

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 277**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2011** **E 11702471 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016** **EP 2534242**

54 Título: **Composición mejorada para inhibir la proliferación de células tumorales**

30 Prioridad:

10.02.2010 US 303153 P
10.02.2010 SE 1050133

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.09.2016

73 Titular/es:

IMMUNICUM AB (100.0%)
Grafiska Vägen 2
412 63 Göteborg, SE

72 Inventor/es:

KARLSSON-PARRA, ALEX;
ANDERSSON, BENGT y
WALLGREN, ANNACARIN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 581 277 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

Composición mejorada para inhibir la proliferación de células tumorales

Campo de la invención

- 5 Esta invención pertenece en general al campo del tratamiento del cáncer. Más en particular, la invención se refiere a la inmunoterapia contra el cáncer, y más en particular a una inmunoterapia celular para la inhibición de la proliferación de las células tumorales.

Antecedentes

- 10 Las vacunas se han utilizado desde hace tiempo para prevenir las enfermedades infecciosas, tales como las infecciones víricas o microbianas. La respuesta celular del sistema inmunitario tiene entre sus principales cometidos proporcionar al hospedador la capacidad para defenderse, recuperarse de las infecciones e impedir otras infecciones por el mismo antígeno. Los mecanismos inmunitarios celulares también se cree que son útiles contra el cáncer.

- 15 Las células dendríticas (CD), las células presentadoras de antígeno (CPA) más potentes, desempeñan una función central en el inicio y regulación de las respuestas inmunitarias. Tienen la capacidad única de sensibilizar los linfocitos T indiferenciados y desencadenar e inducir las respuestas eficaces de linfocitos T citotóxicos (LTC). Las precursoras de las CD están presentes en la sangre circulante y se pueden atraer con rapidez a los sitios de infección o de inflamación. Cuando las precursoras de las CD se diferencian en CD inmaduras, se vuelven muy eficaces a la hora de captar y procesar los antígenos de las proteínas exógenas. En respuesta a diferentes estímulos de la maduración, tales como componentes bacterianos y víricos que expresan ligandos del receptor de tipo Toll (TLR), citocinas inflamatorias y/o interacciones específicas de linfocitos T (interacciones entre el ligando de CD40 y CD40), inician un proceso de diferenciación que conduce a la disminución de la captación del antígeno y de la capacidad de procesamiento, y a un incremento de la expresión de moléculas coestimuladoras y del CMH. Es importante señalar que la intensidad de la señal y la persistencia de las señales que induce el reconocimiento directo de los patógenos (p. ej., los TLR) o la ligación a CD40 se ha demostrado que son determinantes críticos de las funciones específicas de las CD. Por lo tanto, las CD se ven inducidas a término por factores de activación en los sitios periféricos, para cumplir 1 de las 2 funciones mutuamente excluyentes, esto es, o migrar a los ganglios linfáticos (como CD migratorias maduras) para la interacción eficaz con los linfocitos T, o bien acondicionar el microentorno mediante la producción de grandes cantidades de mediadores inflamatorios, entre ellos quimiocinas y citocinas (como CD proinflamatorias maduras).

- 30 Las estrategias inmunoterápicas contra el cáncer que ya existen y que se centran en las CD se basan todas en la premisa de que la calidad de la respuesta de los linfocitos T depende principalmente de la capacidad que tienen las CD migratorias para procesar y presentar antígenos tumorales a los linfocitos T en los órganos linfáticos secundarios, y así pues crear una respuesta de LTC específica contra el tumor, lo que conduce a un ataque inmunitario contra las células cancerosas. Los datos de diferentes modelos tumorales de ratón han demostrado que se puede desencadenar tal respuesta de acuerdo con una de las tres estrategias principales, bien conocidas por el experto en la técnica. Estas estrategias inmunoterápicas contra el cáncer se están comprobando activamente en la actualidad en los humanos, pero todas con escaso éxito.

- 40 La primera estrategia es activar y madurar las CD migratorias cargadas de antígeno desde el paciente portador del tumor *ex vivo* y posteriormente reintroducirlas al mismo paciente. La carga de antígeno se realiza típicamente mediante la adición de antígenos asociados al tumor (células tumorales lisadas, proteína, péptidos o ácidos nucleicos que codifican tales antígenos) a las CD inmaduras procedentes de monocitos y la posterior activación/maduración de las CD cargadas de antígeno con diferentes combinaciones de factores inflamatorios. Las CD reintroducidas se supone que migran a los ganglios linfáticos de drenaje, donde sensibilizan a los linfocitos T específicos del tumor. Los linfocitos T sensibilizados por las CD, en particular los LTC, viajan a continuación al sitio del tumor, donde posteriormente inducen la apoptosis de las células tumorales.

- 50 En «Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration», *CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY*, vol. 57 (11), 2008, págs 1589-1597, Boullart et al. describen que las CD maduras con poli(I:C) (ligando del TLR3) y/o R848 (ligando de los TLR7/8) son capaces de producir cantidades inmensas de IL-12p70, pero muestran menos capacidad migratoria, lo que dificulta la migración a los ganglios linfáticos. La adición de la prostaglandina E2 (PGE2) mejoró la capacidad migratoria de las CD maduras por el ligando del TLR, al mismo tiempo que mantiene su producción de IL-12p70 tras el encuentro con los linfocitos T. Sin embargo, en el ámbito clínico, la manipulación *ex vivo* de las CD propias, a saber, autólogas, de los pacientes lleva mucho tiempo y expone al paciente a un mayor riesgo de infecciones. También resulta tedioso el proceso de manipulación en el cual las CD reciben una breve sensibilización con antígenos tumorales y se activan en CD migratorias que presentan con eficacia los antígenos tumorales.

La segunda estrategia principal, que elude la necesidad de la propagación *ex vivo* de las CD migratorias procedentes de paciente, comprende la administración de antígenos tumorales, entre ellos las células tumorales alógenas irradiadas, o plásmidos que codifican antígenos tumorales, en tejidos normales intactos, entre ellos las inyecciones subcutáneas o intramusculares. Los antígenos tumorales se complementan con los denominados adyuvantes, que tienen el objetivo de desencadenar una respuesta inmunitaria mediada por las CD *in vivo*. Los adyuvantes que se utilizan con más frecuencia son quimiocinas, citocinas o plásmidos que codifican estos factores, y/o factores de maduración de las CD, tales como el factor α de la necrosis tumoral (TNF- α) y/o agonistas de los TLR.

Sin embargo, la administración del antígeno tumoral exógeno es un proceso tedioso.

La tercera estrategia principal, que también elude la necesidad de la propagación *ex vivo* de las CD migratorias procedentes del paciente, incluida en la primera estrategia principal y que, además, elude la necesidad del antígeno tumoral exógeno, incluida en la segunda estrategia principal, tiene en cuenta un adyuvante que se inyecta directamente en los tumores. Así pues, se desea que el adyuvante actúe selectivamente sobre las CD *in vivo* y el tumor del paciente actúa como una fuente de antígenos asociados al tumor. Los adyuvantes que se han analizado son parecidos a los descritos en la segunda estrategia principal: quimiocinas, citocinas o plásmidos que codifican estos factores y/o factores de maduración de las CD, tales como el TNF- α y los agonistas de los TLR. Sin embargo, un tumor viable puede ser una mala fuente del antígenos asociados al tumor para las CD inmaduras atraídas debido a que no haya una cantidad suficiente de células tumorales muertas, preferiblemente inducidas por apoptosis, y que puedan ser engullidas por estas CD.

Las tres estrategias mencionadas más arriba se han comprobado en los pacientes humanos con cáncer, pero con escaso éxito. Por lo tanto, hay una necesidad obvia de más vacunas terapéuticas eficaces y de métodos mejorados para el tratamiento del cáncer.

Compendio

Por consiguiente, la presente invención busca preferiblemente solventar las deficiencias identificadas más arriba en la técnica, por sí solas o en cualquier combinación, y soluciona al menos los problemas mencionados más arriba al proporcionar una célula dendrítica madura proinflamatoria que produce una gran cantidad de quimiocinas deseables e interleucina 12 (IL-12), una composición que comprende tal célula dendrítica proinflamatoria, un método para producir tal célula dendrítica proinflamatoria, un uso de dicha célula dendrítica proinflamatoria o dicha composición como un medicamento, y un uso de dicha célula dendrítica o dicha composición para el tratamiento del cáncer.

Así pues, en un primer aspecto, se da a conocer una célula dendrítica (CD) proinflamatoria, que se ha estimulado para que madure *ex vivo* mediante el tratamiento con las sustancias sal sódica del ácido poliinosínico-policitidílico (poli-I:C), resiquimod (R848) e interferón γ (IFN- γ), pero no con la prostaglandina E2 (PGE2), para ser usada para el tratamiento contra el cáncer en un individuo diferente al de la fuente de las CD maduras proinflamatorias, en donde el uso es la inyección intratumoral.

En un segundo aspecto, se da a conocer una composición farmacéutica que comprende CD proinflamatorias de acuerdo con el primer aspecto, uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, células mononucleares de la sangre periférica (CMSP), para ser usada para el tratamiento contra el cáncer en un individuo diferente al de la fuente de las CD maduras proinflamatorias, en donde el uso es la inyección intratumoral.

Se definen otras realizaciones de la invención en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención difiere de la técnica anterior en que produce una gran cantidad de citocinas deseables, tales como la quimiocina ligando 9 (motivo C-X-C) (CXCL9), también conocido como MIG, quimiocina 3 de motivo C-C (CCL3), también conocida como proteína 1 α inflamatoria de macrófagos (MIP-1 α), factor α de la necrosis tumoral (TNF- α), IL-1 β e IL-12 después de la retirada de los estímulos de activación, y así pues son idóneos para ser usados, tal como por inyección, sin la presencia de factores exógenos estimulantes de la maduración.

Cuando se inyectan dentro del tumor en un paciente en una preparación alógena, a saber, el paciente es diferente al donante de quien proceden las CD proinflamatorias, o las CMSP, utilizadas para crear la CD proinflamatoria, tal DC proinflamatoria activará las propias CD de los pacientes, de tal modo que se diferenciarán en las CD migratorias cargadas con el tumor. Este efecto se debe a la capacidad que tienen las CD proinflamatorias inyectadas para producir grandes cantidades de una combinación de citocinas deseables e IL-12, entre ellas la quimiocina MIP-1 α /CCL3 que atrae CD, linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T de la memoria, la quimiocina MIG/CXCL9 que atrae linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T de la memoria, así como la citocina IL-12 que activa los linfocitos citolíticos naturales. Además, una ventaja de las CD maduras, tales como las CD maduras proinflamatorias, frente a las CD inmaduras es que potencian la activación de los linfocitos citolíticos naturales mediante el contacto de una célula con otra. El hecho de que las CD proinflamatorias estén libres de factores exógenos fuertes de activación, tal como maduración, es una ventaja, ya que la presencia de factores exógenos fuertes de activación dentro del tumor puede, si no, desencadenar una diferenciación de las CD propias del paciente atraídas al interior del tumor en CD proinflamatorias específicas del paciente, o sea, propias, y no en las CD migratorias deseables específicas del paciente. Así pues, se necesitarán al menos 18 horas de estimulación para conseguir probablemente una expresión

alta de moléculas como CD86 en una CD en maduración para darle la capacidad óptima para activar un linfocito citolítico natural. De acuerdo con la técnica anterior, las CD activadas/maduras son incapaces de producir cantidades significativas de IL-12 al cabo de 18 horas. Si se aborta la activación después de tan solo 8 horas, quedaría pendiente una producción. Sin embargo, estas CD no han tenido tiempo de inducir moléculas relevantes que activen los linfocitos citolíticos naturales.

Se sabe que el trasplante con órganos, tejidos o CD maduras alógenas induce una fuerte inmunización que conduce a la expansión de los linfocitos T CD4+ alorreactivos que son específicos de los péptidos alógenos derivados del CMH que se presentan con las propias moléculas del CMH de clase II (llamada la vía indirecta de alorreconocimiento). Mediante el uso de CD proinflamatorias alógenas para la inyección intratumoral, las CD posteriormente serán destruidas (rechazadas) por el sistema inmunitario del hospedador y, gracias a ello, se convertirán en una fuente de epítomos muy inmunógenos para los linfocitos T cooperadores CD4+ (péptidos alógenos derivados del CMH) que serán capturados por las CD atraídas propias y lo más probable es que contribuyan a romper la tolerancia CD8 a los antígenos tumorales en los pacientes portadores de tumores. Así pues, las CD proinflamatorias actuarían como adyuvante y no como CD migratorias, lo que es a la vez ventajoso y diferente en comparación con la técnica anterior. Por ejemplo, si la prostaglandina E2 (PGE2) está incluida en diferentes cócteles de maduración de CD, la CD madura se convertirá en una CD migratoria que abandonará rápidamente el sitio de la inyección (tumor), lo que es una desventaja dentro del contexto de esta invención.

Mediante el uso de las CD alógenas, a saber, en un individuo diferente del que se aislaron, o donante, de las CD maduras proinflamatorias o las CMSP, tal posible adyuvante no se ha preparado individualmente para cada paciente concreto y permite la producción a gran escala con la consiguiente disminución de los costes de fabricación. Además, la vacuna se puede congelar y transportar a grandes distancias, que mejora además su viabilidad comercial.

Breve descripción de los dibujos

Estos y otros aspectos, características y ventajas de los que es capaz la invención resultarán obvios y se deducirán de la siguiente descripción de las realizaciones de la presente invención, en la que se hace referencia a los dibujos acompañantes, en los que

la figura 1 es una ilustración esquemática de un método de acuerdo con el tercer aspecto;

la figura 2 es una ilustración esquemática de un método de acuerdo con el cuarto aspecto;

la figura 3 son gráficos que muestran la producción de CCL3/MIP-1 α (figura 3C), CCL5/RANTES (figura 3A) y CXCL9/MIG (figura 3B) desde las CD maduras proinflamatorias de acuerdo con el primer aspecto;

la figura 4 es un gráfico que muestra la producción de IL-12 desde las CD maduras proinflamatorias de acuerdo con el primer aspecto;

la figura 5 son gráficos que muestran la producción de la IL-1 β y del TNF- α por una composición de acuerdo con el segundo aspecto;

la figura 6 son gráficos que muestran la producción de la IL-1 β y del TNF- α por una composición de acuerdo con el segundo aspecto;

la figura 7 es un gráfico que muestra la producción del IFN- γ por una composición de acuerdo con el segundo aspecto;

la figura 8 son gráficos de FACS que muestran la influencia de diferentes sustancias sobre la maduración de las CDi;

la figura 9 son gráficos de FACS que muestran la influencia de las CD maduras proinflamatorias de acuerdo con el primer aspecto, o una composición de acuerdo con el segundo aspecto, sobre la maduración de las CDi.

la figura 10 es un gráfico que muestra el volumen tumoral de un estudio que contempla una realización;

la figura 11 muestra fotos de los resultados histopatológicos (tumor primario) de un estudio que contempla una realización;

la figura 12 muestra fotos de los resultados histopatológicos de control (tumor primario) de un estudio que contempla una realización.

la figura 13 muestra fotos de los resultados histopatológicos (tumor secundario) de un estudio que contempla una realización; y

la figura 14 muestra fotos de los resultados histopatológicos de control (tumor secundario) de un estudio que contempla una realización.

Descripción de las realizaciones

Varias realizaciones de la presente invención se describirán con más detalle a continuación con referencia a las figuras acompañantes para que los expertos en la técnica sean capaces de llevar a cabo la invención. Sin embargo, la invención puede realizarse de muchas formas diferentes y no se debe interpretar que está limitada por las realizaciones presentadas en la presente memoria. Es más, estas realizaciones se dan a conocer para que esta descripción sea detallada y completa, y transmita por completo el alcance de la invención a los expertos en la técnica. Las realizaciones no limitan la invención, sino que la invención está solo limitada por las reivindicaciones adjuntas a la patente. Además, la terminología utilizada en la descripción detallada de las realizaciones concretas ilustradas en las figuras acompañantes no pretende limitar de ningún modo la invención.

Los adyuvantes inyectados en el interior del tumor que tienen el propósito de inducir una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz con toda probabilidad tendrán que inducir 3 fenómenos en el interior del tumor que recibió la inyección, todos igual de importantes para conseguir una erradicación del tumor mediada por los LTC.

Primero, la CD inmadura (CDi) necesita ser atraída al tumor para quedar expuesta al antígeno tumoral. Está perfectamente establecido en la técnica que la quimiocina MIP-1 α /CCL3 tiene una fuerte capacidad para estimular la atracción de las CDi, que incluye la atracción de las CDi *in vivo* al interior del tumor.

Segundo, es importante inducir la apoptosis de las células tumorales para hacer que los antígenos tumorales queden disponibles para las CDi atraídas. Existen dentro de la técnica varios métodos diferentes para conseguir esto, entre ellos métodos que desencadenan la atracción al interior de los tumores y la activación de los linfocitos citolíticos naturales. En diferentes modelos de ratón, la destrucción primaria de las células tumorales susceptibles mediada por los linfocitos citolíticos naturales, principalmente debido a la inducción de la apoptosis, ha demostrado repetidamente que suscita con eficacia un desarrollo posterior, mediado por las CD, de las respuestas de los linfocitos T citotóxicos específicos del tumor contra las células tumorales originales resistentes a los linfocitos citolíticos naturales. Se sabe que los linfocitos citolíticos naturales expresan el receptor de quimiocinas CXCR3 y la atracción dependiente de CXCR3 de los linfocitos citolíticos naturales se ha demostrado en varios modelos animales. Un ligando de CXCR3 bien conocido es MIG/CXCL9 y hay pruebas de que los linfocitos citolíticos naturales se acumulan después de la inyección intratumoral de MIG/CXCL9.

Para que los linfocitos citolíticos naturales atraídos destruyan de manera eficaz las células tumorales, lo más probable es que también sea necesaria la presencia de factores activadores de los linfocitos citolíticos naturales, tales como la IL-12, un potente activador *in vitro* e *in vivo* de la actividad destructora de los linfocitos citolíticos naturales.

Tercero, se debe inducir la maduración de las CDi atraídas para que pasen a ser CD migratorias maduras.

Las primeras etapas de las infecciones víricas (que conducen normalmente a las respuestas inmunitarias desviadas de Th1) están normalmente asociadas a la atracción local y a la activación tanto de las CD como de los linfocitos citolíticos naturales. En un estudio reciente, a los linfocitos citolíticos naturales de la sangre periférica humana que se habían expuesto a IL-12 o IL-4 en una incubación breve (durante una noche) se les investigó su capacidad para inducir la maduración de las CD. En especial, sólo los linfocitos citolíticos naturales que se habían estimulado con la IL-12 fueron capaces de inducir la maduración sustancial de las CD. Así pues, se concluyó que los linfocitos citolíticos naturales expuestos a la IL-12 durante un intervalo de tiempo compatible con las respuestas *in vivo* podrían favorecer la selección de las CD maduras apropiadas para la posterior sensibilización de las células Th1 en los órganos linfáticos secundarios (5). Estos datos *in vitro* con humanos están en línea con los datos *in vivo* con modelos de ratones que muestran que la respuesta de Th1 se incrementa significativamente cuando la inyección de las CD cargadas de antígeno en los ratones va seguida de la atracción acumulativa de linfocitos citolíticos naturales, en comparación con las situaciones en las que no se observó ningún reclutamiento de linfocitos citolíticos naturales.

También se ha demostrado que la maduración de las CD polarizantes de Th1 está inducida por factores solubles producidos por los linfocitos T activados policlonalmente. El tratamiento de las CD inmaduras con un medio acondicionado de linfocitos T (MALT) preparado a partir de sobrenadantes libres de células de linfocitos T activados con anti-CD3, o linfocitos T activados por la estimulación dual con anti-CD3 y anti-CD28, se ha demostrado que contiene varios factores solubles, entre ellos el ligando de CD40, el TNF- α y el IFN- γ . A diferencia de la inducción moderada de moléculas coestimuladoras mediante la adición de citocinas independientes o medio acondicionado con monocitos, el tratamiento de las CD inmaduras con MALT se ha demostrado que induce un incremento notable de la expresión de las moléculas coestimuladoras de una manera dependiente de la dosis. La capacidad del MALT para inducir tales cambios fenotípicos se anula adicionalmente mediante la neutralización de anticuerpos específicos contra CD40L, TNF- α e IFN- γ , lo que indica que estos factores presentes en el MALT están principalmente implicados en la maduración de las CD. Es importante señalar que las CD tratadas con MALT producen una gran cantidad de IL-12 desviante de Th1.

Finalmente, se sabe que los linfocitos T CD4+ desempeñan funciones cruciales en la sensibilización, expansión y memoria y en la supervivencia de los LTC CD8+ al «ayudar» a las CD migratorias durante su interacción análoga con los linfocitos T CD8+ específicos de antígeno en los ganglios linfáticos de drenaje. Una serie de estudios dentro

del área de la inmunoterapia contra el cáncer se han basado en la estrategia de que los linfocitos T CD4+ que reconocen los péptidos del CMH de clase II con el antígeno tumoral de tipo silvestre proporcionarían la ayuda necesaria para la inducción de los LTC. Sin embargo, la ayuda proporcionada por los péptidos de los antígenos tumorales a menudo será débil o ausente debido a la inducción de la tolerancia de los linfocitos T CD4+ hacia estas autoproteínas que evolucionan durante la progresión tumoral, lo que podría dificultar el efecto terapéutico de una vacuna. Los resultados recientes demuestran que la adición de epítopos auxiliares que no son del propio T CD4+ a las autoproteínas asociadas al tumor en el sitio de la vacuna es suficiente para romper la tolerancia de CD8 establecida contra los antígenos asociados al tumor en los modelos de ratones.

Tomados en su conjunto, todos estos datos indican que un adyuvante inyectado en el interior del tumor que tiene el objetivo de inducir una respuesta inmunitaria antitumoral adaptativa (mediada por linfocitos T) eficiente se debe caracterizar por una elevada y continua producción de MIP-1 α /MIP-1 α /CCL3 (atracción de CD, linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T de memoria), MIG/CXCL9 (atracción de linfocitos T de memoria y linfocitos citolíticos naturales), IL-12p70 (liberación de antígenos tumorales mediada por los linfocitos citolíticos naturales, y maduración de las CD migratorias mediada por los linfocitos citolíticos naturales) y, finalmente, la presencia de proteínas inmunógenas que no sean propias y que podrían actuar como epítopos auxiliares de linfocitos T CD4+ durante la sensibilización, mediada por las CD, de los linfocitos T CD8+ específicos del tumor en el ganglio linfático de drenaje.

Las CD procedentes de monocitos humanos tienen la capacidad de producir gran cantidad de MIP-1 α /CCL3, IL-12p70 y MIG/CXCL9 durante la estimulación persistente con determinados ligandos de TLR que también conducen a su maduración. Para inyectar dentro del tumor tales CD maduras proinflamatorias activadas persistentemente, tienen que lavarse antes de instilarlas al interior del tumor. Si no, la administración concurrente de los estimulantes (con el objetivo de inducir *ex vivo* las CD proinflamatorias) lo más probable es que conduzca a una activación fuerte y persistente de CD inmaduras atraídas también al interior del tumor, lo que conduce a su diferenciación en CD maduras proinflamatorias en vez de la diferenciación deseada en CD maduras migratorias. Por desgracia, el cese de los estímulos de maduración como los ligandos de TLR4 o el CD40L en los momentos en los que las CD se han diferenciado en CD maduras (normalmente al cabo de más de 12 horas de la estimulación) se sabe que induce una rápida disminución de la producción de citocinas inflamatorias, que incluye la producción de la IL-12. Por lo tanto, se deben utilizar métodos de activación que activan las CD en CD maduras proinflamatorias con una producción continua de los factores deseables después del cese de factores inductores de la activación.

Los presentes inventores encontraron un método para producir una CD madura proinflamatoria, que tras la retirada de la estimulación persistente con factores de activación fuertes, hace, así pues, que las CD libres de los factores de estimulación, que producen una cantidad sorprendentemente alta de quimiocinas deseables e IL-12. Las CD maduras proinflamatorias se pueden administrar a un paciente de una forma alógena, a saber, a un paciente que no es de quien se obtienen las CD.

Las CD maduras proinflamatorias pueden estar mezcladas con células mononucleares de la sangre periférica (CMSP), con lo que forman una composición. Las CD maduras proinflamatorias pueden estar revestidas con un superantígeno, tal como la enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*, que provocará una activación policlonal de los linfocitos T dentro de la población de las CMSP.

Cuando se administran a un paciente, las CD maduras proinflamatorias o las composiciones inducirán una respuesta inmunitaria que conducirá a una respuesta inmunitaria celular contra el tumor que destruye el tumor.

El efecto es extrafuerte si el paciente no es el donante de las CMSP, bien como tales o bien como la fuente de las CD maduras proinflamatorias, a saber, son alógenas para el paciente. A continuación, las CD maduras proinflamatorias o la composición actuarán como epítopos auxiliares de los T CD4+ que no son propios.

Las CD maduras proinflamatorias o la composición contribuirán a que las CD, los linfocitos citolíticos naturales y los linfocitos T propios del paciente se vean atraídos al sitio de la inyección, mediante la capacidad que tienen las CD maduras proinflamatorias para producir quimiocinas relevantes, tales como MIP-1 α /CCL3, en gran cantidad y para activar los linfocitos citolíticos naturales atraídos mediante interacciones que dependen del contacto entre las células y la capacidad que tienen las CD maduras proinflamatorias para producir una gran cantidad de la citocina IL-12, que conducirá a la carga del antígeno en las CD atraídas propias del paciente con el material tumoral inmunógeno de las células tumorales destruidas por los linfocitos citolíticos naturales.

Preferiblemente, la composición 100 se inyecta directamente en el tumor. La capacidad para atraer las CD al interior del tumor y por todos los tumores es importante, ya que en la mayoría de los pacientes estudiados con cáncer, las CD se han encontrado principalmente en la periferia de los tumores, lo que podría limitar su interacción con las células tumorales. Es importante señalar que la capacidad que tienen las quimiocinas para atraer las CD en circulación de los propios pacientes al sitio tumoral expone las células tumorales a CD recién atraídas o generadas (a diferencia de las CD locales), lo que puede estar menos afectado por un medio tumoral inmunodepresor.

En una realización de acuerdo con la figura 1, se da a conocer un método 10, en donde se proporcionan 11 células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) 101. Los monocitos 102 se aíslan 12 de dichas CMSP 101. Las CD inmaduras (CDi) 103 se generan 13 a partir de dichos monocitos 102 y la maduración de las CDi 103 se induce 14

por la adición de los inductores de activación poli-I:C, R848 e IFN- γ a las CDi 103, seguido del lavado para retirar todos los factores de activación, lo que da lugar a las CD maduras proinflamatorias 104 libres del factor de estimulación.

- 5 En una realización, la inducción 14 de la maduración de las CDi 103 comprende además la adición de al menos una de las sustancias elegidas del grupo que consiste en: IFN- α , IL-1 β y TNF- α .

En una realización, la generación 13 de las CDi se induce mediante el cultivo de monocitos en un medio acuoso que comprende IL-4 y GM-CSF durante 2 a 7 días, tales como de 3 a 5 días, o 3 o 5 días.

- 10 En una realización de acuerdo con la figura 2A, se da a conocer un método 20 para producir una composición 100, tal como el cocultivo de las CD maduras proinflamatorias 104 y las CMSP 101. El método comprende proporcionar 21 células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) 101, obtener 22 CD maduras proinflamatorias 104, y mezclar 23 dichas CMSP 101 y dichas CD maduras proinflamatorias 104.

En una realización de acuerdo con la figura 2B, el método 20 para producir una composición 100 comprende además la etapa, antes de mezclar, de tratar 22b la CD madura proinflamatoria 104 con un superantígeno 200.

Las realizaciones anteriores se describirán con más detalle a continuación.

15 Experimental

La siguiente realización experimental no pretende limitarse a la forma específica presentada en la presente memoria. Es más, la invención está limitada solo por las reivindicaciones acompañantes y resultan igualmente posibles dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas otras realizaciones además de las realizaciones específicas arriba mencionadas.

20 Aislamiento de CMSP y monocitos

- 25 Las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) 101 se separan de la sangre periférica obtenida de donantes sanos (Sahlgrenska sjukhuset, Göteborg, Suecia) mediante centrifugación en gradiente de densidad en un Lymphoprep (Nycomed, Pharma, Oslo, Noruega), bien conocido por los expertos en la técnica. Las CMSP 101 se resuspenden en el medio Cellgro (Cell Genix, Friburgo, Alemania) a una concentración final de $2,5 \times 10^6$ /ml seguido de la incubación en una placa de 24 pocillos con fondo plano (1 ml/pocillo) a 37 °C y CO₂ al 6%. Al cabo de 2 h, se retiran las células sin adherir, mientras que las células adheridas restantes se lavan dos veces con PBS, lo que da lugar a monocitos 102 aislados (que consisten principalmente en células CD14+).

Generación de las CD

- 30 Para diferenciar los monocitos 102 en CD inmaduras 103, los monocitos 102 de la etapa de aislamiento se cultivaron en medio acuoso recién preparado, tal como medio Cellgro, complementado con inductores, a saber, 1000 U/ml de IL-4 humana recombinante y 1000 U/ml de GM-CSF humano recombinante (todos de CellGenix, Friburgo, Alemania) en 3 o 5 días.

La generación de CD inmaduras (CDi) 103 procedentes de monocitos en IL-4 y GM-CSF es un modelo *in vitro* bien aceptado, y las células se pueden considerar análogas a las CD del tejido periférico.

35 Maduración de las CD

- 40 Después de 3 a 5 días de cultivo en medio Cellgro complementado con IL-4 y GM-CSF, la maduración de las CD inmaduras 103 se indujo con la adición de poli-I:C a 20 μ g/ml (Sigma, Steinheim, Alemania), un inmunoestimulante específico del receptor TLR-3, también conocido como ácido poliinosínico:policitidílico o sal sódica del ácido poliinosínico-policitidílico, y R848 a 2,5 μ g/ml (Sigma, Steinheim, Alemania), ligando 7/8 del receptor de tipo Toll, también conocido como resiquimod, al medio de cultivo, o la combinación poli-I:C y R848 complementado con el interferón γ a 1000 U/ml (IFN- γ , R&D Systems, Minneapolis, EE. UU). Al cabo de 18 h de incubación, las células se lavaron tres veces y se incubaron adicionalmente en medio recién preparado (sin añadir factores de activación exógenos) durante 24 h para obtener las CD maduras proinflamatorias 104 de acuerdo con un aspecto.

- 45 Los sobrenadantes de cultivo se recogieron de los cultivos de acuerdo con los protocolos bien conocidos por el experto en la técnica.

Se realizó un análisis por ELISA sobre los sobrenadantes, tal y como se describe a continuación, para analizar la concentración de las quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la citocina interleucina 12 (IL-12).

Cocultivo de CD y CMSP

- 50 Las CMSP 101 se obtuvieron de acuerdo con lo anterior y también se obtuvieron las CD maduras proinflamatorias

104 de acuerdo con lo anterior.

Para conseguir una maduración rápida y la activación policlonal de los linfocitos T de las CMSP 101, se añadió EEB (enterotoxina estafilocócica B) a 0,01 µg/ml (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.) al cultivo de CD en la etapa de maduración, 30 min antes del lavado. Después de lavarlas tres veces en PBS, las DC maduras proinflamatorias 104 (2,5 × 10⁵ células/ml) se cocultivaron con 1 × 10⁶ células/ml de CMSP alógenas (aisladas de la sangre periférica de donantes sanos, tal y como se describe más arriba) en un volumen total de 1 ml durante 24 h.

Se recogieron los sobrenadantes de cultivo del cocultivo de las CD maduras proinflamatorias 104 y las CMSP alógenas, también denominados sobrenadantes MLR, y posteriormente se conservaron a -80 °C. Los sobrenadantes se analizaron luego para detectar por ELISA, tal y como se describe a continuación, la presencia de los factores de activación/maduración de las CD bien conocidos IFN-γ, TNF-α e IL-1β. Los sobrenadantes también se estudiaron para detectar si eran capaces de inducir la maduración fenotípica de las CDi, y también se describe a continuación.

ELISA

La cantidad de CCL3/MIP-1α, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, IL-12, TNF-α, IL-1β e IFN-γ se midió mediante el ensayo absorbente inmunoenzimático (ELISA) con el Duo Set ELISA Development System de R&D System, Minneapolis, EE. UU., de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Evaluación de la maduración fenotípica

Las células dendríticas derivadas de monocitos 103 (CDi) se generaron tal y como se describe más arriba. Al cabo de 5 días de incubación en medio Cellgro complementado con IL-4 y GM-CSF, las CD inmaduras 103 se incubaron a 37 °C durante 24 h en 300 µl de los sobrenadantes MLR mencionados más arriba y 100 µl de medio Cellgro recién preparado. Las CD cultivadas sin la adición de los sobrenadantes se utilizaron como control. Para determinar si los sobrenadantes MLR inducen la maduración, las muestras se tiñeron con PE anti-CD86 de humano en combinación con FITC de anti-CD83 de humano. Las IgG1 y IgG2 de ratón teñidas con FITC y PE se utilizaron como controles de isotipo (todos de BD Biosciences, California, EE. UU.). Las muestras se analizaron por citometría de flujo (FACS) con el programa informático Cell Quest (BD Biosciences, California, EE. UU.).

Resultados

A continuación se comentan los resultados de la parte experimental

Producción continua de las quimiocinas inflamatorias deseables

Tal y como se muestra en la figura 3, la producción de CCL3/MIP-1α (figura 3C), CCL5/RANTES (figura 3A) y CXCL9/MIG (figura 3B) desde las CD maduras proinflamatorias 104 de 3 donantes de sangre estudiados era más alta si las CDi se habían inducido mediante el cultivo durante 5 días en GM-CSF e IL-4 antes de la estimulación combinada del TLR, a saber, inducción 14 de la maduración, en comparación con el cultivo durante 3 días en GM-CSF e IL-4. Además, la estimulación combinada del TLR con la adición de IFN-γ dio la cantidad más alta de CCL3/MIP-1α y CXCL9/MIG, mientras que la producción de CCL5/RANTES no se vio afectada por la adición del IFN-γ.

Así pues, una célula dendrítica proinflamatoria (CD), que se ha estimulado para la maduración *ex vivo* mediante el tratamiento con las sustancias sal sódica del ácido polilinosínico-policitidílico (poli-I:C), resiquimod (R848) e interferón γ (IFN-γ).

En una realización, la célula dendrítica (CD) proinflamatoria, además, se ha estimulado con al menos una de las sustancias elegidas del grupo que consiste en interferón α (IFN-α), interleucina 1β (IL-1β) y factor α de la necrosis tumoral (TNF-α).

En especial, la elevada concentración que se detectó de las quimiocinas relevantes se produjo después de la retirada de los estímulos de maduración. El hecho de que las CD maduras proinflamatorias 104 estén libres de factores de activación exógenos fuertes, tales como los de maduración, es una ventaja, ya que la presencia de factores de activación exógenos fuertes dentro del tumor podría de otro modo estimular una diferenciación de las CD propias del paciente que se ven atraídas al interior del tumor en CD proinflamatorias específicas del paciente, a saber, propias, y no en las deseables CD migratorias específicas del paciente.

La CD madura proinflamatoria produce al menos 25.000 pg IL-12/ml/10⁶ células, tal como 120.000 pg/ml/10⁶ células, al menos 100.000 pg CXCL9/ml/10⁶ células, tal como 400.000 pg/ml/10⁶ células, y al menos 40.000 pg CCL3/ml/10⁶ células, tal como 180.00 pg/ml/10⁶ células, durante 24 horas después de retirar los estímulos.

Las CD maduras proinflamatorias también pueden producir CCL5/RANTES, tal como 17.500 pg/ml/10⁶ células, durante 24 h después de retirar los estímulos.

No se halló una cantidad detectable (nivel de detección: 312 pg/ml) de CCL2/MCP-1 (datos sin mostrar). La figura 3 muestra la concentración de CCL3/MIP-1 α (figura 3C), CCL5/RANTES (figura 3A) y CXCL9/MIG (figura 3B), según se obtuvieron con análisis por ELISA. Los resultados mostrados son valores medios \pm DE de tres individuos. El eje Y correspondiente muestra la cantidad de la sustancia correspondiente producida en pg/ml/ $2,5 \times 10^5$ células, durante 24 h después de retirar los estímulos. El eje X muestra las diferentes combinaciones medidas.

Producción continua de IL-12p70

Ya que la estimulación combinada de TLR, a saber, la inducción 14 de la maduración, con o sin la estimulación concurrente con IFN- γ , se halló que inducía una producción continua y fuerte de las quimiocinas que atraen a los linfocitos citolíticos naturales (CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES y CXCL9/MIG) en las CD proinflamatorias maduras 104, fue interesante estudiar si tales CD podían liberar concurrentemente la IL-12, tal como IL-12p70, un factor activador de los linfocitos citolíticos naturales bien conocido. Tal y como se muestra en la figura 4, la estimulación doble de los TLR (tal como con R848 y poli-I:C) mostró que inducía una producción fuerte y continua de IL-12p70 después de retirar los estímulos de maduración, tal como los inductores de la activación. Además, la adición del IFN- γ durante la activación mejoró más la producción de IL-12p70. A igual que la producción de las quimiocinas, la producción de IL-12p70 era óptima (en 3 de los 4 experimentos) cuando se cultivaron los monocitos en GM-CSF e IL-4 durante 5 días, en comparación con 3 días, antes de la activación. La figura 4 muestra la producción de IL-12p70 después de la inducción de la maduración de las CD. Los datos presentados son en forma de media \pm DE de tres experimentos con diferentes donantes. El eje Y muestra la cantidad de la sustancia producida en pg/ml/ $2,5 \times 10^5$ células, durante 24 h después de retirar los estímulos. El eje X muestra las diferentes combinaciones medidas.

El cocultivo de CD maduras, o CD maduras revestidas con EEB, con CMSP alógenas induce la producción de factores de maduración de CD.

Se sabe que los factores solubles proinflamatorios producidos por linfocitos citolíticos naturales activados y los linfocitos T favorecen la maduración de las CD inmaduras presenciales. Así pues, fue interesante examinar si las CD maduras proinflamatorias 104, cuando se cocultivan con las CMSP alógenas (que imitan las células inmunitarias reclutadas) en una composición 100, eran capaces de inducir la producción de citocinas que se sabe que son importantes para la maduración de las CD. Para optimizar la activación de los linfocitos T inducidos por las CD, las CD se revistieron con el superantígeno endotoxina estafilocócica B (EEB) mediante la adición de la EEB al cultivo de CD al final (30 minutos antes del lavado) del periodo de estimulación con agonistas dobles de TLR e IFN- γ . Los superantígenos, entre ellos la EEB, se sabe que forman complejos con el CMH de clase II en las CPA y que estimulan los linfocitos T a través del receptor de los linfocitos T. Se produce una activación policlonal rápida y tanto los linfocitos T CD4+ como los CD8+ aparecen en respuesta a la EEB, lo que lleva al incremento de la producción de mediadores proinflamatorios, entre ellos TNF- α , IL-1 e IFN- γ . La EEB consigue estimular hasta el 20% del repertorio de linfocitos T y la «hiperactivación» de los linfocitos T se produce habitualmente en menos de 48 h desde la exposición a la EEB.

Después de varios lavados, las CD maduras proinflamatorias 104, con o sin un «revestimiento» concurrente con la EEB, se cocultivaron con CMSP alógenas durante 24 h, y se midió por ELISA la cantidad de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ liberados en el sobrenadante. También se pueden usar otros tipos de superantígenos, tales como las enterotoxinas estafilocócicas A, C, D, E, F, G, H y J, y la toxina 1 del síndrome de choque tóxico estafilocócico (TSST-1, por su nombre en inglés). Tal y como se muestra en la figura 5A, el cocultivo de CD maduras proinflamatorias 104 revestidas con EEB (estimuladas con los ligandos del TLR combinados), pero no las CD inmaduras, inducían una producción significativa de IL-1 β después del cocultivo con las CMSP alógenas. El cocultivo de las CD inmaduras revestidas con EEB con las CMSP alógenas indujo una producción sustancial del TNF- α que mejoró marginalmente con el uso de las CD maduras. La producción de la IL-1 β o del TNF- α no estaba sustancialmente afectada por la adición de IFN- γ para la estimulación doble de los TLR durante la maduración de las CD. En particular, el revestimiento con EEB contribuyó notablemente a la liberación de la IL-1 β y del TNF- α en el modelo de cocultivo presente (figura 6), lo que indica que los linfocitos T activados policlonalmente son los principales productores de estas citocinas.

Así pues, las CD maduras proinflamatorias pueden producir al menos 2.000 pg TNF- α /ml/ 10^6 células, tal como 32.000 pg/ml/ 10^6 células y al menos 500 pg IL-1 β /ml/ 10^6 células, tal como 2.500 pg/ml/ 10^6 células, durante 24 h después de retirar los estímulos.

Se demostró que, al igual que la producción de la IL-1 β y del TNF- α , la producción más abundante del IFN- γ era cuando se utilizan las CD maduras que se habían revestido con EEB en los cocultivos (figura 7), lo más probablemente debido a la activación policlonal de los linfocitos T. La adición de las CMSP a las CD estimuladas por los TLR y el IFN- γ indujo ligeramente la producción del IFN- γ , posiblemente secretado por los linfocitos citolíticos naturales activados por la IL-12 producida por las CD maduras proinflamatorias 104.

La figura 5 muestra la cantidad de las citocinas IL-1 β (figura 5A) y TNF- α (figura 5B) según se mide por ELISA. La figura 6 muestra la cantidad de citocinas IL-1 β (figura 6A) y TNF- α (figura 6B) según se mide por ELISA, pero con la adición de medio, CMSP o CMSP/EEB. Los datos mostrados en la figura 5 son valores medios \pm DE de cuatro

individuos, y la figura 6 muestra los resultados de un experimento.

La figura 7 muestra la cantidad de la citocina IFN- α en los sobrenadantes según se mide por ELISA. Los datos mostrados en la figura 7 proceden de un único experimento.

- 5 El correspondiente eje X en las figuras 5, 6 y 7 muestra la cantidad de la correspondiente sustancia producida en pg/ml/2,5 $\times 10^5$ células, durante 24 h después de retirar los estímulos. El correspondiente eje Y muestra las diferentes combinaciones medidas.

Maduración fenotípica de las CD inmaduras presenciales

- 10 A los sobrenadantes de los cocultivos de las CD maduras proinflamatorias 104 revestidas con EEB o sin revestir y de las CMSP alógenas 101 se les estudió posteriormente su capacidad para inducir una maduración fenotípica de las CD inmaduras presenciales. Así pues, se da a conocer una composición 100 que comprende CD maduras proinflamatorias 104 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores y células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) 101. Los sobrenadantes de estos cocultivos celulares se utilizaron para estimular las CD inmaduras presenciales obtenidas de los monocitos adheridos cultivados durante 5 días en GM-CSF e IL-4. Al cabo de 24 h de estimulación, se recogieron las células para el análisis por FACS. Se utilizaron anti-CD86 y anti-CD83 humanos para examinar la expresión de moléculas coestimuladoras (CD86) y marcadores de maduración (CD83), respectivamente. Los sobrenadantes de los cocultivos de las CD maduras proinflamatorias 104 que se habían madurado con la estimulación combinada de los TLR, a saber, mediante la adición de poli-I:C, R848 a las CDi 103, seguido del revestimiento con EEB, indujo una expresión prominente de CD86 y CD83 desde las CD presenciales, tal y como se muestra en la figura 8. Así pues, la composición 100 puede comprender un superantígeno. La adición del IFN- γ durante la maduración de las CD de vacuna mediada por los TLR no contribuyó a ninguna maduración fenotípica adicional inducida por los sobrenadantes de las CD inmaduras presenciales, tal y como se observa en la figura 8C.

- 25 La figura 8 muestra la influencia de la EEB y los ligandos del TLR, a saber, inductores de maduración, sobre las CD inmaduras 103. Los monocitos adheridos se incubaron en GM-CSF e IL-4 durante 5 días para obtener las CDi 103. Los sobrenadantes de un MLR con CD maduras proinflamatorias 104 estimuladas con EEB/TLR y las CMSP 101 se añadieron el día 5, a lo que siguió otra incubación durante 24 h. Para estudiar las moléculas coestimuladoras y los marcadores de maduración, se recogieron las células y se tiñeron con anti-CD86 y anti-CD83 humanos. Los marcadores de la superficie coestimuladores y de maduración se indujeron con fuerza con los ligandos de TLR y la EEB. Los resultados mostrados son de uno de los dos experimentos representativos.

- 30 Los sobrenadantes de cultivos celulares que solo contienen CD maduras proinflamatorias 104 que se habían madurado con la estimulación combinada del TLR más el IFN- γ indujeron una expresión sustancial de CD83 en las CD presenciales, tal y como se ve en la figura 9B. Tal y como se aprecia en la figura 9C, la expresión de CD83 mejoró más con los sobrenadantes de cocultivos con las CMSP alógenas y las CD maduras proinflamatorias 104. Finalmente, los sobrenadantes de los cocultivos con las CD maduras proinflamatorias 104 revestidas con la EEB y las CMSP alógenas 101 indujeron la expresión más fuerte de CD83, tal y como se ve en la figura 9D, lo que indica que para inducir la maduración máxima inducida por sobrenadante de las CD inmaduras presenciales es importante la inclusión de la EEB en los cocultivos 100 de CD maduras proinflamatorias 104 con CMSP 101 alógenas.

En vista de los resultados arriba mencionados, de acuerdo con un aspecto, se da a conocer una CD madura proinflamatoria 104, o una composición 100, para el uso como medicamento.

- 40 De acuerdo con un aspecto, se da a conocer una CD madura proinflamatoria 104, o una composición 100, para ser usada en el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con un aspecto, se da a conocer el uso de CD maduras proinflamatorias 104, o una composición 100, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento contra el cáncer.

La CD madura proinflamatoria 104, o una composición 100, se podría inyectar en el interior del tumor.

- 45 En una realización, se elige el cáncer del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer intestinal, gliomas malignos, osteosarcoma, melanoma maligno, cáncer de páncreas, linfomas malignos y cáncer de esófago.

- 50 De acuerdo con un aspecto, se da a conocer una CD madura proinflamatoria 104, o una composición 100, para ser usada como medicamento en un individuo diferente del que se obtienen, tal como un donante, las CD maduras proinflamatorias 104 o las CMSP 101.

De acuerdo con un aspecto, se da a conocer una CD madura proinflamatoria 104, o una composición 100, para ser usada para el tratamiento contra el cáncer en un individuo diferente del que se obtuvieron, tal como un donante, las CD maduras proinflamatorias 104 o las CMSP 101.

Inyección intratumoral

Tal y como se menciona más arriba, la CD madura proinflamatoria 104, o una composición 100, se puede inyectar dentro del tumor para producir un efecto inhibitor sobre el crecimiento tumoral.

Para demostrarlo, Visionar Preclinical AB realizó un estudio con ratas en Uppsala (Suecia) de acuerdo con la descripción siguiente.

- 5 Se utilizaron 15 ratas hembra Fischer en este estudio. Después de la aclimatación (como mínimo una semana), una suspensión celular de 100 µl que comprendía 10^6 células MAT B III (aisladas originalmente del adenocarcinoma de la glándula mamaria de la rata) en medio RPMI se inyectó por vía subcutánea en el glúteo izquierdo de los animales (día -4). Cuatro días después se indujo un segundo tumor en el glúteo derecho (día 0). La CD madura proinflamatoria 104 (producida tal y como se describe más arriba) o el vehículo solo (tampón PBS con suero de ternera fetal (STF) al 10% (volumen)) se inyectó en el primer tumor (glúteo izquierdo) cuatro días después de la instilación del segundo tumor (glúteo derecho) (día 4). La dosis de la CD madura proinflamatoria 104 fue de 20 µl por animal, lo que comprende 10^5 células CD maduras proinflamatorias 104. El crecimiento del primer y segundo tumor se registró a lo largo de todo el estudio. La parte experimental con animales del estudio fue autorizada por el comité de ética regional para la experimentación con animales en Uppsala, Suecia (C320/9).
- 15 Una visión general del diseño experimental se observa en la tabla 1 que viene a continuación.

Grupo	N	ID	Tumor 1	Tumor 2	Tratamiento
Control	6	658, 659, 662, 667, 668, 671	1×10^6 células lado izquierdo (día -4)	1×10^6 células lado derecho (día 0)	Vehículo en el interior del tumor IZQUIERDO (día 4)
CD madura proinflamatoria 104	9	657, 660, 661, 663, 664, 665, 666, 669, 670	1×10^6 células lado izquierdo (día -4)	1×10^6 células lado derecho (día 0)	$0,1 \times 10^6$ células CD 104 en el interior del tumor IZQUIERDO (día 4)

Tabla 1. Diseño experimental. La primera columna es el grupo, seguido del número de ratas participantes (N), ID único de la ratas participantes, especificación de la inducción del tumor 1 y 2, y, finalmente, especificación del tratamiento, respectivamente.

- 20 El día de la vacunación intratumoral en el primer tumor, en el glúteo izquierdo (día 4), los animales se distribuyeron al azar en dos grupos diferentes en función del volumen del tumor izquierdo. Tanto en el grupo de CD maduras proinflamatorias 104 como en las de control, las inyecciones intratumorales se hicieron con un vehículo de tampón PBS con suero de ternera fetal al 10% (volumen).

- 25 En días alternantes se comprobaba el crecimiento del tumor en los animales. Cuando eran palpables, el tamaño del tumor se midió con el uso de un calibrador. Se anotó la longitud y la anchura del tumor. El volumen del tumor se calculó mediante la fórmula: longitud (cm) \times anchura (cm) \times profundidad (cm) \times 0,44.

- 30 El plan original era sacrificar tres animales del grupo de CD maduras proinflamatorias 104 el día 7 y a todos los demás animales el día 15 (once días después de la inyección del segundo tumor). Sin embargo, el día 7, los tumores del lado izquierdo de un animal de control y de siete animales del grupo de CD maduras proinflamatorias 104 (a los que se dio vehículo o vehículo + células de vacuna, respectivamente) eran de más de 2 cm³ y, por lo tanto, se sacrificaron estos ocho animales. Dos días después (día 9), el tumor izquierdo (primer tumor) de los siete animales restantes también había superado el límite ético y, así pues, también fueron sacrificados estos animales.

Los tumores se diseccionaron, se pesaron, se congelaron en hielo seco y se conservaron a -70 °C para el posterior estudio histopatológico.

- 35 Los tumores congelados (derecho e izquierdo) enviados a MicroMorph para el análisis histopatológico se presentan en la tabla 2 que viene a continuación. Se prepararon criosecciones de 8 µm y se tificaron con hematoxilina/eosina, y para las CD/macrófagos (anticuerpo de ratón anti-CD68 de rata), linfocitos citolíticos naturales (anticuerpo de ratón anti-CD161a de rata) y células positivas para CD8 (linfocitos T CD8+ y también CD/macrófagos CD8+), de acuerdo con los métodos bien conocidos por un experto en la técnica.

- 40 El número de células inmunógenas en los diferentes tumores se puntuaron a ciegas como sigue: pocas células positivas (1+), un número moderado de células positivas (2+) o una gran cantidad de células positivas (3+).

ID	Grupo	Día experimental
659	Control	7
661	CD madura proinflamatoria 104	7
662	Control	9

ID	Grupo	Día experimental
664	CD madura proinflamatoria 104	9
665	CD madura proinflamatoria 104	7
667	Control	9
670	CD madura proinflamatoria 104	9

Tabla 2. Tumores congelados enviados para el análisis histopatológico. Las columnas muestran el ID de la rata, el grupo y el día experimental del sacrificio, respectivamente.

- 5 El análisis de los resultados de diferentes grupos con respecto a los volúmenes tumorales se realizaron con la prueba de *t* y mediciones repetidas de ANOVA (PASW v 18 en un ordenador HP Compac dc 7700p). La estadística descriptiva del volumen tumoral se presenta en las tablas 3 y 4 que vienen a continuación.

Control de vehículo							CD maduras proinflamatorias 104					
Tumor							Tumor					
Primer tumor			Segundo tumor				Primer tumor			Segundo tumor		
Media	EEM	N válido	Media	EEM	N válido		Media	EEM	N válido	Media	EEM	N válido
VT d2	0,03	0,02	6			0	0,04	0,02	9			0
VT d4	0,20	0,05	6			0	0,20	0,06	9			0
VT d6	1,17	0,16	6	0,04	0,02	6	1,40	0,22	9	0,01	0,01	9
VT d7	2,02	0,61	6	0,09	0,04	6	3,35	0,55	9	0,05	0,02	9
VT d9	4,43	0,25	5	0,68	0,08	5	4,32	1,04	2	0,36	0,04	2

Tabla 3. Volumen del tumor (VT) a diferentes días (d*). La tabla muestra el volumen medio del tumor (ml), el error estándar de la media (EEM) y el número de animales (N) a la largo de todo el estudio.

- 10 Una medición repetida ANOVA se utilizó para analizar el volumen tumoral del día 6 al día 9. El primer y segundo tumores se analizaron por separado. Debido a la manipulación de los valores ausentes en el análisis de las mediciones repetidas, se trasladó el último valor medido.

Control del vehículo							CD maduras proinflamatorias 104					
Tumor							Tumor					
Primer tumor			Segundo tumor				Primer tumor			Segundo tumor #		
Media	EEM	N válido	Media	EEM	N válido		Media	EEM	N válido	Media	EEM	N válido
VT d6	1,17	0,16	6	0,04	0,02	6	1,40	0,22	9	0,01	0,01	9
VT d7	2,02	0,61	6	0,09	0,04	6	3,35*	0,55	9	0,05	0,02	9
VT d9	4,53*	0,22	6	0,57*	0,13	6	3,96*	0,48	9	0,12‡	0,05	9

- 15 Tabla 4. El volumen medio del tumor (ml), el error estándar de la media (EEM) y el número de animales (N) con traslado del último valor medido. * $P < 0,05$ comparado con el día 6 dentro del grupo. # $P < 0,05$ comparación completa con el tumor correspondiente en el grupo de control, ‡ $P < 0,05$ en comparación con el tumor correspondiente en el grupo control.

La estadística descriptiva de la masa tumoral se presenta en la tabla 5 que viene a continuación.

	Control del vehículo						COMBIG-DC					
	Tumor						Tumor					
	Primer tumor			Segundo tumor			Primer tumor			Segundo tumor		
	Media	EEM	N válido	Media	EEM	N válido	Media	EEM	N válido	Media	EEM	N válido
MT d7	3,3491		1	0,1992		1	3,1209	0,3819	7	0,1423	0,0292	7
MT d9	4,0094	0,3604	5	0,6090	0,0690	5	4,0201	0,3530	2	0,2740*	0,0104	2

Tabla 5. Masa tumoral media (MT, g), error estándar de la media (EEM) y número de animales (N) en los diferentes días de sacrificio. * $P < 0,05$ en comparación con el correspondiente tumor en el grupo de control (prueba de t).

La figura 10 es un gráfico que muestra el volumen tumoral (ml) de los diferentes tumores en los diferentes grupos (COMBIG-DC significa CD madura proinflamatoria 104). Cuando los animales se retiraron del estudio, se trasladó el último valor medido. Los valores son media \pm EEM. Se puede observar con claridad que las ratas tratadas con las CD maduras proinflamatorias 104 tenían un volumen tumoral más pequeño con respecto al primer y al segundo tumor.

El primer tumor creció muy rápido y a todos los animales tuvieron que ser sacrificados antes de lo planificado debido al gran volumen tumoral. A siete de nueve animales del grupo de CD maduras proinflamatorias 104 y a uno de seis animales del grupo de control tuvieron que ser sacrificados el día 7, y el resto de animales el día 9. Para poder realizar el análisis estadístico sobre el material, el último volumen tumoral medido a día 7 se trasladó al día 9. Esto podría posiblemente dar un volumen falsamente más bajo del primer tumor (inyectado con vacuna) el día 9, y el hecho de que se retirasen más animales del grupo de CD maduras proinflamatorias 104 se debería tener en cuenta al analizar los resultados sobre el volumen y el peso del primer tumor (izquierdo). A continuación, se utilizó una medición repetida ANOVA para analizar los volúmenes tumorales desde el día 6 al día 9. El primer y el segundo tumor se analizaron por separado.

El mayor volumen tumoral del primer tumor en el grupo de CD maduras proinflamatorias 104 el día 7 se podría explicar por una respuesta inflamatoria en marcha contra las células dendríticas inyectadas, ya que la inmunohistoquímica reveló un incremento del número de células inflamatorias infiltrantes en estos primeros tumores en el grupo de CD maduras proinflamatorias 104 en comparación con el grupo de control (véase a continuación).

El segundo tumor del grupo de CD maduras proinflamatorias 104 tenía una reducción estadísticamente significativa del volumen tumoral en comparación con el grupo de control. Además, se encontró un peso más bajo estadísticamente significativo de los dos segundos tumores que se retiraron el día 9 en el grupo de CD maduras proinflamatorias 104 en comparación con el grupo de control.

Se congelaron los tumores y se prepararon criocortes, y se tiñeron con hematoxilina/eosina y para las CD/macrófagos (anticuerpos de ratón anti-CD68 de rata), linfocitos citolíticos naturales (anticuerpos de ratón anti-CD161a de rata) y células CD8 positivas (linfocitos T CD8+ y también CD/macrófagos CD8+). Los tumores se componían de células tumorales malignas rodeadas por una cápsula conjuntiva laxa de un grosor variable. Se encontraron hebras de fibras conjuntivas entremezcladas con las células tumorales. Se observaron áreas de células tumorales necróticas en todas las muestras. Se observaron conjuntos de material cristalizado en algunos de los primeros tumores (inyectados). Ya que esto se encontró sólo en los primeros tumores, lo más probable es que sea una reminiscencia del material inyectado.

Un resumen de esto se presenta en la tabla 6 que viene a continuación.

ID	Grupo	Día exp.	Tumor	CD68	CD161a	CD8a	H/E
659	Control	7	Primero	1-2+	1-2+	1-2+	Aprox. la mitad del tumor necrótico
			Segundo	3+	2+	2-3+	Aprox. la mitad del tumor necrótico
661	CD madura proinflamatoria 104	7	Primero	3+	2+	3+	Aprox. la mitad del tumor necrótico
			Segundo	3+	2+	3+	Aprox. la mitad del tumor necrótico
662	Control	9	Primero	2+	1+	2+	Aprox. la mitad del tumor necrótico
			Segundo	2+	1+	2+	La mayoría de las células

ID	Grupo	Día exp.	Tumor	CD68	CD161a	CD8a	H/E
tumores son viables							
664	CD madura proinflamatoria 104	9	Primero	1-2+	1+	2+	La mayoría de las células tumorales son viables
			Segundo	2+	1+	2+	La mayoría de las células tumorales son viables
665	CD madura proinflamatoria 104	7	Primero	3+	2+	3+	La mayoría de las células tumorales son necróticas
			Segundo	3+	1-2+	2-3+	La mayoría de las células tumorales son viables
667	Control	9	Primero	2+	1+	2+	Aprox. la mitad del tumor necrótico
			Segundo	2+	1+	2+	La mayoría de las células tumorales son viables
670	CD madura proinflamatoria 104	9	Primero	2-3+	1+	2-3+	La mayoría de las células tumorales son necróticas
			Segundo	3+	1-2+	2-3+	La mayoría de las células tumorales son viables

Tabla 6. Resultados del análisis histopatológico el día del sacrificio (día exp.). Los valores son puntuaciones del número de CD/macrófagos (CD68), linfocitos citolíticos (CD161a), CD/macrófagos (CD8a) y linfocitos T citotóxicos (CD8a). La evaluación morfológica de los tumores se realizó sobre cortes con tinción de H/E.

- 5 Se hallaron células positivas para CD8a, CD68 y CD161a infiltradas en el tumor en todas las muestras analizadas. Las células positivas se observaron en la cápsula que rodea el tumor, así como en las áreas de las células tumorales. Aunque el resultado no era concluyente, parecía haber una tendencia a que los animales tratados con las CD maduras proinflamatorias 104 tuvieran una mayor presencia de las células estudiadas.
- 10 Así pues, había una tendencia a que el tratamiento con la inyección intratumoral de las CD maduras proinflamatorias 104 indujera un incremento de la atracción de CD/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T citotóxicos hacia los tumores con una posterior reducción del volumen y del peso del segundo tumor.
- La figura 11 muestra fotos de los resultados histopatológicos para los macrófagos, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citotóxicos (CD/CD8+) 3 días después de la inyección intratumoral de las CD maduras proinflamatorias 104 en el tumor primario.
- 15 La figura 12 muestra fotos de los resultados histopatológicos del correspondiente control, con la inyección intratumoral solo con el vehículo.
- Así pues, se puede observar que CD/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T citotóxicos se vieron atraídos hacia el tumor después de la inyección con las CD maduras proinflamatorias 104, pero no después de la inyección con el vehículo únicamente.
- 20 La figura 13 muestra fotos de los resultados histopatológicos para CD/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T citotóxicos de los tumores secundarios 5 días después de la inyección intratumoral de las CD maduras proinflamatorias 104 en el tumor primario.
- La figura 14 muestra fotos de los resultados histopatológicos del correspondiente control, con la inyección intratumoral del vehículo únicamente.
- 25 Así pues, se puede observar que CD/macrófagos, linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T citotóxicos se ven atraídos incluso hacia el tumor secundario (metástasis) después de la inyección con las CD maduras proinflamatorias 104 en el tumor primario, pero a un grado más bajo después de la inyección únicamente del vehículo.
- 30 En conjunto, este estudio de vacuna en un modelo tumoral indica que la inyección de las CD maduras proinflamatorias 104 en el interior del tumor induce una atracción prominente de las células inflamatorias, entre ellas CD, linfocitos citolíticos naturales y linfocitos T, hacia el sitio de la inyección (primer tumor). Tal atracción intensa de células inflamatorias probablemente explica el incremento del volumen tumoral que se observa los primeros 2 o 3 días después de la inyección. La inyección intratumoral de las CD maduras proinflamatorias 104 induce además una reducción de un tumor distante (tumor derecho), lo que indica un efecto antitumoral sistémico.

En una realización, el cáncer se elige del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer intestinal, gliomas malignos, osteosarcoma, melanoma maligno, cáncer de páncreas, linfomas malignos y cáncer de esófago.

- 5 En una realización, las CD maduras proinflamatorias 104, o una composición 100 de acuerdo con lo anterior, comprende además excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, conservantes, adyuvantes, etc.

En una realización, el excipiente es seroalbúmina humana al 2%, que se proporciona en una solución fisiológica de NaCl.

- 10 En una realización, las CD 104 maduras y las células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) 101 son alógenas con respecto al sujeto, a saber, se originan en un donante cuyo CMH es incompatible con el sujeto, tal como un CMH completamente incompatible.

Esto tiene la ventaja de que la composición terapéutica se puede producir por adelantado y conservar, tal como en un estado congelado, antes de ser usada. La naturaleza alógena de la composición con respecto al paciente también ocasionará que la composición sea más eficaz, como se explica más arriba.

- 15 En un aspecto, se da a conocer un método para el tratamiento de un paciente mamífero que tiene un tumor. El método comprende la administración al paciente, una vez o varias veces, de una cantidad terapéuticamente eficaz de una CD madura proinflamatoria 104, o una composición 100, en donde un donante, del cual se toman las CD maduras proinflamatorias 104 y/o las CMSP 101, no es el paciente.

La administración puede ser por inyección en el interior del tumor.

- 20 En las reivindicaciones, el término «comprende/que comprende» no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Además, aunque se enumeran por separado, se pueden aplicar una multitud de elementos o etapas de métodos en, p. ej., una única etapa. Adicionalmente, aunque las características individuales pueden estar incluidas en diferentes reivindicaciones, estas se pueden combinar posiblemente de manera ventajosa y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea factible y/o ventajosa. Además, las referencias singulares no excluyen las múltiples. Los términos «un», «una», «primero», «segundo», etc., no excluyen una multitud. Los signos de referencia en las reivindicaciones se proporcionan simplemente como un ejemplo aclaratorio y no se deben interpretar como que limitan el alcance de las reivindicaciones de ningún modo.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Una célula dendrítica (CD) proinflamatoria, que ha sido estimulada para la maduración *ex vivo* mediante el tratamiento con las sustancias sal sódica del ácido polinosínico-policitidílico (poli-I:C), resiquimod (R848) e interferón γ (IFN- γ), pero no con la prostaglandina E2 (PGE2), para ser usada para el tratamiento contra el cáncer en un individuo diferente de la fuente de las CD maduras proinflamatorias, en donde el uso es por inyección en el interior del tumor.
2. La CD madura proinflamatoria para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, que además ha sido estimulada con al menos una de las sustancias elegidas del grupo que consiste en interferón α (IFN- α), interleucina 1 β (IL-1 β) y factor α de la necrosis tumoral (TNF- α).
3. La CD madura proinflamatoria para ser usada de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que produce al menos 25.000 pg IL-12/ml/10⁶ células, al menos 100.000 pg CXCL9/ml/10⁶ células y al menos 40.000 pg CCL3/ml/10⁶ células durante 24 h después de la retirada de los estímulos.
4. La CD madura proinflamatoria para ser usada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además produce al menos 2.000 pg TNF- α /ml/10⁶ células y al menos 500 pg IL-1 β /ml/10⁶ células durante 24 h después de la retirada de los estímulos.
5. La CD madura proinflamatoria para ser usada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el cáncer se elige del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer intestinal, gliomas malignos, osteosarcoma, melanoma maligno, cáncer de páncreas, linfomas malignos y cáncer de esófago.
6. Composición farmacéutica que comprende las células dendríticas proinflamatorias maduras de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables, para ser usada para el tratamiento contra el cáncer en un individuo diferente de la fuente de las CD maduras proinflamatorias, en donde el uso es por inyección en el interior del tumor.
7. La composición farmacéutica para ser usada de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende células mononucleares de la sangre periférica.
8. La composición farmacéutica para ser usada de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las células mononucleares de la sangre periférica se han obtenido de una persona que no es el paciente.

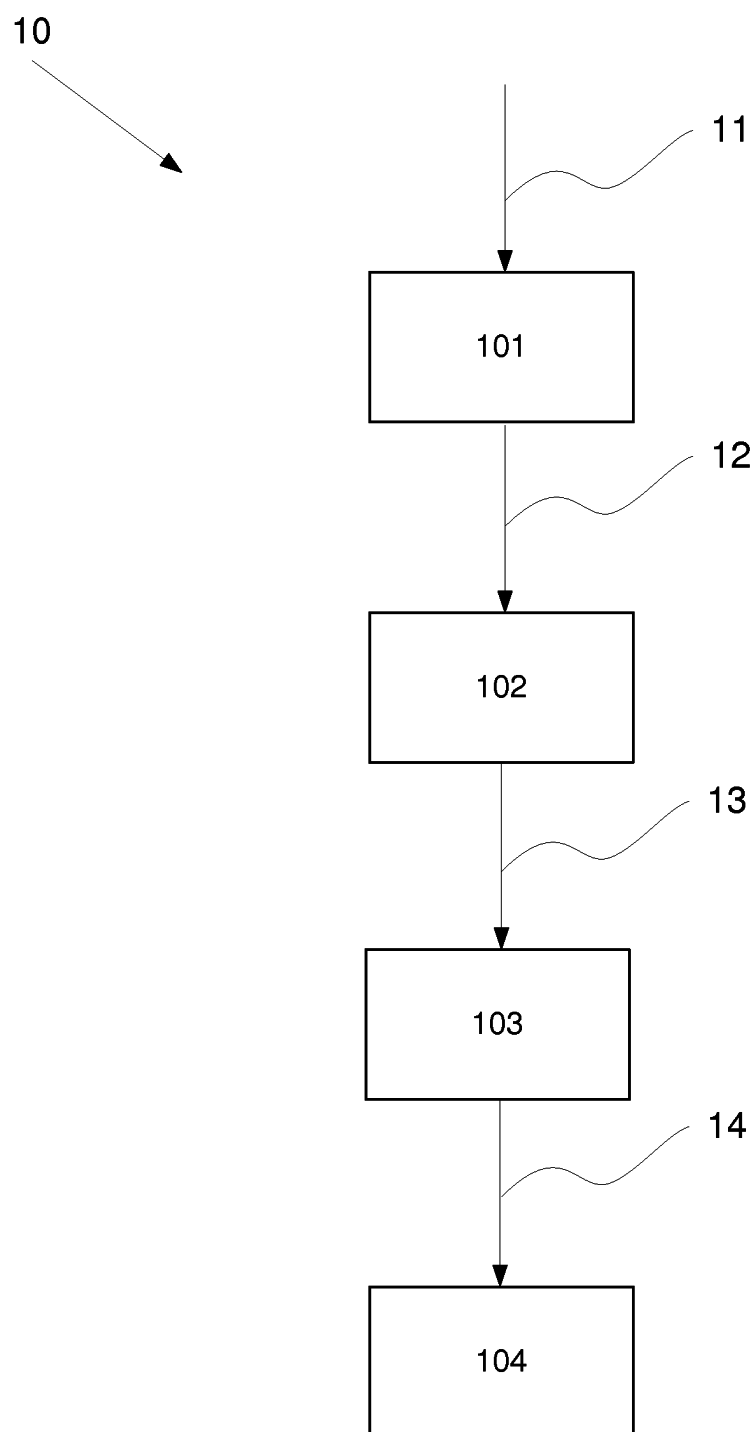


Fig. 1

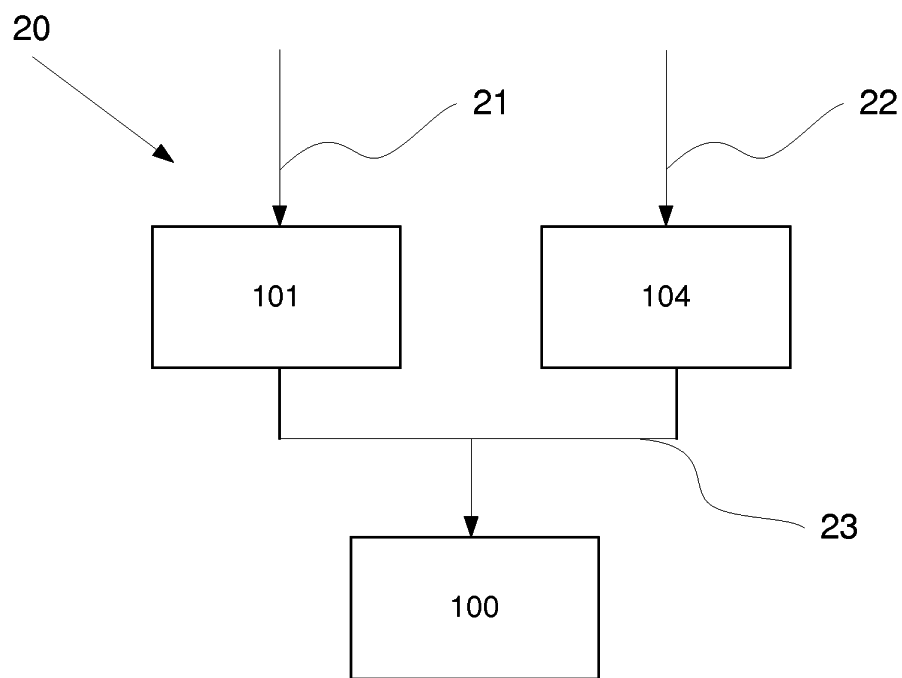


Fig. 2A

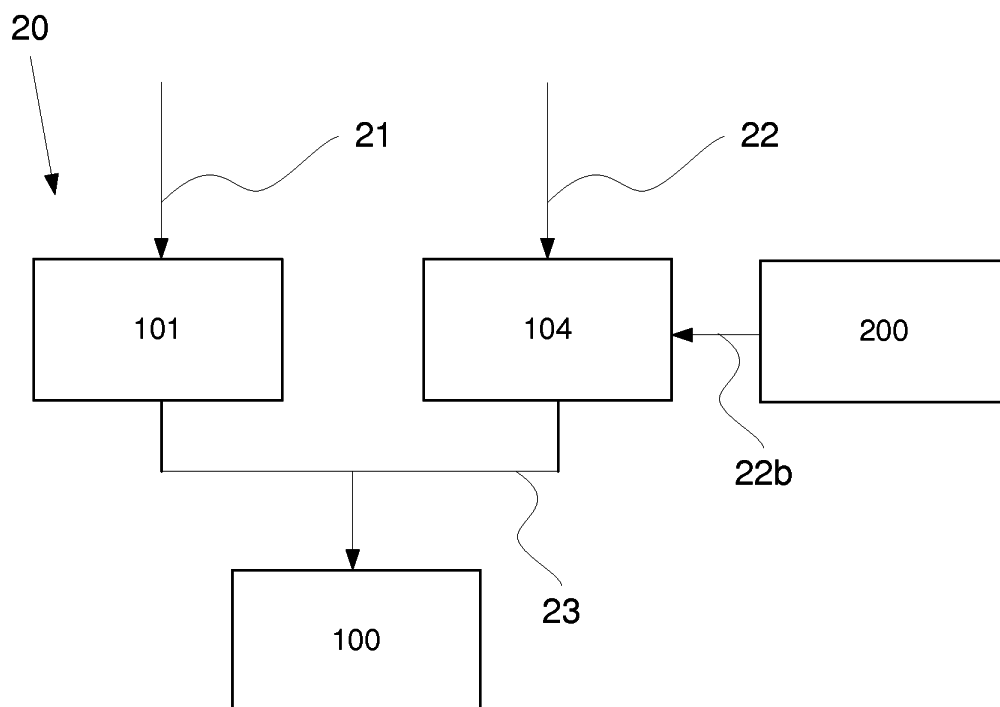


Fig. 2B

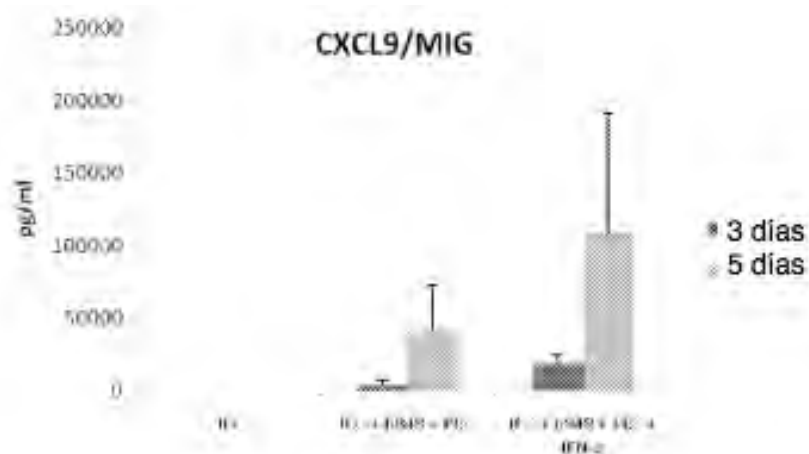


Fig. 3A

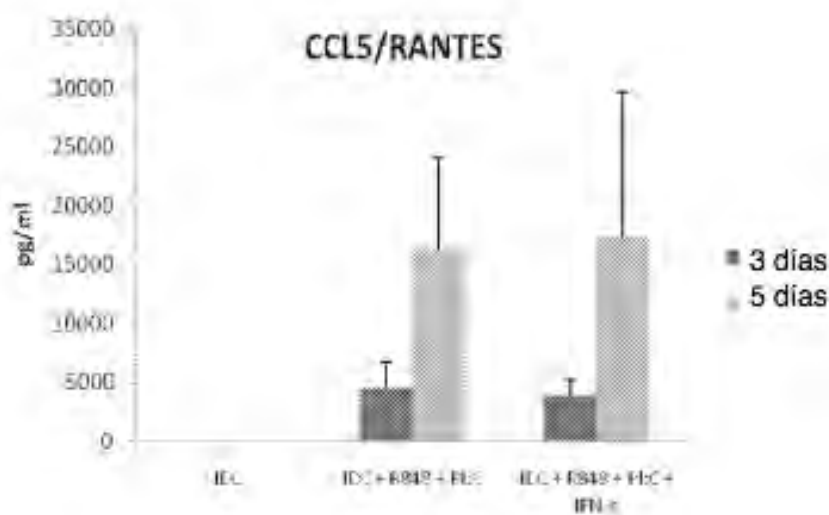


Fig. 3B

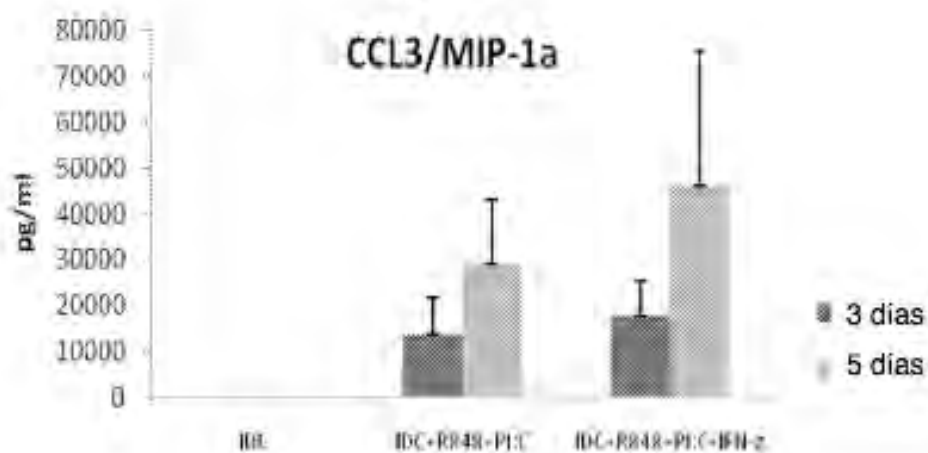


Fig. 3C

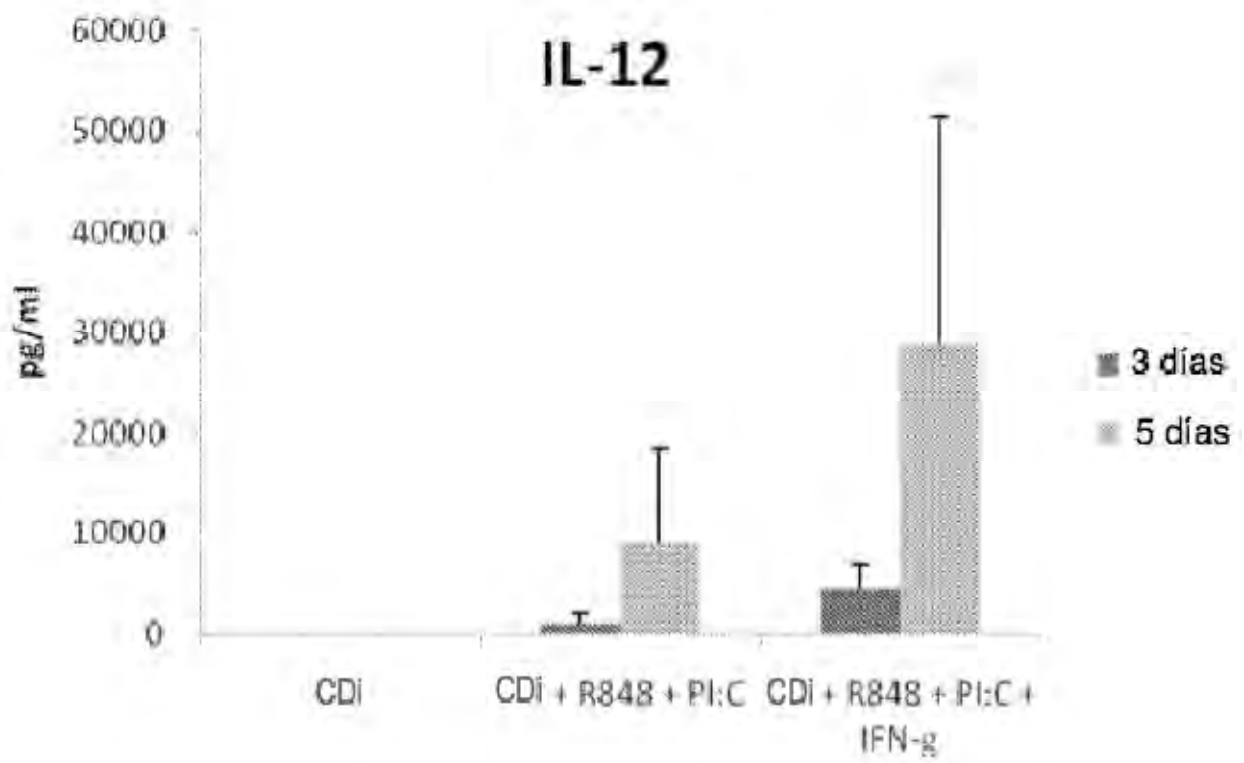


Fig. 4

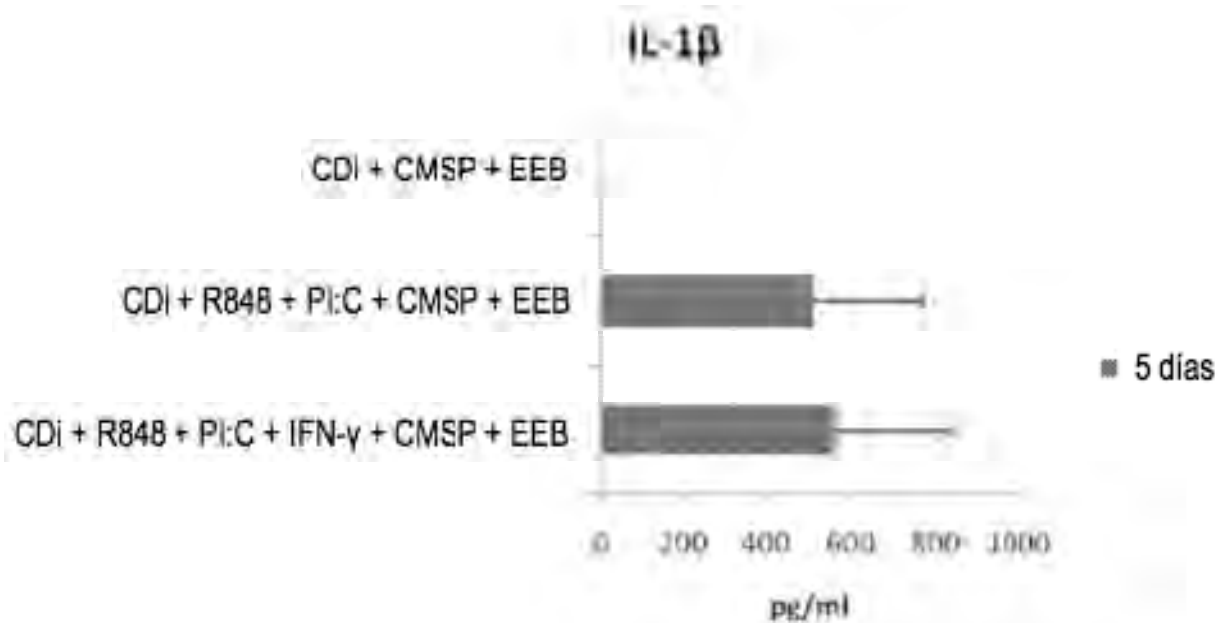


Fig. 5A

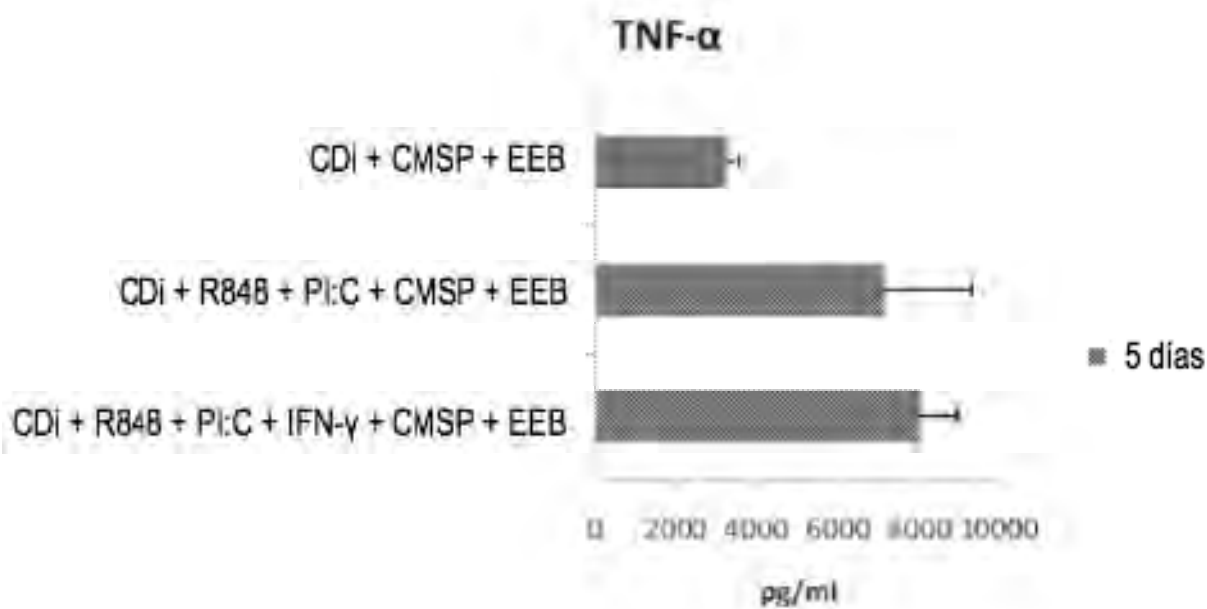


Fig. 5B

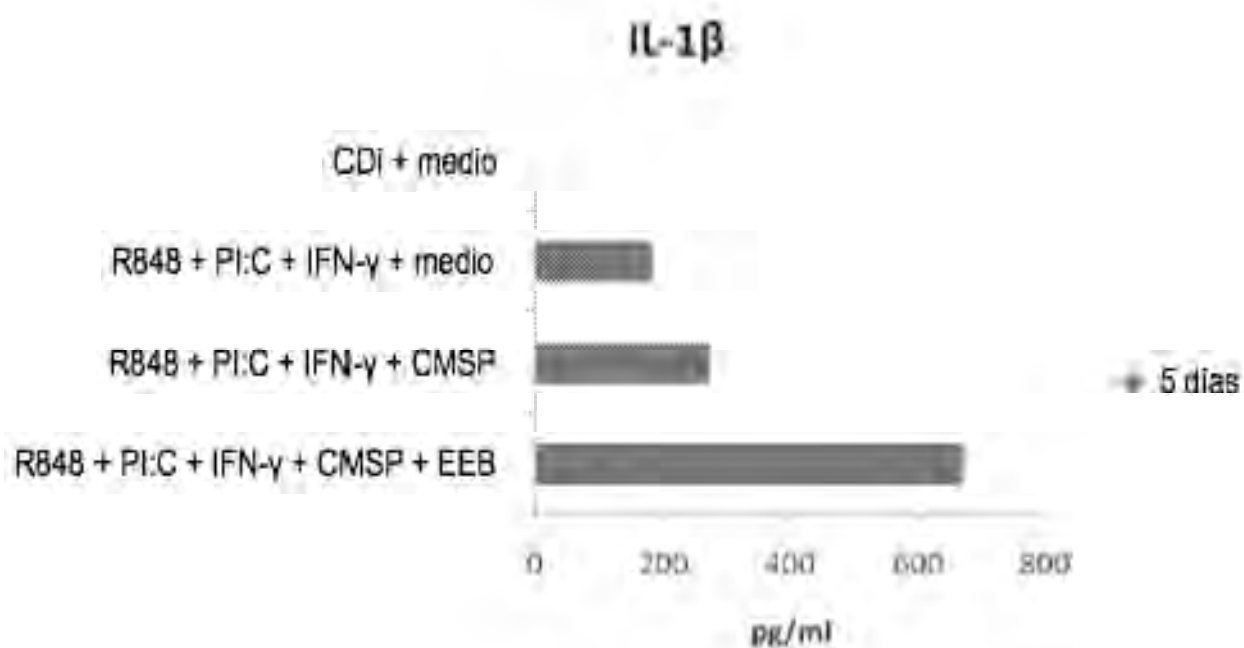


Fig. 6A

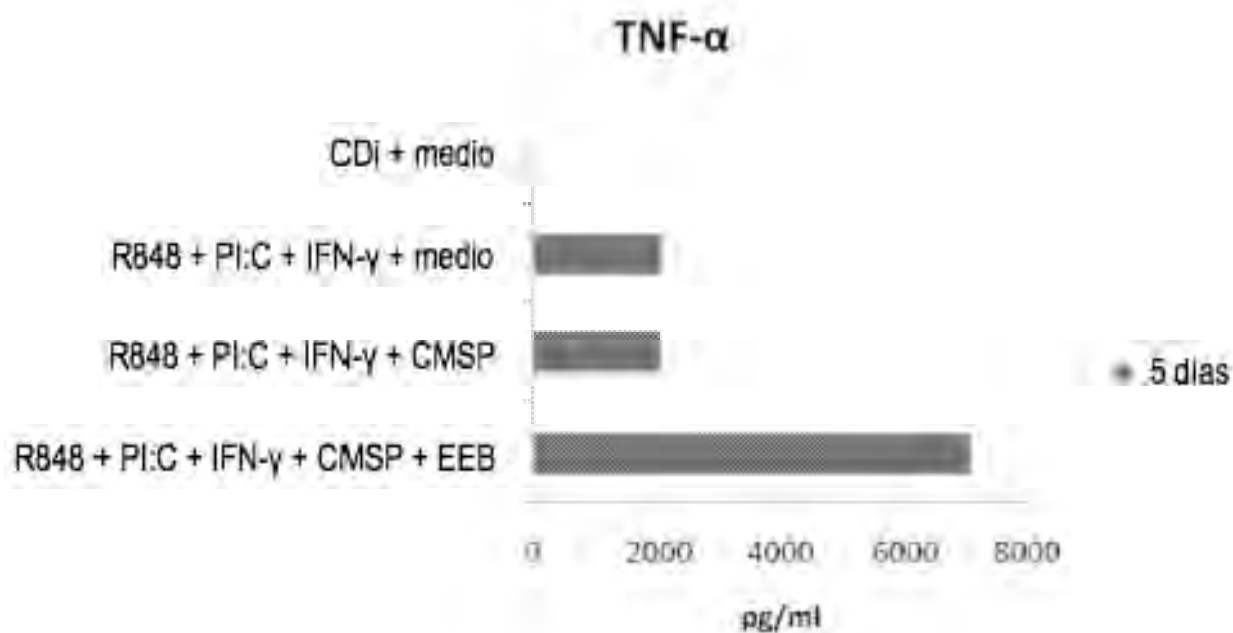


Fig. 6B

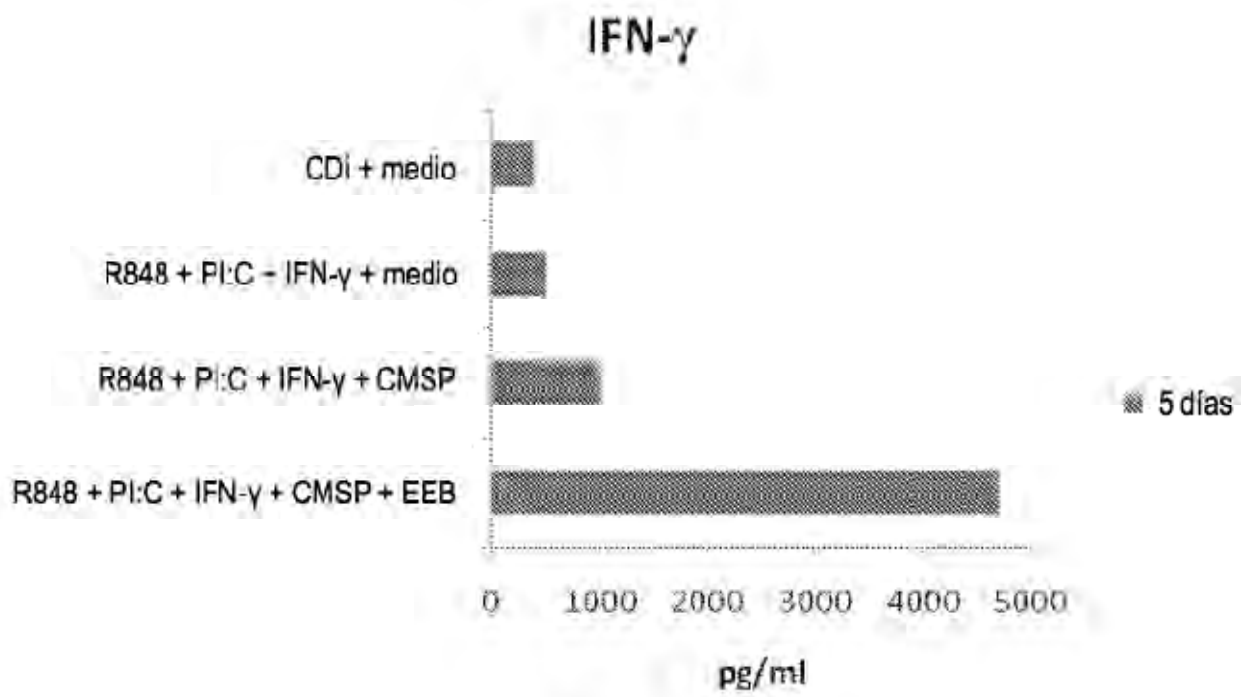


Fig. 7

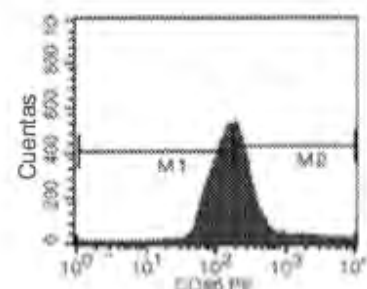
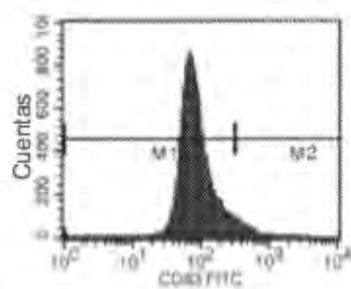
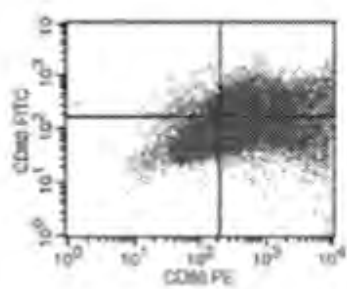


Fig. 8A

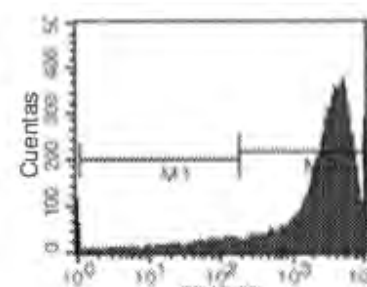
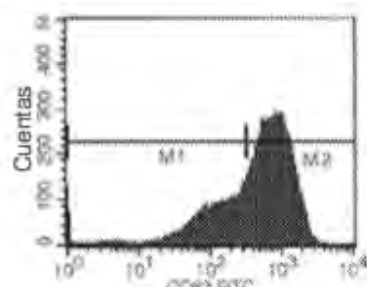
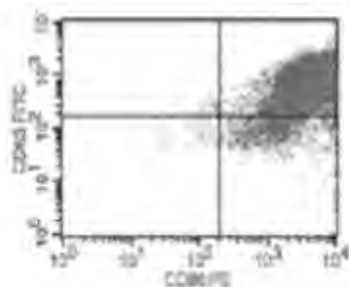


Fig. 8B

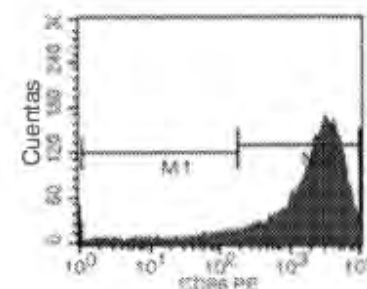
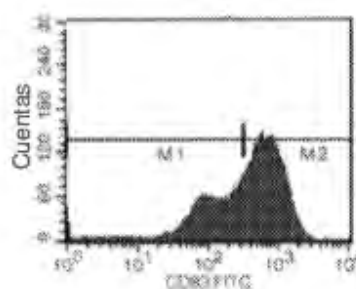
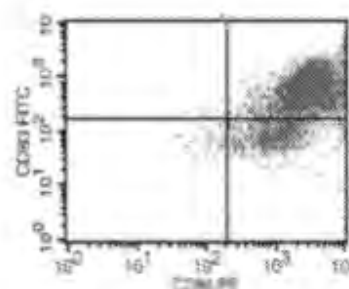


Fig. 8C

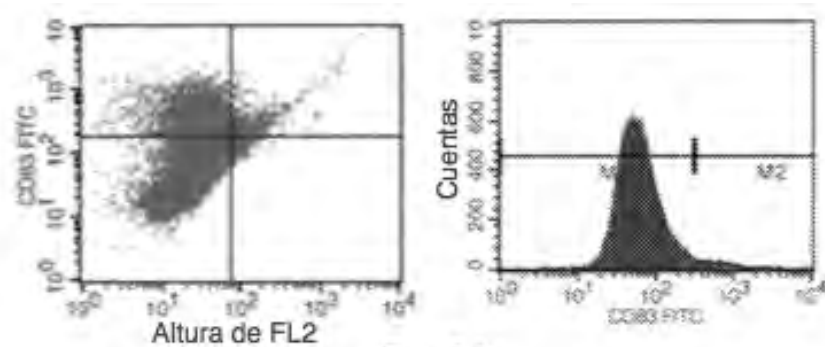


Fig. 9A

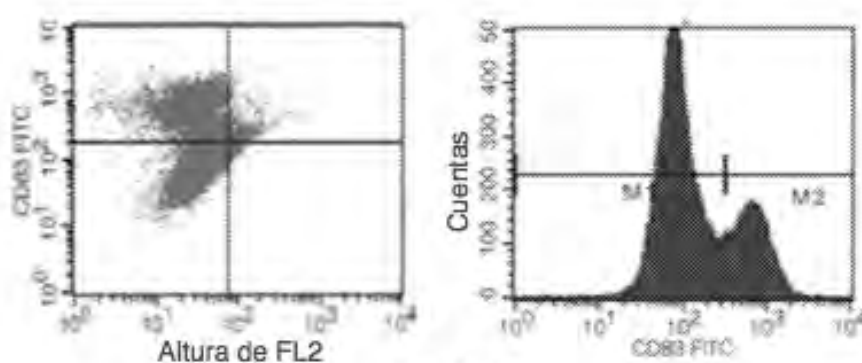


Fig. 9B

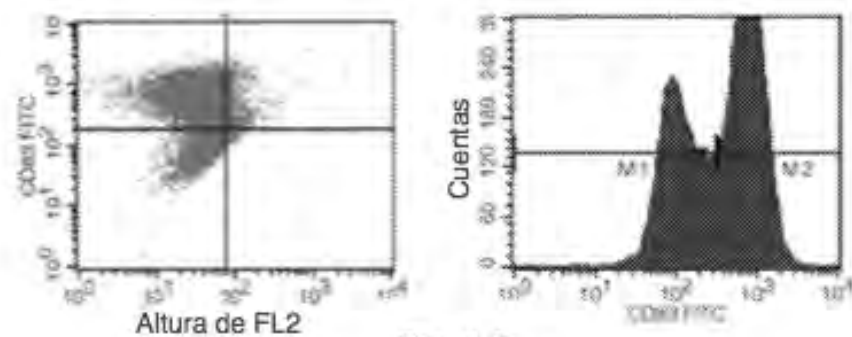


Fig. 9C

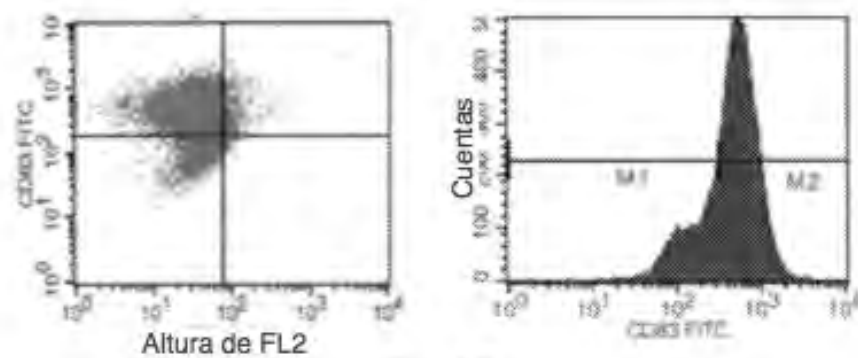


Fig. 9D

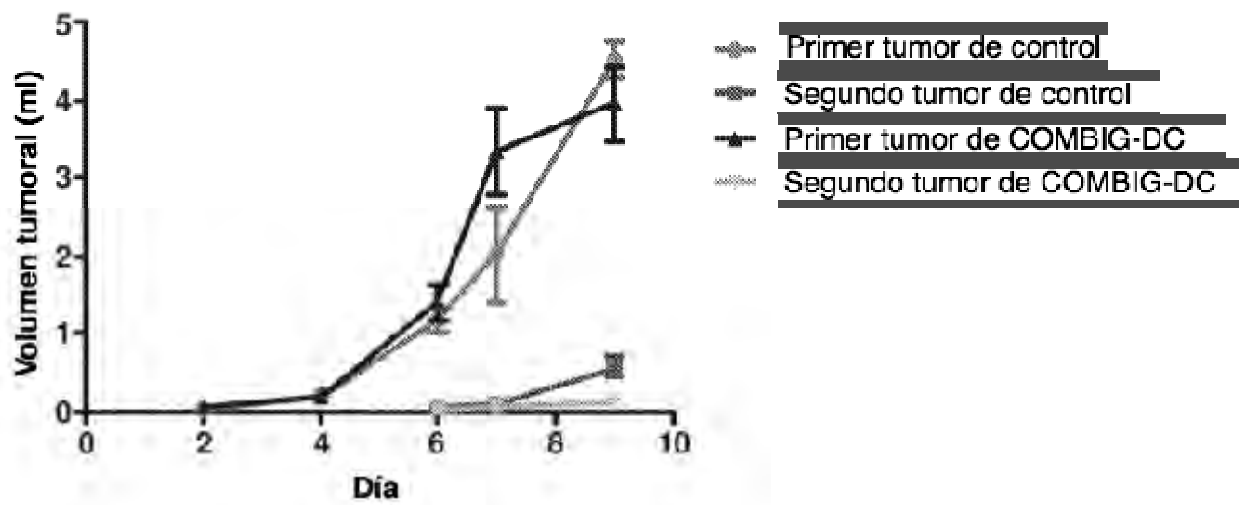


Fig. 10

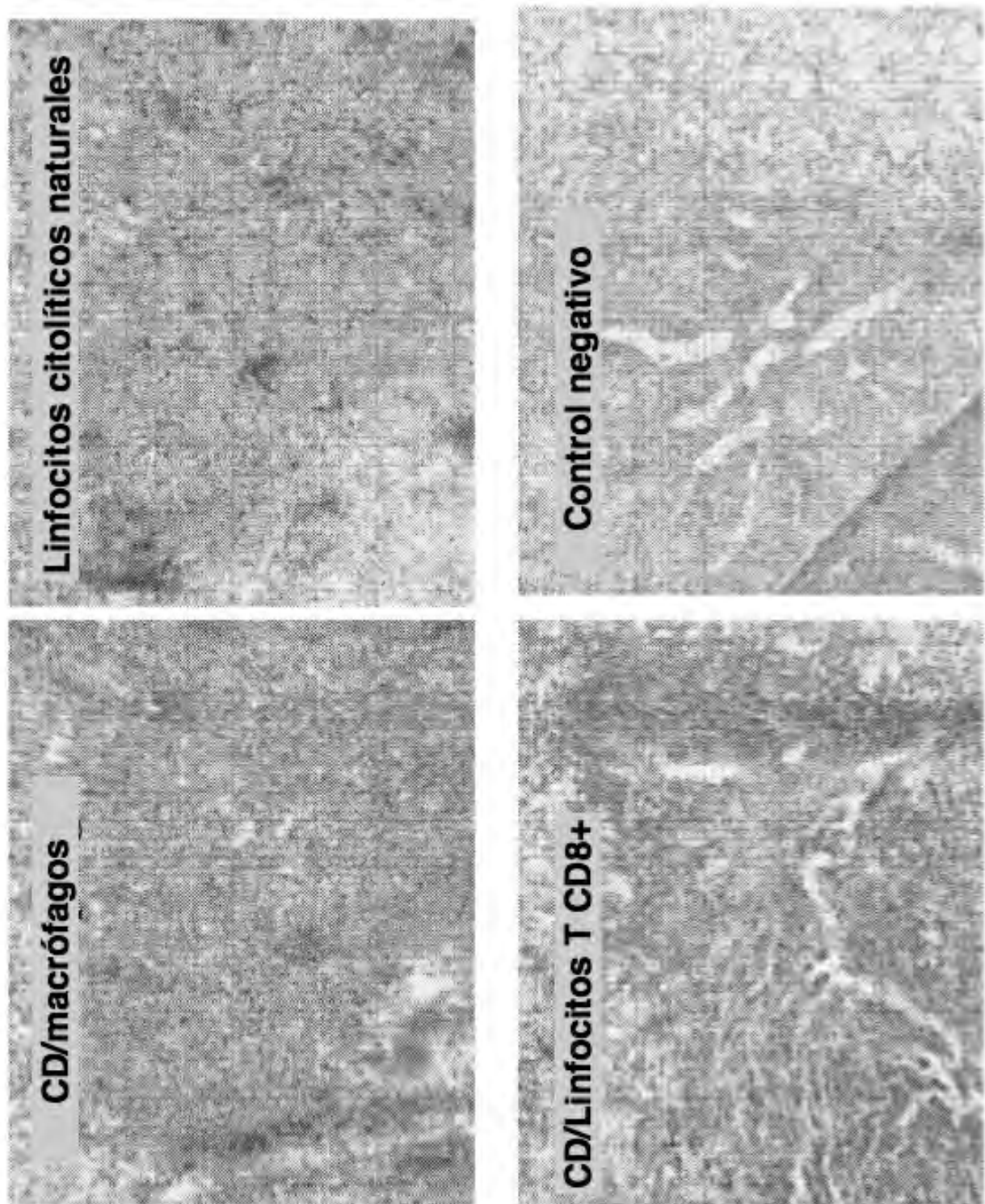


Fig. 11

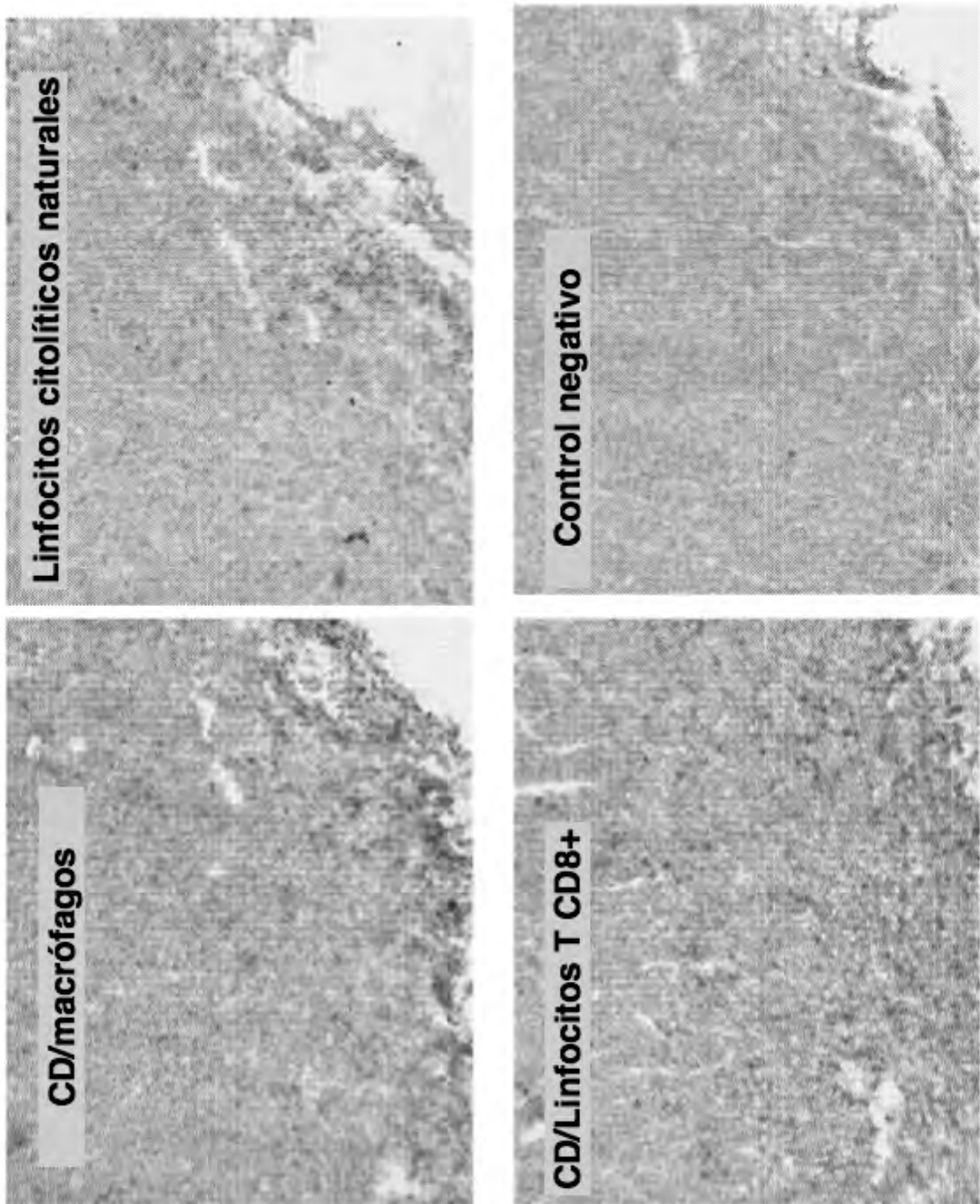


Fig. 12

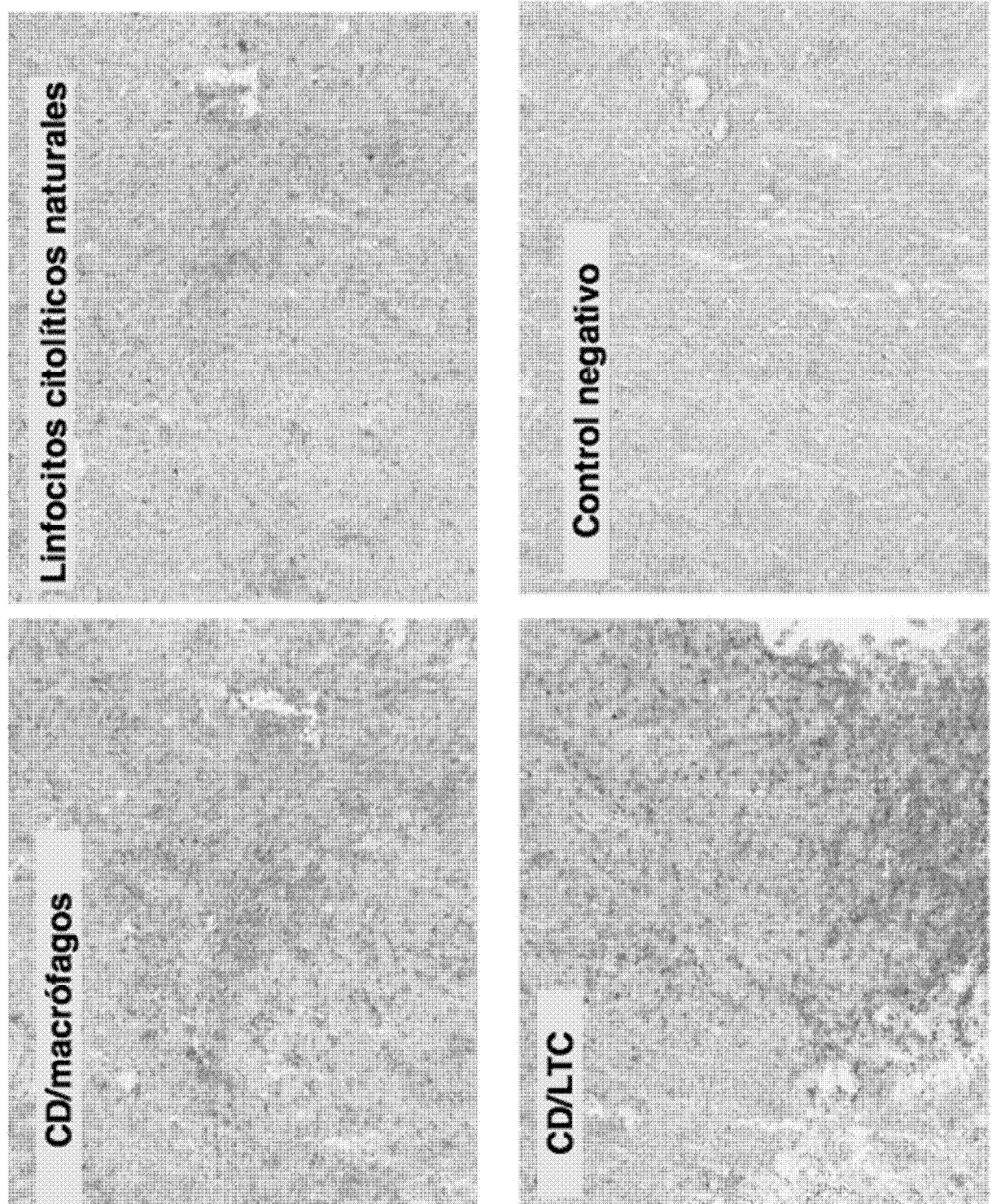


Fig. 13

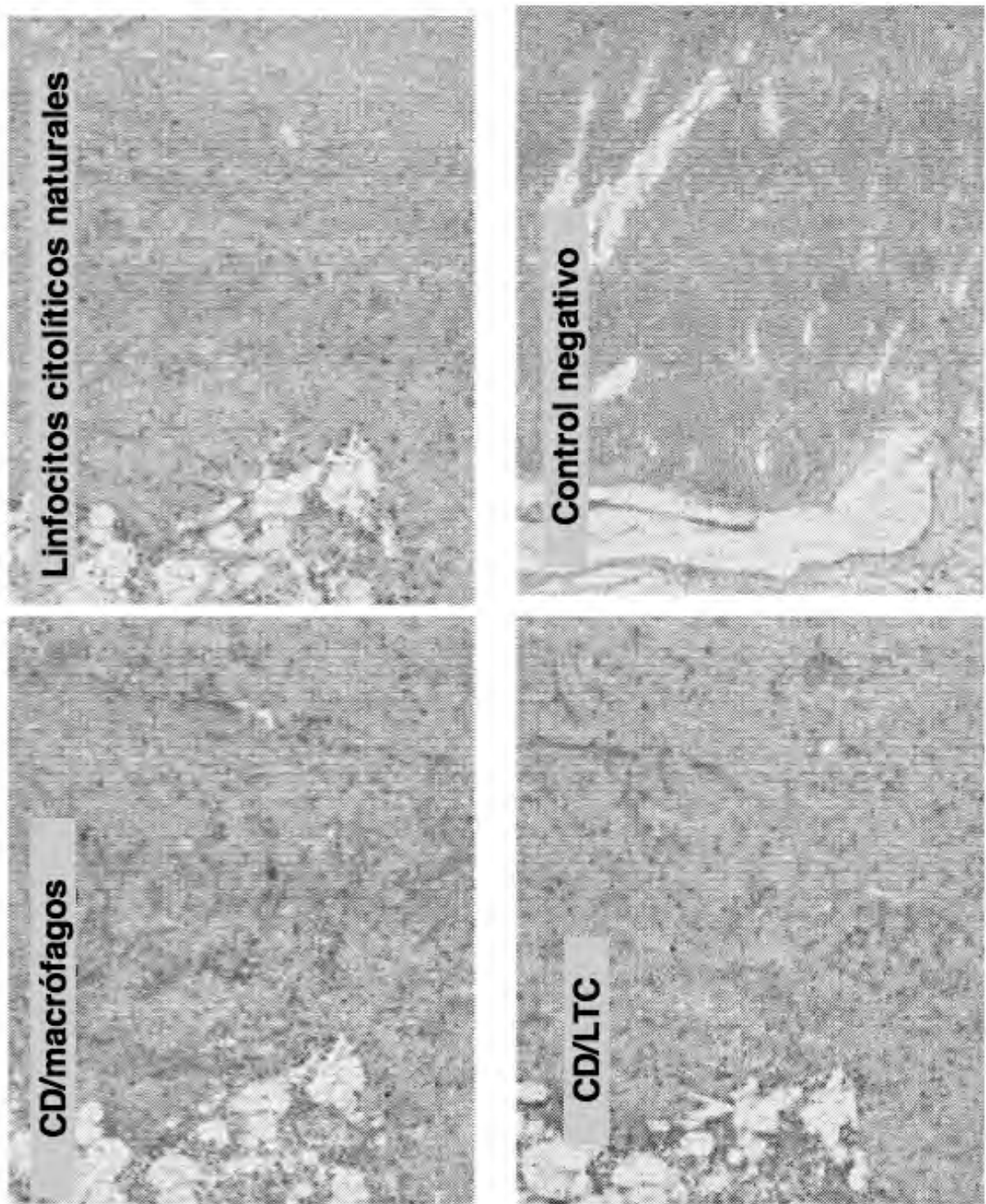


Fig. 14