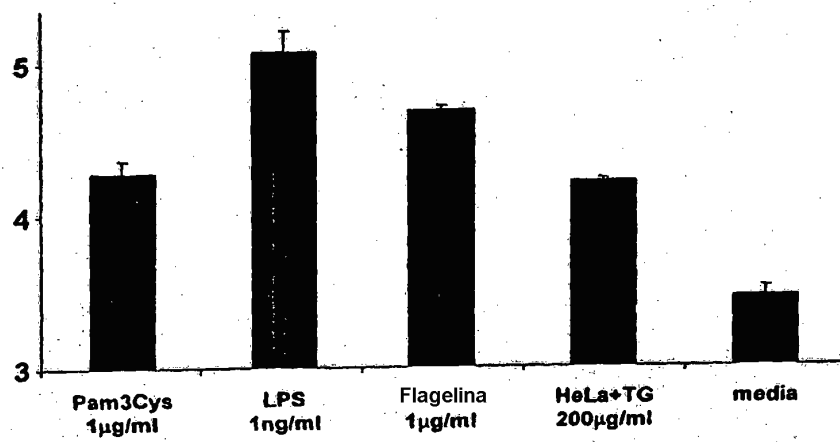


Figura 11

Secuencia de nucleótidos de CD40L:

ATGATAGAAACATACAGCCCAACCTTCCCCCAGATCCGTTGGCAACTGGACTTCCAGCGAGCATGAAGATTTTATGTATTACTTACTGT
 TTTCCCTTATCACCCAAATGATTGGATCTGTGCTTTTGTGCTTTTTCATAGAGATTGGATAAGGTGGAAGAGTAACCTTC
 ATGAAGATTTGTATTTCATAAATAAGCTAAGAGATGCAACAAGGAGAGGATCTTTATCCTTGTGAACCTGTGAGGAGATGAGAAGG
 CAATTTGAGACCTTGTCAAGGATATAACGTTAACAAGAGAGAAAAAGAAAACAGCTTTGAAATGCAAAAGAGGTGATGAGGATCC
 TCAAATTCAGCACACGTTGTAGCGAAGCCACAGTAATGCAGCATCCGTTCTACAGTGGGCCAAGAAAGGATATTATACCATGAAAA
 GCAACTTGGTAATGCTTGAAAATGGGAACAGCTGACGGTTAAAGAGAGAGGACTCTATTATGTCTACACTCAAGTCACCTTCTGCTCT
 AATCGGGAGCCTTCGAGTCAACGCCCATTCATCGTCGGCTCTGGCTGAAGCCCAAGCAGTGGATCTGAGAGAACTCTTACTCAAGCGGGC
 AATACCCACAGTTCCTCCAGCTTTGCGAGCAGCAGTCTGTTCACTTGGGGGAGTGTGTTGAATTACAAGCTGGTGCCTTCTGTGTTTG
 TCAACGTGACTGAAGCAAGCCAAGTGATCCACAGAGTTGGCTTCTCATCTTTTGGCTTACTCAAACTCTGA

Figura 12

[illegible]

Figura 13

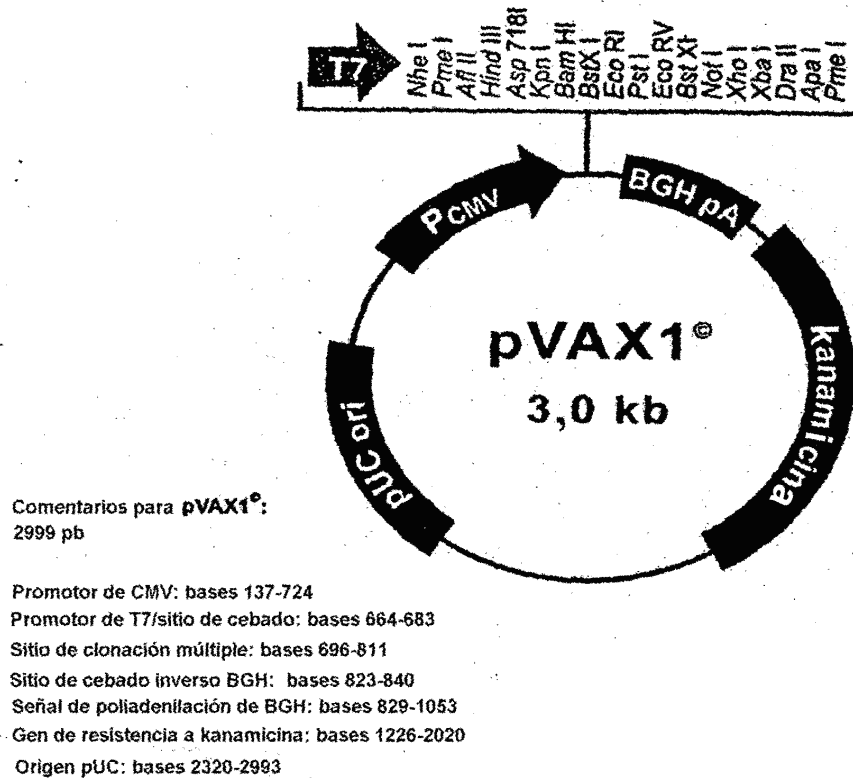


Figura 14