

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 295**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61K 38/19	(2006.01)
A61K 38/20	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61K 35/28	(2015.01)
A61K 38/21	(2006.01)
A61B 18/00	(2006.01)
A61B 18/12	(2006.01)
A61B 18/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2010 PCT/US2010/060431**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO11084451**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 10842519 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2512502**

54 Título: **Métodos y composiciones para la liquidación de tumores**

30 Prioridad:

15.12.2009 US 286551 P
14.12.2010 US 967910

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.05.2018

73 Titular/es:

IMMUNOVATIVE THERAPIES, LTD. (100.0%)
Malcha Technology Park, 1 Agudat Sport Hapoel
Street
Jerusalem 96951, IL

72 Inventor/es:

HAR-NOY, MICHAEL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 667 295 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

Métodos y composiciones para la liquidación de tumores

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a propuestas de inmunoterapia para el tratamiento de la enfermedad. Más específicamente, la presente invención se refiere a medicamentos y métodos para el tratamiento de enfermedades que dan como resultado la liquidación de los tumores.

Antecedentes de la invención

10 El mecanismo de prevención y tratamiento de enfermedades mas preciso, potente y seguro conocido es la respuesta inmune natural "esterilizante" que combina elementos tanto de inmunidad innata como adaptativa para eliminar una gran variedad de patógenos extraños del organismo sin intervención médica. El sistema inmunitario está diseñado para "recordar" los antígenos extraños eliminados con el fin de generar rápidamente una respuesta inmune tras la re-infección. Los sistemas inmunitarios, incluso los de pacientes con cáncer, pueden reconocer y montar una respuesta a antígenos extraños, tales como los que se encuentran en virus y bacterias, lo suficiente como para destruirlos por completo o eliminarlos del cuerpo. La ferocidad y especificidad de esta respuesta inmune esterilizante se puede atestiguar en la forma en la que un sistema inmunitario reprimido inadecuadamente puede destruir por completo los órganos grandes transplantados, tales como el riñón, el hígado o el corazón, sin afectar a los tejidos propios. El efecto destructivo de esta inmunidad frente a antígenos extraños sería beneficioso para la terapia del cáncer si este efecto pudiera redirigirse a los tumores.

20 La inmunoterapia se dedica a desarrollar métodos para aprovechar, dirigir y controlar la respuesta inmune frente a las enfermedades, especialmente el cáncer. Las vacunas terapéuticas del cáncer son un tipo de inmunoterapia diseñada para educar al sistema inmune de pacientes con cánceres existentes para que reconozcan sus células tumorales como extrañas. Si los tumores son reconocidos por el sistema inmune como un patógeno extraño, teóricamente se podría provocar una respuesta inmune que podría causar que las células inmunes destruyan tumores grandes y busquen y destruyan células tumorales metastásicas donde quieran que residan en el cuerpo. Después de una inmunoterapia exitosa, la capacidad del sistema inmunitario para "recordar" las células extrañas eliminadas permitiría al sistema inmunitario eliminar cualquier célula cancerosa recurrente sin ningún tratamiento adicional, al igual que el sistema inmunitario protege frente a las infecciones oportunistas.

30 Las propuestas de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer son alternativas muy deseables a las estrategias actuales del tratamiento del cáncer. A diferencia de los mecanismos antitumorales inmunomediados, las modalidades actuales de cirugía, radiación y quimioterapia no son capaces de una especificidad antitumoral al nivel de célula individual. Por lo tanto, no es tecnológicamente posible para estas modalidades actuales eliminar hasta la última célula tumoral. Sin la eliminación de hasta la última célula tumoral, la reaparición del cáncer después del tratamiento es un resultado común. Además, en lugar de "memoria" de la eliminación del tumor, las modalidades actuales conducen a la resistencia del tumor al tratamiento.

35 Muchos en el campo de la investigación de vacunas contra el cáncer han seguido estrategias de desarrollo de vacunas clásicas centrandó la investigación en encontrar antígenos únicos en tumores (no encontrados en células normales), llamados antígenos específicos de tumores (TSA) o antígenos asociados a tumores (TAA) que se sobre expresan en las células cancerosas. Los TAA son antígenos propios y, por lo tanto, no causan el reconocimiento del tumor como extraño, sino que permiten la distinción inmunológica de tumores frente a células normales. Las vacunas contra el cáncer que contienen TAA incorporan también métodos para aumentar la capacidad de estos antígenos para estimular respuestas inmunitarias antitumorales.

45 El desarrollo de la vacuna contra el cáncer ha seguido un camino para buscar propuestas para aumentar la inmunogenicidad de estos TAA para que se puedan utilizar para estimular la inmunidad terapéutica. Se han explorado sin éxito notable métodos tales como la mezcla con adyuvantes inmunológicos (tales como MF59, adyuvante incompleto de Freund, saponinas QS-21, y bacilo Calmette-Guerin [BCG], síntesis de derivados más inmunogénicos, conjugación a proteínas inmunogénicas y pulsación directa a células dendríticas. La tasa de éxito de la inmunoterapia en la clínica sigue siendo abismalmente baja.

50 A pesar de la ausencia casi total de respuestas antitumorales clínicamente significativas provocadas por las propuestas de inmunoterapia actuales, docenas de ensayos clínicos que utilizan estos métodos están siendo realizados todavía tanto por patrocinadores industriales como académicos. Una de las razones para el continuo desarrollo de estos tratamientos de inmunoterapia en la clínica puede deberse a la demanda de alternativas a los tratamientos de alta morbilidad ofrecidos actualmente a pacientes con cánceres avanzados. Si bien no se ha demostrado que la inmunoterapia tenga una eficacia clínica impresionante, es una propuesta que ha demostrado tener poca toxicidad. Por otro lado, aunque la velocidad de respuesta a la quimioterapia altamente tóxica ha aumentado durante las dos últimas décadas, ha habido un pequeño impacto en la supervivencia general de 5 años. El modesto aumento en la supervivencia que se ha demostrado para los regímenes de quimioterapia tiene un duro precio en términos de calidad de vida.

5 El documento de Patente WO 2009/135199 está dirigido a composiciones de vacunas farmacéuticas que comprenden al menos un antígeno de vacuna junto con células inmunes vivas. Estas células inmunes incluyen al menos una parte de células T activadas y actúan como un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para prevenir o tratar enfermedades, tales como el cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes.

10 El documento de Patente US 2008/112963 está dirigido al uso de inmunoterapia para el tratamiento de tumores y tejidos infectados por patógenos sensibilizando primero a los pacientes con células alogénicas diseñadas para ser rechazadas por un mecanismo mediado por Th 1, induciendo después la necrosis o apoptosis en un tumor o lesión infectada con patógenos, y administrando después una o más dosis de células alogénicas dentro o cerca del tumor o tejido infectado con patógenos en el paciente sensibilizado.

Har-Noy M y colaboradores (Leukemia Research (2008), vol. 32, no. 12, pp. 1903-1913) describe que células de memoria Th1 alogénicas reticuladas con CD3/CD28 completamente incompatibles provocan efectos anti leucémicos en huéspedes no acondicionados sin toxicidad por GVHD.

Compendio de la invención

15 La presente invención proporciona una composición terapéutica para su uso en la liquidación de un cáncer progresivo metastásico en estadio IV resistente a al menos un ciclo de quimioterapia, la composición que comprende células Th1 alogénicas conjugadas con microperlas recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28, en donde la composición es para administrar a un paciente de acuerdo con el siguiente régimen:

- 20 a) tres o más inyecciones intradérmicas a una dosis de entre 1×10^7 y 4×10^7 células con no menos de 2 días de diferencia y no más de 8 días de diferencia,
- b) entre 2 días y 8 días después de la finalización de la etapa a), una inyección intratumoral de 1×10^7 a 6×10^7 células dentro de una hora de la ablación del tumor, y
- c) dentro de 8 días de la ablación, una o más infusiones intravenosas a una dosis de 1×10^7 a 1×10^8 células con no menos de dos días de diferencia,

25 en donde la administración de la composición da como resultado un aumento en el tamaño del tumor que se vuelve hipodenso u oscuro en comparación con el valor inicial antes del tratamiento como se muestra en una tomografía computarizada (CT) a los 30 días.

30 También se describe un método en el que los tumores se transforman a un estado licuado. El método comprende sensibilizar con una composición terapéutica que comprende un antígeno extraño para crear inmunidad Th1 frente al antígeno extraño y extirpar un tumor o tumores seleccionados en donde la ablación da como resultado la muerte de al menos parte de los tumores.

También se describe un método que comprende la creación de un microentorno inflamatorio en la proximidad de la lesión del tumor muerto y la activación de células inmunes adaptativas e innatas.

35 También se describe un método para estimular y mantener una respuesta de Th1 en un paciente que comprende sensibilizar al paciente con una composición terapéutica que comprende al menos un antígeno extraño, al menos una molécula efectora capaz de causar la maduración de las células dendríticas y al menos una citoquina de Th1 y administrar la composición terapéutica periódicamente al paciente.

40 Se describe otro método para la liquidación de un tumor en un paciente que comprende sensibilizar al paciente con una composición terapéutica que comprende al menos un antígeno extraño, al menos una molécula efectora capaz de causar la maduración de las células dendríticas y al menos una citoquina de Th1, extirpar el tumor utilizando un método que da como resultado la necrosis de un tumor, administrar la composición terapéutica intratumoralmente, e infundir la composición terapéutica para activar las células inmunes adaptativas e innatas.

45 Otro método de liquidación de un tumor en un paciente comprende la creación de una respuesta de Th1 de novo en el paciente mientras se suprime la respuesta de Th2, proporcionando una fuente de antígenos tumorales generados por la muerte necrótica de las células cancerosas, proporcionando un entorno inflamatorio consistente con una respuesta de Th1 para la maduración de las células dendríticas que responden a los antígenos tumorales y a los mecanismos de inmuno-evasión tumoral incapacitantes mediante el mantenimiento de la respuesta de Th1.

50 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 comprende las imágenes de varias tomografías computarizadas (CT).

La Figura 2 es una imagen que ilustra los resultados de la biopsia.

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

La presente descripción describe composiciones terapéuticas y métodos de tratamiento para un paciente con cáncer. Esta descripción describe un medicamento terapéutico que da como resultado la liquidación sistemática de un tumor (es) cuando se administra apropiadamente a un paciente que tiene cáncer. Las composiciones incluyen generalmente los siguientes componentes clave: (1) un antígeno extraño, (2) citoquinas de tipo 1, y (3) una molécula efectora capaz de causar la maduración de las células dendríticas (DC), preferiblemente CD40L.

La presente descripción describe métodos para la liquidación de tumores mediante la estimulación de una respuesta inmune de Th1 efectiva en un paciente que tiene un tumor, desarrollando una inmunidad anti-tumoral utilizando un método de vacuna *in-situ* y activando después una inmunidad innata y adaptiva en el paciente y deshabilitando al mismo tiempo los mecanismos de inmuno-evasión del tumor. El método también incluye la supresión de la respuesta de Th2 que generalmente se puede lograr mediante la estimulación de la respuesta inmune de Th1. El método implica además la contrarregulación de los mecanismos inmunosupresores efectuados a través de las células Treg.

Por "liquidación" de tumores se entiende que los tumores han disminuido o la falta total del suministro de sangre y en una CT las lesiones son hipodensas u oscuras en comparación con el valor inicial antes del tratamiento y la muestra de biopsia demuestra evidencia de necrosis coagulativa.

La descripción se refiere aquí a "composiciones terapéuticas", "medicamentos" y "medicamentos". Estos términos se utilizan indistintamente y se refieren a composiciones que se administran a un paciente.

Las composiciones terapéuticas incluyen generalmente antígenos extraños. El antígeno extraño puede ser cualquier antígeno no propio, tal como un aloantígeno. El antígeno extraño se debe proporcionar de manera que el antígeno pueda ser engullido por las células presentadoras de un antígeno profesional y presentado al sistema inmune para ser procesado y presentado a las células T. El antígeno puede ser una parte natural de las células vivas o puede ser alterado o bio diseñado utilizando técnicas de biología molecular. El antígeno puede ser soluble o inmovilizado en una superficie, una parte intacta de un organismo o célula viva, o una parte de un organismo atenuado.

Una variedad de citoquinas se puede incluir también en las composiciones terapéuticas. El término citoquina se utiliza como un nombre genérico para un grupo diverso de proteínas solubles y péptidos que actúan como reguladores normalmente a concentraciones nano- a picomolares y que, en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de las células y tejidos individuales. Estas proteínas también median directamente las interacciones entre células y regulan los procesos que tienen lugar en el entorno extracelular. Las citoquinas de Tipo 1 están implicadas en las respuestas inflamatorias y las citoquinas de Tipo 2 en respuestas inmunes humorales. Las citoquinas de Tipo 1 incluyen, por ejemplo, IL-2, IL-12, IL-15, IFN-gamma, TNF-alfa, TNF-beta, GM-CSF y quimioquinas C-C. El componente de citoquina puede ser citoquinas naturales o recombinantes o pueden ser moléculas diseñadas por ingeniería genética para interactuar con los receptores de una citoquina. Las citoquinas se pueden incluir directamente en las composiciones terapéuticas. Alternativamente, las composiciones terapéuticas pueden incluir células vivas u otros componentes que producen o secretan las citoquinas. En algunas realizaciones ejemplares, las composiciones terapéuticas incluyen células T en un estado activado que están produciendo y secretando las citoquinas y por lo tanto, sirven como fuente de citoquinas en las composiciones terapéuticas.

La composición terapéutica puede incluir también un factor o factores que causan la maduración de las DCs inmaduras. La capacidad de las DCs para regular la inmunidad depende de la maduración de las DC. Una variedad de factores que puede inducir la maduración después de la absorción y procesamiento del antígeno dentro de las DCs, incluyendo: bacterias enteras o antígenos derivados de bacterias (por ejemplo, lipopolisacárido, LPS), citoquinas inflamatorias tales como IFN-gamma, TNF-alfa, IL-1, GM-CSF, ligadura de receptores de superficie celular seleccionados (por ejemplo, CD40) y productos virales (por ejemplo, RNA bicatenario). Durante su conversión de células inmaduras a maduras, las DCs experimentan un número de cambios fenotípicos y funcionales. El proceso de maduración de las DC, en general, implica una redistribución de las moléculas del mayor complejo de histocompatibilidad (MHC) de los compartimentos endocíticos intracelulares a la superficie de la DC, regulación a la baja de la internalización del antígeno, un aumento en la expresión superficial de las moléculas co-estimuladoras, cambios morfológicos (por ejemplo, formación de dendritas), reorganización del citoesqueleto, secreción de quimioquinas, citoquinas y proteasas, y expresión superficial de las moléculas de adhesión y receptores de quimioquina. En algunas realizaciones preferidas, la CD40L se incluye como un factor de maduración de las DCs.

En otras realizaciones, sustancias que causan la maduración de la DC proporcionan señales a través de los receptores de tipo Toll (TLRs). Los TLRs se expresan en macrófagos y células dendríticas, que están principalmente involucradas en la inmunidad innata. En la actualidad, se han identificado ligandos para varios de los TLRs, tales como TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, y TLR9. La mayoría de estos ligandos se derivan de patógenos, pero no se encuentran en el huésped, lo que sugiere que los TLRs son críticos para detectar microorganismos invasores. El reconocimiento de patógenos por los TLRs provoca la activación rápida de la inmunidad innata al inducir la producción de citoquinas proinflamatorias y la regulación al alza de moléculas coestimuladoras. La inmunidad innata activada conduce posteriormente a una inmunidad adaptativa efectiva. Los ejemplos incluyen ligandos a TLR2 que incluyen lipoproteínas bacterianas y peptidoglicano, y ligandos a TLR-3, -4, -5, -7 y -9 que reconocen RNA

bicatenario, lipopolisacáridos, flagelina bacteriana, imiquimod y DNA bacteriano, respectivamente. La inclusión de éstos y otros factores que causan la maduración de las DCs está también dentro del alcance de la invención.

Las composiciones de la presente invención incluyen generalmente las tres categorías clave de componentes descritos anteriormente. Estos componentes, antígenos extraños, citoquinas Th1 y moléculas de maduración de DC se pueden combinar juntos para formar la composición. Alternativamente, algunos o todos estos componentes pueden ser producidos por células vivas, antes o después de su formulación, y actuar así como fuente de citoquinas y/o de moléculas efectoras.

En una realización ejemplar, la composición terapéutica incluye aloantígenos expresados en células T. Las células T son preferiblemente células T CD4+, y más preferiblemente células Th1. Las células Th1 pueden diferenciarse *in-vitro*, expandirse y activarse a partir de células precursoras CD4+ naïve derivadas de donantes de sangre normales. Preferiblemente, las células están en un estado activado en el momento de la administración con microperlas o nanopérlas conjugadas con anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28. Las perlas pueden ser perlas biodegradables. Estas células pueden producir grandes cantidades de citoquinas inflamatorias tales como IFN-gamma, TNF-alfa y GM-CSF y expresar moléculas efectoras sobre la superficie celular, tales como CD40L, que sirven para promover el desarrollo de la inmunidad Th1.

La composición terapéutica incluye células Th1 alogénicas activadas. Estas células Th1 activadas pueden ser potentes agentes inflamatorios. Estas células Th1 alogénicas activadas y los métodos para prepararlas se describen en los documentos de Patente Números 7,435,592, 7,678,572, 7,402,431 y 7,592,431 y se incorporan aquí por referencia. Las células Th1 alogénicas activadas no son compatibles intencionadamente con el paciente.

La administración intratumoral de las composiciones terapéuticas preferidas puede proporcionar un efecto adyuvante potente para el desarrollo de la inmunidad antitumoral de Tipo 1 y la regulación a la baja de los mecanismos de inmuno-evasión tumoral. El efecto adyuvante de la composición se basa en tres características principales de las células: (1) la capacidad para producir grandes cantidades de citoquinas de Tipo 1; (2) la expresión superficial de CD40L; y (3) la naturaleza alogénica de las células. Antígenos extraños tales como antígenos xeno-, alo- o virales pueden proporcionar también efectos adyuvantes potentes.

Las células Th1 alogénicas de la composición producen preferiblemente grandes cantidades de las citoquinas de Tipo 1: IFN- γ , TNF- α y GM-CSF. IFN- γ es una citoquina esencial de Tipo 1 necesaria para promover la inmunidad antitumoral de Tipo 1. IFN- γ puede mediar los efectos antitumorales al inhibir directamente el crecimiento de las células tumorales e inducir las respuestas antitumorales mediadas por las células T. La secreción de IFN- γ puede contribuir independientemente a la respuesta de las células NK y mejorar la respuesta de las células NK activadas por IL-12.

La importancia de la TNF- α se puede demostrar mediante la evidencia de que la infusión de esta citoquina sola es suficiente para curar ciertos tumores animales establecidos. La TNF- α es parte de una familia de citoquinas y ligandos de Tipo 1 que pueden destruir efectivamente las células cancerosas al inducir la apoptosis. Las IFN- γ y TNF- α no solo tienen un efecto adyuvante sobre las células efectoras antitumorales, sino que pueden también inducir directamente la apoptosis de los tumores.

La producción de GM-CSF puede proporcionar también un potente efecto adyuvante. La GM-CSF puede inducir la producción de citoquinas del Tipo 1 mediante PBMC humanas, linfocitos T, y APC. La GM-CSF puede regular a la baja la expresión de la citoquina de Tipo 2 y promover la diferenciación de monocitos en la DC con una expansión preferencial de DC1 (DC que produce IL-12) y la activación de la actividad de NK.

La mezcla del medicamento con DC inmadura puede causar que la DC madure y produzca IL-12. La IL-12 se conoce como un iniciador primario de la respuesta inmune de Tipo 1 y actúa como un regulador positivo anterior para la producción de IFN- γ a partir de células NK y Th1. La IL-12 puede activar células T citotóxicas y causar que los linfocitos CD4+ se diferencien en el fenotipo Th1 e inclinar el equilibrio entre las respuestas inmunitarias de Tipo 1 y Tipo 2 en favor del Tipo 1. Se sabe que la IL-12 tiene un fuerte efecto adyuvante en la promoción de la inmunidad de Tipo 1.

Un medicamento que contiene células Th1 alogénicas activadas puede derivarse de precursores purificados a partir de donantes de sangre cribados normales. Las células deberían suministrarse como una forma de dosificación estéril y baja de endotoxina formulada o para inyección intratumoral intradérmica, o infusión intravenosa. Las células se pueden formular también para infusiones intraperitoneal, intrapleural, intranodal, intravesicular o epidural. Los donantes se analizan preferiblemente para que sean negativos para HIV1, HIV2, HTLV1, HTLV2, HBV, HCV, RPR (sífilis), y las células se ensayan preferiblemente para que sean negativas para micoplasma, EBV y CMV. En realizaciones preferidas, las células alogénicas activadas son HLA incompatibles con el paciente.

Los métodos de la presente invención incluyen generalmente administrar las composiciones de la presente invención de tal manera que manipulen el sistema inmune del paciente para que reaccione y cause la liquidación del tumor (es). La primera etapa en los métodos descritos aquí se diseña generalmente para aumentar los números circulantes de las células inmunes Th1 en pacientes con cáncer, desplazando el equilibrio del entorno Th2 al entorno

Th1. La segunda etapa puede ser provocar una inmunidad Th1 específica antitumoral y la tercera etapa puede ser activar los componentes de las respuestas inmunes innatas y adaptativas y generar un entorno sostenido de citoquina Th1 para regular a la baja la inmuno-evasión tumoral.

5 El sistema inmune de un individuo puede evaluarse a través del equilibrio de citoquinas que se producen en respuesta a organismos patógenos y puede ser una respuesta Th1 o respuesta Th2. Este método de clasificación cada vez más popular se conoce como el equilibrio Th1/Th2. Las interleuquinas e interferones se denominan "citoquinas" que se pueden agrupar en las secretadas por células del tipo Th1 y las secretadas por células del tipo Th2. Las células Th1 promueven la inmunidad mediada por células, mientras que las células Th2 inducen la inmunidad humoral. La inmunidad celular (Th1) dirige las células asesinas naturales (NK), células T y macrófagos para atacar las células y microorganismos anormales en los sitios de infección. La inmunidad humoral (Th2) da como resultado la producción de anticuerpos utilizados para neutralizar invasores extraños. En general, la polarización Th2 de las células T CD4+ se ha demostrado que está relacionada con la progresión del cáncer en la mayoría de los estudios del cáncer en humanos y animales, mientras que la polarización Th1 se correlaciona con la regresión tumoral y la inmunidad antitumoral. Las células Th1 producen IL-2 y IFN- γ y median la inmunidad de Tipo 1, mientras que las células Th2 producen IL-4, IL-5, y IL-10 y median la inmunidad de Tipo 2. Las respuestas inmunes de Th1 y Th2 son contrareguladoras, de modo que las respuestas aumentadas de Tipo 1 regulan a la baja las respuestas de Tipo 2 y las respuestas aumentadas de Tipo 2 regulan a la baja las respuestas de Tipo 1.

20 Los métodos descritos aquí incluyen sensibilizar a un paciente administrando una composición que contiene un antígeno extraño para crear inmunidad Th1 en el paciente frente al antígeno extraño. El método incluye además extirpar todo o una parte del tumor que da como resultado al menos algo de necrosis tumoral. Una variedad de métodos se puede utilizar para generar necrosis tumoral en el paciente, tal como crioblación, radioablación, quimioterapia, embolización, y electroporación. El método implica también la creación de un microentorno inflamatorio en las proximidades del sitio de necrosis tumoral, es decir, el sitio de la lesión tumoral. Además, el método incluye la activación de las células inmunes adaptativas e innatas del paciente para mantener un entorno Th1 prolongado. En realizaciones preferidas, un componente clave del método incluye el uso de un medicamento o composición que contiene células inmunes alogénicas activadas que producen citoquinas Th1 como se describió anteriormente.

30 Dado que la mayoría de los pacientes con cáncer humano pueden presentar una inmunidad Th2 polarizada, el objetivo de la primera parte de este método de tratamiento es aumentar la cantidad de células Th1 circulantes en pacientes con cáncer. El número de células Th1 circulantes se puede acumular en el paciente con cáncer sensibilizando o vacunando al paciente con una composición terapéutica que incluye un antígeno extraño. La composición terapéutica puede incluir también citoquinas Th1 que permiten al paciente encontrarse con el antígeno extraño en un entorno Th1. En una realización ejemplar, el paciente se sensibiliza con células Th1 alogénicas activadas que se inyectan intradérmicamente. En realizaciones preferidas, las inyecciones intradérmicas se realizan en un programa semanal una vez a la semana durante 3 semanas. Sin embargo, las inyecciones intradérmicas se pueden administrar cada dos días o años de diferencia. El programa de inyecciones debe diseñarse para mejorar la huella de las células de memoria Th1 en circulación. Los aloantígenos expresados en las células extrañas pueden estimular una potente respuesta de rechazo inmunitario. Además, la presencia de citoquinas Th1 en la composición o la expresión de las citoquinas Th1 por las células alogénicas puede proporcionar el entorno adyuvante inflamatorio necesario para dirigir la respuesta inmune a los aloantígenos hacia la inmunidad de memoria Th1. Esto puede crear un conjunto aumentado de células de memoria Th1 en circulación específica para los aloantígenos contenidos dentro de las células Th1 alogénicas. Las administraciones múltiples pueden actuar como vacunas de refuerzo, aumentando el número de células Th1 de memoria circulantes específicas para los aloantígenos. En general, se prefieren dosis más bajas de 1×10^6 a 2×10^7 células para cada inyección con cada inyección preferiblemente cada 3-7 días de diferencia. Para aumentar aún más el título de las células de memoria Th1 en circulación, se puede administrar una dosis de células alogénicas activadas intravenosas. En realizaciones preferidas, se administra un programa de $1-2 \times 10^7$ células por vía intradérmica de una a tres veces por semana durante 2-3 semanas seguido por una infusión intravenosa de $3-10 \times 10^7$ células. La siguiente etapa en el método es educar al sistema inmune para que reconozca el tumor.

50 Para educar al sistema inmune de la amenaza planteada por el tumor, y desarrollar una inmunidad antitumoral específica que pueda provocar la licuefacción de los tumores se utiliza un método de vacuna *in-situ*. Esta estrategia se puede ejecutar mediante la combinación de la administración de la composición terapéutica, que preferiblemente contiene células alogénicas, junto con métodos de ablación tumoral. En los métodos descritos aquí, una fuente de antígeno tumoral se crea *in-situ* mediante la ablación de una lesión tumoral seleccionada. Se puede utilizar cualquier método de ablación que cause la muerte del tumor al menos en parte por necrosis. También se pueden utilizar métodos que causen la muerte del tumor por apoptosis, sin embargo estos métodos no son tan efectivos como los métodos que inducen la necrosis. La ablación tumoral puede incluir quimioterapia, radioterapia, crioblación, ablación por radiofrecuencia, electroporación, ablación con alcohol, terapia biológica, terapia anti-angiogénica, otros métodos de ablación o combinaciones de estos métodos se pueden utilizar para la ablación del tumor. También se pueden utilizar métodos de quimioterapia que citoreducen los tumores.

Se utiliza la técnica mínimamente invasiva de crioablación percutánea guiada por imagen (a través de la piel) o crioablación o ablación con alcohol (utilizada mejor para la ablación de lesiones palpables). Las lesiones tumorales elegibles para la ablación pueden residir, por ejemplo, en el hígado, piel, cabeza/cuello, ganglios linfáticos, páncreas, huesos, suprarrenales, vejiga, tracto gastrointestinal o riñón y se ubicarán en una localización dentro de aquellos órganos que permiten un acceso percutáneo seguro utilizando una guía de imagen por CT o ultrasonido cuando sea necesario.

El procedimiento de ablación da como resultado la liberación de grandes cantidades de restos tumorales en un microentorno tumoral que sirve como una fuente de antígenos tumorales específicos del paciente. Normalmente, las células en el cuerpo mueren por un proceso natural conocido como apoptosis que ocurre como consecuencia continua de la renovación celular. El sistema inmune se programa para que no responda a las células apoptóticas, evitando así la autoinmunidad. La muerte celular necrótica como resultado de la ablación, sin embargo, puede enganchar células inmunes al sitio tumoral y los contenidos internos de las células proporcionan señales "eat me" a las células inmunes que responden. Sin embargo, los potentes efectos adyuvantes de las células Th1 activadas pueden superar los efectos normales de la muerte celular apoptótica que no estimulan una respuesta inmune. Por esta razón, cualquier método que cause la muerte de las células tumorales puede utilizarse en combinación con la composición de células Th1 alogénicas activadas preferidas.

Los antígenos se presentan al sistema inmune mediante una red de células especializadas que se conocen como células presentadoras de antígenos profesionales (APCs) o células dendríticas (DCs). Las DCs son responsables de inducir inmunidad a patógenos o tumores al presentar antígenos a células T naïve, que dan como resultado la diferenciación de las células T en células T efectoras y de memoria específicas para los antígenos. Las células T efectoras, principalmente las células T citolíticas CD8+ (CTL), son capaces de destruir las células que expresan los antígenos. Las células T de memoria proporcionan protección inmune frente a la recurrencia o la reinfección. La diferenciación de las DCs en las potentes APCs se desencadena por estímulos moleculares que se liberan como resultado de la alteración del tejido y una respuesta inflamatoria local.

Las DCs que procesan los antígenos tumorales contenidos en los materiales engullidos pueden programarse para madurar en presencia de señales de peligro inflamatorias, es decir, bajo condiciones Th1, de una manera que pueda promover el desarrollo de la inmunidad Th1 específica para los antígenos engullidos. Al combinar la muerte tumoral patológica o natural por métodos de ablación o quimioterapia con administración intratumoral de la composición terapéutica, conteniendo preferiblemente células Th1 alogénicas activadas que producen señales de peligro inflamatorias, se pueden crear las condiciones para la inmunidad específica del tumor Th1. La combinación de antígenos tumorales expuestos en presencia de señales de peligro inflamatorias dentro del cuerpo se denomina método de vacuna *in-situ*.

También dentro del alcance de esta invención está el desarrollo de chips u obleas que están incrustadas con los componentes claves de la composición terapéutica: (a) un antígeno extraño; (b) una molécula que causa maduración de la DC; y (c) citoquinas inflamatorias. Por ejemplo, una oblea incrustada con aloantígenos y CD40L implantada con citoquinas incrustadas o exógenas, tales como GM-CSF y/o IFN-gamma entraría dentro del alcance de esta invención.

Las DCs inmaduras que engloban los antígenos tumorales pueden procesar antígenos tumorales en presencia de señales inflamatorias y después madurar, diferenciarse y migrar a los nódulos linfáticos que drenan donde pueden sensibilizar las células T inmunes a la inmunidad Th1, incluyendo células T citolíticas (CTL) que son capaces de buscar específicamente y destruir los tumores donde quiera que residan en el cuerpo. Para que este proceso ocurra correctamente, las células dendríticas inmaduras que toman antígenos tumorales deben procesar los antígenos dentro de un entorno altamente inflamatorio. El tipo de entorno inflamatorio que es necesario para impulsar la maduración de las células dendríticas para sensibilizar para la inmunidad Th1 no se produce de forma natural y no se produce como resultado del proceso de ablación solo y requiere, por lo tanto, un adyuvante.

Para proporcionar un adyuvante para dirigir la maduración correcta de DC, la composición terapéutica que preferiblemente incluye las células Th1 alogénicas activadas descritas aquí se puede administrar en el centro necrótico de la lesión tumoral ablacionada, preferiblemente en 1 h después del procedimiento de ablación. Las células inmune alogénicas se pueden activar en el momento de la inyección mediante la unión de micropelotas recubiertas con anticuerpos monoclonales CD3/CD28. Estas células inmunes producen grandes cantidades de citoquinas inflamatorias y expresan moléculas superficiales (por ejemplo, CD40L) que se sabe que provocan la maduración de las células dendríticas y promueven el desarrollo de la inmunidad antitumoral Th1. Además, dado que los pacientes serán inmunes a los aloantígenos debido a las inyecciones de sensibilización intradérmicas previas, la administración intratumoral puede provocar una potente respuesta de memoria de las células Th1 para rechazar estas células alogénicas. Todos estos factores sirven como un adyuvante al promover la maduración de DC para sensibilizar para la inmunidad Th1 específica antitumoral. El momento de la inyección intratumoral puede alterarse para mejorar el efecto terapéutico. El efecto adyuvante de las células Th1 alogénicas de memoria activadas se optimiza cuando las células se administran al mismo tiempo que las células dendríticas entran en la lesión tumoral ablacionada. Como se sabe que la ola de células dendríticas que entra en los tejidos dañados ocurre aproximadamente 3 días después del acto de ablación, se prefiere que las células alogénicas se administren también 3 días después del procedimiento de ablación. Esta inyección intratumoral puede ser adicional a la

inyección intratumoral en el momento de la ablación o en vez de la inyección intratumoral en el momento de la ablación.

Dado que se sabe que los tumores son capaces de evadir las respuestas inmunes Th1, una etapa adicional del método se diseña para desactivar estos mecanismos de inmuno-evasión tumoral. Un entorno altamente inflamatorio puede tener el efecto de suprimir la inmune evasión del tumor y romper la tolerancia a los antígenos tumorales de la misma manera que la inflamación puede romper la tolerancia a los antígenos del tejido propio y promover la autoinmunidad. Para crear y mantener este entorno inflamatorio, el medicamento que incluye las células Th1 alogénicas activadas descritas aquí pueden infundirse en el paciente por vía intravenosa. Alternativamente, este medicamento se puede administrar intraarterialmente. Las células Th1 alogénicas activadas son preferiblemente del mismo donante que las células alogénicas que se utilizaron para sensibilizar inicialmente al paciente.

La infusión del medicamento causa un entorno altamente inflamatorio a medida que el sistema inmune sensibilizado del paciente se activa para rechazar estas células. Además, el rechazo de las células alogénicas tiene el efecto secundario de activar los componentes del sistema inmune innato del huésped (tal como células NK y macrófagos) que inicia la cascada de sucesos inmunológicos necesarios para la liquidación y la eliminación del tumor sistémico, así como la supresión de la capacidad del tumor para evitar este ataque inmune. Esta respuesta de rechazo puede crear un entorno inmunológico similar al entorno GVHD creado en el entorno del trasplante alogénico. Sin embargo, de acuerdo con el método de esta invención el rechazo de las células alogénicas no es tóxico.

El método descrito aquí incluye proporcionar la molécula CD40L de maduración de la célula dendrítica (CD154) al paciente. La CD40L puede interactuar con CD40 expresada constitutivamente en progenitores hematopoyéticos del huésped, células epiteliales y endoteliales, y todos los APC, DC, monocitos activados, linfocitos B activados, DCs foliculares y células NK. CD40L es uno de los más fuertes inductores de las respuestas Th1 y la estimulación de CD40L anula el efecto supresor de las células Treg. CD40L activa también las células NK innatas y es uno de los activadores más potentes de DC. La activación CD-40-CD40L de DC conduce a la maduración y a la regulación al alza de moléculas co-estimuladoras y a la producción de grandes cantidades de IL-12, que tiene potentes propiedades antitumorales y de dirección Th1. También se ha demostrado que CD40L tiene efectos antitumorales directos tanto al suprimir el crecimiento del tumor como al inducir una muerte tumoral extensa. La activación de CD40L también puede mejorar la lisis de tumores mediada por CTL. El CD40L se puede administrar al paciente separadamente o como parte de una composición terapéutica. El CD40L se puede proporcionar al paciente en la composición terapéutica que incluye las células Th1 alogénicas activadas porque CD40L es regulado al alza por las células Th1 alogénicas activadas con anticuerpos reticulados anti-CD3/anti-CD28 presente en la composición.

Las citoquinas Th1 producidas por las células Th1 alogénicas de la composición y la expresión de CD40L en estas células también pueden activar las células Th1 aloespecíficas circulantes creadas en la etapa de sensibilización del método de la invención y otras células inmunes del huésped para regular al alza su expresión de CD40L. Esto proporciona una señal de CD40L sostenida después de que la composición se rechaza manteniendo la expresión de CD40L en las células activadas del huésped. La expresión de CD40L del huésped sostenida proporciona el entorno inflamatorio sostenido necesario para la regulación a la baja de la inmuno-evasión del tumor y permite que los CTL específicos del tumor creados en la segunda fase de la vacuna in-situ del método medie los efectos antitumorales.

Ejemplos

Pacientes

Los pacientes con cáncer metastásico progresivo (estadio IV) resistente a al menos un ciclo de quimioterapia fueron elegibles para participar en el estudio. El estadio clínico de cada paciente se evaluó utilizando un historial médico completo, examen físico, hemograma completo, química clínica, y tomografía computarizada (CT) de tórax, abdomen y pelvis. En algunos pacientes con antecedentes de metástasis óseas también se realizó una CT/PET. Los estadios clínicos para todos los pacientes se determinaron en base al sistema revisado del American Joint Committee (AJC).

Otros requisitos de elegibilidad fueron los siguientes: consentimiento informado voluntario por escrito, edad ≥ 18 años, enfermedad medible con al menos una lesión metastásica en un lugar considerado evaluable de forma segura para la crioablación percutánea, estado de rendimiento Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) ≤ 2 ; esperanza de vida ≥ 2 meses; y función hematológica, renal y hepática adecuada: bilirrubina total $< 1,5$ mg/dL; AST/ALT $\leq 2,5$ ULN, creatinina $\leq 1,5$ mg/dL, fosfatasa alcalina $\leq 2,5$ ULN (≤ 5 veces normal si hay afectación hepática), recuento absoluto de granulocitos $\geq 1.200/\text{mm}^3$, recuento de plaquetas $\geq 75.000/\text{mm}^3$, PT/INR $\leq 1,5$, y hemoglobina ≥ 9 g/dL. Los pacientes no debieron haber recibido bevacizumab dentro de las 3 semanas posteriores a la acumulación (6 semanas antes de la crioablación) y no debieron tener quimioterapia dentro de las 2 semanas posteriores a la acumulación.

Los criterios de exclusión fueron cualquier condición médica preexistente que perjudicaría la capacidad de recibir el tratamiento planificado, trasplante alogénico previo de médula ósea/célula madre u órgano sólido, uso crónico (> 2 semanas) de dosis mayores que las dosis fisiológicas de un agente corticosteroide (dosis equivalente a > 5 mg/día

- de prednisona) dentro de los 30 días posteriores al primer día del tratamiento farmacológico del estudio, enfermedad autoinmune activa concomitante (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad tiroidea autoinmune, uveítis), tratamiento previo con vacuna experimental contra el cáncer (por ejemplo, terapia de células dendríticas, vacuna de choque térmico), terapia inmunosupresora, incluyendo: ciclosporina, globulina antitumoral, o tacrolimus dentro de los 3 meses posteriores a la entrada del estudio, historial de reacciones de transfusiones de sangre, infección bacteriana o viral progresiva, enfermedad cardíaca de naturaleza sintomática o fracción de eyección cardíaca < 45%, enfermedad pulmonar sintomática o FEV1, FVC, y DLCO ≤ 50% predicho, historial de positividad de HIV o AIDS (se permitió la positividad de HBV y/o HCV). La mayoría de los pacientes tuvieron ingesta inadecuada de calorías y líquidos en el momento de la acumulación y no fueron excluidos por esta razón.
- 5
- 10 Se evaluaron 42 pacientes. La edad media fue 60,2 años (intervalo 50-89 años) con 40% de hombres y 60% de mujeres. Los pacientes se pretrataron en gran medida con un promedio de 2,7 líneas previas de quimioterapia y un promedio de 7 cursos por línea. El 45% tuvieron radioterapia previa y el 90% tuvieron excisión quirúrgica previa de las lesiones tumorales. Los pacientes también tuvieron altas cargas tumorales con un promedio de 22 lesiones metastásicas por paciente. La muestra más común fue el cáncer de mama (42%) seguido por el cáncer colorrectal (19%) e incluyendo también ovario, sarcoma, carcinoma de células escamosas, pulmón, vejiga/uréter, páncreas, melanoma y cánceres metastásicos esofágicos.
- 15

Inyecciones intradérmicas

- Se administraron inyecciones intradérmicas del medicamento que contiene las células Th1 alogénicas conjugadas con microperlas recubiertas de CD3/CD28 a dosis entre 1×10^7 a 4×10^7 células. Las células se suspendieron en un tampón de formulación que contiene PlasmaLyteA y un 1% de albúmina sérica humana a una densidad de 1×10^7 células por ml. Entre una y cuatro inyecciones de 1 ml se administraron a la vez en diferentes lugares (parte superior del brazo, parte superior del muslo y abdomen). Las inyecciones intradérmicas se administraron a una frecuencia tan alta como cada dos días o tan baja como cada 9 días, pero preferiblemente una inyección cada semana durante un mínimo de 3 semanas.
- 20

Inyecciones intratumorales

- La inyección intratumoral del medicamento se produce en el centro necrótico de un tumor ablacionado, una hora después de la ablación pero puede estar dentro de la semana de la ablación. Se administró la inyección intratumoral de 1×10^7 a 6×10^7 células del medicamento preferido. Si existían tumores múltiples, solo se ablacionó un tumor. En algunos casos se repitió el procedimiento de ablación.
- 25

Infusiones Intravenosas, Intraperitoneales, Intrapleurales, Intravenosas, Epidurales

- Se administraron infusiones intravenosas, intraperitoneales, intrapleurales, intravenosas del medicamento, a dosis que varían desde 1×10^7 a 1×10^9 células, con 1×10^8 células la dosis habitual. La infusión del medicamento en la cavidad peritoneal se puede utilizar para tratar carcinomatosis y la ascitis maligna. De manera similar, la infusión intrapleural puede tratar derrames pleurales malignos y las inyecciones epidurales pueden tratar tumores malignos en el espacio cerebro espinal. Estas infusiones se repitieron según fue necesario hasta que el tumor fue completamente erradicado.
- 30
- 35

- La primera etapa del protocolo se llama etapa de "sensibilización". La etapa de sensibilización consiste en tres o más inyecciones intradérmicas del medicamento a dosis que varían desde 1×10^7 a 4×10^7 células administradas con al menos 2 días de separación y preferiblemente no más de 8 días de separación. Los pacientes se observaron durante al menos 30 minutos después de la inyección para cualquier efecto adverso.
- 40

- La segunda etapa del método se llama etapa de "vacunación *in-situ*". Esta etapa se realizó entre los dos días y los ocho días después de la finalización de la etapa de sensibilización. Este procedimiento implica la ablación de una lesión tumoral seleccionada seguida una hora después por una inyección intratumoral de 1×10^7 a 6×10^7 dosis de medicamento. Alternativamente, los pacientes con ascitis maligna fueron elegibles para la infusión intraperitoneal con o sin crioablación del tumor y los pacientes con lesiones palpables fueron elegibles para ablación con alcohol con o sin crioablación. Los pacientes con carcinomatosis peritoneal recibieron una dosis de 1×10^8 a 1×10^9 células del medicamento preferido por vía intraperitoneal.
- 45

- Un método utilizado para crioablación fue el uso de un CryoCare-28 Percutaneous Probe System (Endocare, CA, USA). Este sistema utiliza el efecto Joule-Thomson para enfriar el final de una criosonda en un sistema cerrado. De acuerdo con el coeficiente de gas y la dimensión de la boquilla, diferentes elementos gaseosos generan diferentes sucesos de intercambio térmico en el área próxima a la boquilla. El gas argón se utiliza para enfriar (-187°C), y el helio se utiliza para calentar (67°C).
- 50

- Cuando fue necesario, la lesión tumoral objetivo planificada se identificó y localizó bajo una guía de imágenes de CT. Se creó un campo estéril y se administró anestesia local en el sitio de inserción de la sonda planificada. Se insertó una sonda guía por vía percutánea y se verificó por CT que estaba dentro de la lesión tumoral objetivo. Se realizaron uno o dos ciclos de congelación-descongelación. Se utilizó una sola sonda de 2- o 5- mm de acuerdo con
- 55

el tamaño del tumor objetivo. El tiempo de congelación fue aproximadamente de 15-20 minutos dependiendo de la consecución de una “bola de hielo”, visible en CT. El deshielo se logró mediante la entrada de helio durante un periodo equivalente al tiempo de congelación antes de que se iniciase un segundo proceso de congelación (cuando se utilizó). El procedimiento solo requiere la ablación de una muestra de la lesión tumoral y no requiere una ablación tumoral completa con márgenes libres de tumor.

5 La lesión ablacionada se dejó enfriar durante aproximadamente de 10 minutos a 1 hora después del ciclo de congelación antes de la inyección del medicamento preferido.

10 La etapa final del método que es la etapa de estimulación inmune se realizó en el mismo día de la crioablación hasta dentro de los ocho días siguientes al procedimiento de crioablación. Esta etapa consiste en una o más infusiones intravenosas del medicamento a dosis que variaban desde 1×10^7 hasta 1×10^9 células administradas con no menos de dos días de diferencia. La mayoría de los pacientes recibieron infusiones intravenosas mensuales como inyecciones de refuerzo.

Respuesta

15 Los pacientes tratados por el método de esta invención se evaluaron por CT después de aproximadamente 30 días a partir del último tratamiento. En una CT sin contraste intravenoso, un tumor es normalmente de una densidad intermedia. El tumor, los vasos sanguíneos, los músculos, y los ganglios linfáticos pueden tener la misma densidad. Después de la administración intravenosa (IV) de medio de contraste iodado, los tumores aumentan en varios grados: los Paragangliomas, que son muy musculares, se intensifican intensamente, mientras que los carcinomas de células escamosas, que son más celulares, no se intensifican intensamente, o poco o nada. Los focos de necrosis o hemorragia previa son oscuros (hipodensos) en CT. Al carecer de suministro de sangre, los focos de necrosis no mejoran después de la administración del contraste.

20 En un tratamiento exitoso, la tomografía computarizada a los 30 días indicó hinchazón (aumento en tamaño) de todas las lesiones tumorales que se vuelven hipodensas (oscuras) en comparación con el valor inicial. La apariencia del tumor más grande en CT aparece con manchas heterogéneas con puntos de baja densidad en comparación con quistes homogéneos de baja densidad o un tumor progresivo con un área de necrosis central y bordes de avance viables. La apariencia heterogénea de baja densidad indica que los tumores se han licuado.

Resultados:

30 La Figura 1 muestra la vista coronal de un paciente con cáncer colorrectal metastásico de 89yo que presentó enfermedad metastásica en el hígado en Junio del 2009 y se trató con líneas de quimioterapia de FOLFOX y FOLFIRI y FOLFIRI con avastina. Estaba avanzando y se volvió resistente a la quimioterapia en Junio del 2010 y presentó 11 lesiones metastásicas en el hígado en Septiembre del 2010. El paciente se sometió a 3 dosis intradérmicas semanales de 1×10^7 del medicamento descrito aquí, y una semana después se sometió a un procedimiento de crioablación de una de las metastásis hepáticas y una infusión intratumoral del medicamento preferido el día 21 y una infusión intravenosa IV el día 28 de 1×10^9 células.

35 La Figura 1 muestra la apariencia inicial de una porción seleccionada de las lesiones metastásicas en el hígado. Después de 60 días los tumores se vuelven más grandes y más hipodensos, consistente con una respuesta de licuefacción. A los 90 días los tumores mantienen el tamaño más grande, pero pierden la hipodensidad presumiblemente debido a la reabsorción del agua. Después, se administró al paciente una infusión intravenosa de refuerzo el día 95 y se tomó otra imagen CT el día 120. La imagen muestra la devolución de la hiperdensidad así como el aumento de tamaño. Para demostrar que esto era de hecho una licuefacción y no solo un tumor progresivo, el tumor se sometió a biopsia y se evaluó por un patólogo. Como se muestra en la Figura 2, la biopsia indica grandes áreas de necrosis coagulativa y fibrosis consistentes con la licuefacción tumoral inmune mediada.

45 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones preferidas, los expertos en la técnica reconocerán que se pueden hacer cambios en la forma y el detalle sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Una composición terapéutica para uso en la liquidación de un cáncer metastásico progresivo en estadio IV resistente a al menos un ciclo de quimioterapia, la composición comprende células Th1 alogénicas conjugadas con microperlas recubiertas de anticuerpo monoclonal anti-CD3/anti-CD28, en donde la composición es para la administración a un paciente de acuerdo con el siguiente régimen:
- 5
- a) tres o más inyecciones intradérmicas a una dosis de entre 1×10^7 a 4×10^7 células con no menos de 2 días de diferencia y no más de 8 días de diferencia,
- b) entre 2 días y 8 días después de la finalización de la etapa a), una inyección intratumoral de 1×10^7 a 6×10^7 células dentro de una hora de la ablación del tumor, y
- 10 c) dentro de los 8 días de la ablación, una o más infusiones intravenosas a una dosis de 1×10^7 a 1×10^8 células con no menos de dos días de diferencia,
- en donde, la administración de la composición da como resultado un aumento en el tamaño del tumor que se vuelve hipodenso y oscuro en comparación con el valor inicial previo al tratamiento como se muestra en la tomografía computarizada a los 30 días.

15

Figura 1

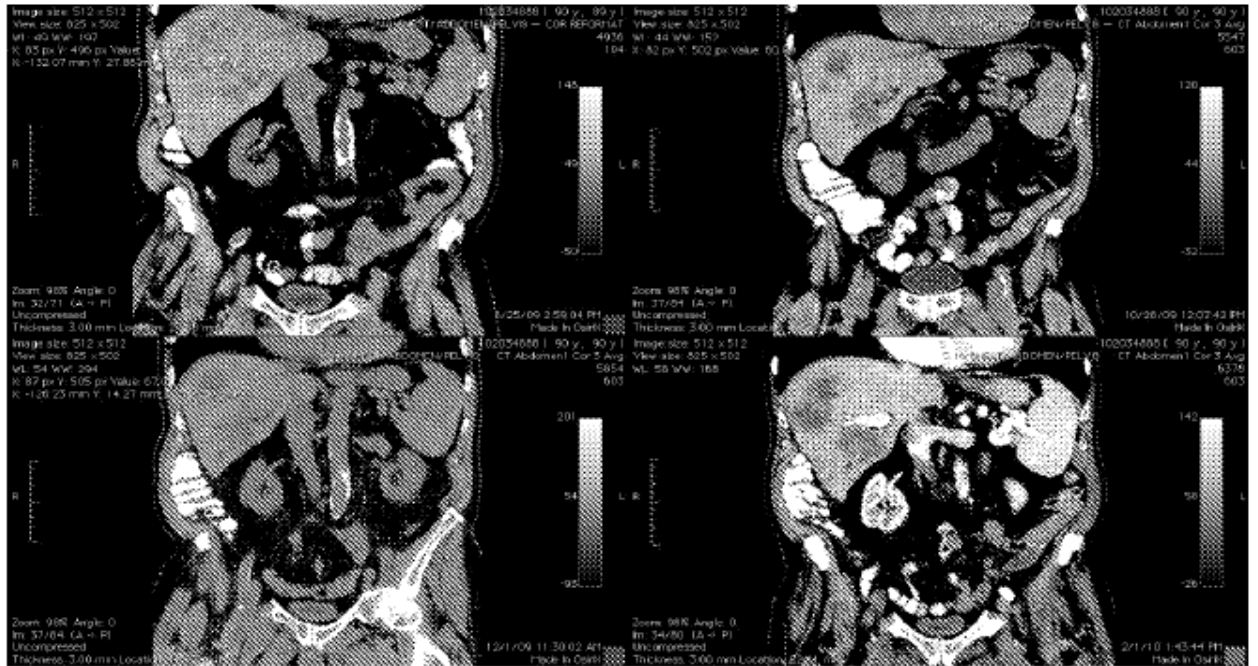


Figura 2

