

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 123**

51 Int. Cl.:

A61K 31/711 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2005 PCT/EP2005/008770**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.02.2006 WO2006015872**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2005 E 05772724 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 1776124**

54 Título: **Oligonucleótidos inmunomoduladores en conexión con medidas quimioterapéuticas**

30 Prioridad:

09.08.2004 WO PCT/DE2004/001801

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

03.07.2017

73 Titular/es:

MOLOGEN AG (100.0%)

Fabeckstrasse 30

14195 Berlin, DE

72 Inventor/es:

WITTIG, BURGHARDT;

SCHMIDT, MANUEL y

BOHLEN, HERIBERT

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 621 123 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

Oligonucleótidos inmunomoduladores en conexión con medidas quimioterapéuticas

La invención se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico, cerrada de modo covalente, para el tratamiento terapéutico de enfermedades tumorales, también en combinación con medicamentos quimioterapéuticos.

5 Las enfermedades tumorales son una de las causas más significativas de mortalidad en el mundo industrializado. Los métodos establecidos de terapia tales como la extirpación quirúrgica, la radiación y la quimioterapia con frecuencia conducen solamente a un retroceso de la enfermedad por una cantidad limitada de tiempo. Algunas enfermedades cancerígenas, tales como el carcinoma bronquial de células no pequeñas, no pueden operarse y la expectativa de vida de los pacientes es aproximadamente un año después del diagnóstico, con o sin terapia.

10 La eficacia de la quimioterapia depende principalmente del hecho que las células que se dividen y se multiplican continuamente son sensibles al tratamiento con fármacos citotóxicos. Estas células son principalmente células tumorales malignas. Puesto que las células saludables de diferentes órganos también se están dividiendo, éstos también reaccionan de manera sensible a la quimioterapia. Algunos medicamentos citostáticos provocan cáncer ellos mismos, son mutagénicos o dañan la línea germinal. Por esta razón, una breve duración de la terapia con sólo algunos ciclos de quimioterapia sería de gran ventaja para los pacientes a fin de reducir los efectos secundarios que experimentan los pacientes.

15 Uno de los grandes retos en la aplicación de quimioterapia es no solamente la reducción de efectos secundarios. También se ha mostrado que algunos cánceres desarrollan una cierta resistencia contra los fármacos empleados en quimioterapia. A pesar de todos los efectos secundarios, algunas veces significativos, la quimioterapia permanecerá como uno de los pilares del tratamiento de enfermedades neoplásicas.

20 Estado de la técnica

Los tratamientos a base de quimioterapia se realizan habitualmente en varios ciclos que se interrumpen por pausas de 2 a 4 semanas. Durante este tiempo el paciente puede recuperarse de los efectos secundarios.

25 Los medicamentos quimioterapéuticos destruyen células tumorales mediante reacciones bioquímicas que inician muerte celular.

30 Las células pueden perecer de dos maneras diferentes de muerte celular: por apoptosis, muerte celular programada, o por necrosis, muerte celular activamente inducida. Las células tumorales mueren por necrosis. El núcleo de la célula se descompone y se disuelven las estructuras internas de la célula tumoral. Esto provoca una respuesta inmune, como consecuencia de lo cual son atraídas las células del sistema inmune. Éstas definen la frontera del tejido viable adyacente y descomponen activamente las proteínas de las células necróticas.

35 En contraste con los patógenos que entran al cuerpo, los antígenos asociados a tumor (TAA) que se liberan durante esa descomposición inducen solamente una respuesta inmune débil. Con el fin de inducir una respuesta inmune suficiente contra tales antígenos, tiene que superarse el umbral existente de inmunotolerancia. Por esta razón, una estrategia de la terapia depende de incrementar el efecto de la quimioterapia combinándola con otras terapias, por ejemplo aplicaciones adicionales de interferones o citocinas, con el fin de apoyar el sistema inmune del paciente (McDermott et al., 2004, Expert Opin Biol Ther. 4: 455-68).

40 En experimentos que se refieren a la estimulación de respuestas inmunes se ha observado que ciertas secuencias de ácido nucleico que contienen motivos CpG (CpG: citosina-guanosina no metilada) pueden tener un enorme efecto estimulante inmune. Tales motivos de CpG no metilados ocurren en ADN bacteriano y representan una señal peligrosa para el sistema inmune (Krieg, Nat. Med 2003, 9: 831-835).

45 En experimentos con ratones se mostró que la aplicación de secuencias de ADN ricas en CpG conduce a una fuerte activación de linfocitos B y estimula la expresión de ciertas citocinas, por ejemplo IL-6 y GM-CSF. Adicionalmente, los motivos de CpG inducen una respuesta inmune citotóxica, sesgada por Th1, por medio de la citocinas interleukina 12, interferón gamma y factor de necrosis tumoral. Los linfocitos citotóxicos del brazo de Th1 son capaces de atacar y destruir células tumorales. Adicionalmente, los motivos de CpG conducen a la activación de células NK (asesinas naturales) y células dendríticas (Klinman et al., 1996, PNAS USA 93: 2879, Sparwasser et al., 1998, Eur. J. Immunol. 28: 2045).

50 Los ensayos clínicos en la fase III se realizan respecto del uso de oligonucleótidos que contienen CpG con el fin de apoyar la terapia de carcinoma de mama, que ha hecho metástasis, con Herceptin (HER). Esta terapia condujo a un retroceso del tumor en una fracción significativa de los pacientes (Baselga et al., 1996, J. Clin. Oncol. 14: 737-744). En contraste a la quimioterapia, el principio fundamental de la acción de Herceptin es muy diferente. En aproximadamente 20% de todos los pacientes con carcinoma de mama, la proteína receptora de HER-2 se sobre-expresa en la superficie de células cancerosas. Herceptin, un anticuerpo monoclonal, se enlaza selectivamente a partes del receptor de HER-2 y lo bloquea, de modo que no se derivan señales de crecimiento a partir del mismo. Con tumores negativos a HER-2, sin embargo, no existen sitios diana, o existen demasiado pocos, para el anticuerpo. El crecimiento de estas células se ve influenciado tan poco por el anticuerpo, que el bloqueo del receptor no tiene efecto; estos pacientes no se benefician de esta terapia.

55

El documento US 6,653,292 divulga un concepto para tratar enfermedades tumorales combinando citocinas, por ejemplo GM-CSF, con medidas quimioterapéuticas o combinando oligonucleótidos que contienen CpG, estimulantes inmunes, con quimioterapia. No obstante, los datos in-vivo e in-vitro o los resultados clínicos que demuestran la eficacia de las combinaciones reivindicadas no puede mostrarse aquí.

5 Los oligonucleótidos de CpG, que se emplean en ambos casos, se protegen mediante residuos de fosfotioato en ambos extremos con el fin de protegerlos de la digestión por parte de enzimas celulares. En estudios clínicos, no obstante, se mostró que estos compuestos de tioato imparten efectos secundarios adversos significativos, principalmente en el sistema de coagulación de la sangre y el sistema de complemento (Sheehan et al., 1998, Blood 92: 1617-1625). En macacos Rhesus se demostró una toxicidad severa de los oligonucleótidos de CpG protegidos con tioato, lo cual se debió a la
10 activación del sistema de complemento (Henry et al., 2002, Int. Immunopharmacol 2: 1657). Adicionalmente, las modificaciones de tioato condujeron a un agrandamiento significativo del bazo, a la destrucción de vesículas endocíticas y a la inmunosupresión después de aplicación repetida en ratones (Heikenwalder et al., 2004, Nat. Med. 10: 187).

Estos severos efectos secundarios permiten el uso de oligonucleótidos de CpG protegidos con tioato en terapia tumoral sólo con grandes reservas.

15 Además, las secuencias de ácido nucleico inmunoestimulante (ISS), que también contienen motivos de CpG, son sólo algunas bases en longitud y no ejercen su efecto por las proteínas de expresión codificadas a partir de ahí, y se conocen del documento EP 1 196 178 B1. Éstas son moléculas de ácido desoxirribonucleico con forma de mancuerna. Éstas consisten en oligonucleótidos cuyas bases pueden hibridar parcialmente entre sí, y uno o dos bucles de horquilla que comprenden 30 bases y contienen varios motivos de CpG (véase Fig. 1). La enseñanza del uso y de la producción de ISS
20 que contiene CpG, inmunoestimulante se divulga en detalle en el documento EP 1 196 178 B1. Las moléculas de ácido desoxirribonucleico cerradas covalentemente pueden estar hechas ventajosamente de moléculas de ácido desoxirribonucleico de cadena abierta que comprenden una secuencia parcialmente auto-complementaria y pueden formar una molécula estable de modo intermedio entre sí o con una segunda molécula. De manera favorable, la molécula puede estar hecha de ligación intramolecular de una molécula que comprende al menos dos regiones auto-complementarias, que están separadas por un espacio en el fosfato. Las moléculas obtenidas de esta manera no
25 comprenden extremos OH terminales 5' o 3' libres y por lo tanto no son accesibles para las exonucleasas.

De preferencia, el desoxirribonucleótido inmunomodulador comprende una secuencia de la secuencia de base $N^1N^2CGN^3N^4$, en la cual N^1N^2 es un elemento seleccionado del grupo que comprende GT, GG, GA, AT o AA, N^3N^4 es un elemento seleccionado del grupo que comprende CT o TT, y C es desoxicitosina, G es desoxiguanosina, A es desoxiadenosina y T es desoxitimidina. De preferencia, la secuencia de la secuencia base $N^1N^2CGN^3N^4$ está posicionada en la región monocatenaria del desoxirribonucleótido y el desoxirribonucleótido comprende 40 a 200 nucleótidos.
30

Del documento 1 196 178 B1 se conoce el uso de las moléculas dSLIM divulgadas allí como adyuvantes, en particular para desplazar una respuesta inmune de un paciente de una respuesta tipo 2 a una respuesta tipo 1.

35 Wittig et al. (2001; "Therapeutic Vaccination against Metastatic Carcinoma by Expression-Modulated and Immunomodified Autologous Tumor Cells: A First Clinical Phase I/II trial", Humane Gene Therapy, 12:267-278) describen el uso de un ODN distinto para la producción de una molécula de DSLIM la cual se investiga luego para uso en el tratamiento de cáncer. Wittig et al. callan con respecto a la estructura de dSLIM y su relevancia para el tratamiento tumoral.

A pesar de la investigación durante muchos años y de estrategias prometedoras, no ha sido posible desarrollar una terapia eficaz contra la mayoría de las enfermedades tumorales comunes.

40 A la luz de este estado de la técnica, el objetivo de la presente invención es proporcionar un compuesto y una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de enfermedades tumorales que conduzcan a una inducción de una respuesta inmune humoral y celular específica para el tumor.

La solución de acuerdo con la invención y ventajas de la invención

45 El problema fundamental en el reconocimiento de tumores por parte del sistema inmune del cuerpo es que los tumores, en contraste con la mayoría de los microorganismos, no inducen una reacción inflamatoria. Por lo tanto falta la señal para el sistema inmune de empezar la reacción inmune. Las células tumorales no pueden reconocerse como células aberrantes y, por lo tanto, son capaces de crecer y multiplicarse sin impedimentos.

La descomposición necrótica de las células tumorales, que es una consecuencia de la quimioterapia, libera desechos celulares y partículas moleculares del citoplasma. Estas estructuras liberadas, también denominados antígenos tumorales, representan estructuras importantes para direcciona y reconocer para el ataque del sistema inmune contra células tumorales residuales o células que se han esparcido en el cuerpo. Como una consecuencia de las medidas de la quimioterapia o de la radioterapia con medicamentos citostáticos muy tóxicos, se encuentra presente una gran cantidad de antígenos en el cuerpo, causados el inicio de la necrosis. El sistema inmune innato no tiene especificidad impartida de modo evolucionario para estas estructuras como si las tiene para microbios u otros agentes externos de enfermedad. Por lo tanto, las estructuras antigénicas relacionadas con un tumor no se reconocen, o se reconocen insuficientemente, por
50 componentes innatos de inmunidad. Esto a su vez causa que los antígenos tumorales no sean atacados de manera eficiente por el sistema inmune innato. Puesto que el sistema inmune adaptable no se provoca por antígenos tumorales
55

en ausencia de co-factores tales como señales inflamatorias, no se provoca una respuesta inmune específica contra los antígenos tumorales.

Este problema se resuelve por el uso de un inmuno-modulador con base en ADN, en cuyo caso dicho inmuno-modulador con base en ADN se encuentra presente en forma de moléculas de ácido desoxirribonucleico inmuno-moduladoras, cerradas de modo covalente, con forma de mancuerna, que tienen una combinación de eje bicatenario y bucles monocatenarios, y cada uno de los bucles comprende tres motivos de CpG, y el inmuno-modulador consiste en la secuencia tal como se muestra en la figura 1b para usar en el tratamiento de enfermedades tumorales y la vacuna de combinación según la reivindicación 3.

La invención hace uso del hecho de que una respuesta inmune no específica puede cambiarse a una respuesta inmune adaptable específica si están presentes antígenos contra los cuales se va a organizar una respuesta inmune específica.

Suministrando el inmuno-modulador de acuerdo con la invención, se conduce el sistema inmune a reaccionar de una manera como si hubiera tenido lugar una infección, la cual en realidad no ocurrió. Como consecuencia, las células, principalmente timocitos que poseen una función auxiliar, y timocitos citotóxicos y células B y las denominadas células NK (asesinas naturales), macrófagos y monocitos, así como también células dendríticas y sus precursores, como también poblaciones de células funcionalmente no explicadas todavía, con funciones dentro del sistema inmune, se estimulan para proliferar, migrar, diferenciar o volverse activas y se inducen a trasladarse al sitio de la infección. Estas células inmunes diferentes, ya sean recién formadas en los procesos descritos antes o que se hayan inducido a migrar por las sustancias de señal, no encuentran, no obstante, un agente infeccioso en el sitio supuesto de infección. Estas células comenzarán luego a involucrarse en fagocitosis de los antígenos tumorales, en lugar de los agentes infecciosos que no están presentes, y los presentan como fragmentos moleculares al sistema inmune adaptable. Por esta ruta, el sistema inmune adaptable aprende a reconocer el reconocimiento molecular y las estructuras de direccionamiento de las células tumorales y produce células inmunes aún más específicas contra estas. De esta manera, el sistema inmune adquiere la capacidad de producir células de defensa y destrucción contra tumores incluso para el futuro.

El inmuno-modulador según la invención conduce a la generación de antígenos de memoria, los llamados antígenos de recordación. Mediado por células inmunes especiales, el sistema inmune puede recordar estos antígenos y se provoca una nueva respuesta celular al renovarse el contacto (véase fig. 7).

Por lo tanto, la invención se refiere al uso novedoso del inmuno-modulador según la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones y a la producción de una sustancia farmacéutica que puede aplicarse en combinación con medicamentos quimioterapéuticos en la terapia de enfermedad neoplásica.

No se divulgó ni podía esperarse que la molécula de ácido desoxirribonucleico inmuno-moduladora de la invención fuera útil para servir al propósito de estimular el sistema inmune humano como una medida preparatoria en el evento de un diagnóstico relacionado con una enfermedad neoplásica maligna, con aplicación indicada de manera concurrente de medicamentos citostáticos.

En el contexto de la invención divulgada en la presente, los siguientes términos deben interpretarse tal como sigue:

Un "paciente" para los propósitos de la presente invención incluye tanto humanos como otros animales, particularmente mamíferos y otros organismos. Por lo tanto, los métodos son aplicables tanto para la terapia humana como para las aplicaciones veterinarias. En la realización preferida, el paciente es un mamífero, y en la realización más preferida el paciente es humano.

El término "animal" se refiere un organismo con un sistema circulatorio cerrado de vasos sanguíneos e incluye aves, mamíferos y cocodrilos. El término "animal" que se usa aquí también incluye sujetos humanos.

El término "angiogénesis" se refiere a la generación de nuevos vasos sanguíneos en células, tejidos, órganos o tumores.

El término "metástasis" se refiere al proceso por el cual las células tumorales se esparcen a distintas partes del cuerpo. El término también se usa en la presente para referirse un tumor que se desarrolla mediante del proceso metastásico.

El término "contactar" se usa en la presente de manera intercambiable con lo siguiente: combinar con, adicionar a, mezclado con, pasados sobre, incubado con, fluido sobre, etcétera. Además, los compuestos de la presente invención pueden "administrarse" mediante cualquier método convencional tal como, por ejemplo, la ruta parenteral, oral, tópica y por inhalación, tal como se describe en la presente.

Tal como se usa en la presente, el término "cantidad segura y efectiva" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica), de manera proporcional a una relación razonable beneficio/riesgo, cuando se usa a la manera de esta invención. Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad de un compuesto de la presente invención que es efectiva para producir la respuesta terapéutica deseada. Por ejemplo, una cantidad efectiva para retrasar el crecimiento o la causa de un cáncer, ya sea un sarcoma o un linfoma, para encoger o no hacer metástasis. La cantidad específica, segura y efectiva una cantidad terapéuticamente efectiva variará con tales factores como la condición particular que se está tratando, la condición física del paciente, el tipo de mamífero que se está tratando,

la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si hay alguna) y las formulaciones específicas empleadas, así como la estructura de los compuestos o sus derivados.

5 “Una cantidad anti-angiogénica” se refiere a una cantidad de un compuesto o de una composición que es efectiva para debilitar, suprimir o inhibir angiogénesis o para dar lugar a un mejoramiento de los síntomas asociados con una enfermedad angiogénica. El resultado deseado puede ser un alivio subjetivo de un síntoma(s) o un mejoramiento objetivamente identificable en el receptor de la dosis, una disminución en la vascularización de células endoteliales o una disminución en la tasa de angiogénesis, tal como lo note un especialista clínico u otro observador calificado.

10 Los términos “tratar cáncer”, “terapia”, y similares se refiere generalmente a cualquier mejoramiento en el mamífero que tienen cáncer, en cuyo caso el mejoramiento puede atribuirse al tratamiento con los compuestos de la presente invención. El mejoramiento puede ser subjetivo u objetivo. Por ejemplo, si el mamífero es humano, el paciente puede notar vigor o vitalidad que han mejorado o dolor que ha disminuido como síntomas subjetivos de mejoramiento o respuesta a la terapia. Como alternativa, el especialista clínico puede notar de crecimiento en el tamaño del tumor o carga de tumor con base en un examen físico, parámetros de laboratorio, marcadores de tumor o hallazgos radiográficos. Algunas señas de laboratorio que el especialista clínico puede observar para respuesta a la terapia incluyen normalización de pruebas, tales como 15 conteo de glóbulos blancos, conteo de glóbulos rojos, conteo de plaquetas, tasa de sedimentación de eritrocitos y diversos niveles de enzimas. De manera adicional, el especialista clínico puede observar una disminución en el marcador de tumor detectable. Como alternativa pueden usarse otros ensayos para evaluar el mejoramiento objetivo tales como ecografías, ensayos de resonancia magnética nuclear y ensayos de emisiones de positrones.

20 “Inhibir el crecimiento de células tumorales” puede evaluarse por cualquier método aceptado de medición de si el crecimiento de las células tumorales se ha desacelerado o disminuido. Esto incluye observación directa de evaluación indirecta tal como síntomas subjetivos o señales objetivas, como se han discutido antes.

25 Por consiguiente, las composiciones de la invención se administran a células. Por “administrar” se entiende en la presente la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de los agentes candidatos de la invención a una célula, ya sea en cultivo celular buen un paciente. Por “dosis terapéuticamente efectiva” se entiende en la presente una dosis que produce los efectos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y podrá establecerse por alguien especialista en la materia usando técnicas conocidas. Tal como se conocen la técnica, pueden ser necesarios ajustes para entrega sistémica versus localizada, edad, peso corporal, estado general de salud, sexo, 30 dieta, tiempo de administración, interacción medicamentosa y la severidad de la condición, y podrán establecerse mediante experimentación rutinaria por aquellos especialistas en la técnica. Por “células” se entiende en la presente casi cualquier célula en la cual pueda alterarse la mitosis o la meiosis.

En el contexto de la presente invención, el término “tratamiento” significa el efecto profiláctico y/o terapéutico de un compuesto farmacéutico.

35 La inmuno-estimulación/inmuno-modulación significa la manipulación terapéutica de la reacción inmune, es decir la propensión del organismo a organizar una defensa. El objetivo de tal terapia es combatir el tumor con medios facilitados por el cuerpo.

La quimioterapia es la terapia farmacéutica sistemática de enfermedades tumorales con los denominados medicamentos citostáticos.

40 En el contexto de la presente invención, el término quimioterapéutico se refiere a medicamentos citostáticos que se aplican habitualmente en terapia tumoral adyuvante, paliativa y curativa. Estos incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a los siguientes:

Compuestos

- del grupo de inhibidores de la topoisomerasa, por ejemplo Irinotecán, Topotecán,
- del grupo de agentes alquilantes, por ejemplo Busulfano, Dacarbazina
- del grupo de compuestos de platino, por ejemplo cisplatino, carboplatino o oxaliplatino,
- 45 ○ del grupo de compuestos antimetabolitos, por ejemplo Metotrexato, 5-Fluoruracilo, Mercaptopurina o Citarabina,
- del grupo de compuestos de antraciclina y actinimicina, por ejemplo Mitoxantrona y Amsacrina,
- del grupo de alcaloides vinca, por ejemplo Vinorelbina,
- del grupo de compuestos de taxano, por ejemplo Paclitaxel y Docetaxel,
- del grupo de compuestos anti-estrogénicos, por ejemplo Tamoxifeno,

50 A continuación se muestran quimioterapéuticos cancerosos más detallados. Se caracterizan en diferentes grupos dependiendo de su naturaleza química o su impacto fisiológico al organismo, más precisamente

- AGENTES ALQUILANTES
- ANTIMETABOLITOS
- ANTIBIÓTICOS
- INHIBIDORES MITÓTICOS
- 5 • INHIBIDORES DE FUNCIÓN DE CROMATINA
- HORMONAS E INHIBIDORES DE HORMONAS
- INMUNOMODULADORES
- MISCELÁNEOS

El grupo de AGENTES ALQUILANTES comprende los siguientes agentes:

- 10 I. Mostazas nitrogenadas
 - mecloretamina (Mustargen)
 - ciclofosfamida (Cytoxan, Neosar)
 - ifosfamida (Ifex)
 - fenilalanina mostaza; melfaleno (Alkeran)
 - 15 - clorambucol (Leukeran)
 - uracilo mostaza
 - estramustina (Emcyt)
 - II. Etileniminas
 - tiotepa (Thioplex)
 - 20 III. Sulfonatos de alquilo
 - busulfano (Myerlan)
 - IV. Nitrosoureas
 - lomustina (CeeNU)
 - carmustina (BiCNU, BCNU)
 - 25 - estreptozocina (Zanosar)
 - V. Triazenos
 - dacarbazine (DTIC-Dome)
 - VI. Complejos de coordinación de platino
 - cis-platino, cisplatino (Platinol, Platinol AQ)
 - 30 - carboplatino (Paraplatino)
 - VII. OTROS
 - altretamina (Hexalen)
- El grupo de ANTIMETABOLITOS comprende los siguientes agentes
- I. Análogos de ácido fólico
 - 35 - metotrexato (Amethopterin, Folex, Mexate, Rheumatrex)
 - II. Análogos de pirimidina
 - 5-fluoruracilo (Adrucil, Efudex, Fluoroplex)

- floxuridina, 5-fluorodeoxiuridina (FUDR)
 - capecitabina (Xeloda)
 - fludarabina: (Fludara)
 - citosina arabinósido (Cytaribine, Cytosar, ARA-C)
- 5 II. Análogos de purina
- 6-mercaptapurina (Purinethol)
 - 6-tioguanina (Thioguanine)
 - gemcitabina (Gemzar)
 - cladribina (Leustatin)
- 10 - desoxicoformicina; pentostatina (Nipent)
- El grupo de ANTIBIÓTICOS comprende los siguientes agentes
- doxorubicin (Adriamycin, Rubex, Doxil, preparación liposomal de Daunoxome)
 - daunorubicina (Daunomicina, Cerubidina)
 - idarubicina (Idamycin)
- 15 - valrubicina (Valstar)
- mitoxantrone (Novantrone)
 - dactinomicina (Actinomicina D, Cosmegen)
 - mitramicina, plicamicina (Mitracina)
 - mitomicina C (Mutamycin)
- 20 - bleomicina (Blenoxane)
- procarbazona (Matulane)
- El grupo de INHIBIDORES MITÓTICOS comprende los siguientes agentes
- I. Taxanos (diterpenos)
- paclitaxel (Taxol)
- 25 - docetaxel (Taxotere)
- II. Alcaloides vinca
- sulfato de vinblastina (Velban, Velsar, VLB)
 - sulfato de vincristina (Oncovin, Vincasar PFS, Vincrex)
 - sulfato de vinorelbina (Navelbine)
- 30 El grupo de INHIBIDORES DE FUNCIÓN DE CROMATINA comprende los siguientes agentes
- I. Camptotecinas
- topotecán (Camptosar)
 - irinotecán (Hycamtin)
- II. Epipodofilotoxinas
- 35 - etoposido (VP-16, VePesid, Toposar)
- teniposido (VM-26, Vumon)
- El grupo de HORMONAS E INHIBIDORES DE HORMONAS comprende los siguientes agentes

- I. Estrógenos
 - dietilstilbesterol (Stilbesterol, Stilphostrol)
 - estradiol, estrógeno (many brands)
 - estrógeno esterificado (Estratab, Menest)
- 5 - estramustina (Emcyt)
- II. Antiestrógenos
 - tamoxifeno (Nolvadex)
 - toremifeno (Fareston)
- II. Inhibidores de aromatasa
- 10 - anastrozol (Arimidex)
- letrozol (Femara)
- III. Progestinas
 - 17-OH-progesterona (muchas marcas)
 - medroxiprogesterona (muchas marcas)
- 15 - acetato de megestrol (Megace)
- IV. Agonistas de GnRH
 - goserelina (Zoladex)
 - leuprolide (Leupron)
- V. Andrógenos
- 20 - testosteronas (muchas marcas)
- metilt testosterona (muchas marcas)
- fluoxmesterona (Android-F, Halotestin)
- VI. Antiandrógenos
 - flutamida (Eulexin)
- 25 - bicalutamida (Casodex)
- nilutamida (Nilandron)
- VII. Inhibidores de síntesis
 - aminoglutetimida (Cytadren)
 - ketoconazol (Nizoral)
- 30 El grupo de INMUNOMODULADORES comprende los siguientes agentes
 - rituximab (Rituxan)
 - trastuzumab (Herceptin)
 - denileuquina diftitox (Ontak)
 - levamisol (Ergamisol)
- 35 - bacilo Calmette-Guerin, BCG (TheraCys, TICE BCG)
- interferón alfa-2a, alfa 2b (Roferon-A, Intron A)
- interleuquina-2, aldesleuquina (ProLeukin)

Se conocen otros varios quimioterapéuticos misceláneos y se muestran con la presente:

- I-aspariginasa (Elspar, Kidrolase)
- pegaspasgasa (Oncaspar)
- hidroxuurea (Hydrea, Doxia)
- 5 - leucovorina (Wellcovorin)
- mitotano (Lysodren)
- porfimer (Photofrin)
- tretinoin (Veasnoïd)

10 Todos los quimioterapéuticos cancerosos precedentes son parte y objeto de la invención. Además, el alcance de la invención también incluye otros medicamentos citostáticos que se emplean en quimioterapia y no se han oxidado explícitamente antes. Se prefieren medicamentos citostáticos o combinaciones de los mismos que se aplican a un paciente en un solo ciclo.

15 Las composiciones y métodos suministrados en la presente son considerados particularmente útiles para el tratamiento de cáncer que incluye tumores sólidos tales como carcinomas de piel, mama, cerebro, cervical, carcinoma testicular, etcétera. Más particularmente, cánceres que pueden tratarse por las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a: cardíaco: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rdbdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rdbdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; pulmón: carcinoma broncogénico (de células escamosas, de células pequeñas no diferenciadas, de células grandes no diferenciadas, adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; Gastrointestinal: de esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, linfoma), de estómago (carcinoma, linfoma, leiomiomasarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), de intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Karposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), de intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma); tracto genitourinario: de riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm [nefroblastoma], linfoma, leucemia), de la vejiga y la uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma), de la próstata (adenocarcinoma, sarcoma), de los testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrional, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, lipoma); del hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; huesos: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de célula reticular), mieloma múltiple, cordoma tumoral de células gigantes malignas, osteocronfoma (exostosis cartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma benigno, condromixofibroma, osteoma osteoide tumores de células gigantes; sistema nervioso: de cráneo (osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteitis deformans), de meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), de cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); ginecológico: útero (carcinoma endometrial), cérvix (carcinoma cervical, displasia cervical pre-tumoral), ovarios (carcinoma de ovario [cistoadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma, carcinoma no clasificado], tumores de células de granulosa-thecal, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células claras, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide (rdbdomiosarcoma embrionario), trompas de Falopio (carcinoma); hematológico: de sangre (leucemia mielóide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin [linfoma maligno]; de la piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Karposi, nevos displásicos de lunares, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; y glándulas suprarrenales: neuroblastoma. Por lo tanto, el término "célula cancerosa" tal como se suministra en la presente incluye una célula aquejada por cualquiera de las condiciones identificadas antes.

50 Por lo tanto, tal como se usa en la presente, "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer o neoplasma o tumores malignos encontrados en mamíferos, que incluyen carcinomas y sarcomas. Ejemplos de cánceres son cáncer del cerebro, mama, cérvix, colon, cabeza y cuello, riñones, pulmón, de pulmón de células no pequeñas, melanoma, mesotelioma, ovario, sarcoma, estómago, útero y meduloblastoma.

55 El término "leucemia" se refiere ampliamente a enfermedades malignas, progresivas de los órganos que forman sangre y generalmente se caracteriza por una proliferación distorsionada y un desarrollo de leucocitos y sus precursores en la sangre y en la médula. La leucemia generalmente se clasifica de modo clínico con base en (1) la duración y el carácter del enfermedad, aguda o crónica; (2) el tipo de célula involucrada; mielóide (mielógena), linfóide (linfógena), o monocítica; y (3) el incremento o no incremento en el número de células anormales en la leucémica de sangre o leucémica (subleucémica). El modelo de leucemia P388 es ampliamente aceptado por ser predictivo de actividad anti-leucémica in vivo. Se cree que el compuesto que ensaya positivo en el ensayo P388 exhibirá generalmente algún nivel de actividad

anti-leucémica in vivo a pesar del tipo de leucemia que se esté tratando. Por consiguiente, la presente invención incluye un método de tratar leucemia y, preferiblemente, un método de tratar leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T de adulto, leucemia aleucémica, leucemia leucocitémica, leucemia basofílica, leucemia de células blásticas, leucemia 5 bovina, leucemia mielocítica crónica, cutis leucémico, leucemia embrionaria, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica, leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células de linfosarcoma, leucemia de mastocitos, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, 10 leucemia granulocítica mieloide, leucemia mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células de plasma, leucemia plasmacítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica, y leucemia de células no diferenciadas.

El término "sarcoma" por lo general se refiere a un tumor que está hecho de una sustancia como el tejido conectivo embrionario y generalmente está compuesto de células empacadas cercanamente, incrustadas en una sustancia fibrilar. 15 Los sarcomas que pueden tratarse con un éster de la invención y opcionalmente un agente potenciador y/o quimioterapéutico incluyen un condrosarcoma, fibrosarcoma, linfosarcoma, melanosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, sarcoma de Abemethy, sarcoma adiposo, liposarcoma, sarcoma de la parte blanda alveolar, sarcoma ameloblástico, sarcoma botiroides, sarcoma cloroma, carcinoma corio, sarcoma embrionario, sarcoma de tumor de Wilms, sarcoma de endometrio, sarcoma estromal, sarcoma de Ewing, sarcoma fascial, sarcoma fibroblástico, sarcoma de células 20 gigantes, sarcoma granulocítico, sarcoma de Hodgkin, sarcoma hemorrágico pigmentado múltiple idiopático, sarcoma inmunoblástico de células B, linfoma, sarcoma inmunoblástico de células T, sarcoma de Jensen, sarcoma de Kaposi, sarcoma de células de Kupffer, angiosarcoma, leucosarcoma, sarcoma mesenquimoma maligno, sarcoma parosteal, sarcoma reticulocítico, sarcoma de Rous, seroquístico, sarcoma sinovial y sarcoma telangiectático.

El término "melanoma" se adopta para dar entender un tumor que surge del sistema melanocítico de la piel y de otros 25 órganos. Los melanomas que pueden tratarse con dichos ésteres y opcionalmente un potenciador y/u otro agente quimioterapéutico incluyen, por ejemplo, melanoma lentiginoso acral, melanoma amelanótico, melanoma juvenil benigno, melanoma de Cloudman, melanoma S91, melanoma de Harding-Passey, melanoma juvenil, melanoma léntigo maligno, melanoma maligno, melanoma nodular, melanoma subungueal, y melanoma de difusión superficial.

El término "carcinoma" se refiere a un nuevo crecimiento maligno hecho de células epiteliales que tienden a infiltrarse en 30 los tejidos circundantes y dan origen a metástasis. Carcinomas ejemplares que pueden tratarse con dicho éster y opcionalmente un potenciador y/o un agente quimioterapéutico incluyen, por ejemplo, carcinoma acinar, carcinoma acinoso, carcinoma adenoquístico, carcinoma quístico adenoide, carcinoma adenomatoso, carcinoma de corteza suprarrenal, carcinoma alveolar, carcinoma de células alveolares, carcinoma de células basales, carcinoma basocelulares, carcinoma basaloide, carcinoma de células basoescamosas, carcinoma bronquioalveolar, carcinoma bronquiolar, 35 carcinoma broncogénico, carcinoma cerebriiforme, carcinoma colangiocelular, carcinoma coriónico, carcinoma coloide, carcinoma comedo, carcinoma de cuerpo, carcinoma cribriforme, carcinoma en cuirasse (en coraza), carcinoma cutáneo, carcinoma cilíndrico, carcinoma de células cilíndricas, carcinoma de ducto, carcinoma durum, carcinoma embrionario, carcinoma encefaloide, carcinoma epiermoide, carcinoma de adenoide epitelial, carcinoma exófitico, carcinoma ex ulcere, carcinoma fibrosum, carcinoma gelatiniforme, carcinoma gelatinoso, carcinoma de células gigantes, carcinoma 40 gigantocelular, carcinoma glandular, carcinoma de células de granulosa, carcinoma de matriz pilosa, carcinoma hematoide, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células de Hurthle, carcinoma de hialina, carcinoma hipemefroide, carcinoma embrionario infantil, carcinoma in situ, carcinoma intraepidérmico, carcinoma intraepitelial, carcinoma de Krompecher, carcinoma de células de Kulchitzky, carcinoma de células grandes, carcinoma lenticular, carcinoma lenticular, carcinoma lipomatoso, carcinoma linfoepitelial, carcinoma medular, carcinoma medular, carcinoma melanótico, 45 carcinoma blando, carcinoma mucinoso, carcinoma mucíparo, carcinoma mucocelular, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mucoso, carcinoma mucoso, carcinoma mixomátodo, carcinoma de nasofaringe, carcinoma de células en avena, carcinoma osificante, carcinoma osteoide, carcinoma papilar, carcinoma periportal, carcinoma preinvasiva, carcinoma de células espinosas, carcinoma pultáceo, carcinoma de células renales del riñón, carcinoma de células de reserva, carcinoma sarcomatoide, carcinoma schneideriano, carcinoma escirroso, carcinoma de escroto, carcinoma de 50 células de sello, carcinoma simple, carcinoma de células pequeñas, carcinoma solanoide, carcinoma de células esféricas, carcinoma de células del huso, carcinoma esponjoso, carcinoma escamoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma de cuerda, carcinoma telangiectático, carcinoma telangiectoide, carcinoma de células transicionales, carcinoma tuberoso, carcinoma tuberoso, carcinoma verrugosa y carcinoma vellosa.

Cánceres adicionales que pueden tratarse con ésteres de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, la enfermedad 55 de Hodgkin, linfoma que no es de Hodgkin, micloma múltiple, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, rabdomiosarcoma, trombocitosis primaria, macroglobulinemia primaria, tumores de pulmón de células pequeñas, tumores primarios de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de colon, insulanoma pancreático maligno, carcinoide maligno, cáncer de vejiga urinaria, lesiones de piel pre-malignas, cáncer testicular, linfomas, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer esofágico, cáncer del tracto genito-urinario, hipercalcemia maligna, cáncer cervical, cáncer 60 endometrial, cáncer cortical suprarrenal y cáncer de próstata.

El término enfermedad tumoral o enfermedad neoplásica incluye, por lo tanto, enfermedades carcinogénicas que hacen metástasis del grupo de carcinoma de cérvix, carcinoma de mama, carcinoma colorrectal y rectal, carcinoma primario de

células hepáticas, carcinoma de próstata, carcinoma bronquial de células no pequeñas (NSCLC), carcinoma pancreático, carcinoma de vejiga, carcinoma de ovario y otras enfermedades cancerosas que no se mencionan.

La vacuna que es un resultado del uso inventivo novedoso se proporciona a pacientes, la cual debe inyectarse en la piel, bajo la piel y en el músculo.

5 La aplicación de la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones en el tiempo inmediato antes de comenzar la terapia con medicamentos citostáticos en el paciente, conduce a una concentración incrementada de citocinas solubles, y moléculas co-estimulantes, que estimulan la proliferación en el sitio de aplicación como una consecuencia de la reacción inmune inducida, conjuntamente con antígenos asociados al tumor (TAA), lo cual conduce a la activación y la proliferación de células T específicas del tumor.

10 Además, como consecuencia de las infecciones con la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones, las células que presentan antígeno (APC) y las células dendríticas (DC) son atraídas para migrar hacia el sitio de aplicación. La presencia de estos dos tipos de célula tiene un efecto sinérgico en la presentación de TAA, y la presentación aumentada de TAA tiene a su vez un efecto en los linfocitos T citotóxicos activados que se forman cada vez más.

15 Además, la inyección de la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones conduce a la expresión de moléculas de superficie inmuno-relevante en las células tumorales, incluyendo ICAM-1, HLA-DR, CD80 y CD40. La molécula de adhesión ICAM-1 conduce a la activación de células ayudantes T efectoras. Respecto de HLA-DR, pudo demostrarse que la densidad de expresión en monocitos es un marcador sustituto confiable para la capacidad de los monocitos de reaccionar liberando citocinas pro-inflamatorias (por ejemplo, factor de necrosis tumoral alfa, IL-1, IL-6, IL-8). Se demostró in vitro que la molécula de ácido desoxirribonucleico según la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones conduce a la formación de interferón gamma e interleuquina 6, otro estimulante importante de la respuesta inmune y hematopoyesis (véase la figura 2). La expresión incrementada de ICAM-1 y HLA-DR en linfocitos B se muestra en la figura 3.

25 Además, la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones provoca una proliferación incrementada de linfocitos B, las células cargadoras de la respuesta inmune tumoral. Los linfocitos B se diferencian en células de plasma que producen anticuerpos o en células de memoria que cambian a producción de anticuerpos directamente después del contacto renovado por un antígeno previamente encontrado. Se mostró que la molécula de ácido desoxirribonucleico según la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones conduce a una secreción incrementada de inmunoglobulinas IgM, IgA e IgG (véase Fig. 4). Los isótopos de anticuerpo IgG1 e IgG2 fueron determinados también con el fin de demostrar un desplazamiento posible Th2/Th1 en la tendencia de la respuesta inmune. La distribución isotópica de gamma inmunoglobulina (IgG) para un antígeno dado refleja la tendencia de la reacción inmune completa contra este antígeno. Los subtipos de IgG1 son característicos para una respuesta humoral, acompañada por secreción incrementada de interleuquinas IL-4 y IL-10 por linfocitos activados. Un nivel incrementado del subtipo IgG2 es típico para una respuesta Th1 celular, acompañada por secreción incrementada de IFN gamma y IL-12.

35 En contraste con los oligonucleótidos protegidos con tioato, lineales conocidos que contienen motivos de CpG, la molécula de ácido desoxirribonucleico según la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones empleadas en la presente muestran un número de ventajas no conducen a un tamaño incrementado del órgano, mostrado en el ejemplo de los órganos hígado, bazo y nudos linfáticos en ratones comparando los dos compuestos (véase la figura 5). Como otra ventaja no pudieron demostrarse anomalías que ocurrieron en estos órganos en el periodo experimental.

40 Además, la molécula de la invención no conduce a la prolongación del tiempo de coagulación de sangre como consecuencia del tratamiento (véase figura 6). Un incremento del tiempo de coagulación de sangre conduciría a una duración prolongada del sangrado en caso de lesiones externas, hemorragia nasal, hemorragia gingival o micro lesiones causadas la ingesta de alimento en la mucosa gastrointestinal y en el caso de procedimientos quirúrgicos. Además, el riesgo de hemorragia interna tendría que tomarse en cuenta, lo cual puede diagnosticarse demasiado tarde.

45 La invención también se refiere a un kit y al uso del mismo en medicina. De una manera preferida, el compuesto de la invención o el kit que comprende el mismo se usa en una terapia de combinación, especialmente en el tratamiento de tumores. De una forma particularmente preferida, dicha terapia de combinación comprende una quimioterapia, un tratamiento con agentes citostáticos y/o una radioterapia. En una realización particularmente preferida de la invención, la terapia de combinación es una forma biológicamente específica de terapia, y en una forma particularmente preferida la terapia de combinación comprende una terapia de genes y/o una terapia que usa un compuesto de acuerdo con la invención. Diversas terapias de combinación, especialmente para el tratamiento de tumores, son bien conocidas por aquellos especialistas en la técnica. Por ejemplo, un tratamiento con agentes citostáticos o irradiación de un área particular del tumor pueden concebirse dentro del alcance de una terapia de combinación, y este tratamiento se combina con una terapia de genes, usando los compuestos de la invención como agentes anticancerosos. Además, un uso preferido del compuesto de acuerdo con la invención es para inhibir la vitalidad, la tasa de proliferación de células y/o para inducir apoptosis y detención del ciclo celular.

Por lo tanto, el otro objeto de la invención es un kit que comprende en medios de contenedor adecuados a los inmunomoduladores a base de ADN en la forma de moléculas de ácido desoxirribonucleico inmunomoduladoras, cerradas de modo covalente, con forma de mancuerna, y un medicamento citostático (quimioterapéutico) o composiciones del mismo y una información acerca del uso de las partes del kit. Dicha información también puede referirse a un diagnóstico o a un esquema terapéutico. Las partes esenciales del kit se usan secuencialmente, por lo cual las cantidades terapéuticas de las partes del kit se administran a un paciente con cáncer de modo secuencial dentro de 0 a 72 horas. El kit, respectivamente las partes del kit son útiles para el tratamiento de cáncer, angiogénesis.

En resumen puede declararse que la aplicación de la molécula de ácido desoxirribonucleico según la reivindicación 1 y se reivindicaciones en el tiempo que antecede a una quimioterapia conducirá a expresión incrementada de antígenos de superficie en células tumorales, por lo tanto, para las células tumorales más reconocibles para el sistema inmune. Además, se activan receptores para células inmunes importantes, entre ellas las células NK, que aumentan la capacidad del sistema inmune para combatir células tumorales. Además, puede observarse la síntesis incrementada de anticuerpos que también pueden destruir células tumorales. Las interacciones locales entre células que tienen antígeno y células efectoras, tales como las células asesinas naturales (células NK) y los linfocitos T son importantes para una reacción inmune efectiva contra tumores.

Otras formas ventajosa de la invención pueden derivarse de las reivindicaciones dependientes y de la descripción. El efecto sorprendente del producto farmacéutico de la invención para la terapia tumoral, así como también el método de la invención, se divulgan en las tablas y en los ejemplos; en detalles se muestra en

la figura 1a: una representación esquemática de oligodesoxinucleótidos inmunomoduladores, cerrados de modo covalente, que contienen motivos de CpG: estructura con forma de mancuerna con tres motivos de CpG representados como un círculo oscuro en la región de horquilla del bucle; los números significan I: bucle y II: tallo.

La figura 1b: la secuencia de ADN del inmunomodulador de acuerdo con la invención.

La figura 2: muestra la secreción de gamma interferón citocinas en interleuquina-6 después de estimulación in vitro de monocitos de sangre periférica (PBMCs) mediante:

25 A: control negativo, regulador de pH

B: inmunomodulador de la invención

C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales.

El control negativo conduce a la no secreción de gamma interferón o interleuquina-6 tal como se esperaba. Ambas moléculas B y C son capaces de estimular PBMCs para secretar citocinas. La secreción de gamma interferón se incrementa en 2,5 veces por B en comparación con C. También puede observarse esta tendencia de una secreción significativamente aumentada en comparación con C para la citosina interleuquina-6.

La figura 3: muestra la expresión de las moléculas de superficie inmuno-relevantes HLA-DR y ICAM-1 después de estimulación in-vitro de linfocitos B por parte de:

35 A: control negativo, regulador de pH

B: inmunomodulador de la invención

C: oligonucleótidos de CpG protegidos con tioato, lineales.

El control negativo conduce a la no secreción de HLA-DR o ICAM-1, tal como se esperaba. Los valores enunciados de 9,7% y 209,6, respectivamente, se emplean como valores base para la determinación de la intensidad de fluorescencia mediana para las células positivas no estimuladas. Ambas moléculas B y C conducen a una estimulación de ambas moléculas superficiales, lo cual da resultados aproximadamente similares para B y C.

La figura 4: muestra producción de anticuerpo incrementada después de la estabilización in vitro de monocitos de sangre periférica (PBMCs) por parte de:

45 A: control negativo, regulador de pH

B: inmunomodulador de la invención

C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales.

El control negativo conduce a la no secreción de IgM, IgA, IgG1 y IgG2, tal como se esperaba. B y C conducen a una estimulación significativamente incrementada de la producción de anticuerpos, donde la secreción de IgA se incrementa 3 veces para B en comparación con C. Los títulos relativos de isótopos IgG1 y IgG2 pueden tomarse como un indicador para el tipo dominante de respuesta inmune. La relación de IgG2 y IgG1 muestra que el inmunomodulador de la presente invención puede provocar una respuesta inmune citotóxica (Th1) en adición a una respuesta humoral.

La figura 5a: se determinó si el inmunomodulador de la presente invención y los oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato pueden tener un efecto tóxico sobre el organismo. Esta determinación se realizó midiendo el incremento en peso de los órganos internos hígado, bazo y ganglios linfáticos en experimentos con ratones.

A: control negativo, regulador de pH

5 B: inmunomodulador de la invención

C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales

10 fueron administrados a ratones. El control negativo sirvió como un valor de base. Los inmunomoduladores a base de ADN, tal como se especifica en la presente invención, B no conducen a un incremento del tamaño del hígado, de modo independiente de la cantidad aplicada. Los oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, conducen, no obstante, a un agrandamiento significativo del hígado incluso para la pequeña cantidad de 60 µg.

La figura 5b: se determinó la influencia de B y C sobre el bazo.

A: control negativo, regulador de pH

B: inmunomodulador de la invención

C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales

15 se administraron a ratones. El control negativo sirvió como un valor de base. Los inmunomoduladores a base de ADN, tal como se especifican en la presente invención, B no conducen a un incremento del tamaño del bazo, independientemente de la cantidad aplicada. Los oligonucleótidos de CpG protegidos con tioato conducen, no obstante, a un agrandamiento significativo del bazo incluso para la pequeña cantidad de 60 µg, lo que refleja un incremento del factor cinco en comparación con los valores de A o B.

20 La figura 5c: se determinó la influencia de B y C en los ganglios linfáticos.

A: control negativo, regulador de pH

B: immune modulators of the invention

C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales

25 fueron administrados a ratones. El control negativo sirvió como un valor de base. Los inmunomoduladores a base de ADN, tal como se especifica en la presente invención B no conducen a un incremento del tamaño del ganglio linfático, independientemente de la cantidad aplicada. Sin embargo, los oligonucleótidos de CpG protegidos con tioato conducen a un agrandamiento significativo del ganglio linfático incluso para la pequeña cantidad de 60 µg, lo que refleja un incremento del factor dos en comparación con los valores de A o B.

30 La figura 6: muestra otro análisis del efecto tóxico de la aplicación de los inmunomoduladores a base de ADN en comparación con los oligonucleótidos de CpG protegidos con tioato. El parámetro en cuestión fue la prolongación del tiempo de coagulación de la sangre. Los dos gráficos están relacionados con los diferentes donantes. El tiempo parcial de tromboplastina en segundos se indica en la ordenada. Fueron aplicados

A: control negativo, regulador de pH

B: immune modulators of the invention

35 C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales.

Los inmunomoduladores a base de ADN tal como se especifica en la presente invención B no mostraron prolongación del tiempo de coagulación de sangre en ambos experimentos al compararse con un control negativo. Los oligodesoxinucleótidos de CpG protegidos con tioate condujeron a una prolongación significativamente incrementada del tiempo de coagulación de la sangre en comparación con el control negativo y B.

40 La figura 7: muestra antígenos de recordación de cuatro pacientes después de un ciclo de quimioterapia.

45 Todos los pacientes estaban en un estado avanzado de la enfermedad en el momento del tratamiento. A fin de determinar un éxito clínico, deben aplicarse los siguientes términos de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (1979): una respuesta parcial (PR) es una reducción de focos tumorales de terminales en más de 50% durante las últimas cuatro semanas y una supresión de nuevos focos tumorales. La enfermedad estable es la continuación del estado. Una respuesta mezclada (MR) es una reacción mezclada, por ejemplo el progreso de hacer metástasis y una reducción de metástasis en otro sitio. Una respuesta completa (CR) es la remisión completa de los focos tumorales.

Selección de pacientes: pacientes con carcinoma cervical, carcinoma de mama, carcinoma colorrectal y carcinoma rectal, carcinoma primario de células hepáticas, carcinoma de próstata, carcinoma bronquial de células no pequeñas (NSCLC),

5 carcinoma pancreático, carcinoma de vejiga urinaria y carcinoma de ovarios, con edades entre 18 y 70 años y un índice de 70 - 100 were fueron aptos para incluirse. Los criterios para rechazo fueron: un tratamiento previo con citocinas o quimioterapia de menos de 28 días antes, valores de creatina por encima de 265 µmol/L, valores de bilirrubina por encima de 51 µmol/L, insuficiencia cardiaca no compensada, dice ritmo ventricular, desorden psiquiátrico severo, hepatitis activa A, B o C, infección con VIH.

10 Tratamiento: aparte de anamnesis, se determinaron los siguientes parámetros antes del tratamiento: examen físico, hematología (hemoglobina, hematocrito, leucocitos y conteo de plaquetas), y análisis químico de la sangre y análisis de la orina. La sangre se tomó para determinar el estatus inmune. Se realizaron ensayos de DHT (hipersensibilidad de tipo retrasada) en la piel con el ensayo Multitest Merieux (Leimen, Alemania). Fueron realizados barridos con rayos X y tomografía por computador del cuerpo superior y abdomen. Se realizaron repetidamente un examen inmunológico completo, ensayos hematológicos y examen clínico superficial (examen físico, examen con ultrasonido y examen del cuerpo inferior, cuando fue apropiado). Se realizó un examen clínico e inmunológico completo comparable con el examen realizado antes del registro al final de cada ciclo de tratamiento.

15 Se provee de acuerdo con la invención que los pacientes reciban inyecciones de 500 µg de la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones en la piel, de modo subcutáneo y en el músculo. Los pacientes reciben cinco veces dos inyecciones de 500 µg de la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones en el período alrededor del ciclo respectivo de quimioterapia, en intervalos pre definidos de dos a ocho días. La cantidad total de moléculas de ácido desoxirribonucleico aplicadas de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones varía entre 1 y 10 mg.

20 Las dos inyecciones se realizaron el primer día de inyección en los sitios típicos de vacunación en la piel (intradérmica) lateralmente en la parte superior del brazo izquierdo o derecho, el segundo día intradérmica en la porción superior del muslo izquierdo y derecho, al tercer día por vía subcutánea aproximadamente 30 mm al izquierda y a la derecha del ombligo, el día cuatro en los sitios descritos en la parte superior del brazo, ero por vía subcutánea, y el día cinco por vía intramuscular en el lado frontal de la parte superior del muslo izquierdo y derecho.

25 El esquema de inyección para el tratamiento de carcinoma de mama que hace metástasis:

Tiempo de inyección	Compuesto	Sitio de aplicación	Método de aplicación
-10	1 mg del inmunomodulador a base de ADN (1 mg/ml)	2 x 0,5 mg parte superior del brazo derecho e izquierdo	intradérmica
-7	1 mg del inmunomodulador a base de ADN (1 mg/ml)	2 x 0,5 mg muslo derecho e izquierdo	intradérmica
-4	1 mg del inmunomodulador a base de ADN (1 mg/ml)	2 x 0,5 mg izquierda y derecha del ombligo	Vía subcutánea
-2	1 mg del inmunomodulador a base de ADN (1 mg/ml)	2 x 0,5 mg parte superior del brazo derecho e izquierdo	Vía subcutánea
-1	1 mg del inmunomodulador a base de ADN (1 mg/ml)	2 x 0,5 mg muslo derecho e izquierdo	Vía intramuscular
0	1 mg de Gemcitabina		

El tiempo de inyección se da en relación con el inicio de la quimioterapia (día cero) con Gemcitabina.

Se toman hasta 50 ml de sangre para procedimientos diagnósticos concurrentes antes de comenzar el tratamiento y antes de cada inyección.

30 Se trataron pacientes con carcinoma cervical que hacía metástasis con radiación después de inyección de la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones.

35 Se trataron pacientes con carcinoma de mama que hacía metástasis con los medicamentos quimioterapéuticos comunes Gemcitabina o Xeloda después de la inyección de la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las reivindicaciones siguientes. También se suministra el uso de antraciclinas (Epirubicina, Doxorubicina, Mitoxantrano) en combinación con la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las reivindicaciones siguientes.

Se trataron pacientes con carcinoma primario de hígado que hacía metástasis de manera paliativa con una combinación de la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las reivindicaciones siguientes y Taxotere, o la molécula de ácido desoxirribonucleico de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones y Mitoxanthron.

5 Se trataron pacientes que sufrían de carcinoma rectal o colorrectal que hacía metástasis por medio de terapia adyuvante o paliativa después de la inyección de la molécula de ácido desoxirribonucleico según la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones con una combinación de medicamentos citostáticos Leucovorina y 5-Fluorouracilo (5-FU). También se suministra la combinación de FOLFOX 4 (Oxaliplatino, ácido folínico y 5-Fluorouracilo) y FOLFIRI (Irinotecán, ácido folínico y 5-Fluorouracilo) después de la inyección de la molécula de ácido desoxirribonucleico según la reivindicación 1 y las
10 reivindicaciones siguientes.

Todos los tratamientos se realizaron de acuerdo con los ciclos preestablecidos. Se proporciona la realización solamente de un ciclo de la combinación que comprende el tratamiento con la molécula de ácido desoxirribonucleico de la invención y quimioterapia subsiguiente. Si es necesario otro tratamiento después del fin de ciclo de quimioterapia, Este tratamiento continúa con otras inyecciones de la molécula de ácido desoxirribonucleico según la reivindicación 1 y las reivindicaciones
15 siguientes. Las soluciones inmunoterapéuticas pueden continuar de lámina manera. Un comienzo inmediatamente subsiguiente de la quimioterapia no parece ser indicada desde un punto de vista médico, pero no se excluye. Puede parecer justificado y en ciertos casos indicado continuar el tratamiento después de seis meses, lo cual se interpreta como otra aplicación de la vacuna de la invención, de acuerdo con la invención.

20 Ejemplo 1: Síntesis del oligodesoxirribonucleótido inmunomodulador cerrado de modo covalente de acuerdo con la reivindicación 1 y las siguientes reivindicaciones.

La síntesis de los oligodesoxirribonucleótidos inmunomoduladores cerrados de modo covalente se realizó de acuerdo con la enseñanza de EP 1 196 178 B1.

25 El producto del ligación se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico final con el fin de retirar las endotoxinas (soporte: LiChrospher DMAE, Merck Darmstadt, Alemania; 0-1 M NaCl en 50 mM fosfato de sodio) y se concentró mediante precipitación con etanol. El procedimiento se realizó en condiciones estériles para experimentos in vivo y el producto final se vuelve en PBS estéril.

Ejemplo 2: Secreción incrementada de citosina por inmunomoduladores a base de ADN.

30 Se incubaron monocitos de sangre periférica (PBMC) en medio RPMI 1640 -en placas de microtitulación de 96 pozos. Los PBMC fueron estimulados adicionando los siguientes compuestos: A: control negativo, regulador de pH, B: inmunomodulador de la invención, C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales; y se incubaron durante 48 h a continuación. La incubación se realizó con cantidades equimolares de los compuestos respectivos (1 $\mu\text{mol/L}$). Los sobrenadantes de las incubación es de retiraron y se realizó un ensayo ELISA para el gamma interferón de citocinas e interleukina-6. Los resultados indican en la figura 2. Delta Ct se indica en la ordenada, y delta Ct es la diferencia de los valores de Ct (referencia menos citosina).

35 Ejemplo 3: Estimulación de moléculas de superficie inmunológicamente relevantes sobre linfocitos B por parte de inmunomoduladores a base de ADN.

40 Se realizó una incubación de células RPMI-8226 (una línea celular de linfocitos B) durante 48h con cantidades equimolares de los compuestos respectivos (1 $\mu\text{mol/L}$) (A: control negativo, regulador de pH, B: inmunomodulador de la invención, C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales). Las células se cosecharon después de la intubación, se trituraron con anticuerpos marcados de modo fluorescente contra las moléculas de superficie HLA-DR y ICAM-1 y fueron ensayadas mediante FACS. La ordenada de la figura 3 muestra actividad de fluorescencia, la abscisa muestra el tamaño de las células. La figura A muestra el resultado del ensayo de los linfocitos B estimulados con regulador de pH. De acuerdo con este resultado, 9,7% de las células viables son positivas para el marcador de superficie HLA-DR, 209,6% para ICAM-1. Estos valores se tomaron como valores de nivel básico. Los resultados se representan en la figura 3.

45 Ejemplo 4: Anticuerpo incrementado provocado por los inmunomoduladores de la invención.

50 Se incubaron monocitos de sangre periférica (PBMC) en placas de microtitulación de 96 pozos en medio RPMI 1640. Las células fueron estimuladas adicionando los siguientes compuestos: A: control negativo, regulador de pH, B: inmunomodulador de la invención, C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales; y se incubaron durante 48 h a continuación. Los títulos de anticuerpo para IgM, IgA e IgG fueron determinados mediante ELISA. Los títulos de isótopo de anticuerpo para Ig1 e Ig2 fueron determinados con el fin de llegar a una determinación de la cantidad de respuesta humoral y celular, respectivamente. Los títulos medidos pueden tomarse como un indicador del subtipo dominante de la respuesta inmune generada. Los resultados se representan en la figura 4.

Ejemplo 5: Comparación de toxicidad mediante agrandamiento de órgano.

55 Se agruparon ratones hembra C57BL/6 en tres grupos de 10 animales cada uno. Los animales fueron inyectados por vía intraperitoneal con 100 μl cada uno de los siguientes compuestos: A: control negativo, regulador de pH; B:

inmunomodulador de la invención; C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales. La concentración de los compuestos inyectados fue de 2,5 µg/mL y 60 µg/mL. Los animales fueron anestesiados y se les dio muerte después de una semana. Se aislaron el bazo, el hígado, los ganglios linfáticos inguinal y mesenterial y se determinó su peso. Se realizó análisis estadístico mediante el test ANOVA. Los resultados indican en Fig. 5a, b, c.

5 Ejemplo 6: Determinación de la influencia del tiempo de coagulación de sangre.

Se estimularon monocitos de sangre periférica (PBMC) adicionando los siguientes compuestos: A: control negativo, regulador de pH; B: inmunomodulador de la invención; C: oligonucleótidos de CpG, protegidos con tioato, lineales; y se incubaron durante 3 minutos a continuación. Después de centrifugar se determinó el tiempo de coagulación de la sangre tal como se indica por el parámetro del tiempo de tromboplastina parcial (aPPT) en segundos, tal como se representa sobre la ordenada de la figura 6. Los valores indicados aquí se derivan de diferentes donantes de sangre. Se realizó una determinación de aPPT de acuerdo con el fibrómetro BBL Fibro System (Becton Dickinson).

Ejemplo 7: Determinación de antígenos de recordación después de un ciclo de quimioterapia

Se analizaron PBMC cosechados después del primer ciclo de quimioterapia para la presencia de linfocitos T específicos del antígeno de recordación. La determinación de los antígenos de recordación se realizó antes y después de la terapia. Los antígenos de recordación determinados fueron el virus de citomegalia y el virus de Epstein-Barr virus (CMV, EBV). La determinación se realizó por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) (véase la figura 7). El paciente no se mostró un incremento de células positivas CD8 de 723% después del primer ciclo.

Ejemplo 8: Evaluación del efecto antitumoral de inmunomoduladores a base de ADN tal como se especifica en la presente invención en modelos de tumores en animales

20 Se hizo una evaluación del efecto antitumoral de inmunomoduladores a base de ADN, tal como se especifica en la presente invención, en modelos de tumores en animales, en diferentes modelos, más precisamente

a) modelo de leucemia linfocítica aguda (singenético): esta determinación se realizó con células BM185 de murino, ratones Balb/c. Se combinaron inmunomoduladores a base de ADN, tal como se especifican en la presente invención, con Imatinib.

25 b) modelo de carcinoma hepatocelular (singenético): esta determinación se realizó con células Hep22 de murino, ratones KM. Los inmunomoduladores a base de ADN, según se especifican en la presente invención, fueron combinados con 5-Fluorouracilo (5-FU).

30 c) modelo de cáncer de pulmón (singenético): esta determinación se realizó con células 3LL de murino, ratones C57/BL6. Los inmunomoduladores a base de ADN, según se especifican en la presente invención, fueron combinados con Paclitaxel, ciclofosfamida, Gemcitabina y Cisplatino.

Los resultados se muestran en la figura 8a. Los inmunomoduladores a base de ADN, tal como se especifican en la presente invención, son abreviados como "dSLIM" de acuerdo con una nomenclatura del solicitante. Es obvio que se mide una reducción significativa del volumen tumoral si, de acuerdo con la presente invención, se indica un quimioterapéutico en combinación con el inmunomodulador a base de ADN tal como se especifica en la presente invención. Además, la cantidad de medicamento de quimioterapéuticos se reduce significativamente comparación con la cantidad de medicamento sin un inmunomodulador. Por lo tanto, dicha combinación es útil para cualquier paciente que esté a favor de prevenir las grandes cantidades de medicamento que usualmente se requieren para llegar a un resultado igual.

40 d) modelo de carcinoma de células renales (singenético): esta determinación se realizó con células Renca de murino, ratones Balb/c. Los inmunomoduladores a base de ADN, tal como se especifican en la presente invención, fueron combinados con 5-Fluorouracilo (5-FU).

Los resultados se muestran en la figura 8b. Es obvio que dependiendo de la concentración se mide una reducción significativa del volumen del tumor. En cualquier caso se muestra una reducción, independiente de la concentración si, de acuerdo con la presente invención, se indica un quimioterapéutico en combinación con el inmunomodulador a base de ADN, tal como se especifican la presente invención. Por lo tanto, dicha combinación es útil para cualquier paciente a favor de prevenir las grandes cantidades de medicamento que usualmente se requieren para llegar a un resultado igual.

45 e) modelo de melanoma (singenético): esta determinación se realizó con células B16 de murino, ratones CL57/BL6. Los inmunomoduladores a base de ADN, tal como se especifican en la presente invención, fueron combinados con Dacarbacina (DTIC).

50 Otros estudios del desarrollo de modelos animales para estudios de eficacia pre-clínica confirman los resultados anteriores en particular.

Establecimiento de modelo animal de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC): • 3LL titulación finalizada

ES 2 621 123 T3

Modelo 3LL de murino singenético	• Quimioterapia (CTX, Taxol, Gemcitabina, Cisplatino) evaluación
Establecimiento del modelo animal de carcinoma hepatocelular (HCC):	• Hep22 titulación finalizada
Modelo Hep22 de murino singenético	• Quimioterapia (5-FU) evaluación
Establecimiento de modelo animal de melanoma:	• B16 titulación finalizada
Modelo B16 de murino singenético	• Quimioterapia (DITC) evaluación
Establecimiento de modelo animal de carcinoma de células renales (RCC):	• Renca titulación finalizada
Modelo Renca de murino singenético:	• Quimioterapia (5-FU) evaluación
Establecimiento del modelo animal de carcinoma colorrectal (CRC):	• C26 titulación finalizada
Modelos C26 de murino singenético	
Establecimiento del modelo animal de CRCI:	• HT-29 titulación finalizada
Xenografo • modelo HT-29 de murino	
Establecimiento de modelo animal de sarcoma: modelo S180 de murino singenético	• S180 titulación finalizada • Quimioterapia (CTX) evaluación
Abreviatura: CTX -ciclofosfamida;	
DITC - Dacarbacina;	
5-FU - 5-Fluorouracilo	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un inmunomodulador a base de ADN, y dicho inmunomodulador a base de ADN está presente en la forma de moléculas de ácido desoxirribonucleico inmunomoduladoras, cerradas de modo covalente, con forma de mancuerna, que tienen una combinación de tallo bicatenario y bucles monocatenarios, y cada uno de los bucles comprende tres motivos de CpG y el inmunomodulador consiste en la secuencia mostrada en la figura 1b para usar en el tratamiento de enfermedades tumorales.
2. El inmunomodulador para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con un medicamento citostático para el tratamiento de enfermedades tumorales.
- 10 3. Una vacuna de combinación para usar en el tratamiento de enfermedades tumorales que comprende un inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1 y un medicamento citostático.
- 15 4. La vacuna de combinación para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en cuyo caso el medicamento citostático se selecciona de uno o de varios del grupo de inhibidores de topoisomerasa, el grupo de agentes alquilantes, el grupo de compuestos de platino, el grupo de compuestos antimetabolitos, el grupo de compuestos de antraciclina o actinomicina, el grupo de alcaloides vinca, el grupo de taxanes, el grupo de estrógenos, como también combinaciones o modificaciones de los mismos.
5. La vacuna de combinación para usar de acuerdo con la reivindicación 4 en la cual una combinación de medicamentos citostáticos de diferentes grupos son un componente de la vacuna.

Fig. 1a

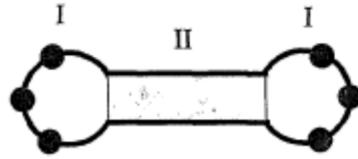


Fig. 1b

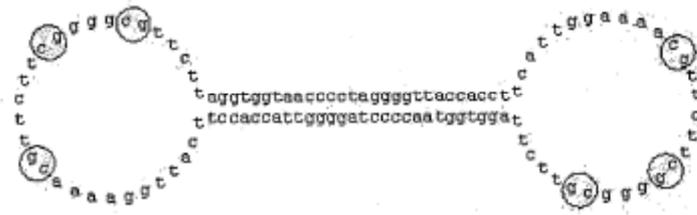


Fig. 2

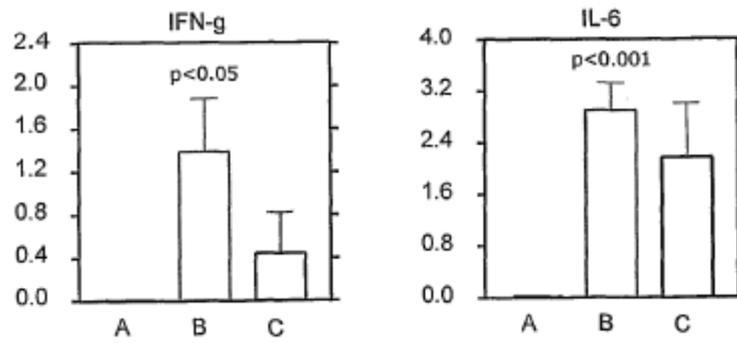
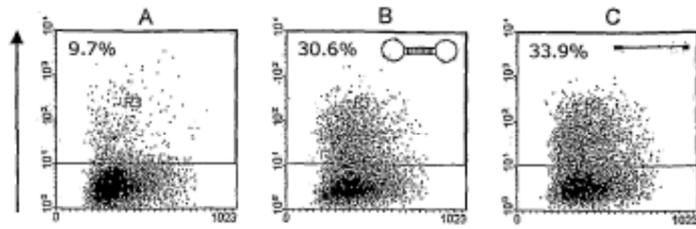


Fig. 3

HLA-DR



ICAM-1

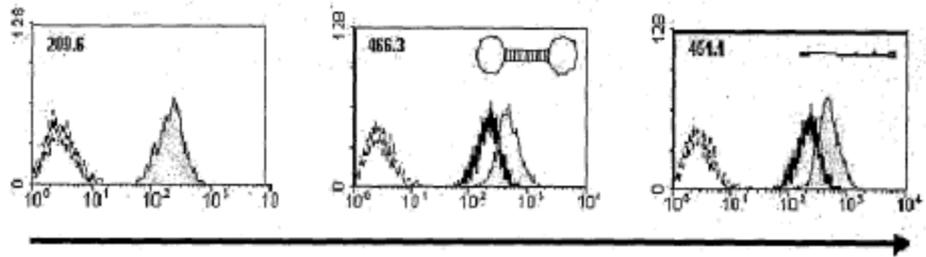


Fig. 4

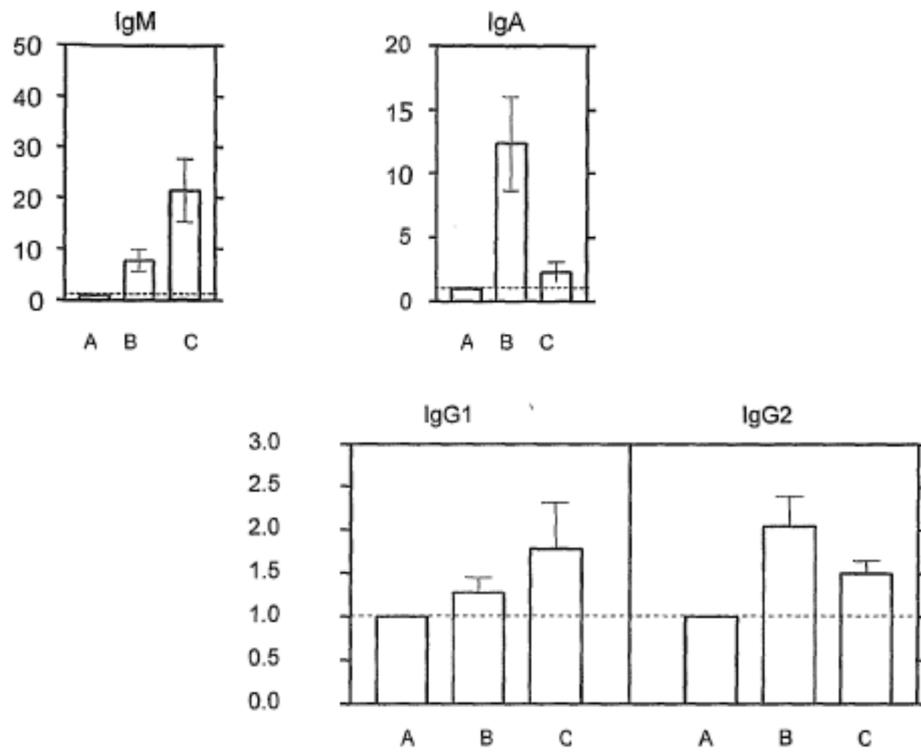


Fig. 5a

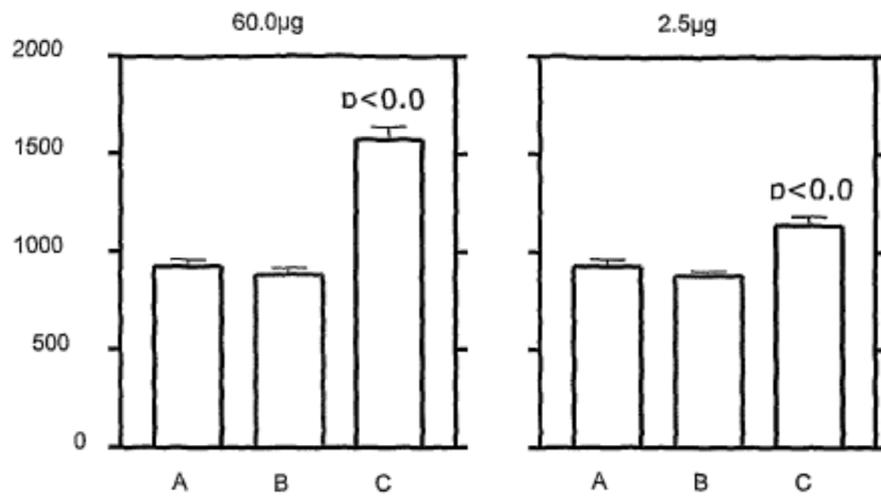


Fig. 5b

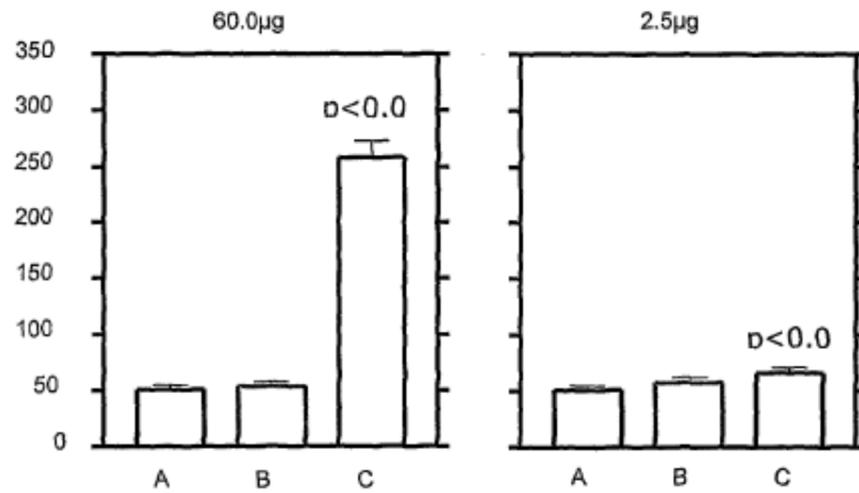


Fig. 5c

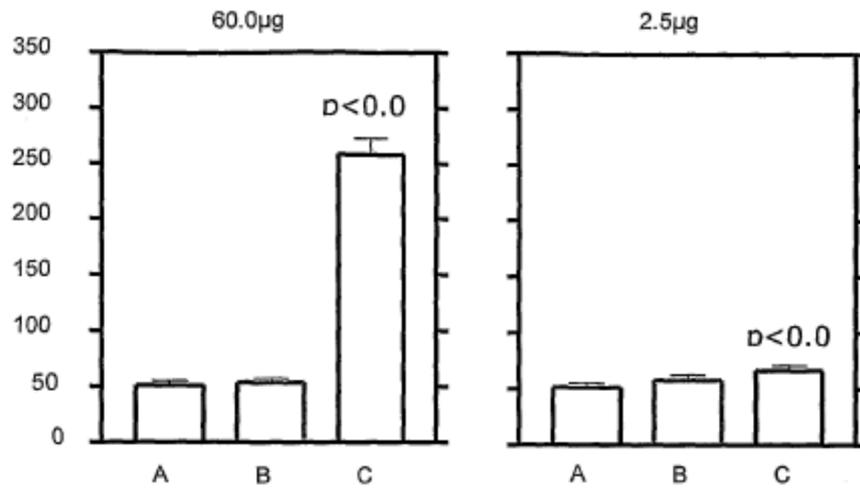


Fig. 6

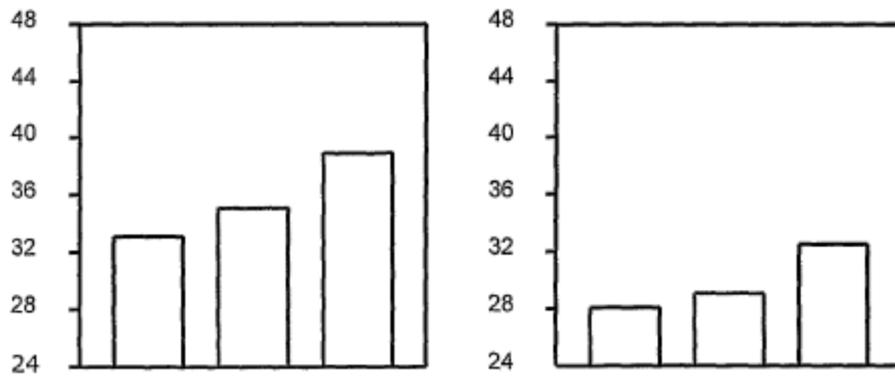


Fig. 7

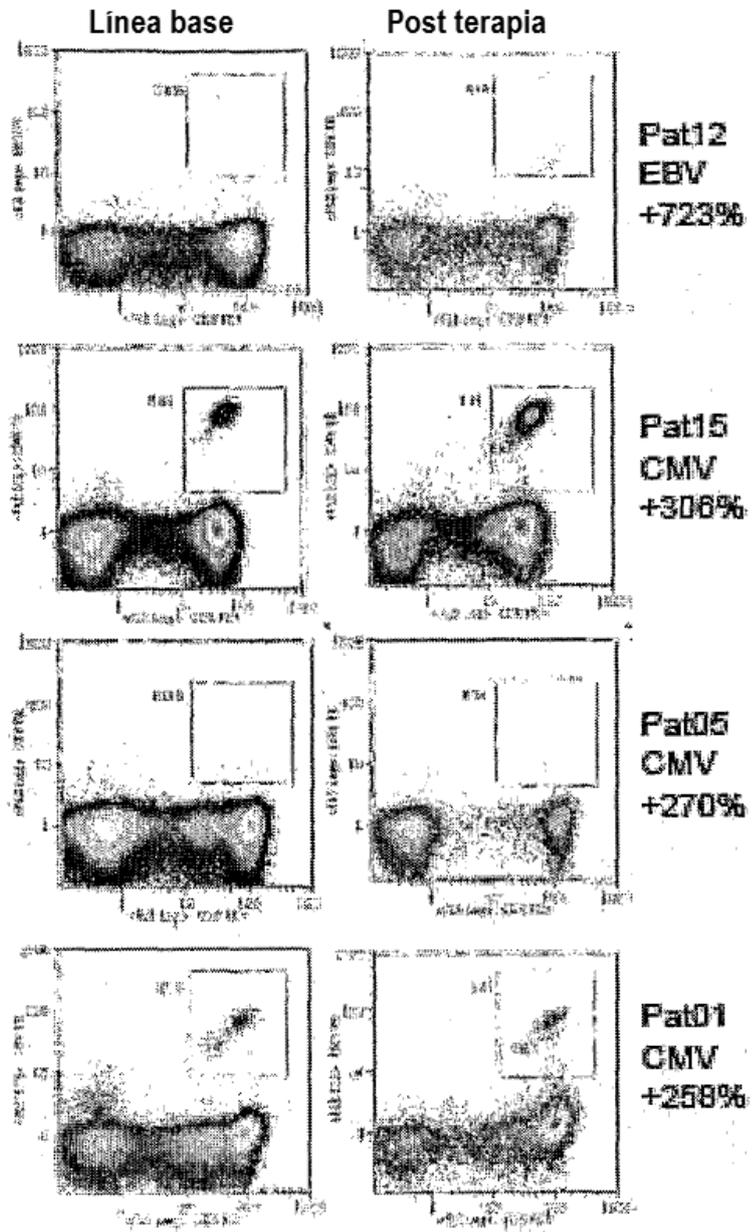


Fig. 8a

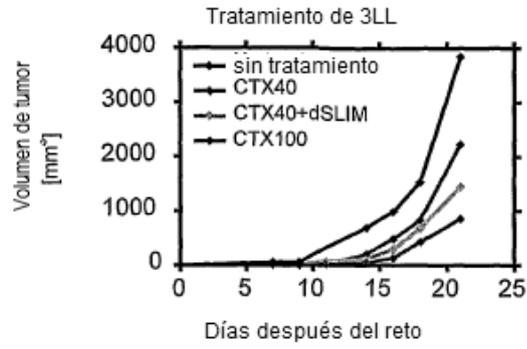


Fig. 8b

