República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0707247-3 A2**

BRPI0707247A2

(22) Data de Depósito: 26/01/2007
(43) Data da Publicação: 26/04/2011
(RPI 2103)

(51) Int.Cl.:
A61K 39/00
A61P 35/00

(54) Título: **VACINA PARA TUMOR COMPREENDENDO CÉLULAS TUMORAIS ALOGENÉICAS OU XENOGENÉICAS**

(30) Prioridade Unionista: 26/01/2006 GB 0601598.6

(73) Titular(es): Apostolos Stathopoulos

(72) Inventor(es): Apostolos Stathopoulos

(74) Procurador(es): Montaury Pimenta, Machado & Lioce S/C Ltda

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007050807 de 26/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/085648de 02/08/2007

(57) Resumo: VACINA PARA TUMOR COMPREENDENDO CELULAS TUMORAIS ALOGENEICAS OU XENOGENÉICAS A presente invenção provê uma composição para o tratamento de um tumor, compreendendo: (1) células tumorais alogenélcas ou xenogenéicaS; e (ii) um excipientefarmaceuticamente aceitável. Se dois ou mais indivíduos heterozigóticos têm o mesmo câncer/tumor do mesmo tipo histológico ou de tipo histológico similar, então o transplante das células/tecido de tumor/câncer a partir de um individuo para outro não apenas induzirá a rejeição do tecido/câncer transplantado, mas também aumentará a sensibilização imunológica do sistema imunológico aos peptídeos compartilhados entre os tumores/cânceres e outros tumores possuindo peptídeos similares.

VACINA PARA TUMOR COMPREENDENDO CÉLULAS TUMORAIS ALOGENÉICAS OU XENOGENÉICAS

Campo da Invenção

Esta invenção se refere ao tratamento de tumores. Mais especificamente, esta invenção se refere a tratamento imune-mediado de tumores.

Histórico da Invenção

O sistema imunológico consiste em duas ramificações, que embora separadas por velocidade e especificidade, são ligadas intrincadamente, criando uma resposta rápida e dirigida contra ambos os ataques[16,21], endógenos e exógenos. O sistema imunológico inato provê defensa de hospedeiro imediata contra ataques[16,21] físicos, químicos e microbiológicos. Ele envolve neutrófilos, monócitos, macrófagos, complemento, citocinas e proteínas[16,21] de fase aguda. Apesar da ausência de especificidade de antígeno, o sistema imunológico inato é capaz de reconhecer peptídeos[16,21] estranhos próprios de não-próprios. Imunidade adaptativa, contudo, envolve linfócitos B e T em uma resposta[16,21] altamente específica dirigida a antígenos. Uma vantagem da imunidade adaptativa é o potencial de memória imunológica, conduzindo à resposta mais forte e mais rápida em uma estimulação[8,9] adicional.

A característica definidora de imunidade adaptativa (imunidade específica) é o uso de linfócitos T e B portando receptores de antígeno específico em uma resposta[16,21] imunológica dirigida. As principais células T executoras são as células T ajudantes, portando receptores CD4 e células T citotóxicas portando receptores[16,21] CD8. As células T ajudantes interagem com MHC II, e são responsáveis pela coordenação da resposta imunológica, reconhecendo antígenos estranhos, ativando várias partes do sistema imunológico e ativando as células-B. As células T

citotóxicas interagem com os receptores MHC I e desempenham uma função na montagem de uma resposta imunológica contra os patógenos[16,21] exógenos.

O Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) é uma região genética que codifica proteínas que desempenham uma função essencial na regulação e modulação da resposta[10,16] imunológica. Os produtos genéticos do MHC são divididos em dois grupos separados, baseados nas propriedades biológicas e estruturais: MHC II e MHC II[10,16]. Receptores MHC de classe I estão presentes em todas as células[10,16] nucleadas. Eles apresentam peptídeos sintetizados endogenamente e estão envolvidos intimamente em auto-reconhecimento. Os receptores MHC de classe II são encontrados apenas nas células envolvidas com respostas imunológicas e apresentam proteínas exogenamente derivadas tais como aquelas de produção[16,16] bacteriana. Classicamente, pensou-se que MHC I estava envolvido na rejeição de tumor, porém, mais recentemente, descobriu-se que MHC II desempenha um papel.

A diversidade de ligação de antígeno pelas moléculas de MHC de classe I se baseia em três princípios básicos e relacionados entre si. Em primeiro lugar, as moléculas da classe I têm a capacidade de ligar peptídeos com muitas seqüências[2,16] diferentes. Esses complexos de antígenos de MHC classe I podem ser reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos (CDS), eventualmente levando à destruição de qualquer célula portando uma proteína[2,16] estranha similar. Em segundo lugar, cada organismo expressa um número de diferentes genes[2,16] de classe 1. Finalmente, MHC exibe polimorfismos com um número de alelos em cada local[2,16,23]. Nos humanos, o MHC I é representado em mais do que um local denominado Antígeno de Leucócito Humano (HLA), os locais sendo HLA-A, -B e -C, sendo o HLA-B[16,23] o mais

polimórfico. Esses fatores inferem um alto grau de especificidade individual e a necessidade de um regulador para exercer pressão seletiva: o sistema imunológico celular.

É esse alto grau de especificidade e pressão seletiva dominante que são explorados no transplante de órgãos e tecidos entre indivíduos[23]. Gêmeos idênticos e membros de família geneticamente próximos têm menos probabilidade de rejeitar o tecido transplantado uma vez que eles têm locais HLA[16] similares. Isso se baseia no fato de que os MHC I são expressos de forma co-dominante e na maioria dos casos herdados intactos sem recombinação[16,23]. Portanto, indivíduos homozigóticos, tais como gêmeos idênticos e ratos singenéicos, poderiam teoricamente aceitar um tumor de cérebro de seu doador homozigótico. Ainda mais criticamente, eles rejeitariam um tumor de cérebro de um doador heterozigo em resposta imunológica específica e dirigida.

Como declarado anteriormente, os receptores MHC de classe I são glicoproteínas de superfície localizadas na maioria das células que desempenham uma função crucial na resposta imunológico. Esse MHC de classe I se liga aos peptídeos antigênicos e interage com as células NK e CD8[5,16,25]. Esses peptídeos são derivados de proteínas endógenas degradadas de células infectadas de tumor e vírus[5,16,25]. O processamento de antígeno é um mecanismo complexo que envolve várias etapas. Uma falha em qualquer uma dessas etapas pode levar a não-expressão do MHC de classe I: complexo de antígeno, e escapar da destruição[12] e reconhecimento de célula T. A perda de, ou a não-regulação nos complexos de MHC I é um mecanismo freqüente para evitar a destruição a partir do CD8[12]. Intuitivamente, se poderia supor que esse marcador "auto-ausente"[17] poderia conduzir

ao maior reconhecimento das células NK, as quais são inibidas pela interação com o complexo MHC I, e estimuladas pelas células com expressão[18] de HLA-2/HA descendentemente regulada. Mesmo com um sistema imunológico completamente funcionando, é possível que os tumores evitem o reconhecimento através do uso de uma estratégia[12] de escapamento elusivo. Embora o mecanismo de escapamento seja pouco entendido, os experimentos descreveram vários mecanismos permitindo que os tumores escapem do reconhecimento do sistema imunológico. Esses mecanismos variam de perda ou mutação de halotipos de HLA à não-resposta aos interferons[12]. Assim, embora uma mudança ou perda de receptores MHC de classe I seja associada com a gênese de vários tumores, a presença de moléculas de MHC de classe I foi mostrada como participando na resistência ao câncer.

Um exemplo dos efeitos anti-tumorogênico da molécula MHC de classe I está na vigilância imunológica da integridade de DNA mitocondrial. Em um estudo, uma das funções das moléculas de MHC I era a de eliminar as células portando mutação[13] mitocondrial. Células de glioma humano carregam múltiplas mutações no tanto DNA mitocondrial quanto no complexo[7] mitocondrial. A partir desses dados, é possível supor que os gliomas do mesmo tipo/espécie histológica carregarão mutações similares no seu DNA e têm proteínas de superfície anormais similares associadas com ambas às moléculas de MHC de classe I e à membrana de célula. Inversamente, um sistema imunológico intacto também pode permitir o desenvolvimento e a progressão de tumores.

Mostrou-se que a progressão de certos cânceres é associada à expressão de antígenos de tumor específico e a uma resposta[15] imunológica associada. Portanto, a rejeição e a imunidade de tumor, efetivas, não podem ser obtidas

apenas mediante autovacinação. Apesar dessas barreiras, existe a evidência crescente de que o sistema imunológico pode ser usado para combater o câncer. Enquanto tanto um sistema imunológico desregulado quanto um sistema imunológico normalmente funcionando lutavam contra a rejeição imunológica de câncer, reportaram-se resultados da rejeição espontânea de tumores[19,26] malignos. Interessante, também foi sugerido que doenças auto-imunes podem contribuir para um melhor prognóstico em pacientes com tumores[6,19] malignos. Nesses pacientes, a maior parte das especificidades IgG identificadas compartilham homologia considerável com ambos os peptídeos[14], humanos e microbianos. Isso conduziu à hipótese de que mimetismo molecular pode iniciar a auto-imunidade tumoral observada. Estudos relacionados a isso mostraram remissão de longo prazo de tumores malignos cerebrais após infecção intracraniana em quatro pacientes[4], e melhorou a sobrevivência de pacientes com câncer com infecção[20,22] microbiana. Isso faz surgir a questão de se a auto-imunidade induzida por mimetismo molecular pode ser usada para tratar tumores. Importante revelar que foi demonstrado que existe homologia significativa entre proteínas humanas e proteínas de outras espécies[24]. Experimentos adicionais mostraram que antígenos xenogenéicos de células endoteliais podem romper a tolerância imunológica contra células[20] endoteliais angiogenéicas autólogas. Isso sugere que a auto-tolerância aos tumores pode ser rompida através de reatividade cruzada com um antígeno estranho homólogo.

Sumário da Invenção

A presente invenção se baseia na realização de que, se dois ou mais indivíduos heterozigóticos têm o mesmo câncer/tumor de um mesmo tipo histológico ou de tipo histológico similar, então transplante de tecidos/células

de tumor/câncer de um indivíduo (ou mais) para outro (ou outros) não apenas induzirá à rejeição do tecido/câncer transportado, mas também aumentará a sensibilização imunológica do sistema imunológico aos peptídeos compartilhados entre os tumores/cânceres e outros tumores possuindo peptídeos similares. Tumores alogenéicos, portanto, podem ser usados para vacinar um tumor estabelecido, reduzir seu tamanho ou eliminar o mesmo e estabelecer memória duradoura. Essa técnica não somente levará à rejeição eventual do tumor principal, mas também conduzirá a uma memória imunológica duradoura, impedindo que o organismo desenvolva outra vez o tumor.

De acordo com um primeiro aspecto da invenção, uma composição para o tratamento ou a prevenção de um tumor compreende

(i) células de tumor alogenéicas ou xenogenéicas; e

(ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável.

As células alogenéicas ou xenogenéicas podem ser providas de um ou mais indivíduos alogenéicos ou singenéicos e apresentadas seja como células integrais ou como um lisado. A composição também pode compreender um lisado de uma célula singenéica.

De acordo com um segundo aspecto da invenção há o uso de células tumorais alogenéicas ou xenogenéicas na fabricação de um medicamento para o tratamento de um tumor em um paciente.

O medicamento pode compreender ainda um lisado de uma célula singenéica. A célula tumoral alogenéica ou xenogenéica pode ser uma célula integral ou pode ser um lisado.

A presente invenção não apenas trata tumores, mas tem o benefício de que o sistema imunológico é capaz de

efetivamente alvejar o tumor, evitando problemas associados com a distribuição/alvodireção dos produtos quimioterapêuticos convencionais. Além disso, a quimioterapia tem muitos efeitos colaterais indesejáveis, incluindo perda de cabelo, náusea, diarréia, anemia e maior risco de infecção, e esses são evitados utilizando-se a terapia da invenção.

Descrição dos Desenhos

A invenção é descrita com referência às figuras anexadas, em que:

A Figura 1 é um desenho esquemático do modelo experimental em Ratos Sprague Dawley. Os ratos foram divididos em dois grupos. Aqueles recebendo uma linhagem de célula singenéica (C6; SD-A) e aqueles recebendo uma linhagem de célula alogenéica (9L; SD-B). O braço singenéico do estudo foi dividido em dois grupos: controle (5 ratos; SD-A1) e tratamento (4 ratos; SD-A2). No dia 27, 4 ratos SD-A1 foram sacrificados. Nesse momento o rato SD-A1 restante (Rato 9) entrou no protocolo de tratamento. Todos os ratos SD foram inicialmente injetados com o 9L de braço alogenéico (SD-B) receberam injeções de flanco com a linhagem de célula C6 singenéica (100.000 células), dez dias após seguiu-se um bolo adicional de 500.000 células C6.

A Figura 2 é um desenho esquemático de modelo experimental em ratos Fisher 344. Os ratos foram divididos em dois grupos. Aqueles recebendo a linhagem de célula 9L singenéica (Fisher A) e aqueles recebendo a linhagem de célula C6 alogenéica (Fisher B). Os ratos no grupo singenéico (Fisher A) foram divididos em um grupo de controle (Fisher A-1) e um grupo tratado (Fisher A-2). Os ratos Fisher A-1 foram desafiados com RG2 singenéico, 9L, ou apenas o intermédio dos dois. Os ratos Fisher A-2 foram

tratados com células alogenéicas, células alogenéicas e lisado de célula, lisado de célula singenéica e células xenogenéicas, ou apenas células xenogenéicas. Os ratos Fisher B receberam inicialmente injeção de células alogenéicas C6. Eles foram subseqüentemente desafiados com injeções de flanco de 9L e células singenéicas (100.000 células) seguido a 10 dias depois de um bolo adicional de 500.000 células.

A Figura 3 é um gráfico traçando a evolução/progressão do tumor em 9 ratos SD com tumor singenéico subcutaneamente implantado (C6). Os ratos foram colocados ou em grupos de controle ou em grupos de tratamento como previamente descrito. A progressão do tumor foi determinada através de medições de volume de tumor (mm^3). Os ratos 1, 2, 3, 4 não receberam tratamento após implante do tumor C6. Os ratos 5, 6, 7, 8 receberam tratamento com células 9L alogenéicas e lisados com lisado C6 singenéico. Deixou-se que o rato 9 formasse um tumor muito grande antes de ele ser transferido para o grupo de tratamento como nos ratos 5-8.

A Figura 4 é um gráfico traçando a evolução/progressão do tumor em ratos Fisher 344 com tumor singenéico subcutaneamente implantado (9L). Os ratos de controle (Fisher A-1) receberam então injeção de células RG2 singenéicas (Rato 1), células singenéicas 9L (Rato 2), ou apenas o intermédio dos dois (Rato 3). O rato 1 teve o dobro da dosagem de células injetadas, e formou um tumor extremamente grande. Os ratos tratados (Fisher A-2) foram tratados apenas com células C6 alogênicas (Rato 4), células alogênicas C6 e lisado (Rato 5), lisado singenéico 9L e células U87 e LN229 xenogenéicas (Rato 6), células xenogenéicas U87 e LN229 isoladamente (Rato 7). O rato 8 foi tratado com lisado de célula 9L singenéica

isoladamente. A progressão do tumor foi determinada através de medições de volume de tumor (mm^3).

A Figura 5 mostra seções de tumor tiradas a partir do controle A e B. Tratamento de ratos Fisher 344. As seções foram cortadas em uma espessura de 7 µm e coradas com um anticorpo dirigido contra o receptor CD4 de acordo com o protocolo previamente descrito. As setas indicam a localização das células coloridas positivamente para o marcador de superfície CD4. A ampliação de ambas as amostras de controle (A) e de tratamento (B) é de 40X.

A Figura 6 mostra seções de tumor tomadas a partir do controle A e B. Tratamento de ratos Fisher 344. As seções foram cortadas em uma espessura de 7 µm e coradas com um anticorpo dirigido contra o receptor CD8 de acordo com o protocolo previamente descrito. As setas indicam a localização das células coloridas positivamente para o marcador de superfície CD8. A ampliação de ambas as amostras de controle (A) e de tratamento (B) é de 40X.

A Figura 7 mostra seções de tumor tomadas a partir de controle A e B. Tratamento de ratos Fisher 344. As seções foram cortadas em uma espessura de 7 µm e coradas com um anticorpo dirigido contra linfócitos B (CD 20) de acordo com o protocolo previamente descrito. As setas indicam a localização das células coloridas positivamente para o marcador de superfície CD 20 (Figura 5b). A ampliação de ambas as amostras de controle (A) e de tratamento (B) é de 40X.

A Figura 8 mostra seções de tumor tomadas a partir de controle A e B. Tratamento de ratos Fisher 344. As seções foram cortadas em uma espessura de 7 µm e coradas com um anticorpo dirigido contra macrófagos (CD 68) de acordo com o protocolo previamente descrito. As setas

indicam a localização das células coloridas positivamente para o marcador de superfície CD 68. A ampliação de ambas as amostras de controle (A) e de tratamento (B) é de 40X.

A Figura 9 mostra seções de tumor tomadas a partir de controle A e B. Tratamento de ratos Fisher 344. As seções foram cortadas em uma espessura de 7 μm e coradas com um anticorpo dirigido contra marcador de célula Dendrítica (DRC) de acordo com o protocolo previamente descrito. As setas indicam a localização das células coloridas positivamente para o marcador de superfície DRC. A ampliação de ambas as amostras de controle (A) e de tratamento (B) é de 40X.

Descrição da Invenção

A presente invenção utiliza células tumorais alogenéicas ou xenogenéicas e células singenéicas, para aumentar a sensibilização de um sistema imunológico do paciente, para tratar um tumor. As vacinas de célula tumoral da presente invenção compartilham peptídeos similares no câncer/tumor com o mesmo tipo histológico, com diferentes moléculas MHC I.

As vacinas são preparadas com células de tumor alogenéicas ou xenogenéicas, ou lisados de células de tumor alogenéicas ou xenogenéicas. A vacina pode compreender ainda um lisado de uma ou mais células singenéicas.

As células alogenéicas ou xenogenéicas preferivelmente serão células tumorais do mesmo (ou similar) tipo histológico que as células tumorais do paciente a ser tratado. Conseqüentemente, se o paciente tem um glioblastoma cerebral, a vacina será preparada com células de glioblastoma cerebral alogenéicas ou xenogenéicas. Desse modo, os peptídeos compreendidos nas células serão similares e aumentarão a probabilidade da resposta imunológica apropriada ser gerada.

As composições de vacina normalmente compreenderão células/lisados alogenéicos ou xenogenéicos de dois ou mais indivíduos heterozigóticos. Preferivelmente, as composições de vacina são preparadas utilizando células/lisados alogenéicos ou xenogenéicos de pelo menos três indivíduos heterozigóticos.

O termo "alogenéicas" se refere às células tiradas de diferentes indivíduos da mesma espécie.

O termo "xenogenéicas" significa aquelas que são derivadas ou obtidas de um organismo de uma espécie diferente.

O termo "singenéicos" se refere aos membros geneticamente idênticos da mesma espécie. Por exemplo, gêmeos idênticos terão células e tecidos que são singenéicos.

Faz-se referência na descrição aos cânceres/tumores do "mesmo ou similar tipo histológico". Aqueles versados na técnica entenderão que isso se refere aos cânceres do mesmo tipo e os quais exibem o mesmo nível de diferenciação. A classificação pode ser realizada de acordo com o método Elston-Ellis (Simpson et al, J. Clin. Oncol. 2000; 18:2059-2069).

A referência a "câncer" e "tumor" é usada permutavelmente.

A presente invenção provê uma composição farmacêutica compreendendo administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz de células de tumor alogenéicas ou xenogenéicas e opcionalmente de excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

As composições farmacêuticas podem ser para utilização humana ou em animais em medicina humana e veterinária e compreenderão tipicamente um excipiente farmaceuticamente aceitável. Excipientes aceitáveis para

uso terapêutico são conhecidos na técnica farmacêutica, e são descritos, por exemplo, na Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). A escolha do excipiente farmacêutico pode ser selecionada com relação à via pretendida de administração e prática farmacêutica padrão. As composições farmacêuticas podem compreender como - ou em adição a - ao excipiente qualquer aglutinante(s) adequado, lubrificante(s), agente(s) de suspensão, agente(s) de revestimento, agente(s) de solubilização. A referência a "excipiente" inclui diluentes e carreadores.

Conservantes, estabilizantes e corantes podem ser providos na composição farmacêutica. Exemplos de conservantes incluem benzoato de sódio, ácido sórbico e ésteres de ácido p-hidroxibenzóico. Antioxidantes e agentes de suspensão também podem ser usados.

Pode haver diferentes exigências de composição/formulação dependendo dos diferentes sistemas de fornecimento.

Onde apropriado, as composições farmacêuticas podem ser administradas mediante injeção, por via parenteral, por exemplo, de forma intravenosa, intramuscular ou subcutânea. Para administração parenteral, as composições podem ser mais bem utilizadas na forma de uma solução aquosa estéril que pode conter outras substâncias, por exemplo, sais ou monossacarídeos suficientes para tornar a solução isotônica com o sangue.

As vacinas podem ser preparadas a partir das composições da invenção.

A preparação das vacinas que contêm células imunogênicas, como os ingredientes ativos, é conhecida por aqueles versados na técnica. Tipicamente, tais vacinas são preparadas como meios injetáveis, como soluções líquidas ou

suspensões; formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão em, líquido anterior à injeção também podem ser preparadas. A preparação pode também ser emulsificada, ou as células encapsuladas em lipossomas. Os ingredientes imunogênicos ativos são freqüentemente misturados com excipientes que são farmaceuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol, ou semelhantes e combinações dos mesmos.

Além disso, se desejado, a vacina pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes de umedecimento ou emulsificação, agentes de compensação de pH, e/ou adjuvantes que melhoram a eficácia da vacina. Exemplos de adjuvantes que podem ser eficazes incluem, mas não são limitados a: hidróxido de alumínio; N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referido como nor-MDP); N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, referido como MTP-PE), e RIBI, que contém três componentes extraídos de bactérias, lipídio A monofosforil, dimicolato de trehalose e esqueleto da parede celular (MPL+TDM+CWS) em uma emulsão a 2% de esqualeno/Tween 80.

Exemplos adicionais de adjuvantes e outros agentes incluem hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio, sulfato de alumínio potássio (alum), sulfato de berílio, sílica, caulim, carbono, emulsões de água em óleo, emulsões de óleo em água, dipeptídeo de muramil, endotoxina bacteriana, lipídio X, Corynebacterium parvum (Propionobacterium acnes), Bordetella pertussis, poliribonucleotídeos, alginato de sódio, lanolina, lisolecitina, vitamina A, saponina, lipossomas, levamisol,

dextrana-DEAB, copolímeros bloqueados ou outros adjuvantes sintéticos. Tais adjuvantes estão comercialmente disponíveis através de várias fontes, por exemplo, Merck Adjuvant 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) ou Freund's Incomplete Adjuvant and Complete Adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, Michigan).

Tipicamente, são usados adjuvantes tais como Amphigen (óleo em água), Alhydrogel (hidróxido de alumínio), ou uma mistura de Amphigen e Alhydrogel. Apenas hidróxido de alumínio é aprovado para uso humano.

A proporção de imunógeno e de adjuvante pode variar por uma ampla faixa desde que ambos estejam presentes em quantidades efetivas. Por exemplo, hidróxido de alumínio pode estar presente em uma quantidade de aproximadamente 0,5% da mistura de vacina (base $A1_2O_3$). Convenientemente, as vacinas são formuladas para conter uma concentração final de imunógeno na faixa de 0,2 a 200 mg/ml, preferivelmente de 5 a 50 mg/ml, mais preferivelmente de 15 mg/ml.

As vacinas são administradas convencionalmente por via parenteral, mediante injeção, por exemplo, quer subcutaneamente ou intramuscularmente.

Tipicamente, um médico determinará a dosagem efetiva que será mais adequada para um indivíduo e variará com a idade, peso e resposta do paciente específico. As dosagens abaixo são exemplares da média dos casos. Evidentemente, pode haver casos individuais onde faixas de dosagem superiores ou inferiores são merecidas.

As quantidades de cada componente serão evidentes para aqueles versados na técnica. Quantidades adequadas são conforme a seguir:

a) $1x10^6(\pm\ 0,5x10^6)$ de células tumorais alogenéicas com diferente MHC I modificado por DNP.

b) $2x10^6(\pm 1x10^6)$ de células tumorais autólogas modificadas por DNP e irradiadas.

c) $2x10^6(\pm 1x10^6)$ de células de lisado de tumor autólogo (singenéico).

d) $1x10^6(\pm 0,5x10^6)$ de células de lisado de tumor alogenéico.

A invenção será descrita agora adicionalmente com referência às figuras anexadas.

Exemplo

Linhagens de célula e cultura de célula:

As linhagens de célula usadas nesse experimento eram as linhagens de célula de glioma de rato (9L, C6, RG2), e as linhagens de célula de glioma humano (U87, LN229). Todas as linhagens foram obtidas a partir da American Type Tissue Collection (ATTC), e desenvolvidas em meio Dulbecco's da Modified Eagles Medium (DMEM)(GIBCO, Grand Island, NY) suplementadas com 10% de soro de bezerro fetal exterminado a calor (FCS). 5% de penicilina-estreptomicina, e tampão Hepes em uma incubadora umidificada a 37°C em uma atmosfera de CO_2 a 5%.

Preparação de lisado de célula:

$1,0 \times 10^5$ células foram colocadas em um tubo de 5 ml em meio de cultura e centrifugados por 5 minutos em $2,5 \times 10^3$ rpm. O sobrenadante foi descartado e 150 µl de água destilada estéril foram adicionados ao tubo. A solução de água/célula foi bem misturada e transferida para um tubo Eppendorf de 1,0 ml e centrifugada a $1,0 \times 10^4$ por 10 minutos. O sobrenadante não foi descartado e essa solução inteira foi usada para injeções de lisado de célula.

Anticorpos e Imunohistoquímica:

As amostras de tumor tiradas dos ratos Fisher 344 foram congeladas em Composto de Temperatura Ótima (OTC) e

foram cortadas em seções de 7 μm, sobre um criostato. Essas seções foram secas, fixadas com acetona, e bem lavadas com PBS por 1-2 minutos. Um bloqueio foi feito utilizando-se o soro imunológico das espécies das quais o anticorpo secundário foi tirado. Lâminas foram lavadas completamente outra vez e então coradas com anticorpo primário contra CD-4, CD-57 (Nora Castro Lab Ltd., Burlingame, CA), CD-8, células de retículo dendríticas (DRC) (Dako Corportion, Carpenteria, CA) CD-20, CD-68 (Ventana, Tucson, AZ). As lâminas foram lavadas outra vez e um anticorpo biotinilado secundário foi adicionado. Eles foram enxaguados outra vez e colocados em uma solução de peroxidase de hidrogênio a 3% e 9 partes de azeto de sódio a 1% em PBS. As lâminas foram então enxaguadas e ABC foi adicionado por 30-40 minutos. Elas foram lavadas com PBS e reveladas utilizando tetrahidrocloreto de diaminobenzidina e contracoradas. Fotos de todas as lâminas foram tiradas mediante microscopia de luz.

Análise de crescimento do tumor:

Todos os tumores foram encontrados através de inspeção visual e apalpação. Quando descobertos, a área em torno do tumor foi exposta adicionalmente mediante raspagem do pêlo com um barbeador elétrico. No momento da injeção, o tamanho do tumor foi medido em milímetros utilizando compassos de calibre Vernier. As medições foram feitas na direção craniana/caudal (comprimento), superior/inferior (altura), e medial/lateral (largura). O volume do tumor foi calculado por comprimento x largura x altura x 0,5.

Estudos in-vivo

Todos os protocolos de animais foram aprovados pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) da University of Southern California. Todos os ratos foram mantidos em um ambiente livre de patógeno. Para o

experimento, utilizamos ratos Sprague Dawley e Fisher 344. Todos os ratos eram machos e entre idades de 4-6 semanas. Os ratos foram obtidos através da Harlan (Indianapolis, Indiana). No modelo de tumor subcutâneo, C6 e 9L foram coletados utilizando apenas DMEM para lavar os mesmos dos frascos de cultura de tecido. As seringas foram preparadas contendo 100.000-150.000 células suspensas em 150 µl.

Ratos Sprague Dawley (SD) foram divididos em dois grupos (Figura 1). SD-A (9 ratos) foram implantados com o glioma C6, uma linhagem de célula de glioma semelhante à singenéica para ratos SD. SD-B (3 ratos) foram injetados com linhagem de célula alogenéica 9L. Quando um tumor de flanco palpável se desenvolveu nos ratos do Grupo A, eles foram adicionalmente divididos em dois grupos. SD-A1 (ratos do grupo de controle-5) não receberam injeções. SD-A2 (ratos do grupo de tratamento-4) foram injetados com uma combinação de células 9L alogenéicas, lisado 9L alogenéico, e lisado 6C singenéico. No 27° dia, quatro dos cinco SD-A1 foram sacrificados. Nesse momento, um dos ratos de controle, rato 9, começou a receber o mesmo protocolo de tratamento que os ratos SD-A2. A combinação de células alogenéicas com lisados singenéicos e alogenéicos foi usada para melhorar a resposta imunológica. Os ratos SD-B, que nunca formaram tumores, foram testados em relação à memória imunológica mediante provocação dos mesmos com células C6 singenéicas (100.000 células), e outro reforço de 500.000 células C6 10 dias depois, e verificados em termos de formação de um tumor de flanco.

Os ratos Fisher também foram divididos em dois grupos (Figura 2). Fisher-A (8 ratos) foram implantados com a linhagem de célula 9L singenéica. Fisher-B (3 ratos) foram injetados com a linhagem de célula C6 alogenéica. Quando um tumor de flanco palpável se desenvolveu nos ratos

Fisher-A, eles foram adicionalmente subdivididos em dois grupos. Fisher A-1 (ratos do grupo de controle-3) recebeu injeções de células 9L singenéicas, células RG2 singenéicas, ou apenas o meio. Fisher A-2 (ratos do grupo de tratamento-5) recebeu a combinação de células C6 alogenéicas, lisado de células C6 alogenéicas, ou células xenogenéicas U87 e LN229 (vide Figura 2). Os ratos Fisher B, que inicialmente formaram tumores que foram subseqüentemente rejeitados, foram testados em relação à memória imunológica mediante desafio dos mesmos com um coquetel combinado de células 9L singenéicas e lisado, e o desenvolvimento de tumor foi analisado nos mesmos.

Colhendo tecido subcutâneo:

Todos os animais experimentais foram submetidos à eutanásia com uma dose excessiva de pentobarbital. Todos os tumores foram removidos e dissecados sob condições estéreis, cortados em 4 pedaços e armazenados a -80°C. Todas as seções de tumor foram cortadas em 7 μm e coradas mediante imunohistoquímica.

Resultados

A maioria dos estudos de glioblastoma emprega pequenos modelos de animais de laboratório. Os modelos hospedeiros imunes competentes mais freqüentemente usados incluem duas cepas diferentes de rato, os ratos[1] Sprague Dawley e Fisher 344. C6 é uma linhagem de célula similar à singenéica para os ratos SD, enquanto que as linhagens de célula 9L e RG2 são singenéicas para os ratos[1,11] Fisher 344.

Três dos ratos Fisher foram injetados com uma linhagem de célula C6 (Fisher B). Embora tumores bem circunscritos se formassem, eles foram subseqüentemente rejeitados em 40 dias. Um procedimento similar foi usado para tratar 3 ratos SD com uma linhagem de célula 9L (SD-

B). Cada um dos ratos SD rejeitou o tumor 9L sem crescimento de tumor visível ou palpável. Os ratos SD-A foram injetados individualmente com a linhagem de célula C6. Todos esses ratos desenvolveram tumores visíveis dentro de 10 dias. Nesse ponto, 5 ratos foram mantidos como grupo de controle (SD-A1) enquanto que os 4 ratos restantes foram colocados nos grupos de tratamento (SD-A2). No 27° dia os ratos 1-4 foram sacrificados e foi feita uma tentativa de "resgatar" o rato 9. Nesse momento, o rato 9 entrou no grupo de tratamento e começou a receber as mesmas injeções que o grupo SD-A2.

Analisamos o crescimento do tumor e a resposta ao tratamento nos 9 ratos SD-A (Figura 3). Nos ratos SD-A2 tratados (ratos 5-8), ratos individuais receberam diferentes combinações de lisados alogenéicos e singenéicos, assim como células. Por exemplo, após 5 dias, o rato número 5 tinha um tumor de flanco palpável e recebeu uma injeção contralateral ao tumor com lisados 9L alogenéicos (50.000), lisados C6 singenéicos (50.000), e células alogenéicas 9L (50.000). Cinco dias após injeção, o tumor desapareceu. Todos os ratos 6, 7, 8 (ratos SD-A2) tinham tumores visíveis 18 dias após a injeção. Nesse momento, cada um deles recebeu uma injeção com 50.000 células de lisado 9L alogenéicas acrescidas de 50.000 células de lisado C6 singenéicas e 50.000 células alogenéicas 9L. Essas injeções foram repetidas no 23° e 28° dias. O rato 6 recebeu um tratamento adicional no 33° dia, quinze dias após o início do tratamento. Os ratos não tratados (SD-A1, ratos 1-4) foram sacrificados 27 dias após a injeção devido ao tamanho do tumor. Em comparação com a progressão do tumor nos ratos não tratados (ratos 1-4), os ratos 5, 6, 7, 8 (SD-A2) tinham completo desaparecimento de seus tumores. O rato número 9 começou o experimento no

grupo não tratado, e então foi resgatado dias após o sacrifício dos ratos 1-4. O rato 9 recebeu injeções a cada 4 dias com lisados 9L alogenéicos (50.000) acrescidos de lisados singenéicos C6 (50.000) e células alogenéicas 9L (50.000) e foi sacrificado para análise histológica no 55° dia, quando o tamanho do tumor era de 11% do momento inicial do resgate.

Vinte dias após, os ratos SD "tratados", sem tumor mensurável, foram re-injetados no flanco posterior contralateral com a mesma linhagem de célula de tumor C6 singenéica que causou o tumor original, utilizando 100.000 células primeiramente e cinco vezes esse número de células (500.000 células) 10 dias após. Os ratos foram monitorados a cada 3 dias em relação a qualquer sinal de crescimento visual ou palpável do tumor. Em 160 dias, os ratos SD permaneceram livres de tumor.

A Figura 4 mostra o crescimento de tumor e a resposta ao tratamento de 8 ratos Fisher (Fisher A) implantados com células 9L. Os ratos 1, 2 e 3 (Fisher A-1) receberam injeções de flanco contralateral no 20° dia com RG2 singenéica (100.000 células; rato 1) e 9L (100.000 células; rato 2), ou apenas o intermediário dos dois (rato 3). Não houve diminuição no tamanho do tumor, e o RG2 até mesmo pareceu ter um efeito sinergístico no rato 1. Os ratos 4-8 (Fisher A-2), injetados com células alogenéicas C6/lisado alogenéico C6, lisados singenéicos 9L, ou células xenogenéicas U87 e LN229, pareceram todos ter uma redução no tamanho de tumor.

Todos os ratos Fisher 344 foram sacrificados no 40° dia quando eles desenvolveram paralisia das patas e incapacidade de locomoção. Os tumores a partir de cada um desses ratos foram removidos e cortados para coloração. Descobrimos que os tumores do nosso tratamento tinham

números significativamente maiores de células CD4, CD8, linfócito D(CD20), macrófago (CD68), e células dendríticas do que os tumores de controle (Figuras 3-7).

Para determinar o papel da memória imunológica, examinamos se os ratos SD e Fisher 344 inicialmente injetados com a linhagem de célula alogenéica seriam capazes de aceitar uma linhagem de célula singenéica. Os ratos Fisher 344 que rejeitaram o C6 (Fisher B) após 40 dias foram re-injetados com células 9L singenéicas; os ratos SD (SD-B) que inicialmente rejeitaram a linhagem de célula 9L foram injetados com células C6. Todas as injeções foram feitas no flanco contralateral em relação à injeção original e com 500.000 células. No rato SD, nenhum tumor visual ou palpável se desenvolveu. No rato Fisher, um pequeno crescimento (<1cm x <1cm x 1cm) se desenvolveu no local da injeção. Esse crescimento foi perceptível apenas através de apalpação, e se tornou progressivamente menor e completamente não-detectável em 10 dias. Ambas as cepas de ratos permaneceu sem tumor em 150 dias.

Esses resultados sugerem que a injeção subcutânea repetida de células alogenéicas (ou xenogenéicas), lisados de células alogenéicas e lisados de células singenéicas, conduzem à redução do tamanho do tumor mediante aumento da sensibilização imunológica.

Todas as publicações referidas na descrição são aqui incorporadas como referência.

Referências

1. Beutler AS, Banck MS. Wedekind a et al: Tumour gene therapy made easy: allogeneic major histocompatibility complex in the C6 rat glioma model. Hum Gene Ther 10:95-101. 1999
2. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, et al: Structure

of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. Nature 329:506-512, 1987

3. Boudreau CR, Yang I, Liau LM: GNomas: advances in molecular analysis and characterization. Surg Neurol 64:286-294; discussion 294. 2005

4. Bowles AP. Jr., Perkins F: Long-term remission of malignant brain tumours after intracranial infection: a report of four cases. Neurosurgery 44:636-642: discussion 642-633. 1999

5. Budd RG: Activation-induced cell death. Curr Opin Immunol 13:356-362, 2001

6. Bystryn JC, Rigel D, Friedman RJ, et al: Prognostic significance of hypopigmentatson in malignant melanoma. Arch Dermatoi 123:1053-1055, 1987

7. DeHaan C, Habibi-Nazhad B, Yan F, et al: Mutation in mitochondrial complex I ND6 subunit is associated with defective response to hypoxia in human glioma cells. Mol Cancer 3:19, 2004

8. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. First of two parts. N Engl J Med 343:37-49, 2000

9. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. Second of two parts. N Engi J Med 343:108-117,2000

10. Duquesnoy Ri, Trucco *M:* Genetic basis of cell surface polymorphisms encoded by the major histocompatibility complex in humans, CS Rev Immunol 8:103-145, 1988

11. Ehtesham M. Kabos P. Gutierrez MA, et al: Intratumoural dendritic cell vaccination elicits potent tumouricidal immunity against malignant glioma in rats. J Immunother 26:107-116, 2003

12. Garcia-Lora A, Algarra 1, Garrido F: MHC class I antigens, immune surveillance, and tumour immune escape. J Cell Physiol 195:346-355, 2003

13. GuY, Wang C, Roifman CM, et al: Role of MHC class I in

immune surveillance of mitochondrial DNA integrity. J Immunol 170:3603-3607, 2003

14. Hansen MH, Ostenstad B, Sioud M: Antigen-specific SgG antibodies in stage IV long-time survival breast cancer patients. Mol Med 7:230-239, 2001

15. Jager D. Jager F, Knuth A: immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer, J Clin Pathol 54:669-674, 2001

16. Janeway C, National Center for Biotechnology Information (U.S.): immunobiology S the immune system in health and disease, ed 5th. New York: Garland Pub. 2001

17. Ljunggren HG, Karre K: In search of the missing self: MHC molecules and NK cell recognition. Immunol Today 11:237-244. 1990

18. Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al: Receptors for HLA class-1 molecules in human natural killer cells, Annu Rev Immunol 14:619-648, 1996

19. Palo J, Duchesne J. Wikstrom J: Malignant diseases among patients with multiple sclerosis. J Neural 216:217-222, 1977

20. Papachristou DN, Fortner JG: Effect of postoperative wound infection on the course of stage II melanoma. Cancer 43:1106-1111, 1979

21. Parkin J, Cohen B: An overview of the immune system. Lancet 357:1777-1789. 2001

22. Pizzo PA, Commers J, Cotton D, et al: Approaching the controversies in antibacterial management of cancer patients. Am J Med 76:436-449, 1984

23. Shiina T, Inoko H, Kulski JK: An update of the HLA genomic region, focus information and disease associations: 2004, Tissue Antigens 64:631-649, 2004

24. Sioud M: How does autoimmunity cause tumour regression? A potential mechanism involving cross-reaction through epitope mimicry. Mol Med 8:115-119, 2002

25. Vigouroux 5, Yvon F, Biagi F, et at: Antigen-induced regulatory T cells. Blood 104:26-33, 2004

26. von Mensdorff-Pouilly 5, Gourevitch MM, Kenemans P. et al: Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours. Eur J Cancer 32A: 1325-1331, 1996.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para tratamento ou prevenção de um tumor compreendendo

(i) células tumorais alogenéicas ou xenogenéicas; e

(ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente um lisado de uma célula singenéica.

3. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que (i) é um lisado.

4. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, compreendendo adicionalmente um lisado de uma célula alogenéica ou xenogenéica.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, em que as células de (i) são células derivadas do cérebro.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 5, quando pendente em relação à reivindicação 2, em que as células singenéicas são células derivadas do cérebro.

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, em que as células alogenéicas ou xenogenéicas são derivadas dos tumores de dois ou mais indivíduos heterozigóticos.

8. Uso de células tumorais alogenéicas ou xenogenéicas na fabricação de um medicamento para o tratamento de um tumor em um paciente.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, em que o tumor do paciente é do mesmo tipo histológico que o tumor das células alogenéicas ou xenogenéicas.

10. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 ou 9, em que o medicamento compreende adicionalmente células singenéicas ou um lisado de células

singenéicas.

11. Uso, conforme qualquer uma das reivindicações 5, 6 ou 7, em que as células tumorais alogenéicas são providas como lisados.

12. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8, 9, 10 ou 11, em que as células tumorais alogenéicas ou xenogenéicas são derivadas de tumores de dois ou mais indivíduos heterozigóticos.

13. Método para tratamento ou prevenção de um tumor, compreendendo administrar a um paciente uma composição conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7.

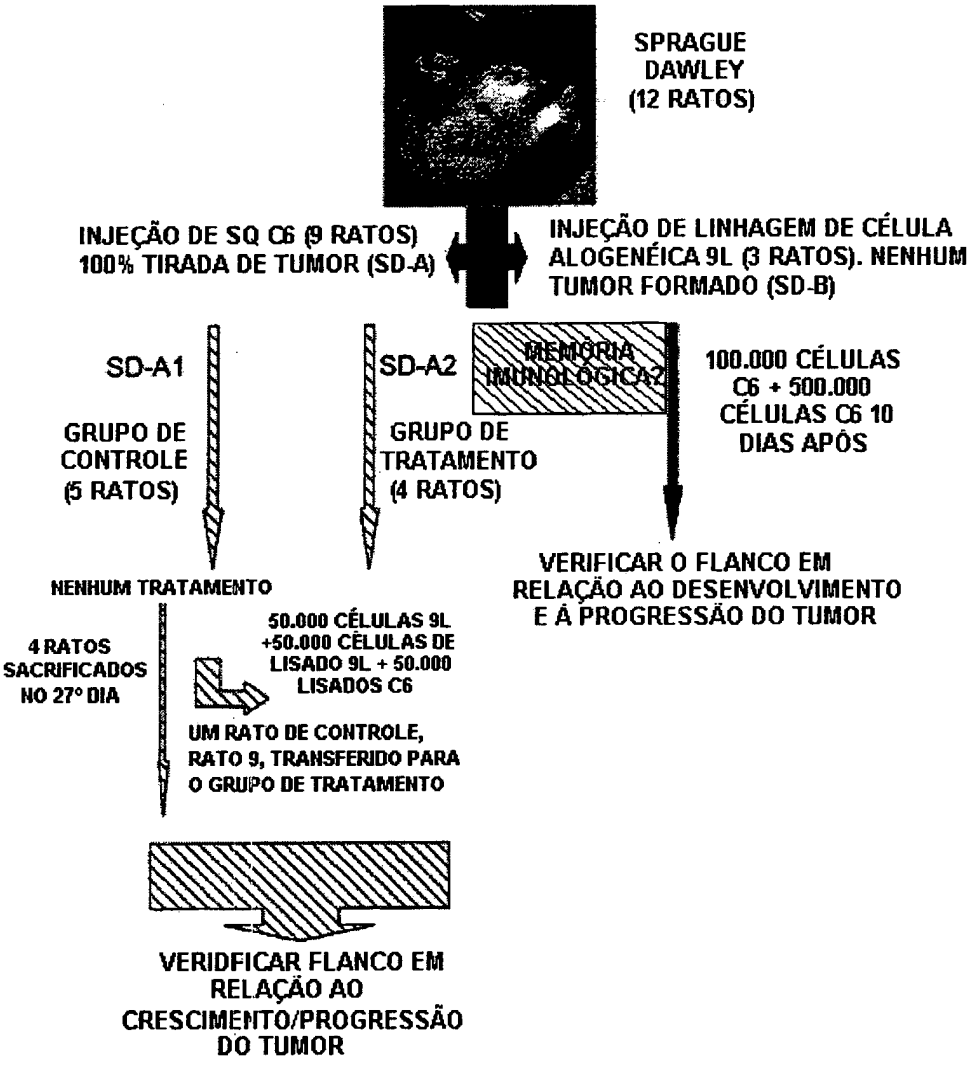
SPRAGUE DAWLEY (12 RATOS)
INJEÇÃO DE SQ C6 (9 RATOS) 100% TIRADA DE TUMOR (SD-A)
INJEÇÃO DE LINHAGEM DE CÉLULA ALOGENÉICA 9L (3 RATOS). NENHUM TUMOR FORMADO (SD-B)
SD-A1
GRUPO DE CONTROLE (5 RATOS)
SD-A2
MEMÓRIA IMUNOLÓGICA2
GRUPO DE TRATAMENTO (4 RATOS)
100.000 CÉLULAS C6 + 500.000 CÉLULAS C6 10 DIAS APÓS
VERIFICAR O FLANCO EM RELAÇÃO AO DESENVOLVIMENTO E À PROGRESSÃO DO TUMOR
NENHUM TRATAMENTO
4 RATOS SACRIFICADOS NO 27° DIA
50.000 CÉLULAS 9L +50.000 CÉLULAS DE LISADO 9L + 50.000 LISADOS C6
UM RATO DE CONTROLE, RATO 9, TRANSFERIDO PARA O GRUPO DE TRATAMENTO
VERIDFICAR FLANCO EM RELAÇÃO AO CRESCIMENTO/PROGRESSÃO DO TUMOR

FIGURA 1



FISHER 344
(11 RATOS)

INJEÇÃO DE TUMOR SINGENÉICO SQ, 9L (8 RATOS). 100% TIRADA DE TUMOR (FISHER A)

INJEÇÃO DE LINHAGEM DE CÉLULA ALOGENÉICA C6 (3 RATOS). TUMOR SQ ESPONTANEAMENTE REJEITADO (FISHER B)

FISHER-A1

FISHER-A2

MEMÓRIA IMUNOLÓGICA?

100.000 CÉLULAS 9L + 500.000 CÉLULAS 9L 10 DIAS APÓS

RATO 1: CÉLULAS RG2
RATO 2: CÉLULAS 9L
RATO 3: APENAS INTERMEDIÁRIO

CÉLULAS SINGENÉICAS E CONTROLE INTERMEDIÁRIO

RATO 4:150.000 CÉLULAS C6
RATO 5: 100.000 CÉLULAS C6 + 100.000 LISADOS DE CÉLULA C6
RATO 8: 100.000 LISADOS DE CÉLULA 9L

CÉLULAS/LISADOS ALOGENÉICOS E LISADOS SINGENÉICOS

RATO 6: 100.000 CÉLULAS DE LISADO 9L+50.000 CÉLULAS U87 +50.000 CÉLULAS LN229
RATO 7: 50.000 CÉLULAS LN229 +50.000 CÉLULAS U87

CÉLULAS XENOGENÉICAS

VERIFICAR O FLANCO EM RELAÇÃO AO CRESCIMENTO/PROGRESSÃO DO TUMOR

VERIFICAR O FLANCO EM RELAÇÃO AO CRESCIMENTO/PROGRESSÃO DO TUMOR

FIGURA 2

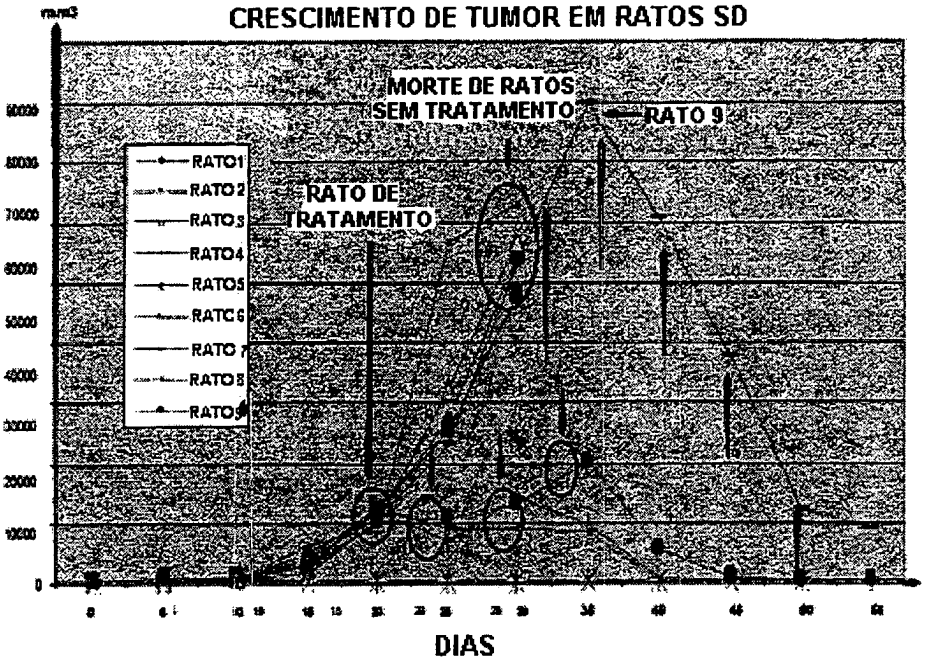
CRESCIMENTO DE TUMOR EM RATOS SD
MORTE DE RATOS SEM TRATAMENTO
RATO 9
RATO DE TRATAMENTO
RATO1
RATO2
RATO3
RATO4
RATO5
RATO6
RATO7
RATO8
RATO9
DIAS

FIGURA 3

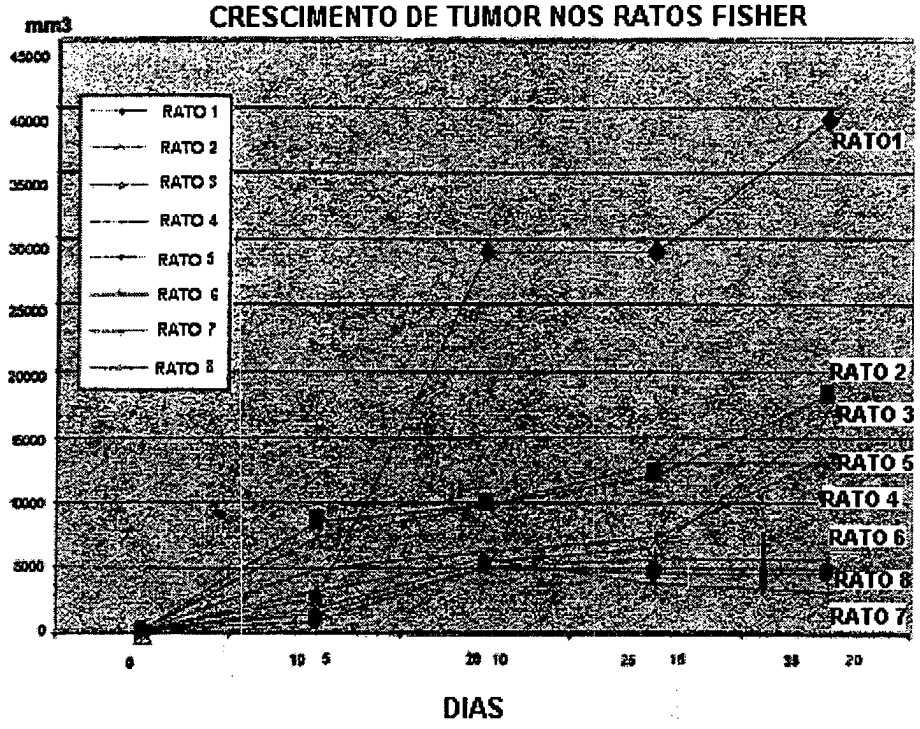
CRESCIMENTO DE TUMOR NOS RATOS FISHER
mm3
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
RATO 1
RATO 2
RATO 3
RATO 4
RATO 5
RATO 6
RATO 7
RATO 8
RATO1
RATO 2
RATO 3
RATO 5
RATO 4
RATO 6
RATO 8
RATO 7
0
10 5
20 10
25 15
30 20
DIAS

FIGURA 4

5.)

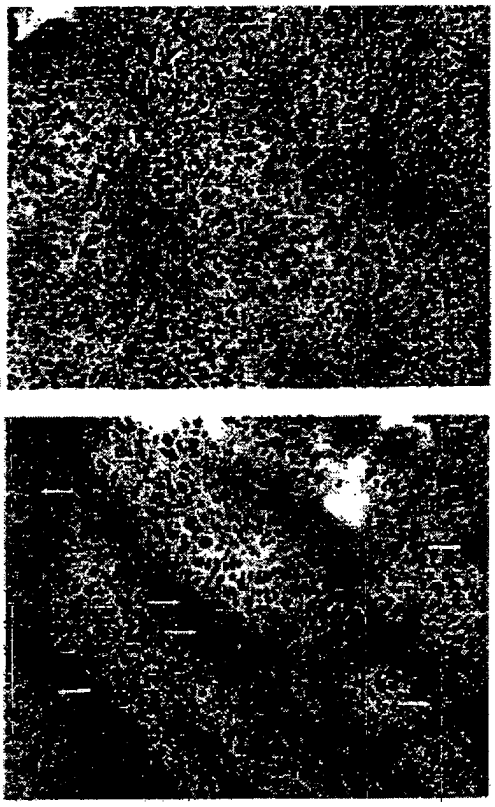

FIGURA 5

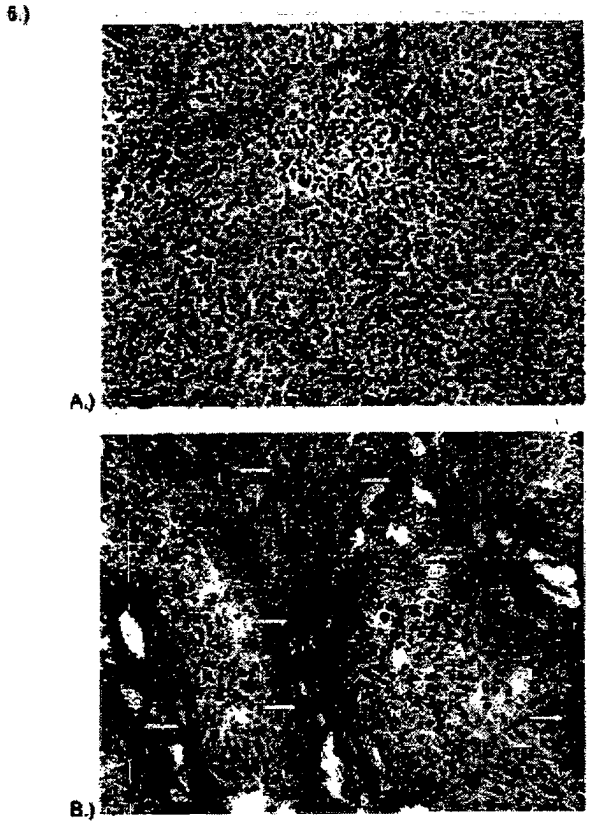

FIGURA 6

7.)

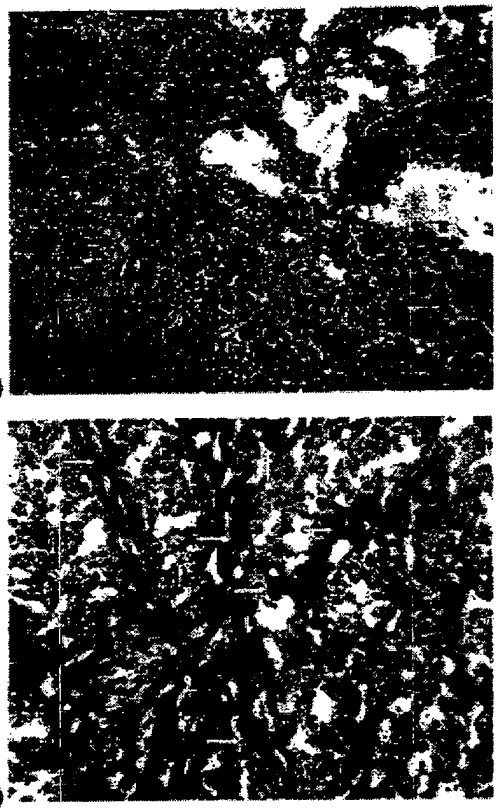

FIGURA 7

8.)

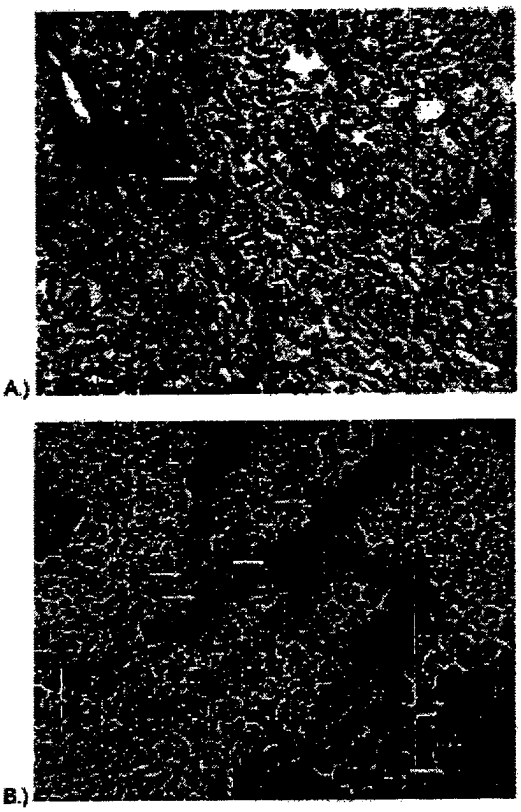

FIGURA 8

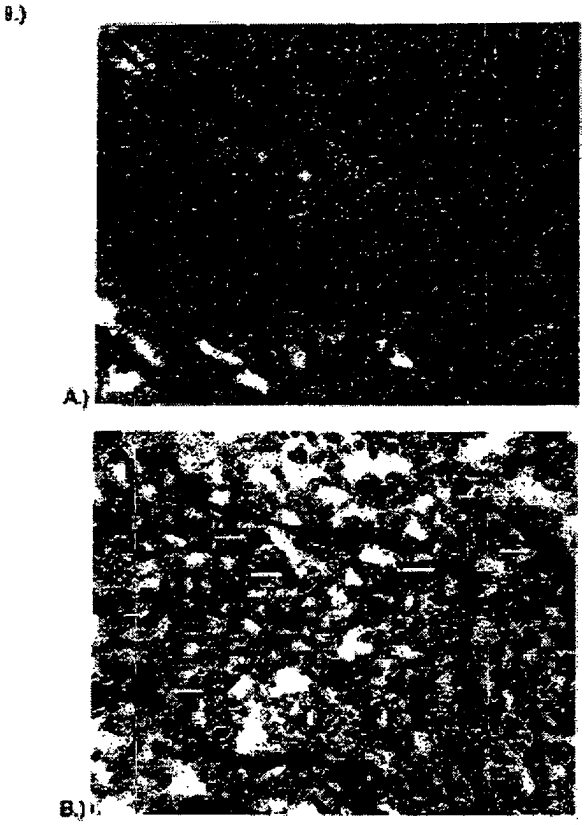

FIGURA 9

PI0707247-3

RESUMO

VACINA PARA TUMOR COMPREENDENDO CÉLULAS TUMORAIS ALOGENÉICAS OU XENOGENÉICAS

A presente invenção provê uma composição para o tratamento de um tumor, compreendendo: (i) células tumorais alogenéicas ou xenogenéicas; e (ii) um excipiente farmaceuticamente aceitável. Se dois ou mais indivíduos heterozigóticos têm o mesmo câncer/tumor do mesmo tipo histológico ou de tipo histológico similar, então o transplante das células/tecido de tumor/câncer a partir de um indivíduo para outro não apenas induzirá a rejeição do tecido/câncer transplantado, mas também aumentará a sensibilização imunológica do sistema imunológico aos peptídeos compartilhados entre os tumores/cânceres e outros tumores possuindo peptídeos similares.