

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 105**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2003 E 09175526 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2147682**

54 Título: **Vacunación con células inmuno-aisladas que producen un inmunomodulador**

30 Prioridad:

**17.06.2002 EP 02013249**

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

**17.02.2016**

73 Titular/es:

**MAXIVAX SA (100.0%)  
RUE MASSOT 7  
1206 GENÈVE, CH**

72 Inventor/es:

**MACH, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 560 105 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

Vacunación con células inmuno-aisladas que producen un inmunomodulador

La presente invención se refiere a un nuevo método para proporcionar un coadyuvante activo o inmunomodulador, por ejemplo en el contexto de la inmunización en personas o en animales. De acuerdo con este método, un inmunomodulador, por ejemplo el GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos), es liberado de células encapsuladas inmunoprotegidas que producen esta proteína. Este sistema está particularmente bien adaptado a la vacunación por cuanto proporciona el inmunomodulador en una forma activa, de una manera continuada no inmunogénica, en la vecindad inmediata del antígeno o de los antígenos de la vacuna. La estrategia de la invención está perfectamente adaptada tanto para la terapia del cáncer como para la vacunación contra agentes infecciosos.

**Antecedentes de la invención**

En el campo de la vacunación, las vacunas de primera generación comprendían tan solo el antígeno contra el que se deseaba una respuesta inmunitaria. Sin embargo, como en la mayor parte de los casos la presencia de un solo antígeno no es más que débilmente eficaz, se desarrolló una segunda generación de vacunas en la que la composición de vacunación incluye uno o más coadyuvantes como inmunomoduladores para potenciar esta respuesta inmunitaria.

Se han publicado varias técnicas diferentes para proporcionar el coadyuvante en el sitio de vacunación, dependiendo del contexto de la inmunización.

En el contexto de las vacunas basadas en un antígeno (al contrario que en las vacunas basadas en células), una técnica ampliamente aplicable usada para proporcionar el coadyuvante necesario es simplemente combinar el antígeno con el coadyuvante en la composición de vacunación. La composición resultante es administrada directamente al sujeto, suministrando así el antígeno y el coadyuvante de una manera simultánea y co-localizada.

Sin embargo, este sencillo método no puede ser usado en todas las versiones de vacunación. Por ejemplo, en la mayor parte de los cánceres, los antígenos útiles son frecuentemente desconocidos. Este es el caso para la mayoría de los cánceres comunes en las personas, tales como el cáncer de pulmón, colon, estómago, linfoma o cerebro. Por consiguiente, se necesitan nuevas estrategias de inmunización tales como el método basado en células. La estrategia de inmunización que implica a vacunas basadas en células, en las que el antígeno o los antígenos contra los cuales se requiere una respuesta inmunitaria es producido por células completas implantadas en un sujeto, necesita el uso de técnicas más elaboradas para asegurar el suministro eficiente del coadyuvante.

Una solución en este tipo de contexto es inyectar directamente el inmunomodulador en el sitio de la vacunación. El inmunomodulador puede ser "desnudo" o alternativamente puede ser administrado en una formulación de liberación lenta usando microesferas liposómicas pegiladas (solicitud de patente internacional WO 98/33520, presentada por Bynstry). Esta estrategia está sin embargo limitada por dificultades técnicas y bioquímicas, así como por cierto grado de liberación sistémica que induce toxicidades potenciales.

Un método alternativo que ha sido propuesto para salvar los problemas que surgen de la técnica de inyección directa es el uso de "células circunstantes" para producir localmente los inmunomoduladores. De acuerdo con este método, se implantan células que producen el coadyuvante en las proximidades de la fuente de antígeno, proporcionando así una eficaz liberación local de coadyuvante en el sitio de la vacuna. La eficacia de este método ha sido demostrada en ratones en los que la vacuna es una mezcla de fibroblastos secretores de GM-CSF y células tumorales irradiadas (Aruga et al., *Cancer Research*, 57, 1997, 3230-3237).

Sin embargo, ni siquiera este método está totalmente libre de inconvenientes. En realidad, para la inmunización humana, es sabido que se requieren inmunizaciones múltiples. Como las células circunstantes singénicas no son fácilmente disponibles, se usan células alogénicas en la inmensa mayoría de los casos. En consecuencia, después de la primera inyección, las "células circunstantes" son reconocidas por el sistema inmunitario del hospedador (alorreconocimiento) y son rechazadas, impidiendo así la posterior producción de inmunomodulador. Además, el alorreconocimiento de las "células circunstantes" pone en peligro la respuesta inmunitaria deseada contra la sustancia antigénica de la vacuna.

Con el fin de evitar este alorreconocimiento, el trabajo de Borrello et al. (Human Gene Therapy, 1999) ha descrito una estrategia en la que las células suministradoras del GM-CSF son una línea celular, la K-562, que no logra expresar antígenos HLA clase I o II, disminuyendo potencialmente la magnitud de las alorrespuestas generadas en inmunizaciones repetidas. Las células K-562, modificadas para segregar GM-CSF, no expresan moléculas del MHC en su superficie. Son HLA negativas. Sin embargo estas células son células cancerosas humanas y son altamente sensibles a potentes mecanismos de rechazo que ocurren sin la intervención de las proteínas HLA de clase I o II. Se sabe que al menos dos subtipos de linfocitos conocidos como células T  $\gamma\delta$  o linfocitos asesinos naturales (NK: Natural Killer) atacan y destruyen a las células extrañas por mecanismos independientes del HLA de clase I o II. En relación con la línea de células K-562, se sabe que es muy sensible a las células NK y también a las células T  $\gamma\delta$  (J.

Immunotherapy 2000 23: 536-548 Schilbach K. et al.) y por tanto se usan como control o testigo positivo para la actividad de las células NK.

Es por tanto probable que las células circunstantes K-562 inyectadas en el sitio de la vacuna sean destruidas eficaz y rápidamente por mecanismos citotóxicos no dependientes del MHC. Esto puede muy bien reducir de forma significativa la liberación del inmunomodulador.

Además de ser muy sensibles a la destrucción rápida por las células NK, las células K-562 pueden expresar MHC de clase I al exponerlas a interferón  $\gamma$ . Es posible que tal citocina pudiera estar presente o ser liberada en el sitio de vacunación durante la primera inmunización o después de inmunizaciones repetidas. Tal regulación por exceso del MHC de clase I conducirá también a una rápida destrucción de la célula a través de la inmunidad celular clásica.

Por estas razones, el uso de células tales como las K-562 en la vacunación trae consigo numerosos inconvenientes.

Otra solución, ampliamente usada en el contexto de las vacunas basadas en células, por ejemplo en la terapia del cáncer, es acoplar la producción de antígeno y la liberación de inmunomodulador, modificando por ingeniería genética la célula que es la fuente del antígeno, para que suministre también el inmunomodulador. Por ejemplo, en las vacunas del cáncer, la fuente de antígeno es normalmente una célula tumoral entera. Esta célula puede modificarse por ingeniería genética, por ejemplo mediante transfección, para que produzca al mismo tiempo el coadyuvante necesario. Se han publicado respuestas inmunitarias antitumorales potentes, específicas y prolongadas en el modelo de ratones usando esta técnica, que se apoya en vectores retrovirales como método de transferencia de genes para construir células tumorales que suministren GM-CSF.

En vista de los favorables resultados obtenidos en el modelo con ratones, los primeros experimentos con personas utilizaron la misma estrategia (Simons JW. et al. 1997 *Cancer Research*, 43 (11); Soiffer R. et al. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13141; Simons et al. 1999, *Cancer Research*, 59 (20)). Sin embargo, la técnica demostró ser muy laboriosa y requerir mucho tiempo, porque las células del paciente, recolectadas quirúrgicamente, necesitan ser expandidas *in vitro* para la infección retroviral, impidiendo un uso amplio del método.

Por tanto se ha propuesto el uso de otro vector viral para infectar las células tumorales para soslayar estas dificultades. Virus contruidos por ingeniería genética como los adenovirus pueden infectar las células tumorales muy eficazmente y con procedimientos mucho más simples. Dado que los adenovirus pueden infectar células no en división, las células tumorales recolectadas pueden ser infectadas inmediatamente, evitando la larga y tediosa etapa de cultivo primario que se requiere cuando se usan vectores retrovirales.

El principal problema de los nuevos virus ensayados es que, en la mayor parte de los casos, algunas proteínas virales serán expresadas en las células tumorales después de la infección. Estas proteínas virales son reconocidas con intensidad por el sistema inmunitario como agentes infecciosos extraños. Por consiguiente, el objetivo inicial de montar una respuesta inmunitaria contra antígenos tumorales débiles es desviado hacia una proteína viral. Esto tiene por resultado enmascarar la respuesta inmunitaria antitumoral. También prepara al receptor contra la subsiguiente inmunización que aumentará más la destrucción de las células inyectadas. Estos dos mecanismos disminuirán muy probablemente la eficacia del esquema de inmunización antitumoral.

Así pues, mientras que el uso de células tumorales autólogas construidas por ingeniería genética como fuente combinada de antígeno y coadyuvante minimiza *a priori* el riesgo de una respuesta inmunitaria no deseable, la etapa de la propia infección viral da lugar a problemas significativos.

Con el fin de limitar los problemas que surgen de la infección viral de células autólogas, se han desarrollado nuevas estrategias que no requieren células del paciente. De acuerdo con estas técnicas, la fuente de antígeno es proporcionada por líneas de células derivadas de otros pacientes con un tipo de cáncer similar. El paciente es después inmunizado con inyecciones repetidas de células tumorales alogénicas (de otra persona), secretoras de GM-CSF irradiadas.

Esta estrategia está basada en la suposición de que la línea de células usada para la inmunización comparte algunos antígenos relevantes con el propio tumor del paciente y que esos antígenos comunes permitirán el desarrollo de una respuesta inmunitaria que reconocerá las células tumorales del paciente y las destruirá. Se ha publicado un ensayo clínico en fase I que usa tal estrategia (Jaffee E. et al. 2001 *Journal of Clinical Oncology*, 19(1)).

Sin embargo, el porcentaje de pacientes que muestran una respuesta inmunitaria es mucho más bajo que en informes previos usando células autólogas que segregan el mismo inmunomodulador (GM-CSF) (Soiffer et al.).

WO 99/38954 se refiere a la inmunoterapia del cáncer que se basa en la premisa de que la incapacidad del sistema inmune para rechazar los tumores que surgen espontáneamente está relacionada con la incapacidad del sistema inmune para responder apropiadamente a los antígenos tumorales. Se describe una línea celular circunstante universal que es humana y, o bien carece de forma natural de antígenos principales de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y de antígenos principales de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) o está modificada para que carezca de antígenos MHC-I y antígenos MHC-II. Además, la línea celular circunstante universal es modificada por la introducción de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el factor

estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) operativamente unido a un promotor y expresa al menos aproximadamente 500ng GM-CSF/10<sup>6</sup> células/24 horas.

5 Cirone. P. et al (2001) Current Pharmaceutical Biotechnology, 2, 269-277 proporciona una revisión de inmuno-aislamiento en oncología. El principio del enfoque de inmuno-aislamiento es una línea celular no autóloga modificada genéticamente para secretar un producto recombinante con potencial para la supresión de tumores.

Hasta ahora no se ha publicado ninguna técnica que proporcione ni una fuente constante de inmunomodulador ni una respuesta inmunitaria eficiente, siendo al mismo tiempo sustancialmente libre de interacciones indeseables con el sistema inmunitario natural o adaptativo.

10 La presente invención proporciona un nuevo método que soslaya los inconvenientes asociados con las estrategias anteriores. La invención se basa en el inmunoaislamiento de células que producen coadyuvante mediante una barrera física tal como una cápsula.

15 La presente invención proporciona un protocolo general para la vacunación, llamado "Maxi-Vax", caracterizado por el suministro, en una estrecha proximidad, de antígenos de células vivas modificadas por ingeniería genética para que segreguen la citocina inmunoactivadora GM-CSF, estando estas células inmunoprotegidas por macro- o micro-encapsulación con el fin de mantener un suministro del activador inmunológico prolongado *in situ*.

Un caso particular de la invención utiliza la macroencapsulación de células en cápsulas de PES de fibra hueca, pero hay otras formas de encapsulación, dentro de dispositivos o dentro de matrices de gel, que están incluidas en la invención.

20 También se describe el uso de células cancerosas como antígeno, con el propósito de inmunizar frente a antígenos específicos del cáncer y establecer una respuesta inmunitaria sistémica protectora anti-célula tumoral. Este último caso se denomina "Onco-Maxi-Vax".

Otro caso particular de la invención se aplica a la vacunación contra agentes infecciosos tales como virus (entre los que se incluyen el HIV y el virus de la hepatitis C).

### Definiciones

25 En el contexto de la presente solicitud, los términos que siguen se definen de la manera siguiente:

- Un **inmunomodulador** o un **agente inmunomodulador** es un compuesto o una composición que puede potenciar, amplificar o reducir una respuesta inmunitaria contra un antígeno o un inmunógeno.
- Un agente **inmunoestimulador** o un **inmunoactivador** es un inmunomodulador que potencia o amplifica específicamente la respuesta inmunitaria contra un antígeno o un inmunógeno. En el contexto de la presente invención, la expresión "agente inmunostimulador" o "inmunoactivador" se usa como sinónimo del término "coadyuvante".
- Se considera que las células son **inmunoaisladas** si, cuando se introducen en un hospedador, están protegidas físicamente contra la respuesta inmunitaria del hospedador, esto es, no hay una respuesta inmunitaria adquirida o natural significativa contra ningún componente de la célula, incluyendo los antígenos de la superficie de la célula, proteínas segregadas, etc., siempre y cuando no haya contacto físico entre las células y los efectores del sistema inmunitario. En consecuencia, no se observa en el organismo hospedador ningún anticuerpo ni respuesta inmunitaria contra la célula mediada por células.

En consecuencia, las células inmunoaisladas no son atacadas ni destruidas por la respuesta inmunitaria del hospedador, porque son indetectables por el sistema humano, que previene cualquier respuesta inmunitaria contra él, y porque están protegidas físicamente contra cualquier respuesta inmunitaria.

- La **encapsulación** es un medio particular de inmunoaislar células en un dispositivo que comprende una cápsula, por ejemplo de un material plástico, que es no inmunógeno para el organismo hospedador. Los polímeros preferidos para la cápsula son las fibras huecas de polietersulfona (PES) termoplástica (diámetro externo: 720 µm; diámetro interno: 524 µm, valores del peso molecular de corte (*cut off*): 32 y 80 kDa; Akzo Nobel Faster AG, Wupperthal, Alemania) y polímero AN-69 (copolímero aniónico de acrilonitrilo y metalisulfonato sódico, Hospal R&D Int, Meyzieu, Francia). Las cápsulas pueden tener varias formas y tamaños.

La presente invención se refiere a células encapsuladas que producen y segregan el inmunomodulador GM-CSF, para su uso en terapia y en vacunación (preferiblemente con células cancerosas). Las células encapsuladas son modificadas por ingeniería genética para que produzcan el inmunomodulador. Se refiere también a composiciones farmacéuticas, vacunas y *kits* que pueden ser usados en este contexto. Finalmente, se refiere a procedimientos para la vacunación o el tratamiento de pacientes.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a células que producen un agente inmunomodulador y que están físicamente inmunoaisladas. El agente inmunomodulador producido es GM-CSF.

En el contexto de la terapia del cáncer, el GM-CSF ha sido identificado como la citocina más potente para activar la inmunidad antitumoral sistémica (Dranoff et al, 1993).

5 Con el fin de inducir una respuesta inmunitaria adecuada, puede ser muy ventajoso combinar varios agentes inmunomoduladores para estimular rutas diferentes. Una combinación preferida es la asociación de GM-CSF y FL. Otras combinaciones de 2 o más agentes inmunomoduladores se contemplan también en la presente solicitud.

10 Aunque el papel principal de una célula inmunoaislada de la invención es producir un agente inmunomodulador, puede desempeñar otras funciones adicionales. Por ejemplo juega un papel en la detección de la magnitud de la localización de la respuesta inmunitaria esperada. Otra de las principales funciones adicionales es proporcionar el agente antigénico. De acuerdo con esta variante, la misma célula puede producir tanto el agente antigénico que dispara la respuesta y el agente inmunoestimulador que potencia la respuesta. Esto es particularmente ventajoso en el caso de la vacunación basada en un antígeno, o la vacunación basada en células en donde los antígenos son segregados o liberados desde la membrana de la célula. Este método asegura que los agentes antigénicos y los agentes inmunoestimuladores están co-localizados.

15 En el caso de la inmunización contra el cáncer, las células inmunoaisladas de la invención se eligen posiblemente entre células cancerosas que expresan TAA (antígenos asociados a tumores), que preferentemente son específicos del linaje y específicos del tumor.

Como las células de la invención son inmunoaisladas, el agente inmunomodulador producido es preferentemente soluble para que sea segregado y liberado. Otro tanto es el caso para los agentes antigénicos como el TAA.

20 De acuerdo con una variante particularmente preferida, la fuente de inmunomodulador, esto es, las células inmunoaisladas de la invención, son disociadas de la fuente de agente antigénico. Por ejemplo, de acuerdo con esta variante, una primera célula o grupo de células constituye la fuente de antígeno y una segunda célula o grupo de células inmunoaisladas constituye la fuente de coadyuvante.

25 Una forma preferida de inmunoaislar células es proporcionar una barrera física que las "oculta" del sistema inmunitario general. Este objetivo puede conseguirse mediante un dispositivo de barrera. Se dispone de diferentes dispositivos de barrera, en particular microcápsulas y macrocápsulas. Las acciones de encerrar una célula o una población de células en tal barrera se denominan en el presente texto como microencapsulación y macroencapsulación, respectivamente.

30 El inmunoaislamiento obvia las importantes desventajas asociadas con la implantación de células libres. De hecho, el uso de células libres requiere generalmente fármacos inmunosupresores con el fin de protegerlas contra el sistema inmunitario del hospedador. Bloqueando mecánicamente los ataques inmunológicos, los dispositivos de barrera alrededor de células injertadas soslayan la necesidad de una terapia inmunosupresora. Además, las células pueden ser recuperadas fácilmente después de un rato, si es necesario. Esta última propiedad permite una liberación conmutable del agente inmunomodulador. Recuperando el dispositivo, la liberación del agente se detiene, lo que evita la presencia no deseada de una molécula después del final del proceso de inmunización. Las cápsulas de la invención pueden ser construidas específicamente para que faciliten su retirada, por ejemplo mediante la incorporación de una cuerda para facilitar su eliminación.

35 El inmunoaislamiento soslaya también los importantes inconvenientes asociados con el uso de células HLA-negativas tales como la línea de células K-562, que no puede expresar antígenos HLA de clase I o II. Dado que las células encapsuladas están totalmente protegidas contra el sistema inmunitario, no son destruidas por la inmunidad celular o innata, mientras que las células K-562 están implicadas en el rechazo por inmunidad innata. La capacidad de las células encapsuladas para sobrevivir, para segregar proteína durante un periodo de tiempo prolongado y para permitir inmunizaciones múltiples, está directamente unida a la barrera física de la cápsula. Además, no es probable que la cuantía de la liberación de GM-CSF en el paciente después de implantar la cápsula difiera de un individuo a otro, dependiendo de su inmunidad innata o de su inmunosupresión. En cambio, es probable que la estabilidad de la liberación de GM-CSF varíe significativamente no sólo en cualquier paciente dado en la primera inmunización y en las siguientes, sino también de un paciente a otro, con la inyección de células K-562 secretoras de GM-CSF.

La propiedad principal del dispositivo de barrera es separar a las células vivas del sistema inmunitario del hospedador por medio de una membrana sintética, permeable selectivamente, no-inmunógena.

40 Las células de la invención son células vivas y preferentemente proporcionan el agente inmunomodulador escogido sobre una base de largo plazo. Por ejemplo, los resultados experimentales indicaron que las células encapsuladas, modificadas por ingeniería genética para que segreguen GM-CSF, sí que liberan GM-CSF fuera de la cápsula durante al menos quince días. Con este propósito, han de estar dotadas de todos los factores necesarios para su supervivencia, su crecimiento y la producción del inmunomodulador de interés. Con el fin de permitir el intercambio libre de nutrientes, proteínas, oxígeno y sustancias bioterapéuticas entre el exterior y el interior, el dispositivo es preferentemente permeable selectivamente. Las moléculas pequeñas pueden pasar por los poros, especialmente las moléculas necesarias para la supervivencia de las células, mientras que las sustancias de peso molecular elevado, tales como los inmunocitos o los anticuerpos, son excluidas. Además excluye las células inflamatorias y de esta forma protege a las células encapsuladas del rechazo de tejido.

En cambio, los agentes inmunomoduladores producidos por las células de la invención pueden ser suministrados a través de los poros al medio exterior. El diámetro de los poros se elige preferentemente en un intervalo tal que se les permita cruzar la barrera a las moléculas pequeñas o proteínas e inmunomoduladores, y no así a las mayores, como las inmunoglobulinas, con el fin de que el dispositivo conserve su propiedad inmunoprotectora.

- 5 Ya se han realizado ensayos clínicos que demuestran que tal inmunoaislamiento, usando cápsulas, es muy eficaz, permitiendo la supervivencia de las células no sólo alogénicas sino también xenogénicas (de otras especies) durante muchos meses sin rechazo inmunitario. La eficacia del inmunoaislamiento físico mediante una cápsula ha sido validada por anteriores ensayos clínicos.

10 La macroencapsulación hace uso de macrocápsulas preformadas, unidades inicialmente vacías que se cargan con una matriz y todas las células que se necesitan para el tratamiento. La matriz es preferentemente un polímero, por ejemplo poli(alcohol vinílico) o un biopolímero como el alginato. La matriz asegura una buena ordenación de las células dentro de la cápsula, concretamente una distribución homogénea, y previene la aglutinación en las paredes. Las macrocápsulas son más duraderas y robustas que las microcápsulas, pueden contener refuerzos internos, pueden ser ensayadas en cuanto a la integridad del sellado antes de la implantación, y pueden ser diseñadas para que sean recargables en el cuerpo. También pueden recuperarse fácilmente.

Los polímeros preferidos para la cápsula son las fibras huecas de polietersulfona (PES) termoplástica (diámetro externo: 720 µm; diámetro interno: 524 µm, valores de corte de peso molecular: 32 y 80 kDa; Akzo Nobel Faster AG, Wupperthal, Alemania) y polímero AN-69 (copolímero aniónico de acrilonitrilo y metilsulfonato sódico, Hospal R&D Int, Meyzieu, Francia).

- 20 Las macrocápsulas pueden tener varios tamaños en el intervalo de unos cuantos micrómetros a tres o cuatro centímetros. Dependiendo del tamaño de la cápsula y del tamaño de las células, pueden cargarse tantas como 200.000 células en un dispositivo de 1 cm.

25 Los dispositivos de la invención son macrocápsulas. De acuerdo con la presente solicitud, las células de la invención producen un agente inmunomodulador. O bien las células producen naturalmente el agente, o este objetivo se logra modificando las células. En un caso preferido, las células son modificadas genéticamente para que expresen el agente inmunomodulador. Esto es particularmente conveniente por muchas razones.

30 Modificando una célula que normalmente no produce el agente inmunomodulador, el uso de células de la invención no está limitado a aquellas que lo producen naturalmente. Es particularmente ventajoso que los agentes no estén limitados a los de origen natural. Como se sabe que las proteínas mutadas a veces ejercen actividades mejoradas, es muy ventajoso usar esta versión modificada de la proteína en vez de la de tipo silvestre. También es a veces conveniente clonar la versión soluble de una proteína membranosa, con el fin de lograr su secreción.

35 Además, modificando genéticamente las células de la invención, es también posible controlar el nivel de expresión del agente inmunomodulador. Una situación particularmente atractiva es la sobreexpresión del agente clonando su secuencia bajo el control de un promotor del que se sabe que es muy fuerte en la célula usada. Las células modificadas se convierten en factorías modificadas por ingeniería genética que producen altos niveles de agente inmunomodulador. El promotor puede escogerse de acuerdo con su actividad, de forma que tenga un nivel de expresión de inmunomodulador controlado. De acuerdo con otra realización, pueden usarse células que contengan naturalmente el gen del agente inmunomodulador, siendo dicho gen transcripcionalmente silencioso en esa célula particular. La transcripción puede ser activada por inserción de secuencias reguladoras apropiadas, por ejemplo por recombinación homóloga. También pueden usarse secuencias reguladoras inducibles que responden a estímulos específicos tales como sustancias, la luz, etc.

45 De acuerdo con la invención, las células secretoras de agente inmunomodulador segregan más de 10 ng/10<sup>6</sup> células/24 horas de agente inmunomodulador. Las células de la invención preferidas segregan una cantidad de agente inmunomodulador igual o superior a 100 ng/10<sup>6</sup> células/24 horas, preferentemente más de 500 ng/10<sup>6</sup> células/24 horas. Si es necesario, pueden implantarse varias cápsulas al mismo tiempo.

En consecuencia, una célula de la invención segrega más de 10 x 10<sup>-15</sup> g de agente inmunomodulador cada 24 horas, preferentemente más de 100 x 10<sup>-15</sup> g/24 horas de agente inmunomodulador. Una célula de la invención segrega por ejemplo entre 80 y 960 x 10<sup>-15</sup> g/24 horas, preferentemente más de 500 x 10<sup>-15</sup> g/24 horas de agente inmunomodulador.

50 En lo concerniente a la mejor forma de modificar genéticamente las células de la invención, hay métodos y protocolos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos particularmente preferidos hacen uso de plásmidos construidos por ingeniería genética introducidos por transfección y virus introducidos por infección. Los retrovirus están bien adaptados en el contexto de la presente invención porque pueden ser modificados por ingeniería genética para introducir un gen que codifica el agente inmunomodulador en el genoma de la célula hospedadora.

55 Como se mencionó anteriormente, las células de la invención no están limitadas a las células que producen de forma natural un agente inmunomodulador de interés. Puede usarse toda clase de células, y en particular se prefieren células que sean fáciles de transducir o de transfectar, y de cultivar y propagar. No es necesario usar células tumo-

rales como productor de inmunomodulador *circunstante*. Basándose en la bibliografía médica, pueden usarse diferentes tipos de célula para producir por ejemplo citocinas. Estas incluyen fibroblastos no tumorales inmortalizados, mioblastos o células tumorales. Las células de la invención son ventajosamente células endoteliales o fibroblastos.

5 Las células particularmente preferidas son en general líneas de células inmortales. Así es posible modificar genéticamente una línea de células solo una vez y usar células a partir de la misma para todas las aplicaciones de la presente invención. Como las células son inmunoaisladas, no están en peligro ante el sistema inmunitario del hospedador, pero tampoco ponen en peligro a las otras células vecinas.

10 Otra ventaja particularmente interesante es que las células no son necesariamente autólogas con respecto al hospedador. Es más fácil emplear células alogénicas o heterólogas, también puede ser ventajoso usar células animales no humanas, sin perjuicio gracias al dispositivo de barrera.

El inmunoaislamiento de las células es por tanto más ventajoso que en los sistemas anteriores porque las fuentes de agente inmunomodulador pueden considerarse como "universales" y no limitadas a un único individuo.

15 Las células de la invención son vivas. Esto asegura que el inmunomodulador es producido de una manera continua, durante al menos varios días e incluso más, si es necesario. En experimentos previos utilizando la encapsulación, células encapsuladas construidas para segregar una proteína han sido implantadas en pacientes durante semanas o meses. Esta liberación de duración prolongada resuelve el problema común de la corta vida mitad de los inmunomoduladores.

20 De acuerdo con un programa de inmunización preferido, las células de la invención se implantan durante algunos días, preferentemente menos de 12 días, por ejemplo entre 4 y 10 días, por ejemplo entre 5 y 7 días. La implantación de células encapsuladas por un periodo de tiempo tan breve no dará lugar a una acusada fibrosis, inducida por la liberación del agente inmunomodulador. La inflamación, en el sitio de la vacunación, alrededor de la cápsula, no inducirá un descenso de la viabilidad de las células dentro de la cápsula, y por tanto no impedirá la producción y liberación de agente inmunomodulador en ese marco de tiempo.

25 Preferentemente, la cápsula que contiene las células es irradiada, por ejemplo con rayos X, antes de la implantación. En primer lugar, esta irradiación asegura que, incluso aunque tenga lugar la rotura de la cápsula, las células encerradas no son capaces de propagarse. En segundo lugar, esta irradiación asegura que la secreción del agente inmunomodulador se detendrá después de aproximadamente 10 días, debido a la muerte celular inducida por la irradiación. Esto puede ser ventajoso si el agente inmunomodulador segregado generase una respuesta inflamatoria violenta. Específicamente, la implantación subcutánea de células secretoras de GM-CSF, encapsuladas o no, podría inducir necrosis cutánea si se implantan durante un periodo de más de 15 días a un mes. La irradiación de la cápsula o de las células antes de la implantación no impide la subsiguiente recuperación de la cápsula.

En una realización, se usan células de la invención en el contexto de la terapia del cáncer. Este producto ha sido denominado "Onco-Maxi Vax". El Onco-Maxi-Vax es un producto terapéutico (vacuna) hecho de dos componentes que están físicamente en estrecha proximidad durante la inmunización.

35 El primer componente del sistema Onco-Maxi-Vax es la fuente de antígenos tumorales, esta carga antigénica está hecha de células irradiadas recogidas del paciente al que se ha de tratar, este componente es específico para cada paciente. Con el fin de asegurar la máxima exposición al antígeno, la fuente de antígeno se hace de las propias células tumorales de cada paciente. Estas se recolectan quirúrgicamente o endoscópicamente del paciente, se digieren con el fin de obtener una suspensión de células, y después se irradian a 10000 Rad antes de almacenarse en partes alícuotas en nitrógeno líquido. La irradiación es una medida de seguridad para prevenir cualquier crecimiento de las células tumorales que serán reinyectadas a los pacientes. Este procedimiento ha sido ya realizado con seguridad. Este componente del sistema Onco-Maxi-Vax es único para cada paciente, ya que será recogido de cada individuo y usado en combinación con el segundo componente de la vacuna.

45 El segundo componente de la vacuna Onco-Maxi-Vax es común (o "universal") a todos los pacientes, es el suministrador de inmunomodulador. Está compuesto o bien de una cápsula grande (macroencapsulación) o de pequeñas cápsulas (microencapsulación) que contiene células vivas. La cápsula o las cápsulas se requieren para inmunoaislar las células humanas alogénicas. La cápsula o cápsulas son semipermeables. Permite la supervivencia de las células en el interior por migraciones de nutrientes y evita la exposición de las células a un entorno que normalmente las destruiría.

50 En el sistema Onco-Maxi-Vax, las células a encapsular son modificadas por ingeniería genética para que segreguen moléculas inmunoestimuladoras. Deben considerarse como un biorreactor inmunoaislado que produce y libera, en el sitio de la vacunación, intensas señales inmunoestimuladoras. Hasta ahora el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)) es probablemente la molécula inmunoestimuladora más potente para la respuesta inmunitaria antitumoral. A causa de las propiedades bioquímicas el GM-CSF necesita ser producido localmente en el sitio de la vacuna para obtener una liberación retardada de la proteína durante un tiempo de al menos cinco a siete días. Inicialmente las células encapsuladas son modificadas por ingeniería genética para que segreguen GM-CSF sólo. Dependiendo de estudios de sinergism,

pueden añadirse sin dificultad otras moléculas inmunomoduladoras (otras citocinas tales como IL-12, IL-15, IL-4, Interferón gamma, quimiocinas o factores de crecimiento dendrítico).

5 Para maximizar la seguridad, la cápsula usada en la macroencapsulación es recuperable y las células que contiene son irradiadas antes de la implantación. Experimentos previos han demostrado que la irradiación de células productoras de GM-CSF no impide la producción y la liberación de la proteína.

Los dos componentes de la vacuna Onco-Maxi-Vax se ponen bajo la piel del paciente en estrecha proximidad o en contacto. Son implantados en sitios distantes del tumor primario o la metástasis con el fin de realizar la vacunación en una localización inmunológicamente no alterada.

10 De cinco a siete días después de la implantación, la cápsula se retira usando, por ejemplo, una cuerda especialmente diseñada unida a la misma. Las células tumorales autólogas irradiadas inyectadas como componente de la Onco-Maxi-Vax son procesadas progresivamente y eliminadas del sistema inmunitario del paciente, por mecanismos naturales.

15 El tratamiento de vacunación con Onco-Maxi-Vax comprende inmunizaciones repetidas en intervalos de dos a tres semanas en sitios diferentes, normalmente subcutáneo. El número total de vacunaciones, aunque ajustable, es preferentemente un mínimo de cinco.

La dosis de células autólogas se ajusta a la cantidad de células recolectadas de los pacientes. Se recomienda tener alrededor de  $10^7$  a  $10^8$  células por inmunización. Cuando esta dosificación no puede repetirse 5 veces, la dosis de células tumorales autólogas se reduce en consecuencia.

20 El número ideal de células a encapsular depende de la cantidad de agente inmunomodulador tal como GM-CSF que se requiere en el sitio de vacunación. En estudios previos, las células autólogas productoras de GM-CSF liberaban entre 80 y 960 ng/ $10^6$  células/24 hr. La liberación entre 500 y 1000 ng/24 hr se considera un objetivo razonable.

25 De acuerdo con la invención, el agente inmunomodulador tal como las células secretoras de GM-CSF segregan más de 10 ng/ $10^6$  células/24 horas de agente inmunomodulador. Las células preferidas de la invención segregan una cantidad de GM-CSF igual o superior 100 ng/ $10^6$  células/24 horas, preferentemente más de 500 ng/ $10^6$  células/24 horas. Si es necesario, pueden implantarse varias cápsulas al mismo tiempo. La cantidad total de agente inmunomodulador suministrado, especialmente GM-CSF, ha de ser al menos 1 microgramo por 24 horas en el sitio de vacunación.

30 En consecuencia, una célula de la invención segrega más de  $10 \times 10^{-15}$  g de agente inmunomodulador cada 24 h, preferentemente más de  $100 \times 10^{-15}$  g/24 horas de agente inmunomodulador. Una célula de la invención segrega por ejemplo entre 80 y  $960 \times 10^{-15}$  g/24 horas, preferentemente más de  $500 \times 10^{-15}$  g/24 horas de agente inmunomodulador.

La cápsula según la invención puede contener entre  $2 \times 10^5$  células y 2, 3, 4 ó  $5 \times 10^7$  células, preferentemente más de  $10^7$  células por cápsula, por ejemplo  $2 \times 10^7$  células por cápsula.

35 Esta inmunización antitumoral se realiza para una amplia gama de tipos de tumor. Como se discutió anteriormente, las células encapsuladas son idénticas para cada paciente. Solamente en pacientes con células tumorales que pueden ser recolectadas de un tumor primario sólido, una metástasis o de fluido que contiene células tumorales (pleural, peritoneal, médula ósea o sangre), es posible generar el producto de vacuna completo.

40 En oncología clínica, la mayoría de los pacientes presentan un tumor primario o una lesión metastásica. No todos los tumores o metástasis son igualmente fáciles de procesar. Por consiguiente, el tipo de tumor que será ensayado necesita cumplir varios criterios en términos de viabilidad. Los cánceres que es probable que tengan un tumor primario que pueda ser recolectado son:

- Tumor del Sistema Nervioso Central tal como el glioblastoma
- Tumor de pulmón (cáncer de pulmón de células no pequeñas)
- Tumor de próstata
- 45 - Carcinoma gástrico
- Carcinoma de mama
- Linfoma
- Carcinoma pancreático
- Hepatocarcinoma (tumor de hígado)
- 50 - Carcinoma de colon

- Carcinoma de células renales
- Carcinoma de ovario
- Carcinoma uterino
- Sarcoma (tejido blando)
- 5 - Leucemia (ganglio linfático o sangre)
- Mieloma múltiple (sangre, médula ósea, ganglio linfático, tejido blando)

Los cánceres que es probable que tengan metástasis que pueden ser recolectadas son dependientes de la localización de la metástasis. Por razones técnicas, es más difícil recolectar metástasis óseas que de otras localizaciones.

Estos cánceres pueden ser, por ejemplo:

- 10 - Carcinoma de cabeza y cuello (metástasis de ganglios linfáticos)
- Cáncer de pulmón (metástasis de pulmón, hígado, tejido blando, cerebro, adrenal)
- Próstata (metástasis no ósea)
- Carcinoma de mama (pulmón, hígado, tejido blando, fluido pleural)
- Carcinoma gástrico (hígado)
- 15 - Carcinoma pancreático (hígado)
- Carcinoma de colon (hígado)
- Melanoma (pulmón, ganglios linfáticos, tejido blando, hígado, cerebro)
- Carcinoma de células renales (pulmón, hígado)
- Carcinoma de ovario (fluido peritoneal o pleural, hígado)
- 20 - Tumores germinales (pulmón)
- Carcinoma de vejiga (hígado, ganglios linfáticos).

Además de estos requisitos, los pacientes a enrolar en un estudio en fase I tienen que haber fracasado o rehusado el tratamiento estándar para el tipo de su cáncer y el estadiaje de su tumor.

- 25 En relación con este aspecto, los siguientes tumores podrían ser tratados preferentemente con Onco-Maxi-Vax Fase I después del tratamiento especificado:

Tumor del CNS (glioblastoma): Recidiva después de cirugía +/- radioquimioterapia;

Tumor de cabeza y cuello: Enfermedad metastásica después de cirugía +/- radioquimioterapia;

Cáncer de pulmón: NSCLC/Mesotelioma: Enfermedad metastásica de primera línea o después de la progresión posterior a quimioterapia;

- 30 Cáncer de pulmón de células pequeñas: En pacientes metastásicos después de la primera línea de quimioterapia para la enfermedad localizada o bien extendida;

Cáncer de mama/ovario: Después de dos líneas de quimioterapia para enfermedad metastásica;

Carcinoma de esófago/gástrico/colon/vejiga, cáncer uterino: Metastásico, que progresa después de una línea de quimioterapia;

- 35 Cáncer pancreático/hepato-celular: Posterior a cirugía cuando es incompleta o con metástasis loco-regional o distante;

Carcinoma de células renales/Melanoma: primera línea de enfermedad metastásica;

- 40 Linfoma/mieloma múltiple/leucemia: Progresión a pesar del régimen de quimioterapia múltiple en enfermedad avanzada, no tratable con la terapia reconocida actualmente disponible (reinfusión de médula ósea autóloga, anticuerpos);

Sarcoma, tumores germinales: Enfermedad progresiva después de múltiples regímenes de quimioterapia;

Cáncer de próstata: después del fracaso de la terapia hormonal y cuando puede recolectarse la metástasis (hígado, ganglios linfáticos, otros).

5 Con el fin de evaluar la respuesta potencial usando criterios radiológicos clásicos, los pacientes han de tener enfermedad medible o enfermedad evaluable. El periodo de seguimiento es hasta la progresión de la enfermedad. El seguimiento incluye estudios radiológicos principalmente con escáner CT para registrar cualquier cambio en el volumen del tumor.

La toxicidad y la viabilidad se registran durante el periodo de inmunización y también durante el periodo de seguimiento mediante visita bisemanal al Centro de Oncología, y la evaluación por un oncólogo.

10 Los marcadores tumorales serológicos tales como CA 153, CA19-9, CEA, AFP, NSE, CA 125, son controlados cuando son elevados antes de la vacunación.

15 Siempre que sea posible, se intenta la resección quirúrgica de la metástasis con el fin de documentar cualquier cambio en la estructura del tumor. Está bien descrito que la evaluación clásica del tumor por medida bidimensional puede no ser el mejor método de evaluación para establecer la eficacia potencial del tratamiento de inmunización. La destrucción de las células tumorales puede ser muy eficiente y estas pueden ser reemplazadas por células fibrosas o inflamatorias sin cambios de tamaño detectables en el examen radiológico. La actividad metabólica que evalúa el escáner PET puede ser de relevancia en este estudio. El análisis de una lesión tumoral posterior a la inmunización es de gran interés para los análisis inmunológicos tales como la caracterización del antígeno tumoral potencial señalado como diana por el tratamiento.

20 En otra realización preferida, las células de la invención se usan en el contexto de la inmunización contra varias enfermedades infecciosas. Este producto de la invención puede así llamarse "IA-Maxi Vax" (agente infeccioso).

De modo similar al del método Onco-Maxi-vax, el "IA-Maxi-Vax" es un producto terapéutico (vacuna) hecho de dos componentes que están físicamente en estrecha proximidad durante la inmunización.

25 Un componente representa la fuente de antígeno o antígenos. Para esta vacunación anti-infecciosa, el antígeno comprende uno o más componentes de los agentes infecciosos. Por consiguiente todos los pacientes con una infección específica serán tratados con el mismo producto. Muchos componentes de antígeno conocidos han sido descritos en enfermedades infecciosas causadas por agentes patógenos virales, bacterianos o parásitos, y actualmente son usados para estrategias de inmunización. Estos antígenos pueden ser usados como patógenos inactivados, lisados de agentes infecciosos, extractos de proteína, proteínas recombinantes, péptidos, DNA u otras formas. En algunas condiciones dependientes del agente infeccioso o de la condición médica del hospedador, la inmunización es débil o no protectora, dando lugar a una morbilidad o mortalidad significativas.

30

El HIV es un ejemplo de fracaso en la erradicación natural de un patógeno viral.

La inmunosupresión después del trasplante de médula ósea es un ejemplo en el que la infección por CMV, usualmente benigna, puede ser potencialmente mortal.

35 El primer componente de la vacuna comprende una combinación del antígeno o una mezcla de antígenos. Las células circunstantes encapsuladas de la invención que liberan localmente, en el sitio de vacunación, una señal inmunomoduladora muy potente, constituyen el segundo componente de la vacuna.

40 El segundo componente de la vacuna es el mismo ("universal") para todos los pacientes. Está hecho de una cápsula semipermeable (macro o micro) que contiene células vivas. La cápsula se requiere para inmunoaislar las células humanas alogénicas. Permite la supervivencia de las células en el interior por migraciones de nutrientes y evita la exposición de las células a un entorno que normalmente las destruiría.

45 Las células a encapsular son modificadas por ingeniería genética para que segreguen moléculas inmunoestimuladoras. Hasta ahora el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF)) es probablemente una de las moléculas inmunoestimuladoras más potentes para reforzar la respuesta inmunitaria. Se ha demostrado que el GM-CSF aumenta la inmunidad contra varios agentes parásitos o virales. A causa de las propiedades bioquímicas el GM-CSF necesita ser producido localmente en el sitio de la vacuna para obtener una liberación retardada de la proteína durante un tiempo de al menos cinco a siete días. Inicialmente las células encapsuladas son modificadas por ingeniería genética para que segreguen GM-CSF sólo. Dependiendo de estudios sinérgicos, podrían añadirse fácilmente otras moléculas inmunomoduladoras (otras citocinas tales como IL-12, IL-15, IL-4, Interferón gamma, quimiocinas o factores de crecimiento dendrítico).

50 Para maximizar la seguridad, la cápsula es recuperable y las células que contiene son irradiadas antes de la implantación. Experimentos previos han demostrado que la irradiación de células productoras de GM-CSF no impide la producción y la liberación de la proteína.

Los dos componentes de la vacuna para el agente infeccioso se ponen bajo la piel del paciente en estrecha proximidad o en contacto. Puede ser beneficioso hacer la administración secuencial de los dos componentes, siendo primero implantada la cápsula, seguida por el estímulo antigénico.

5 De cinco a siete días después de la implantación, la cápsula se retira usando, por ejemplo, una cuerda especialmente diseñada unida a la misma.

El tratamiento de vacunación con "IA-Maxi-Vax" comprende inmunizaciones repetidas en intervalos de dos a tres semanas en sitios diferentes, siempre subcutáneos. El número total de vacunaciones depende del protocolo y las dosis y ha de ajustarse en cada caso en particular.

El "IA-Maxi-Vax" se dirige de forma no exhaustiva a las condiciones siguientes:

10 \* *Infecciones virales:*

Objetivo: Pacientes de HIV en varios estadios de su enfermedad (en el estadio inicial pueden ser mejores candidatos, con un sistema inmunitario más fuerte).

Objetivo: Infección con CMV en una condición específica (anterior o posterior al trasplante de un órgano).

Objetivo: infección de herpes recurrente.

15 Hepatitis B o virus de Epstein Bar.

Hepatitis C.

\* *Infecciones bacterianas tales como:*

Objetivo: Infección micobacteriana en una población específica tal como los pacientes de HIV.

20 Objetivo: *Helicobacter pylori*. El *E. pylori* es el agente causante en la mayoría de las úlceras de estómago o gastritis.

\* *Infecciones parasitarias tales como*

Malaria, Toxoplasma, Neumocistis.

25 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, vacunas y kits que comprenden células que producen el agente inmunomodulador GM-CSF y que están inmunoaisladas físicamente.

30 Todos estos productos están particularmente bien adaptados para la producción industrial porque son fáciles de producir en grandes cantidades gracias a la característica "universal" del dispositivo. Como las células están inmunoaisladas, las mismas células encapsuladas son adecuadas para todos los pacientes. Esta característica "universal" es particularmente interesante para la terapia del cáncer, en la que se requieren múltiples inyecciones de la vacuna o de la composición farmacéutica.

35 Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende células inmunoaisladas que producen el inmunomodulador GM-CSF combinado con un vehículo aceptable fisiológicamente. La densidad de células de la invención a incorporar en la composición ha de ser definida para cada caso diferente. En particular, la densidad de células a incorporar es función de la dosis de inmunomodulador requerida. Los ejemplos de vehículos adecuados aceptables fisiológicamente consistirían en un dispositivo que cumpliera las siguientes necesidades: no tóxico (local y sistémico), inmunoaislamiento eficiente, permeable permitiendo la liberación mantenida del inmunomodulador. Una macro o microcápsula hecha de PES o AH-69 satisfacen estos requisitos así como los productos desarrollados por Theracyles Inc.

40 Una composición de vacuna de la presente invención comprende células inmunoaisladas que producen un inmunomodulador combinado con un componente antigénico. Este segundo componente de la vacuna representa la molécula contra la cual se espera una reacción de inmunización. El primero segrega el inmunomodulador necesario para potenciar el proceso de inmunización. El componente antigénico puede estar representado por una proteína, por ejemplo una proteína viral que se sabe que es inmunógena, o por una célula completa que expresa antígenos en su superficie, o por un extracto que contiene varias sustancias antigénicas. En el contexto del cáncer, el componente antigénico es preferentemente una célula tumoral (vacuna terapéutica). Se sabe que las células tumorales expresan en su superficie antígenos asociados al tumor contra los cuales se desea una respuesta inmunitaria.

45 Cuando se usan células tumorales, como en el contexto del cáncer, las células tumorales son preferentemente irradiadas antes de su incorporación en una composición. La irradiación es una medida de seguridad con el fin de evitar cualquier posible desarrollo de células tumorales que serán reinyectadas en los pacientes. Además de la seguridad,

la irradiación puede ser una forma muy buena de permitir la liberación de determinantes antigénicos potencialmente útiles.

5 En el contexto de la vacunación contra agentes infecciosos, el componente antigénico es preferentemente del agente contra el cual se desea una respuesta inmunitaria, por ejemplo de un virus. Los virus preferidos son los de la Hepatitis C y el HIV.

La presente invención proporciona también *kits* que comprenden células inmunoaisladas que producen un inmunomodulador combinado con un componente antigénico. El primer componente del *kit* segrega el inmunomodulador necesario para potenciar el proceso de inmunización contra el segundo componente antigénico.

10 Como ya se ha mencionado para la composición de la vacuna, el componente antigénico de un *kit* de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente una célula que produce, segrega o libera un antígeno. Alternativamente, el componente antigénico puede ser una molécula, por ejemplo una proteína, o un extracto celular.

En el contexto del cáncer, el componente antigénico del *kit* es preferentemente una célula tumoral. Preferentemente se adoptan las mismas medidas de seguridad irradiando la célula tumoral antes de su empleo.

15 De acuerdo con la presente invención, el *kit* se usará generalmente para la implantación en el cuerpo humano. Por esta razón, se imponen muchas reservas a las propiedades del *kit*. En particular, este *kit* ha de ser diseñado para que sea lo más pequeño posible. También ha de ser biocompatible. Un *kit* de acuerdo con la invención puede ponerse durante un tiempo tan largo como varias semanas o meses. El *kit* ha de ser seguro a lo largo de la duración de este periodo. En particular, en muchos usos del *kit*, el dispositivo de encapsulación necesita ser sellado.

20 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente solicitud, la invención incluye usos de células inmunoaisladas que producen el agente inmunomodulador GM-CSF, y usos de composiciones farmacéuticas, vacunas y *kits* como se describieron antes, en el terreno terapéutico, así como en el campo de la vacunación.

25 La invención se refiere en particular a un procedimiento para vacunar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento. Este procedimiento comprende la administración de una composición que comprende células de la invención. El sujeto es preferentemente un paciente humano, pero también pueden ser animales. Un sujeto puede estar en necesidad de vacunación por distintas razones, porque es preferible una inmunización preventiva, al igual que para una enfermedad benigna, o es necesaria por ejemplo en el caso de epidemias graves.

En un caso de vacunación preferido, se produce la respuesta inmunitaria contra un componente antigénico particular. En este caso predominante, el procedimiento de la invención comprende también la etapa de administrar el componente antigénico al sujeto.

30 Un paciente puede ser vacunado preventivamente porque tarde o temprano va a estar en contacto con el componente antigénico. También puede ser inmunizado terapéuticamente mediante el procedimiento de la invención porque ya está en contacto con el componente antigénico pero no puede generar por sí mismo una respuesta inmunitaria adecuada.

35 Cuando el procedimiento comprende la administración de células de la invención y de un componente antigénico, se contemplan protocolos diferentes. Ambas administraciones pueden hacerse al mismo tiempo, o pueden hacerse por separado o secuencialmente. Puede ser muy ventajoso separar temporalmente las administraciones. De hecho, las células de la invención, gracias a su dispositivo de barrera, tienen un efecto prolongado. Por el contrario, es probable que los componentes antigénicos inyectados sean procesados y eliminados muy rápidamente por el sistema inmunitario del hospedador. En tal caso, cuando las administraciones son separadas, la administración del componente antigénico puede repetirse aunque hay una administración única de células de la invención.

El agente antigénico y el inmunomodulador deben estar preferentemente co-localizados para que produzcan un efecto optimizado.

45 Preferentemente, para un proceso de inmunización optimizado, la administración se repite varias veces, preferentemente se repiten las administraciones de células de la invención así como de componente antigénico. En un caso preferido, la administración se repite más de dos veces, preferentemente entre 3 y 6 veces, preferentemente 5 veces.

50 Es crucial que las inmunizaciones repetidas no generen una respuesta inmunitaria aumentada contra el inmunomodulador o sus medios de suministro, con el riesgo de anular los beneficios de las inmunizaciones repetidas o generar una respuesta inmunitaria peligrosa. El dispositivo de inmunoaislamiento de las células que producen el inmunomodulador, como se propone en la presente solicitud, evita estos problemas. Representa una ventaja técnica sobre los sistemas desarrollados en la técnica anterior.

Como se discutió anteriormente, cuando se usa el procedimiento de vacunación de la invención en el campo del cáncer, el componente antigénico es preferentemente una célula tumoral completa, mejor si ha sido irradiada. Dado que es sabido que algunos antígenos están presentes en muchos tumores del mismo linaje, las células tumorales

usadas pueden ser unas alogénicas. Sin embargo, las células tumorales son preferentemente autólogas con respecto al paciente.

5 Preferentemente, las células tumorales, que son la fuente de componente antigénico, y las células inmunoaisladas, que son la fuente del componente inmunomodulador, son distintas. Esta situación es ventajosa sobre los sistemas anteriores que acoplan a ambos, porque las células tumorales no necesitan ser manipuladas, excepto en las etapas de recolección e irradiación, al contrario que soluciones anteriores que requieren la manipulación genética de las células tumorales.

10 El modo de administración de las células de la invención, de acuerdo con el presente procedimiento, se elige para que sea el más eficaz. En particular, el modo se adapta a la localización deseada para las células y el componente antigénico. Una localización preferida es la subcutánea porque esta zona es rica en células dendríticas. La administración puede hacerse intradérmicamente. También se prefieren otras localizaciones que podrían favorecer la respuesta inmunitaria esperada.

De acuerdo con la invención, las células secretoras de inmunomodulador se cargan en una cápsula, que se ha de implantar. En una realización preferida, la cápsula se retira al cabo de 2 a 7 días, preferentemente de 5 a 7 días.

15 La invención se refiere también a un procedimiento para tratar a un paciente que padece cáncer. Los cánceres y estados particularmente bien adaptados se describieron con detalle anteriormente. Este procedimiento comprende la administración de una composición que contiene células inmunoaisladas que producen un agente inmunomodulador. De acuerdo con la presente invención, las células inmunoaisladas pueden ser autólogas o alogénicas, y en particular pueden ser células tumorales autólogas.

20 La composición administrada puede ser inyectada, ingerida, implantada, aplicada, o para cualquier otro medio de administración. La composición puede comprender cualquier aditivo farmacéutico necesario para la supervivencia de las células y para el éxito de la administración o implantación. La composición puede contener también un componente antigénico que es generalmente células tumorales completas irradiadas. Preferentemente se administra en un sitio distante de la localización del tumor, donde se supone que no ha tenido lugar ninguna respuesta inmunitaria previa. Sin embargo, la composición puede ser administrada en la proximidad de células tumorales del paciente que se ha de tratar.

En el contexto de la presente invención, células inmunoaisladas que producen o segregan un agente inmunomodulador, como se describió antes, se usan en terapia, en particular en la terapia del cáncer. Estas células son también usadas posiblemente en el campo de la vacunación.

30 Otro uso que está perfectamente adaptado a las células de la invención es en la preparación de un coadyuvante. En este caso particular, la función del coadyuvante es potenciar una respuesta inmunitaria que se considera demasiado débil. Si es así, el agente inmunomodulador producido por las células inmunoaisladas de la invención es un inmunostimulador.

35 Otro uso es en la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del cáncer. Las características de tal aplicación han sido ya bien documentadas anteriormente.

Se han descrito antes *kits* que comprenden células de la invención. La presente solicitud contempla también el uso de uno de estos *kits* para la preparación de una vacuna.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Protocolo clínico de inmunización para Onco-Maxi-Vax.

40 El tratamiento de vacunación con Onco-Maxi-Vax comprende inmunizaciones repetidas. La inmunización se repite en intervalos de dos semanas en sitios diferentes, siempre subcutánea. El número total de vacunaciones es un mínimo de cinco.

Δ: cirugía, recolección de células y procesamiento de las propias células de los pacientes.

45 ∫: Inmunización con Onco-Maxi-Vax: células productoras de GM-CSF encapsuladas irradiadas, y células tumorales autólogas irradiadas.

Figura 2: Inmunidad protectora contra tumores de tipo silvestre provocada por varias células tumorales irradiadas, secretoras de citocina.

50 Esta figura compara la eficacia de varias moléculas inmunomoduladoras en el modelo de vacunación de ratones. Cada bloque representa el porcentaje de ratones que sobreviven a una provocación de tumor después de la vacunación con células tumorales irradiadas que producen la molécula descrita.

Todos los ratones vacunados con células tumorales irradiadas secretoras de GM-CSF están protegidos. El 25% de los ratones vacunados con células tumorales irradiadas secretoras de FLT3-L están protegidos.

Figura 3: Liberación de GM-CSF desde células Renca secretoras de GM-CSF encapsuladas, no irradiadas.

Esta tabla muestra un análisis de la secreción de GM-CSF fuera de la cápsula para varios valores del tiempo, por células Renca secretoras de GM-CSF encapsuladas. La liberación de GM-CSF se expresa en ng/cápsula/24h.

5 La medida de la liberación *in-vitro* de GM-CSF murino desde la cápsula que contiene células secretoras de GM-CSF se lleva a cabo los días 4, 7, 11, 14 y 21 posteriores a la carga de las células en la cápsula. Esto se realiza con anticuerpos monoclonales estándar contra GM-CSF murino en ensayos de inmunoabsorbente ligado a una enzima (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assays: ELISA) (R&D systems). Se evalúan las cantidades de proteína liberada, así como la reproducibilidad de una cápsula a otra.

Figura 4: Supervivencia a los 50 días después de la provocación con B16WT.

10 Este gráfico muestra la supervivencia a los 50 días, de ratones inmunizados el día -7 con

- solamente células Renca secretoras de GM-CSF encapsuladas irradiadas (grupo 1),
- o bien células Renca secretoras de GM-CSF encapsuladas irradiadas, más células de melanoma B16 wt irradiadas (grupo 2),
- 15 • o bien células de melanoma B16 wt no encapsuladas irradiadas modificadas por ingeniería genética para segregar GM-CSF (grupo 3).

El gráfico representa el valor medio sobre 5 ratones por grupo.

Figura 5: Supervivencia de ratones después de la provocación con B16WT.

Las condiciones experimentales son idénticas a las condiciones especificadas en la figura 4 y expuestas en el ejemplo 4.

20 Ejemplos detallados.

Ejemplo 1: Prueba de la secreción de GM-CSF humano liberado por varias líneas de células después de la transfección.

Este ejemplo muestra la capacidad de diferentes líneas de células para segregar GM-CSF humano habiendo sido o no irradiadas.

25 Métodos de transfección.

El cDNA de GM-CSF humano fue clonado en un vector retroviral (MFG) como se describe en la bibliografía (Danos Olivier y Mulligan Richard 1988 PNAS Vol. 85 p 6460-64; Jaffe Elizabeth et al. 1993 Cancer Research Vol. 53 p 2221-26).

30 El GM-CSF humano se inserta en marco en el vector retroviral. La construcción MFG-hGM-CSF fue secuenciada con el fin de asegurar la correcta clonación en marco.

35 Usando la técnica de transfección transitoria con lipofectamina, la construcción MFG-hGM-CSF fue transfectada en células 293-gpg como se describe en la bibliografía (Ory Daniel et al. 1996 PNAS Vol. 93 p 11400-06). Con la adecuada selección, estas células producen partículas retrovirales pseudotipadas que contienen el gen de hGM-CSF. Estas partículas virales son deficitarias de replicación pero pueden infectar una amplia gama de células de mamíferos.

El sobrenadante de las células 293-gpg transfectadas se usa para infectar células en división. Esto se realiza con polibreno y no se realiza selección. Por consiguiente se usa la población celular completa para análisis subsiguiente.

Pruebas de secreción.

Las células infectadas se ensayan después en relación con su capacidad para segregar GM-CSF humano.

40 Se realiza un ELISA clásico para medir la cantidad de GM-CSF en el sobrenadante de los diversos tipos de célula ensayados.

Se ensayaron líneas de células murinas y humanas en relación con su capacidad para segregar GM-CSF humano en distintos momentos, y también después de la irradiación con 3500 rads. Las distintas líneas de células ensayadas son las siguientes:

- 45 • Renca: línea de células de cáncer renal murino de base Balb/c.
- B16 F10: línea de células de melanoma de base C57BL/6.

## ES 2 560 105 T3

- Línea de células A: fibroblastos tumorigénicos humanos.
- Línea de células B: fibroblastos humanos inmortalizados.

Se ponen  $10^6$  células en una placa de cultivo. Al cabo de 48 horas el sobrenadante se recolecta y se filtra por 0,2 $\mu$ , y se congela a -20°C. Para el ensayo ELISA los anticuerpos y los patrones de proteína se adquieren de R&D System.

5 También se ensayan células no transfectadas como control o testigo negativo.

Resultados:

Los resultados se expresan en ng de h-GM-CSF por cada  $10^6$  células a las 48 horas.

	no irradiación	irradiación
Renca wt	0	0
B16 wt	0	0
Renca h-GM-CSF	23400	9300
B16-h-GM-CSF	37650	
Línea de células A	0,9	
Línea de células A h-GM-CSF	18600	14900
Línea de células A	1,2	
Línea de células B h-GM-CSF	6300	2950
Sólo medio	0	0

10 Las líneas de células de cáncer murinas y las líneas de células de fibroblastos humanos pueden segregar grandes cantidades de GM-CSF humano durante un prolongado periodo de tiempo, *in vitro*. No se ha observado disminución en la producción con el tiempo (al menos tres semanas después de la infección, para las células no irradiadas).

En su conjunto, estos resultados experimentales indican que los fibroblastos humanos pueden segregar un elevado nivel de GM-CSF humano durante varios días, sin que se presenten toxicidades para las células evidentes. Por tanto son buenos candidatos para la aplicación clínica como se sugiere en el método Maxi-Vax, esto es, células alogénicas inmunoprotégidas encapsuladas que liberan inmunomodulador en el sitio de vacunación.

15

Ejemplo 2: Protocolo experimental que evalúa la eficacia de Onco-Maxi-Vax. Células tumorales autólogas irradiadas + células productoras de GM encapsuladas. Desarrollo pre-clínico en el modelo de ratón.

20 Este ejemplo concierne a la reproducción, usando Onco-Maxi Vax, de la eficacia de vacunación observada en el sistema clásico, cuando el GM-CSF es producido por las células tumorales irradiadas, tanto en ratones de tipo silvestre como en ratones deficientes de GM-CSF. También permite la documentación de cualquier nueva toxicidad relacionada con el uso de la cápsula, su manipulación o las células que contiene.

Además, se lleva a cabo la caracterización de la respuesta por técnicas estándar técnicas (histología del sitio de al vacuna, perfil de citocinas, tinción de células dendríticas en el sitio de vacunación).

25 Diseño experimental.

A) Medida de la liberación de GM-CSF murino *in-vitro* desde la cápsula que contiene células secretoras de GM-CSF.

Esto se realiza con anticuerpos monoclonales estándar contra GM-CSF murino en ensayos ELISA (R&D systems). Se evalúan las cantidades de proteína liberadas así como la reproducibilidad de unas cápsulas a otras, y los resultados se muestran en la figura 3.

30 B) Comparación directa de los dos procedimientos de inmunización:

El grupo testigo negativo: Vacunación con células de melanoma B16 irradiadas, no manipuladas de tipo silvestre (Wild-Type) (B16 WT).

El grupo testigo positivo: La técnica estándar usada en el laboratorio: Vacunación con células de melanoma B16 secretoras de GM-CSF irradiadas (B16-GM).

El grupo de investigación: Vacunación con células de melanoma B16 irradiadas no manipuladas (B16 WT) en estrecho contacto con una cápsula implantada subcutáneamente que contiene células que liberan GM-CSF murino.

- 5 La vacuna combina células de melanoma B16 de tipo silvestre irradiadas inyectadas en estrecho contacto con una macrocápsula hecha de PES (polietersulfona). Esta cápsula contiene 200.000 células Renca construidas retroviralmente para que segreguen GM-CSF. Las células encapsuladas se mezclan con una matriz basada en colágeno.

10 Las células B16 GM y las Renca GM se generan usando la misma técnica de transfección. De forma resumida, el cDNA de GM-CSF murino fue insertado en el vector retroviral MFG. Las partículas retrovirales que contienen el cDNA mGM-CSF fueron obtenidas después de la transfección con lipofectamina de células 293-CPG. Estas partículas retrovirales no replicativas infecciosas, fueron recolectadas, centrifugadas, concentradas y usadas para infectar las células B16 y Renca, respectivamente. La cantidad de GM-CSF liberada por B16-GM y Renca-GM se mide por una técnica Elisa estándar.

Tres grupos adicionales para estudiar el efecto potencial de la propia cápsula.

- 15 a) El grupo testigo positivo + cápsula que contiene células no secretoras, para comprobar si la cápsula hace disminuir el efecto.
- b) El grupo testigo negativo + cápsula que contiene células no secretoras, para comprobar si la cápsula tiene un efecto por sí misma, sin GM-CSF.
- 20 c) Vacunación con solamente células que segregan GM encapsuladas, para comprobar si GM-CSF + células alogénicas tienen algún efecto.

Estos tres grupos adicionales aseguran que el efecto observado con la rama de investigación es dependiente de GM-CSF y específico del tumor.

Protocolo

Ratones: cepa C57B1/6 de al menos 8 semanas de edad.

- 25 Células: Cultivo en medio DMEM con 10% de suero de ternera inactivado + penicilina y estreptomycin. La recolección desde las placas de cultivo de las células se realiza de una a dos horas antes de la inyección. Las células adherentes B16 WT y B16 GM se lavan con PBS x1, se despegan con Tripsina EDTA (Life tech) y después se lavan x 3 en HBSS. Las células se cuentan después y se resuspenden en HBSS a la concentración descrita.

30 Renca GM y Renca Wt son las células cargadas en las cápsulas. Estas células se cultivan en el mismo medio DMEM que antes.

*Día 0: Vacunación:*

- 35 Se recolectan B16-WT o B16 GM, se resuspenden a la concentración de  $2 \times 10^6$ /ml y se irradian a 3500 rad. Las cápsulas se implantan subcutáneamente en el abdomen en los grupos apropiados después de la irradiación (3500 rad). La vacunación se realiza subcutáneamente con  $1 \times 10^6$  células en 500  $\mu$ l en el abdomen. Grupos con la cápsula y las células B16 co-inyección, las células se inyectan en estrecho contacto con la cápsula. Se usa una anestesia superficial para asegurar la reproducibilidad del procedimiento.

*Día 7: Provocación:*

Se recolectan B16 WT de las placas de cultivo y se resuspenden a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml.

La inyección de  $5 \times 10^5$  células en 500  $\mu$ l se realiza en el lomo superior.

- 40 Se usa anestesia superficial para asegurar la reproducibilidad del procedimiento.

*Seguimiento.*

- 45 Los animales son comprobados diariamente para observar si hay crecimiento de tumores. Se toma nota del día que se hace visible un tumor. Los animales son sacrificados cuando el tumor es mayor que 1 cm o se ulcera. Se toma nota del día del sacrificio. Los animales libres de tumores se observan hasta el día 80 para un potencial crecimiento tardío del tumor.

Este modelo ha sido bien descrito en el pasado y los ratones que no desarrollan tumor en el sitio subcutáneo de provocación no desarrollarán metástasis distantes.

Los ratones libres de tumores el día 80 tienen una inmunidad anti-tumoral específica de larga duración siempre y cuando los grupos testigo den los resultados que permitan la validación de los experimentos.

Resultados preliminares:

5 Evaluación de la toxicidad de la liberación prolongada de GM-CSF por las células encapsuladas y por la propia cápsula bajo la piel.

Esto se evalúa mediante el análisis de ratones con cápsula implantada que contiene un número creciente de células secretoras de GM irradiadas. El efecto de la cápsula vacía también es analizado. Esto se lleva a cabo mediante la observación del animal en relación con cualquier toxicidad local o sistémica. El nivel en suero de GM-CSF se analiza mediante ELISA. El análisis histológico se lleva a cabo en el sitio de la vacunación. Esta evaluación de la toxicidad se realiza con dos ratones por grupo.

Ejemplo 3: Protocolo para la preparación de "Onco-Maxi-Vax" para su uso en personas.

Este ejemplo concierne a la preparación de Onco-Maxi Vax, para la vacunación de un paciente humano. El protocolo da información detallada relativa a la preparación de la carga antigénica, la generación del agente suministrador de citocina inmunoaislada y la inmunización con los dos componentes del Onco-Maxi-Vax.

15 Cada etapa de la preparación de la vacuna para los dos componentes (células autólogas irradiadas y células productoras de GM-CSF encapsuladas) y las inmunizaciones se realizan de acuerdo con directrices GMP clínicas.

1) Recolección de células tumorales autólogas (carga antigénica)

Se recolecta quirúrgicamente una masa tumoral (lesión primaria o metástasis) del paciente que ha de ser tratado. Se lleva a cabo un examen patológico estándar en una porción de la masa con el fin de confirmar la naturaleza maligna del material recolectado. Después se procesa con el fin de obtener una suspensión de células individuales. Esto se realiza por métodos tanto mecánicos como enzimáticos.

25 En primer lugar la masa tumoral se corta en piezas más pequeñas usando un microscopio de disección, después se pone el tumor en una bolsa estéril con una solución estéril que contiene varias enzimas (colagenasa). La bolsa se introduce en un mezclador de células (Stomacher Lab System) que procesa el producto formando una suspensión de células. La combinación de las actividades enzimática y mecánica a 37°C durante unas pocas horas permite la eficiente disociación de la matriz extracelular del tumor y la convierte en suspensión de células individuales.

Esto se realiza en solución libre de suero.

30 Las células se lavan después tres veces con HBSS usando una centrifuga refrigerada (Sorvall) 4°C, 5 minutos, 700 rpm, y se resuspenden en HBSS. Después se cuentan las células usando solución de azul de tripano (Fluka) y una cámara de Neubauer.

Las células se resuspenden a una concentración elegida, se irradian a 10000 rads en un irradiador dedicado a uso clínico, se distribuye en alícuotas y se congela en medio de congelación que contiene 10% de DMSO.

2) Agente suministrador de citocina inmunoaislada.

35 a) Generación de células productoras de GM-CSF.

Las células a introducir en las cápsulas son alogénicas (obtenidas de una línea de células humanas). Con el fin de evitar una toxicidad imprevista, se usaron líneas de células que han sido ya aprobadas en protocolos clínicos, tales como mioblastos o fibroblastos inmortalizados. Estas células son en primer lugar transfectadas establemente con cDNA de GM-CSF humano.

40 Pueden usarse dos métodos de transfección: transfección retroviral y electroporación. Para la transfección retroviral, se inserta cDNA de hGM-CSF en marco en el vector retroviral MFG y la transcripción es impulsada por el LTR del virus. El plásmido no contiene ningún marcador de selección ni gen de resistencia a un antibiótico.

Para la transfección por electroporación, el cDNA del hGM-CSF está bajo el promotor de CMV y el plásmido contiene un marcador selectivo (tal como un gen de resistencia a un antibiótico).

45 La invención por tanto incluye el uso de diferentes tipos de células para la transfección y de diferentes plásmidos de GM-CSF. Esto deja más flexibilidad con respecto a las reglamentaciones de organismos sanitarios locales.

50 Las células productoras de citocina se cultivan en medio libre de suero a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, usando técnicas estándar. La recolección se lleva a cabo de la forma siguiente: se elimina el sobrenadante de las células adherentes confluentes en una placa de cultivo de 10 cm, y las células se lavan una vez, durante 5 minutos a 37°C, con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) autoclavada. Después se elimina el PBS y se añaden 2 ml de Tripsina-

- EDTA el 0,5% (Life Technologies N° 25300054), y las células se incuban durante cuatro minutos a 37°C. La tripsina/EDTA permite que se despeguen las células tumorales adherentes. Las células se recolectan entonces con una pipeta de 2 ml y se diluyen en 5 ml de solución salina equilibrada de Hank (HBSS Life Technologies N° 24020091). Las células se lavan tres veces con HBSS usando una centrifuga refrigerada (Sorvall) a 4°C, 5 minutos, a 700 rpm) y se resuspenden en HBSS. Después se cuentan las células usando solución de azul de tripano (Fluka) y una cámara de Neubauer.
- 5 La cantidad de hGM-CSF producido y segregado por las células se evalúa mediante Elisa (R&D system y kits de Pharmingen) en el sobrenadante de las células filtrado. Este análisis permite la selección de la mejor línea de células productoras de citocina.
- 10 b) Inmunoaislamiento de células productoras de citocina.
- Con el fin de asegurar la liberación sostenida de citocina por las células alogénicas y permitir la inmunización repetida, es necesario inmuoaislar las células productoras de citocina del sistema inmunitario del receptor. Esto se lleva a cabo por macro encapsulación o bien por microencapsulación.
- 15 Las células productoras de citocina se cargan en macrocápsulas o se embuten en microcápsulas. Las cápsulas pueden estar hechas de varios polímeros con varios tamaños y poros, tales como las cápsulas de PES y TF10/10, con y sin matriz de PVA (poli(alcohol vinílico)). La cápsula se carga con la suspensión de células a razón de 10,5 ul/min. El sellado de la cápsula se obtiene mediante una cola de polímero, pero también puede hacerse calentando o mediante puntos quirúrgicos. El análisis del sobrenadante de las células encapsuladas que contienen células secretoras de GM-CSF indicó que se consigue una liberación estable continua de GM-CSF durante al menos quince días después de la carga, con niveles de citocina que son de aproximadamente 70 ng/10<sup>5</sup> células/24 hrs.
- 20 3) Inmunización:
- La inmunización con Onco-Maxi-Vax requiere la inyección subcutánea en estrecho contacto de los dos componentes de la vacuna.
- 25 La cápsula que contiene las células productoras de citocina se pone en el tejido subcutáneo usando una pequeña incisión de la piel bajo anestesia local. La piel se cierra con cinta quirúrgica.
- Las células tumorales irradiadas procedentes del paciente (= carga antigénica) se descongelan, se lavan dos veces con solución estéril de NaCl al 0,9%, y después se inyectan, subcutáneamente, en las proximidades inmediatas de la cápsula, usando una aguja del calibre 24.
- 30 La vacunación se repite cada dos semanas cuatro veces (y más si se dispone de células tumorales autólogas suficientes). El sitio de vacunación es diferente en cada inmunización (pared abdominal, extremidades superiores, muslos, tórax, etc).
- Ejemplo 4: Onco-Maxi-Vax. Células tumorales autólogas irradiadas + Células productoras de GM encapsuladas. Resultados *in vivo* en el modelo de ratones que indican la supervivencia a los 50 días después de la provocación con B16WT.
- 35 Este ejemplo concierne a datos *in vivo* en ratones, que están protegidos de la muerte inducida por la línea de células tumorales de melanoma B16.
- Protocolo
- Ratones: Cepa C57B1/6 de al menos 8 semanas de edad.
- 40 Células: Cultivo en medio DMEM con 10% de suero de ternera inactivado + penicilina y estreptomycin. La recolección desde las placas de cultivo de las células se realiza de una a dos horas antes de la inyección. Las células adherentes B16 WT y B16 GM se lavan con PBS x1, se despegan con Tripsina EDTA (Life tech) y después se lavan x 3 en HBSS. Las células se cuentan después y se resuspenden en HBSS a razón de 2 x 10<sup>6</sup> células/ml para la vacunación y 4 x 10<sup>5</sup> células/ml para provocación del tumor.
- 45 Renca GM (células Renca que segregan GM-CSF) son las células cargadas en las cápsulas. Las cápsulas eran cápsulas de PES con matriz de PVA (poli(alcohol vinílico)). Estas células se cultivan en el mismo medio DMEM que antes.
- Se inmunizan tres grupos de 5 ratones C57BL/6.
- Grupo 1 (grupo de control negativo): Los ratones son tratados con solamente células Renca secretoras de GM-CSF encapsuladas irradiadas (no células de melanoma B16).
- 50 Grupo 2 (grupo de estudio). Los ratones son inmunizados con las mismas células Renca-GM-CSF irradiadas encapsuladas más células de melanoma B 16 wt irradiadas.

Grupo 3 (grupo de control positivo). Los ratones son inmunizados células de melanoma B16 irradiadas, no encapsuladas modificadas por ingeniería genética para que segreguen GM-CSF.

5 Los ratones fueron inmunizados con solamente la cápsula irradiada (grupo 1), o bien con cápsula + B16wt irradiada (grupo 2), o bien con B16-GM-CSF irradiada (grupo 3) el día -7. Cada cápsula conteniendo  $10^5$  de células Renca que segregan GM-CSF, fue irradiada (3500 rad) antes de la implantación. A los ratones de los grupos 1 y 2 se les implantaron 2 cápsulas a cada uno, puestas subcutáneamente en forma de V en el abdomen. Al cabo de 3 horas, los grupos 2 y 3 fueron inyectados con células B16 irradiadas,  $10^6$  células B16 wt para el grupo 2, y  $10^6$  células B16-GM-CSF para el grupo 3, subcutáneamente entre las dos cápsulas.

El día 0, todos los ratones fueron provocados con  $2 \times 10^5$  células B16 wt vivas en el lomo superior.

10 Los ratones con tumores en desarrollo mayores que 1 cm o que muestran ulceración del tumor fueron sacrificados. Todos estos fueron relacionados con tumor. Los ratones no sacrificados permanecieron libres de tumores. La supervivencia representa el porcentaje de ratones libres de tumores en cada grupo.

Este experimento con animales indica una eficacia muy buena de las células secretoras de GM-CSF encapsuladas, en la supervivencia a los 50 días (véase la figura 4).

15 Este experimento se repitió y los resultados se muestran en la figura 5 con una representación gráfica diferente. Este segundo experimento ilustra también la eficacia de la vacunación con células secretoras de GM-CSF encapsuladas sobre la supervivencia, de más de dos meses.

### Resumen de características

20 Esta invención abarca una célula que produce al menos un agente inmunomodulador, siendo dicha célula-inmuno aislada. El agente inmunomodulador puede ser un agente inmunoestimulador o una citoquina tal como GM-CSF o FL. La célula puede producir otro agente inmunomodulador o producir también un agente antigénico. El agente inmunomodulador producido se puede segregar.

25 La célula está inmuno-aislada y esto se puede lograr mediante un dispositivo de barrera, que puede ser permeable selectivamente, y puede ser permeable selectivamente a moléculas con un peso molecular menor que 280 kDa. Alternativamente, el inmuno-aislamiento se puede lograr mediante microencapsulación o mediante microencapsulación.

La célula puede ser modificada genéticamente para expresar el agente inmunomodulador. La modificación genética puede lograrse mediante transfección por un plásmido o infección por un virus.

30 La célula puede ser una línea celular humana establecida, por ejemplo un fibroblasto o una línea de células epiteliales. La célula puede ser inmortal o inmortalizada. La célula puede ser no tumoral. La célula puede ser de origen mamífero. La célula puede ser humana. La célula puede irradiarse.

La célula puede segregar entre 80 y  $960 \times 10^{-15}$  g/24h de agente inmunomodulador. Alternativamente, la célula segrega más de  $10 \times 10^{-15}$  g/24h, preferiblemente más de  $100 \times 10^{-15}$  g/24h de agente inmunomodulador.

35 Una composición farmacéutica puede comprender una célula como se describió anteriormente y un vehículo fisiológicamente aceptable.

Una composición de vacuna puede comprender una célula como se describió antes y un componente antigénico. Th componente antigénico puede ser una célula tumoral, también la célula tumoral puede ser irradiada. El componente antigénico puede ser de un agente infeccioso, como un virus, tal como la hepatitis C o el VIH.

40 Un kit puede comprender una célula como se describió antes y un componente antigénico. El componente antigénico puede comprender una célula que produce o libera uno o varios antígenos. La célula que produce o libera uno o varios antígenos puede ser una célula tumoral y la célula tumoral puede irradiarse. El componente antigénico puede ser de un agente infeccioso y el agente infeccioso puede ser un virus. El kit puede ser biocompatible. El kit se puede insertar en el cuerpo humano.

45 Una cápsula puede contener al menos una célula que produce un inmunomodulador, tal como GM-CSF. La cápsula también puede contener una matriz de polímero. La cápsula puede diseñarse para ser extraíble después de la inserción. La cápsula puede irradiarse.

Las células como se describió anteriormente se pueden usar en terapia o la vacunación.

50 Las células como se describió antes pueden utilizarse para la fabricación de un adyuvante para aumentar la respuesta inmune, o para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer. Un kit como se describió antes se puede utilizar para la fabricación de una vacuna. La vacuna puede ser implantada y retirada posteriormente. La extracción puede llevarse a cabo entre 2 y 7 días después de la implantación, preferiblemente entre 5 y 7 días. Preferiblemente, las células son irradiadas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un producto terapéutico, caracterizado por dos componentes:
  - (a) un primer componente que comprende un antígeno, que comprende uno o más componentes de agentes infecciosos; y
  - 5 (b) un segundo componente que comprende una macrocápsula semipermeable que contiene células vivas modificadas genéticamente para que segreguen una molécula inmunoestimuladora GM-CSF.
2. El producto terapéutico de la reivindicación 1, en el que la macrocápsula es extraíble.
3. El producto terapéutico de la reivindicación 1 o 2, en el que las células de la macrocápsula son irradiadas antes de la implantación.
- 10 4. El producto terapéutico de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células encapsuladas segregan otra molécula inmunoestimuladora.
5. El producto terapéutico de la reivindicación 4, en el que la otra molécula inmunoestimuladora se elige de IL-12, IL-15, IL-4, interferón gamma, quimiocinas o factores de crecimiento de células dendríticas, IL-3, IL-9, IL-1, IL-2, IL-7, receptores transmembrana de IFN $\gamma$ , SCR (Factor de Célula Troncal) soluble o membranoso, FL (Ligando de Flt3) o G-CSF, o combinaciones de los mismos.
- 15 6. El producto terapéutico de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno es de un virus, una bacteria o un patógeno parasitario.
7. El producto terapéutico de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el antígeno es un patógeno inactivado, un lisado de agente infeccioso, extracto de proteína, proteína recombinante, péptido o ADN.
- 20 8. Un producto terapéutico caracterizado por dos componentes:
  - (a) un primer componente que comprende un antígeno, que comprende uno o más componentes de agentes infecciosos; y
  - (b) un segundo componente que comprende una macrocápsula semipermeable que contiene células vivas genéticamente modificadas para segregar la molécula inmunoestimuladora GM-CSF,
  - 25 para uso en inmunización contra una enfermedad infecciosa.
9. El producto terapéutico para el uso de la reivindicación 8, que comprende además las características de las reivindicaciones 2 a 7.
10. El producto terapéutico para el uso de la reivindicación 8 o 9, en el que los dos componentes se administran secuencialmente bajo la piel en estrecha proximidad o contacto, implantándose primero la cápsula, seguido del estímulo antigénico.
- 30 11. El producto terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el segundo componente se implanta durante menos de 12 días.
12. El producto terapéutico para el uso de la reivindicación 11, en el que el segundo componente se implanta durante entre 4 y 10 días.
- 35 13. El producto terapéutico para el uso de la reivindicación 12, en el que el segundo componente se implanta durante 5 a 7 días.
14. El producto terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en el que la inmunización comprende inmunizaciones repetidas a intervalos de dos a tres semanas en sitios diferentes, siempre subcutáneas.
- 40 15. El producto terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, para uso en vacunación preventiva.
16. El producto terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, para uso en vacunación terapéutica.
17. El producto terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, para uso en el tratamiento de infecciones víricas.
- 45 18. El producto terapéutico para el uso de la reivindicación 17, en el que la infección vírica se selecciona de VIH, CMV, infecciones herpes recurrentes, Hepatitis B o virus Epstein-Bar y Hepatitis C.

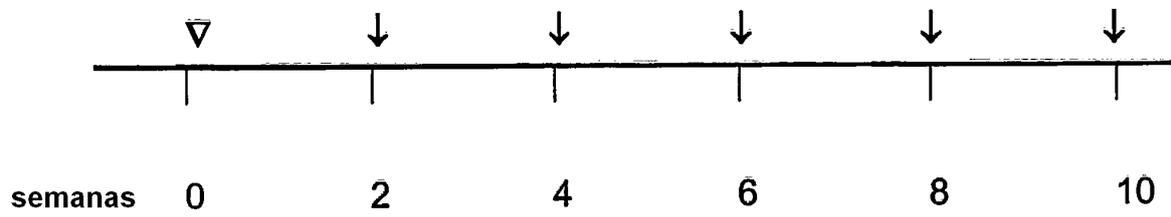
19. El producto para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, para uso en el tratamiento de infecciones bacterianas.

20. El producto terapéutico para el uso de la reivindicación 19, en el que la infección bacteriana se selecciona de infección micobacteriana y *Helicobacter pylori*.

5 21. El producto terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, para uso en el tratamiento de infecciones parasitarias.

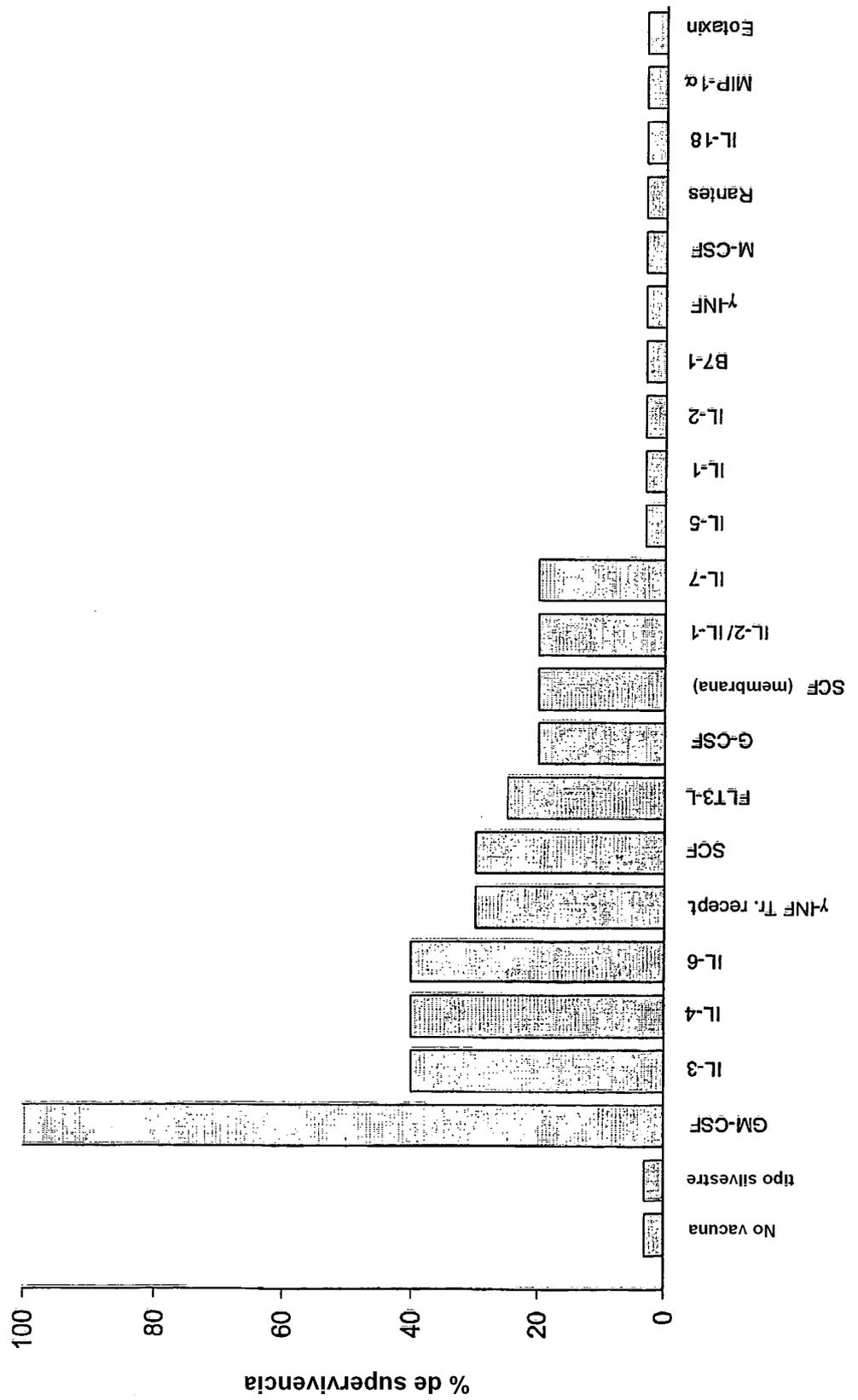
22. El producto terapéutico para el uso de la reivindicación 21, en el que la infección parasitaria se selecciona de malaria, toxoplasma y *Pneumocystis*.

10



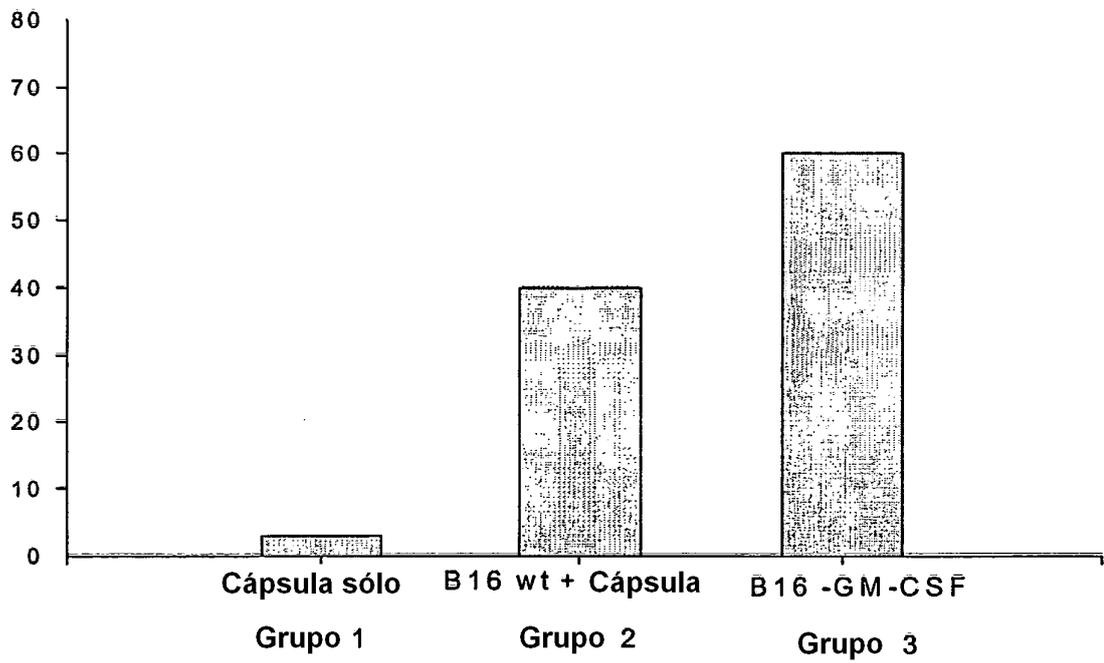
**Figura 1**

Figura 2

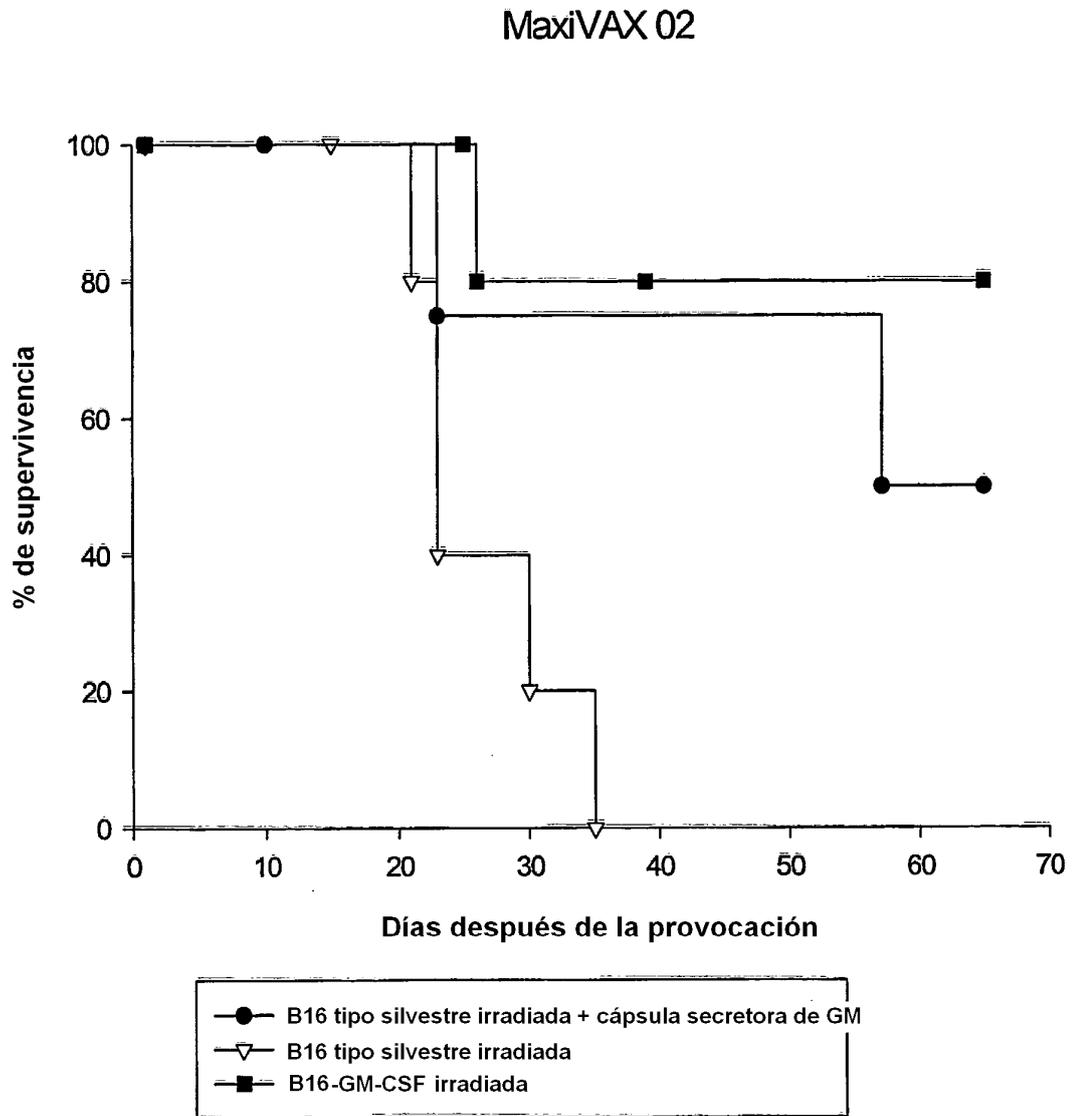


	Día 4	Día 7	Día 11	Día 14	Día 21	media	sem
1	49	63.5	50.5	49	-	52.9	3.6
2	24.5	49.5	42	41	-	39.2	5.3
3	32.5	54	41.5	47.5	-	43.9	4.6
4	49	50.5	53	57.5	45	51	2.1
5	51	48	47.5	45.5	51	48.5	1.1
6	50	38	51.5	41	49.5	46	2.7
7	39.5	38	42.5	49	48.5	43.5	2.3
8	38	40	45.9	49	55	45.4	3.1
9	33	47.5	-	-	-	40.3	7.25
10	50.5	61	-	-	-	55.8	5.25
media	41.7	49	46.62	47.37	49.8		
sem	3	2.8	1.6	1.87	1.6		

Figura 3



**Figura 4**



**Figura 5**