

(11) Número de Publicação: **PT 1699480 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/00 (2011.01) **C12N 5/09** (2011.01)

C12N 5/10 (2011.01) **A61P 35/00** (2011.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.04.20	(73) Titular(es): MOLOGEN AG	
(30) Prioridade(s): 2003.12.30 WO PCT/DE03/04299	FABECKSTRASSE 30 14195 BERLIN	DE
(43) Data de publicação do pedido: 2006.09.13	(72) Inventor(es): BURGHARDT WITTIG	DE
(45) Data e BPI da concessão: 2011.06.15 165/2011	MANUEL SCHMIDT	DE
	TOMISLAV DOBRIC	DE
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA	
	AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **AGENTE TERAPÊUTICO ANTI-TUMORAL ALOGÉNICO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE A UMA VACINA QUE SE BASEIA EM CÉLULAS TUMORAIS ALOGÉNICAS E É USADA PARA O TRATAMENTO TERAPÊUTICO DE DOENÇAS TUMORAIS. TAMBÉM É REVELADO UM PROCEDIMENTO PARA A PRODUÇÃO DE TAL VACINA, ASSIM COMO CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS TRANSFECTADAS USADAS COMO VACINA.

RESUMO**"Agente terapêutico anti-tumoral alogénico"**

A invenção refere-se a uma vacina que se baseia em células tumorais alogénicas e é usada para o tratamento terapêutico de doenças tumorais. Também é revelado um procedimento para a produção de tal vacina, assim como células tumorais humanas transfectadas usadas como vacina.

DESCRIÇÃO

"Agente terapêutico anti-tumoral alogénico"

A invenção refere-se a uma vacina baseada em células tumorais alogénicas para o tratamento terapêutico de doenças tumorais, assim como a um procedimento para a preparação de tais vacinas, além de células tumorais humanas transfectadas para serem usadas como vacina.

Além dos procedimentos de tratamento convencionais de doenças cancerígenas, tais como a radioterapia e a quimioterapia, que representam desde os anos 50 a única opção de tratamento para doenças tumorais progressivas e muito dispersas, a imunoterapia parece ser, no caso dos tumores metastásicos, um novo enfoque prometedora.

A imunoterapia tem por objectivo reforçar a resposta imune natural face à doença tumoral, mediante modificações de engenharia genética. Por isso, a "atenção" do sistema imunitário é influenciada face a células cancerígenas e, com isso, a reacção de defesa é influenciada, combatendo o tumor do próprio corpo.

Devido ao facto de algumas doenças malignas como, por exemplo, o carcinoma progressivo das células renais, parecerem relativamente sensíveis aos tratamentos imunoterapêuticos, a terapia sistémica com citocinas como a IL-2 e a IFN-alfa implica, por exemplo, efeitos

secundários consideráveis, de forma que foram desenvolvidos outros protocolos imunoterapêuticos.

A maioria dos estudos clínicos conduz hoje em dia à extirpação do tumor, após uma transfecção ex-vivo das células tumorais com um gene terapêutico, irradiação da população de células tumorais e subsequente reimplantação das múltiplas células tumorais modificadas. Mediante esta vacinação com células tumorais pode-se aumentar a resposta anti-tumoral em função do gene terapêutico transfectado em diferente medida.

Com base nesta focagem, assim como nos resultados experimentais em animais, foi efectuada uma série de estudos clínicos de fase I e II (Finke e col., 1997; Witting e col., 2001).

No entanto, os primeiros resultados com genes terapêuticos singulares transfectados apresentaram, além de uma boa tolerância à terapia, remissões parciais ou completas apenas em alguns casos.

Num modelo de rato de carcinoma do cólon a transferência genética de CD40UCD154 pôde gerar um esvaziamento de citocinas, uma erradicação do tumor e uma imunidade (Sun e col, 2000).

Os inventores do presente pedido puderam demonstrar que a transferência de plasmídeos de expressão para interleucina 7 humana (IL-7) em células tumorais conduz a uma sensibilidade elevada contra células efectoras do sistema imunitário, especialmente em transferência

autóloga (Finke e col., 1997, Cancer Gene Ther, 4:260-268). Os inventores puderam igualmente demonstrar que, após a transfecção de dois genes terapêuticos (IL-7, GM-CSF) em células tumorais autólogas se vislumbrava uma reacção clínica significativa em metade dos pacientes tratados (documento WO 02/060476).

Pelo documento US 5.681.562 sabe-se que a injeção de pacientes com determinadas células de doenças cancerígenas que foram transfectadas com ADN ou ARN codifica citocina. O sistema imunitário do paciente deve ser estimulado contra antigénios de tumores. No documento de patente descrevem-se ensaios em que foram transfectados fibroblastos de ratos com vectores retrovirais, que codificam IL-2. Igualmente se descreve o ensaio in vivo em que se ensaiou a actividade do tratamento num modelo de carcinoma de intestino grosso murino. Os ratos cujos fibroblastos transfectados foram injectados desenvolveram, em comparação com os grupos de controlo, um crescimento de tumor claramente prolongado. No ensaio in vitro com fibroblastos humanos transfectados foi possível determinar igualmente um nível de expressão de IL-2 claramente elevado. Além dos dados clínicos errados que surgem com o modelo de rato, os vectores virais usados como vector de expressão são considerados como pouco vantajosos. Mediante a instabilidade da estirpe de inoculação atenuada não se exclui uma reconversão numa estirpe virulenta e, além disso, os

próprios componentes virais podem actuar, o que conduz a uma diminuição da sua actividade mediante o sistema imunitário do paciente. Estes riscos verificam-se em nível considerável com o uso frequente como vector de terapia genética.

Diversas publicações mostram que os melhores resultados terapêuticos são conseguidos mediante uma combinação de genes de citocina com o factor de crescimento GM-CSF (Paillard, 1998, Hum. Gene Ther. 9: 2547-2458; Schadendorf e col., 1995, J. Mol. Med. 73: 473-477). O significado de GM-CSF demonstrou em inoculações com antigénio de tumor também no aumento da resposta anti-tumoral clínica e imunológica em vacinações de péptido (Jäger e col., 1996). A este respeito pode-se relevar que a activação de células dendríticas apresentadoras de antigénio desempenha um papel essencial, assim como a estimulação de uma população de células efectoras.

Até ao momento não está bem claro quais os genes de citocina que, em combinação numa composição imunogénica com GM-CSF, conseguem a resposta imune anti-tumoral mais efectiva.

Em experiências com ratos demonstrou-se que uma inoculação com construções de expressão que codificam IL-7 provoca um efeito anti-tumoral (Miller e col., 1993, Blood 18: 3686-3694; Murphy e col., 1993, J. Clin. Invest. 92: 1918-1924). Sabe-se igualmente que a

incubação de CTL com IL-7 ou células transfectadas com IL-7 conduz à regressão do tumor nos ratos (Jicha e col., 1991; Hock e col., 1993) e se induz a transfecção com IL-7 e infiltrações de células T B7.1/CD80 CD28+CD25+ e imunidade (Cayeux e col., 1995).

Até agora não houve qualquer êxito terapêutico, nem sequer no modelo de rato.

Observou-se adicionalmente em ensaios para a estimulação de respostas imunes mediante terapia genética com ADN plasmídeo ou sequências de oligonucleótidos que determinadas sequências de ácido nucleico, que apresentam o motivo CpG (CpG = dinucleótido citosina-guanosina não metilado), podem ter um enorme efeito imunoestimulatório (Schmidt-Wolf e col., 1989, J. Immunol. Methods 125: 185-189). As sequências de ácido nucleico imunoestimulatórias (ISS) já foram usadas há muito tempo por este motivo como adjuvantes em protocolos de imunização baseados em ADN face a agentes patogénicos infecciosos (Sato e col., 1996, Science 273: 352-354). Em experiências com ratos demonstrou-se que a administração de sequências de ADN ricas em CpG conduz a uma forte activação das células B e estimula a expressão de determinadas citocinas como, por exemplo, de IL-6 e GM-CSF. Pôde-se igualmente demonstrar no modelo de rato que uma imunização com CpG-oligodesoxirribonucleótidos (ODN) juntamente com uma proteína de fusão pôde impedir, três dias antes da inoculação do tumor, um crescimento do tumor nos ratos

(Liu e col., 1998). A indicação de consumo e preparação de ISS que contém gene Cp imunoestimulatório está incluída no documento WO 98/18810.

Pelo documento WO 00/04918 conhece-se a transfecção de células tumores com genes que codificam, por exemplo, interferão-gama e GM-CSF. Como vectores de expressão usam-se plasmídeos. Este documento apresenta um conceito: o tratamento de doenças tumorais por imunoterapia. Não são apresentados dados ou resultados clínicos in-vivo ou in-vitro de grande valor informativo que confirmem a actividade das vacinas reivindicadas. É de realçar que estes vectores baseados em plasmídeo são adequados para aplicação na terapia genética humana sem restrição, dado que estes portam, além das sequências terapêuticas, unidades de função genética, que são necessárias para a sua replicação. Além disso, apresentam genes resistentes a antibióticos que são imprescindíveis para a sua selecção. Efectua-se, por isso, uma expressão terapêutica duradoura de proteínas de mamíferos ou bactérias indesejáveis.

Apesar de investigações ao longo de muitos anos e das respectivas preparações, até agora não foi encontrado o desenvolvimento de uma terapia baseada em imunização efectiva contra doenças tumorais, mediante a aplicação de substâncias imunogénicas.

É objectivo da invenção proporcionar uma vacina como medicamento para o tratamento de doenças que se

verificam em relação com citocinas como, por exemplo, doenças cancerígenas, que possa ser usada específica e eficientemente e que, de forma particular, conduza à indução de respostas imunes específicas do tumor. Além disso, deve-se preparar um procedimento correspondente para a preparação de uma vacina deste tipo.

Este objectivo é conseguido com as características das reivindicações independentes.

No sentido da invenção significam:

allogénico de um indivíduo geneticamente diferente da mesma espécie (espécie) em contraposição a "autólogo" (células do próprio corpo)

APC células apresentadoras de antigénio

B7.1/CD80 cluster de diferenciação 80

CD40L/CD154 cluster de diferenciação 40 ligando

CD células dendríticas

DSLIM oligodeoxirribonucleótidos imunomoduladores de ferradura dupla

GM-CSF factor estimulante de colónia de granulócitos e macrófagos

IL-7 interleucina-7

ISS sequências de ácido nucleico imunoestimulatório

MIDGE vector de expressão genética definido imunologicamente minimalista (MIDGE® é uma marca comercial da Mologen AG)

ODN oligodesoxirribonucleótido

TAA antigénio associado a tumor

Em seguida deve-se entender uma série de termos gerais como segue:

Células transfectadas no sentido da invenção são células tumorais alogénicas humanas que foram tratadas ex-vivo com vectores de expressão codificante em correspondência com a invenção e que expressam, em consequência deste tratamento, as sequências do factor de citocina e co-estimulatório codificado e são usadas como tratamento imunoterapêutico em doenças tumorais.

No que respeita à presente invenção, o termo factor co-estimulatório e/ou citocina refere-se tanto a factores co-estimulatórios e/ou citocinas de origem natural como a todas as modificações, mutantes ou derivados de factores co-estimulatórios e/ou citocinas, factores co-estimulatórios e/ou citocinas preparados mediante técnicas de recombinação, as modificações de aminoácidos tais como inversões, deleções, inserções, transposições e semelhantes, enquanto estiver presente pelo menos uma parte das funções essenciais dos factores co-estimulatórios do tipo selvagem e/ou citocinas. Tais factores co-estimulatórios e/ou citocinas também podem compreender aminoácidos não habituais e/ou modificações como uma alquilação, oxidação, modificação com tiol, desnaturalização e oligomerização e semelhantes. No que respeita à presente invenção, os factores co-estimulatórios e/ou citocinas podem ser particularmente proteínas, péptidos e/ou proteínas de fusão que contêm,

além de outras proteínas, péptidos ou partes dos mesmos factores co-estimulatórios e/ou citocinas de forma total ou parcial. Numa forma de execução adicional da presente invenção os factores co-estimulatórios e/ou citocinas são formas recortadas de factores co-estimulatórios e/ou citocinas de origem natural.

Todos os factores co-estimulatórios anteriormente referidos, que são adequados para a modulação da reacção do sistema imunitário, são substâncias imunogénicas no sentido desta invenção. Por conseguinte, uma vacina de acordo com a invenção representa, no sentido desta invenção, uma composição imunogénica, dado que contém uma combinação de substâncias imunogénicas. As células tumorais diferenciam-se de células normais, entre outros aspectos, por uma expressão modificada de proteínas de superfície celular. Sobretudo a expressão de antigénios associados a tumor (TAA) permite teoricamente o reconhecimento e a destruição destas células com o sistema imunitário. No entanto, muitas vezes o sistema imunitário do paciente está suprimido, de modo que não consegue reconhecer as células modificadas.

Este problema resolve-se mediante a preparação de uma vacina para o tratamento de pacientes com doenças tumorais definidas, sendo esta vacina composta por células tumorais de outro paciente (células alogénicas) e sendo estas células tumorais previamente transfectadas ex-vivo com construções de expressão que codificam

interleucina-7 (IL-7), factor GM-CSF estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (granulocyte makrophage-colony-stimulating factor), e construções de expressão que codificam factores co-estimulatórios CD40UCD154 e B7.1/CD80. Numa forma de execução adicional da invenção proporciona-se uma vacina correspondente em que foram previamente transfectadas estas células tumorais ex-vivo com construções de expressão que codificam interleucina-7 (IL-7), factor GM-CSF estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (granulocyte makrophage-colony-stimulating factor), e construções de expressão que codificam factor co-estimulatório CD40UCD154.

As células tumorais usadas podem ser células derivadas de pacientes com o mesmo quadro clínico que o paciente que se tenciona tratar, ou então de células de pacientes com outro quadro clínico diferente do quadro do paciente que se tenciona tratar.

A combinação de componentes (substâncias imunogénicas) de vacinas deve garantir que se geram estes três níveis de cascata de sinal que são necessários basicamente para a indução de uma resposta imune específica. Os três níveis compreendem a apresentação de antigénio, a co-estimulação e a preparação de um ambiente local adequado.

A expressão de GM-CSF e CD40UCD154 deve fazer com que se recrutem e activem células apresentadoras de

antigénio (APC) assim como células dendríticas (DC) localmente. Como consequência, chega-se a uma apresentação reforçada de TAA.

A expressão de B7.1/CD80 conduz a um aumento da actividade co-estimulatória, mediante a qual se reforça a antigenicidade de TAA e se aumenta a quantidade de linfócitos T activados face a TAA.

A expressão de IL-7 induz adicionalmente a proliferação de linfócitos T específicos do tumor.

Por isso, a vacina de acordo com a invenção conduz, no ponto de aplicação, a uma alta concentração de citocinas solúveis que fomentam a proliferação, e moléculas co-estimulatórias relativamente a TAA na superfície das células tumorais, que conduz à activação e proliferação de células T específicas do tumor. "Bloqueiam-se" igualmente APC e DC no lugar de aplicação.

As construções de expressão apresentam-se como plasmídeo, mas também preferivelmente construções de expressão génica definidas imunológicas minimalistas. A este respeito trata-se de uma cassette de expressão fechada covalentemente, de cadeia dupla linear, que é composta apenas por um promotor de CMV, um intrão, a sequência genética codificante e uma sequência de poliadenilação. A cassette de expressão está covalentemente fechada nas duas extremidades da cadeia dupla mediante um circuito curto de resíduos de nucleótidos de cadeia única. Estas construções de ADN

minimalistas fechadas covalentemente são designadas, de agora em diante, de vectores MIDGE (MIDGE: vector de expressão genética definido imunologicamente minimalista); veja o documento EP 0941318 B1. As construções MIDGE têm a vantagem de com os mesmos se poderem evitar estruturas que não são essenciais para o efeito terapêutico, o que impede finalmente as desvantagens de procedimentos génicos convencionais.

A preparação de um ambiente local que seja permissivo para a indução de uma resposta imune específica garante-se com o uso de um adjuvante em forma de sequências de ácido nucleico imunoestimulatórias (ISS). Para este fim, propõe-se de acordo com a invenção que a vacina compreenda adicionalmente oligodesoxirribonucleótidos imunomoduladores. Dá-se preferência neste caso a um oligodesoxirribonucleótido imunomodulador, que

a) compreenda uma sequência com a sequência de bases N1N2CGN3N4, sendo N1N2 um elemento seleccionado do grupo que compreende GT, GG, GA, AT ou AA, N3N4 um elemento seleccionado do grupo que compreende CT ou TT, assim como C desoxicitosina, G desoxiguanosina, A desoxiadenosina e T desoxitimidina,

b) e uma cadeia circular compreende ácido desoxirribonucleico com uma sequência de bases antiparalela parcialmente complementares entre si, e é configurada em forma de haltere.

Os motivos CpG de ISS (veja para este fim a figura 2a) provocam um aumento da actividade de células NK e macrófagos, assim como uma forte estimulação da resposta imune a TH1 celulares. Por isso, estes actuam como imunomoduladores e permitem e reforçam a resposta imune específica do tumor. Prefere-se usar ISS fechados covalentemente com um comprimento de 30 bp, tal como no documento WO 01/07055. Além disso, as construções são designadas de dSLIM (oligodeoxirribonucleótidos imunomoduladores em forquilha dupla).

A sequência com a sequência de bases N1N2CGN3N4 está posicionada na região de cadeia única do oligodesoxirribonucleótido e compreende entre 40 a 200 nucleótidos (veja a figura 2b).

Também é objecto da invenção um procedimento para a preparação de uma vacina anteriormente descrita para o tratamento de pacientes com doenças tumorais, que contém células tumorais alogénicas e oligodesoxirribonucleótidos imunomoduladores, em que as células tumorais são previamente transfectadas ex-vivo com

a) interleucina-7 (IL-7), factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), CD40L/CD154 e B7.1/CD80 ou

b) interleucina-7 (IL-7), factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e CD40L/CD154

e em seguida transformam-se numa composição

farmacêutica que pode ser administrada. Os oligodesoxirribonucleótidos imunomoduladores já anteriormente descritos compreendem um ácido desoxirribonucleico de cadeia circular com uma sequência de bases antiparalela, parcialmente complementar entre si e estão configurados em forma de haltere. Estes são igualmente componentes do procedimento como adjuvantes.

Prevê-se, de acordo com a invenção, que uma célula tumoral alogénica compreenda pelo menos três, preferivelmente quatro moléculas de ácido nucleico, que codificam conjuntamente os factores co-estimulatórios B7.1/CD80 e CD40/CD154 e as citocinas interleucina-7 e GM-CSF.

Por isso, também são objecto da invenção células tumorais humanas alogénicas, transfectadas em correspondência, que foram transfectadas ex-vivo com moléculas de ácido nucleico que codificam

a) interleucina-7 (IL-7), factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), CD40L/CD154 e B7.1/CD80 ou

b) interleucina-7 (IL-7), factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e CD40L/CD154

e apresentam as respectivas construções de expressão. As células tumorais apresentam construções de expressão em forma de um plasmídeo ou então como cassete de expressão fechada covalentemente, de cadeia dupla

linear, que é composta por um só promotor de CMV, um intrão, a sequência genética codificante e uma sequência de poliadenilação, que está fechada covalentemente nas duas extremidades da cadeia dupla mediante um circuito curto de resíduos de nucleótidos de cadeia única. Trata-se preferivelmente de uma célula tumoral alogénica de uma linha celular do carcinoma das células renais.

Tal como acontece com a própria vacina, também se prevê no procedimento de acordo com a invenção que as moléculas de ácido nucleico se apresentem numa ou em várias construções de expressão. Por isso, pode-se tratar de uma construção de expressão de ADN para a expressão genética múltipla,

composta por regiões de fio duplo, que contêm uma cassete de expressão linear e que apresentam pelo menos uma sequência promotora e uma sequência codificante,

e onde estas regiões de fio duplo estão unidas entre si com cadeias únicas de ADN ou fios duplos de ADN de não codificação,

e as cassetes de expressão nas extremidades em que não estão unidas às outras cassetes de expressão por cadeias únicas de ADN ou cadeias duplas de ADN de não codificação, estão protegidas contra degradação por exonuclease.

Já foi descrita uma construção de expressão de ADN deste tipo para a expressão genética múltipla no documento PCT/DE03/02478. Por isso, vários ácidos

nucleicos, que constituem o objecto da vacina de acordo com a invenção, podem estar colocados numa construção de expressão individual.

Numa forma de execução especialmente preferida da invenção, a molécula de ácido nucleico é um ADN, de forma particular um ADNc ou um ADN genómico. É evidente que também pode ser vantajoso o facto de a molécula de ácido nucleico ser um ARN.

As células tumorais alogénicas derivam de pacientes com carcinoma colorrectal, carcinoma do pulmão de células pequenas e não pequenas, carcinoma da próstata, carcinoma da mama, carcinoma dos ovários e carcinoma das células renais, assim como melanoma maligno.

No âmbito da invenção usou-se de forma particular uma linha celular de carcinoma das células renais, que é especialmente adequada para a preparação da vacina de acordo com a invenção. Foi depositada uma linha celular de carcinoma das células renais no DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH) como cultivo viável com o número DSM ACC 2635. Em células desta linha celular de carcinoma das células renais são aplicadas, mediante procedimentos de transfecção essencialmente conhecidos do tipo biológico, químico e/ou físico, as construções de expressão de ADN, que conduzem à expressão de genes desejados nas células. Para tais células alogénicas transfectadas desta forma adiciona-se um adjuvante, preferivelmente ISS, com especial

preferência dSLIM (veja acima). Após a irradiação radioactiva das células tumorais alogénicas transfectadas com radiação gama, aplica-se a vacina de acordo com a invenção a pacientes com uma doença tumoral.

O corpo de extracção de células - contrariamente à terapia com células autólogas - não é do corpo que se tenciona tratar com o próprio medicamento. O uso de células alogénicas tem, por sua vez, a vantagem da caracterização única e multiplicação fiável de células. Por outro lado, está previsto o estímulo alogénico como efeito adjuvante favorável adicional.

As células de tratamento podem derivar de um único corpo (estranho) ou então são combinadas de vários corpos com igual quadro clínico (reunidas).

Por isso, a invenção refere-se à combinação de três ou quatro ácidos nucleicos expressáveis que codificam duas citocinas e um ou dois factores de co-estimulatórios.

Como imunomoduladores adicionais podem ser usados ISS, de preferência dSLIM.

Em experiências de cultivo celular em linhas celulares humanas primárias foi possível detectar, após a transfecção, células tripla ou quadruplamente positivas (veja a figura 1). "Tripla" ou "quadruplamente" positivas significa a este respeito que se transfectou com êxito uma maior percentagem de células com todos os três ou quatro genes que codificam GM-CSF, IL-7, CD40UCD154 e B7-

1/CD80 e que depois estes três ou quatro genes foram expressos por parte destas células. Na linha celular do carcinoma do cólon usada foi possível determinar 14,4% de todas as células como células positivas múltiplas mediante análise FACS (classificador de células activadas por fluorescência). Além disso, foi possível comprovar que foram transfectadas independentemente do gene 20,3% de todas as células após a electroporação com um gene; com três genes diferentes fá-lo-iam com êxito 19,9% das células. Verificou-se que a proporção percentual das células de carcinoma do cólon transfectadas com êxito após a transfecção quádrupla com construções de expressão que codificam CD40L/CD154, GM-CSF, B7.1/CD80 e IL-7 se encontra em 14,4% das células. Por conseguinte, 14,4% das células seriam transfectadas com quatro genes diferentes e em consequência disso poderiam expressar estas. Ao todo seriam transfectados 69,4% de todas as células com um ou mais dos genes.

A transfecção com vários genes é vantajosa, dado que deste modo as citocinas e factores co-estimulatórios expressos são expressos em estreita proximidade espacial entre si nos órgãos efectores do sistema imunitário. Esta proximidade espacial é significativa, dado que os sinais co-estimulatórios só facilitam no que respeita ao antigénio reforço efectivo de inoculação.

Para a transfecção podem ser usados essencialmente procedimentos biológicos, químicos e/ou físicos

conhecidos como, por exemplo, transfecção mediante transferência balística (documento EP 0686697), transfecção com polycatiões, precipitação com fosfato de cálcio, microinjecção, fusão de protoplastos, fusão de lipossomas, sistemas de transfecção virais, lipofecção e/ou electroporação in-vivo e/ou in-vitro. Numa forma de execução preferida da invenção a transfecção é efectuada mediante electroporação.

Outros procedimentos vantajosos são os procedimentos de transfecção biológicos, tais como a transferência genética mediada por receptor. A este respeito unem-se, por exemplo, as construções de expressão de ADN que codificam pelo menos um, preferivelmente dois factores co-estimulatórios e duas citocinas, covalentemente com um oligopéptido, que é preferivelmente a sequência de localização do núcleo (sinal de localização nuclear = NLS) do vírus de símio SV-40.

Mediante o uso de outros péptidos de preparação em parte sintética é possível aumentar a eficiência de transfecção. Este procedimento é particularmente adequado para a transferência genética in vivo específica das células conforme aplicação por via intravenosa.

A vacina de acordo com a invenção preparada mediante o procedimento de acordo com a invenção a partir de células tumorais alogénicas modificadas apresenta efeitos surpreendentes. De forma vantajosa podem ser

eliminados tanto défices no sistema imunitário de pacientes com tumor como simultaneamente reforçada a resposta imune intrinsecamente presente no antigénio específico do tumor.

Adicionalmente pode-se usar a vacina em pacientes cujo tumor foi extirpado, como terapia adjuvante para o melhoramento e restabelecimento da sua resposta imune contra células tumorais residuais ou para a redução da massa tumoral restante. Abre-se uma perspectiva para pacientes com tumor primário tratado cirurgicamente sem metástase reconhecida que poderiam beneficiar de uma terapia adicional específica do tumor que reduz a taxa de recaída.

Outras formas de configuração vantajosas da invenção resultam das reivindicações subordinadas e da descrição. A invenção, incluindo o efeito surpreendente do medicamento de acordo com a invenção (como inóculo para terapia contra carcinoma), assim como o procedimento de acordo com a invenção são descritos mais pormenorizadamente em seguida, em função das figuras e dos exemplos de execução. As figuras mostram:

Figura 1 intensidades de FACS de células humanas de carcinoma transfectadas em quadruplicado. A transfecção foi efectuada mediante electroporação com vectores de expressão que codificam CD40UCD154, GM-CSF, B7.1/CD80 e IL-7;

Figuras 2a e b esquemas de estrutura

imunomoduladora (dSLIM) em forma de haltere respectivamente com três motivos de CG esquematicamente representados nas estruturas de ferradura do circuito; significam I: circuito e II: estirpe.

Para a detecção de produtos génicos foram usados anticorpos que estão acoplados nos quatro corantes de fluorescência distinguíveis. Na figura 1 são designados com

CD80-FITC

hGMCSF-PE

IL7-PerCP

CD154-APC

O classificador de células activadas por fluorescência (FACS) reconhece estas cores em quatro canais diferentes. Nas abcissas designam-se com FL1-H, FL2-H, FL3-H e FL4-H. Os expoentes das abcissas dão uma intensidade de fluorescência relativa. Nas ordenadas verificam-se as contagens, que correspondem aproximadamente à quantidade de células medidas. A avaliação é efectuada com o denominado gating, que significa que só se contam as células que passam por um determinado nível de energia.

Na tabela 1 seguinte é representada a proporção percentual de células do carcinoma das células renais alogénicas transfectadas com êxito em conformidade com a transfecção tripla com construções de expressão que codificam CD40L/CD154, GM-CSF e IL-7 ou então transfecção

quádrupla com construções de expressão que codificam CD40UCD154, GM-CSF, B7.1/CD80 e IL-7.

Tabela 1

Gene codificante	Transfecção tripla com construções de expressão que codificam CD40L/CD154, GM-CSF e IL-7	Transfecção quádrupla com construções de expressão que codificam CD40L/CD154, GM-CSF, B7.1/CD80 e IL-7
	Proporção de células transfectadas (1 medida)	Proporção de células transfectadas (2 medidas)
B7.1/CD80	---	de 66,3 a 87,6%
CD40UCD154	60,8%	de 21,6 a 29,5%
IL-7	21,7 ng em 1×10^6 células	de 14,9 a 38,2 ng em 1×10^6 células
GM-CSF	698,9 ng em 1×10^6 células	de 370,6 a 1.567,2 ng em 1×10^6 células

A transfecção de factores co-estimulatórios B7.1/CD80 ou CD40UCD154 foi determinada mediante coloração de células com anticorpos marcados com fluorescência; a magnitude da transfecção com citocinas IL-7 ou GM-CSF foi determinada em função da concentração de citocinas no meio de cultivo celular.

A vacina de acordo com a invenção composta por células transfectadas ex-vivo alogénicas foi administrada a pacientes com tumores sólidos metastáticos, com intervalos de 7 a 10 dias em forma de 4 ciclos de injeção constituídos respectivamente por 2 injeções. As células foram previamente transfectadas com vectores de

expressão que codificam IL-7, GM-CSF, CD40UCD154 e/ou B7.1/CD80 e em seguida foram adicionadas sequências imunoestimulatórias (ISS). As duas primeiras injeções foram efectuadas no dia 1 no ponto de inoculação típico na pele (por via intradérmica) lateralmente no antebraço esquerdo e direito, no dia 7 (até 10) na zona de inoculação típica por via intradérmica na parte lateral dianteira da coxa esquerda e direita, no dia 14 (até 20) sob a pele (por via subcutânea) a cerca de 30 mm à esquerda e direita do abdómen e no dia 21 (até 30) novamente no antebraço mas sob a pele (por via subcutânea).

Todos os pacientes se encontravam no início do tratamento numa fase avançada da doença. Para a avaliação do êxito clínico servem as seguintes formulações em correspondência com a Organização Mundial de Saúde (1979): como uma reacção parcial (resposta parcial, PR) nota-se o retrocesso do tumor em mais de 50% nas últimas quatro semanas assim como a contenção de novos tumores. Com decurso estável da doença (doença estável, SD) nota-se a manutenção do estado. Uma resposta mista (MR), é uma reacção mista como, por exemplo, o progresso da metástase e um retrocesso da metástase noutro lugar. Uma resposta completa (CR) designa o retrocesso completo do tumor.

Deve-se esclarecer em seguida a invenção, de forma detalhada, em função dos exemplos, mas sem que a invenção fique limitada a estes exemplos.

Vacinação

O paciente, homem, é paciente de carcinoma do pulmão de células pequenas, recebeu com intervalos de 7 dias quatro inoculações sucessivas com a vacina de acordo com a invenção. A linha celular de carcinoma das células renais alogénicas foi tratada conforme descrito acima. Foi efectuado um controlo de expressão 24 h após a transfecção. O controlo da expressão de factores co-estimulatórios B7.1/CD80 ou CD40UCD154 foi efectuado mediante coloração das células com anticorpos marcados com fluorescência e em seguida foi efectuada medição por citometria de fluxo. A determinação da expressão de citocinas IL-7 e GM-CSF foi efectuada mediante medição da concentração no meio de cultivo celular com a ajuda de ELISA.

Transfectadas com êxito significa: células positivas vivas. Os dados de transfecção estão representados na tabela 1. A proporção percentual de células transfectadas com êxito com B7-1/CD80 situava-se entre 66,3 e 87,6%. A proporção de células transfectadas com CD40UCD154 estava entre 21,6 e 29,5%. A concentração da citocina IL-7 em 1×10^6 células situava-se entre 14,9 e 38,2 ng. A concentração em GM-CSF em 1×10^6 células situava-se entre 370,6 e 1.567,2 ng.

Em caso de transfecção para a vacinação tripla com construções de expressão que codificam CD40UCD154, GM-CSF e IL-7 a proporção percentual em células transfectadas

com êxito com CD40L/CD154 situava-se em 60,8%. A concentração da citocina IL-7 em 1×10^8 células situava-se em 21,7 ng. A concentração de GM-CSF em 1×10^6 células era de 698,9 ng.

Tratamento de doenças tumorais metastásicas

Seleção dos pacientes: foram recrutados pacientes com carcinoma colorrectal, carcinoma do pulmão de células pequenas e não pequenas, carcinoma da próstata, carcinoma da mama, carcinoma dos ovários e carcinoma das células renais, assim como melanoma maligno, com idades entre os 18 e os 70 anos, e um índice de Karnofsky de 70 a 100. Os critérios de exclusão foram: um tratamento prévio com citocina ou quimioterapia em menos de 28 dias, valores de creatina acima dos 265 micromol/l, valores de bilirrubina acima dos 51 micromol/l, insuficiência cardíaca não compensada, alterações do ritmo ventricular, doenças psiquiátricas graves, hepatite A, B ou C activa, infecção por VIH.

Tratamento: além da anamnese foram determinados os parâmetros seguintes antes do início do tratamento: estudo físico, hematologia (hemoglobina, hematócritos, leucócitos e nível de plaquetas), valores sanguíneos químicos e análises de urina. Foi recolhido sangue para a determinação do estado imune. Foram efectuados ensaios de pele DHT (hipersensibilidade do tipo retardado) com o ensaio Multitest Merieux (Leimen, Alemanha). Foram feitas radiografias do tronco assim como tomografias por

computador do tronco e do abdómen. Os pacientes receberam quatro injeções por via subcutânea com pelo menos $8 \times 10^8 - 1,4 \times 10^7$ células com células tumorais previamente tratadas ex-vivo. Repetiram-se os estudos imunológicos, estudos hematológicos e estudos clínicos básicos (estudo físico, estudo por ultra-sons e estudo do baixo ventre, conforme as necessidades) nos dias 14, 28 e 56. No dia 84 foi efectuado um estudo clínico e imunológico completo, comparável com o estudo de selecção efectuado no início.

Construção de expressão genética definida imunologicamente minimalista (MIDGE)

Foram usados vectores de expressão de ADN minimalistas fechados covalentemente para a transfecção de células tumorais. Os vectores de expressão serviram para a expressão de interleucina-7 (IL-7) humana, do factor de estimulação de colónias de macrófagos e granulócitos humano (GM-CSF), de factores co-estimulatórios B7.1/CD80 e CD40UCD154. Os vectores MIDGE foram sintetizados em conformidade com a prescrição SOP e num dos laboratórios correspondentes à classe B com controlo de qualidade subsequente.

As sequências codificante de IL-7 (NCBI nº de acc.: J04156), GM-CSF (NCBI nº de ac.: M11220), B7.1/CD80 (NCBI nº de ac.: AF177937) e CD40UCD154 (NCBI nº de ac.: S49008, obtidas do banco de dados (www.ncbi.nlm.nih.gov) do National Center for Biotechnology Information), foram inseridas em plasmídeos pMOK e serviram como construções

de partida para a preparação de vectores MIDGE. O plasmídeo pMOK tem, além do "promotor imediato prematuro" forte do vírus de CMV, um intrão e uma sequência de poliadenilação do vírus SV40 (MOLOGEN, Berlim). O plasmídeo pMOK que codifica IL-7 foi totalmente digerido com a enzima de restrição Eco311 durante a noite a 37° C. Mediante a digestão por restrição foram produzidos dois fragmentos de ADN. Um consistia no gene de resistência a canamicina e o outro em sequências necessárias para a propagação do plasmídeo em bactérias. O outro fragmento consistia nas sequências que deveriam ser componentes do ADN MIDGE: promotor de CMV melhorado, intrão quimérico, da sequência genética para IL-7 e da sequência de poliadenilação de SV-40. Mediante a enzima T4-ADN ligase, ligaram-se os oligodesoxirribonucleótidos em forma de ferradura fosforilados em 5' ((TIB-MolBiol, Berlim, ODN 1 = ID sec 5 do documento WO 03/031469 A2 (Mologen e col.) sem base modificada X) e ODN 2 = ID sec 6 do documento WO 03/031469 A2 (Mologen e col.)) na presença da enzima de restrição Eco31I durante a noite a 37° C no fragmento de ADN que forma ADN MIDGE. Entretanto faz-se referência à síntese apresentada no documento WO 03/031469 A2 (Mologen e col.) e às sequências de oligonucleótidos (ODN) aí referidas. A reacção foi parada após aquecimento a 70° C. A mistura resultante em ácidos nucleicos foi tratada com a enzima T7-ADN-polimerase. O ADN MIDGE foi purificado mediante cromatografia de intercâmbio de aniões e

precipitado com isopropanol (veja o documento EP 0 941 318 B1).

Foi efectuada correspondentemente a preparação dos vectores que codificam GM-CSF, B7.1/CD80 e CD40L/CD154.

Preparação de MIDGE acoplado com NLS

Para a preparação de NLS-MIDGE faz-se referência à síntese apresentada no documento WO 03/031469 A2 (Mologen e col.) e às sequências de oligonucleótidos (ODN) aí referidas. Acopla-se previamente o péptido de NLS (ID sec 4 do documento WO 03/031469 A2 (Mologen e col.) no ODN. Para este fim foi usada na ferradura com um ODN 1 dotado de um desoxiuracilo (XT) modificado com grupos amino assim como o ODN 2 não modificado do documento WO 03/031469 A2 (Mologen e col.):

Em primeiro lugar activou-se o oligonucleótido ODN 1 (0,1 mM) modificado com sulfo-KMUS (5 mM) em PBS à temperatura ambiente. Decorridos 120 minutos parou-se a reacção com tris-(hidroximetil)aminometano 50 mM e o ODN 1 activado é obtido após precipitação com etanol (NaOAc 300 mM pH 5,2, MgCl₂ 5,5 mM, etanol a 70%), centrifugação e lavagem uma vez com etanol a 70%. O ODN 1 assim obtido (0,1 mM) foi dissolvido em PBS e reagiu com o péptido NLS (0,2 mM) durante uma hora à temperatura ambiente. A reacção foi controlada com electroforese em gel (3%) e coloração com brometo de etídio. O ODN 1 acoplado com NLS que se gerou foi purificado mediante HPLC e usado tal como previamente descrito com o ODN 2 para a síntese de

construções MIDGE-NLS.

Oligodesoxinucleótidos imunomodulatórios de fio duplo (d-SLIM)

Oligodesoxinucleótidos imunomodulatórios de cadeia dupla são moléculas com sequências CG. Para tal fecham-se covalentemente oligodesoxinucleótidos (ODN) lineares mediante circuito de nucleótido de modo que se protegem contra a degradação por exonucleases. A este respeito resultam moléculas em forma de haltere, as dSLIM, que significa "imunomodulador de forquilha dupla" (veja a figura 2). O efeito imunomodulatório baseia-se numa activação não específica do sistema imunitário mediante as sequências CG não metiladas que se unem a receptores do tipo Toll. Qualquer circuito do DSLIM contém três motivos de CG não metilados.

Foram preparados imunomoduladores de cadeia dupla d-SLIM do tipo ISS30 (SOP) e subsequente controlo de qualidade no laboratório de classe B. Para este fim foram ligados oligodesoxirribonucleótidos (ODN) fosforilados em 5' em forma de ferradura de cadeia única com ligase T4-ADN. Após digestão dos eductos restantes com T4-polimerase e purificação cromatográfica, os ODN foram concentrados com etanol e precipitados com acetato de sódio e magnésio e dissolvidos em PBS. O procedimento exacto está representado no documento WO 01/07055. A figura 2b mostra um d-SLIM deste tipo.

Caracterização da linha tumoral alogénica

A linha celular usada deriva de um carcinoma das células renais primárias de uma paciente fêmea. A partir destas células primárias colocou-se uma linha celular que se depositou no DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) como cultivo viável com o número DSM ACC2635. Após um procedimento de crivagem foram determinadas tais células a partir dos cultivos primários dispostos da paciente com tumor, o que serviu de material de partida para a preparação do banco de células-mãe. Foi necessário caracterizar a população de células pela expressão estável de TAA, com uma taxa de distribuição constante e boa, assim como um comportamento de crescimento o mais homogêneo possível. Foi igualmente necessário garantir a ausência de contaminação viral ou bacteriana.

Comprovou-se que a linha celular de carcinoma das células renais num laboratório certificado era negativa em vírus HI, vírus da hepatite B e C. Foi igualmente efectuada uma caracterização no que se refere ao tipo de HLA, à expressão de TAA e à libertação de citocinas. Para este fim foram estabelecidas diferentes técnicas como a ELISA para determinações de citocinas por exemplo de: TNF-alfa, IL-6, GM-CSF e IL-7. Adicionalmente foram desenvolvidas medidas de FACS intracelulares e ensaios de PCT RT em tempo real. Após a transfecção, as células foram estudadas em relação à expressão de antigénios de superfície, moléculas de transdução de sinal e genes

repórteres. A linha celular caracteriza-se pelos seguintes valores imunológicos de marcadores de superfície específicos:

EpCAM: positivo

Her-2/novo: negativo

Citoqueratina 7+8: positivo

HLA-A1: positivo

HLA-A2: positivo

Fibroblastos: negativo

Determinação de antigénios específicos do tumor:

PRAME: positivo SCP-1: positivo

MAGE-4: negativo Fertilina-beta: negativo

MAGE-3: negativo RAGE-1: positivo

MAGE-1: negativo G250: positivo

Electroporação

Para a transferência genética ex-vivo nos núcleos de células das células tumorais e das células de controlo usou-se preferivelmente o procedimento de electroporação. As células tumorais libertam-se com solução de tripsina/EDTA do recipiente de cultivo e ajustam-se a uma densidade de $1-1,5 \times 10^7$ células por 600 μ l em meio (sem FCS) ou PBS. A estes 600 μ l de suspensão de células adicionam-se respectivamente de 5 a 10 μ g de vector de expressão, transferem-se para tinas de electroporação arrefecidas (Eurogentec) e submetem-se a electroporação com uma tensão de 300 v e a capacidade de 1050 microfarads num equipamento de electroporação Easyject

(EquiBio).

Depois transferem-se as células para meio fresco (5-20 ml) e incubam-se durante 24 horas num armário de cultivo celular (CO₂ a 5%, 37° C, humidade saturada). Foi efectuada a medição das moléculas de superfície (CD40UCD154 e B7.1/CD80) e das citocinas (GM-CSF e IL-7) mediante citometrias de fluxo em quatro cores. Foi igualmente efectuado um controlo do número de células e da vitalidade.

Imediatamente após a transferência genética cobriram-se as células tumorais com 10 ml de meio de suspensão celular pré-aquecido e transferiram-se mediante pipetagem cuidadosa para tubos de centrifugação de 15 ml. Após a sedimentação das células, dissolveram-se as células a 300 x g e 4° C durante 5 minutos no meio. Conservaram-se novamente alíquotas para ensaios de esterilidade, ensaios para regeneração de células e sobrevivência, para análises FACS e para a determinação da expressão de citocina. A eficiência de transfecção foi determinada da forma descrita (Foa e col., 1994, Nat. Immun. 13: 65-75)).

Secou-se novamente a suspensão de células tumorais transfectadas, recolheu-se em 1,5 ml de meio de congelação (80% de FCS, 10% de DMSO, 10% de meio de suspensão) e conservou-se em porções de células de 8×10^6 a $1,4 \times 10^7$ em tubos de congelação de 2 ml lacrados. Os tubos foram conservados a -80° C a 1° C/ minuto em

nitrogénio líquido.

Acabamento da vacina de acordo com a invenção

Após descongelação cuidadosa dos tubos de congelação, determinou-se novamente a quantidade de células e reservaram-se alíquotas para ensaios de esterilidade. Após lavagem meticulosa repetida das células suspendeu-se novamente o agregado celular obtido em solução salina tamponada de fosfato de Dulbecco (DPBS, Camprex nº de catálogo: 17-512F). De acordo com o preparado foram incorporados na suspensão 500 microgramas do adjuvante DSLIM. A vacina preparada foi transferida para um recipiente de reacção sem endotoxina estéril. Foram retirados respectivamente 750 microlitros deste preparado mediante cânula em injeção.

Antes da aplicação foi efectuada a irradiação por cinco vezes das injeções com irradiação gama, o que correspondia a uma dose total de 150 Gray.

Preparação de linfócitos

Foram obtidos monócitos sanguíneos periféricos (PBMC) a partir de sangue periférico heparinizado mediante Lymphoprep (GIBCO, Karlsruhe) mediante centrifugação por densidade. Lavaram-se as células duas vezes com PBS e secaram-se por congelação em nitrogénio líquido, na presença de mais de 20% de FCS para ELISPOT e ensaios citotóxicos.

Análise estatística

Usou-se ensaio por pares e sem pares ajustado de

Wilcoxon para a análise de significativos estatísticos.

Observa-se um valor de $p < 0,05$ como significativo.

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

A presente listagem de referências citadas pela requerente é apresentada meramente por razões de conveniência para o leitor. Não faz parte da patente de invenção europeia. Embora se tenha tomado todo o cuidado durante a compilação das referências, não é possível excluir a existência de erros ou omissões, pelos quais o EPO não assume nenhuma responsabilidade.

Patentes de invenção citadas na descrição

- WO 02060476 A [0009]
- US 5681562 A [0010]
- WO 9818810 A [0015]
- WO 0004918 A [0016]
- EP 0941318 B1 [0032] [0069]
- WO 0107055 A [0034] [0074]
- DE 0302478 W [0040]
- EP 0686697 A [0050]
- WO 03031469 A2, Mologen [0069] [0071]

Literatura não relacionada com patentes, citada na descrição

- **Finke et al.** Cancer Gene Ther., 1997, vol. 4, 260-268 [0009]
- **Paillard.** Hum. Gene Ther., 1998, vol. 9, 2457-2458 [0011]
- **Schadendorf et al.** J. Mol. Med., 1995, vol. 73, 473-477 [0011]
- **Miller et al.** Blood, 1993, vol. 18, 3686-3694 [0013]
- **Murphy et al.** J. Clin. Invest., 1993, vol. 92, 1918-1924 [0013]
- **Schmidt-Wolf et al.** J. Immunol. Methods, 1989, vol. 125, 185-189 [0015]
- **Sato et al.** Science, 1996, vol. 273, 352-354 [0015]
- **Foa et al.** Nat. Immun., 1994, vol. 13, 65-75 [0080]

REIVINDICAÇÕES

1.- Vacina para o tratamento de pacientes com doenças tumorais, que contém células tumorais alogénicas e oligodesoxirribonucleótidos imunomoduladores como adjuvante, onde se transfectaram as células tumorais em primeiro lugar ex-vivo com moléculas de ácido nucleico que codificam a interleucina-7 (IL-7), factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e CD40L/CD154 e B7.1/CD80.

2. Vacina para o tratamento de pacientes com doenças tumorais, que contém células tumorais alogénicas e oligodesoxirribonucleótidos imunomoduladores como adjuvante, onde se transfectaram as células tumorais em primeiro lugar ex-vivo com moléculas de ácido nucleico que codificam a interleucina-7 (IL-7), factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e CD40L/CD154.

3. Vacina de acordo com a reivindicação 1 ou 2, onde as moléculas de ácido nucleico codificantes estão presentes numa ou em várias construções de expressão.

4. Vacina de acordo com a reivindicação 3, em que a construção de expressão

a) é um plasmídeo, ou

b) é uma cassette de expressão fechada covalente, de cadeia dupla linear, que é composta apenas por um promotor de CMV, um intrão, a sequência genética

codificante e uma sequência de poliadenilação, que está fechada covalentemente nas duas extremidades da cadeia dupla mediante uma alça curta de resíduos de nucleótidos de cadeia única.

5. Vacina de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 4, em que o oligodesoxiribonucleótido imunomodulador

a) compreende uma sequência com a sequência de bases $N^1N^2CGN^3N^4$, sendo N^1N^2 um elemento seleccionado do grupo que compreende GT, GG, GA, AT ou AA, N^3N^4 um elemento seleccionado do grupo que compreende CT ou TT, assim como C desoxicitosina, G desoxiguanosina, A desoxiadenosina e T desoxitimidina,

b) e compreende uma cadeia circular de ácidos desoxirribonucleicos com uma sequência de bases antiparalela parcialmente complementares entre si, e é configurada em forma de haltere.

6. Vacina de acordo com a reivindicação 5, em que a sequência com a sequência de bases $N^1N^2CGN^3N^4$ está posicionada na região de cadeia única do oligodesoxirribonucleótido e compreende entre 40 a 200 nucleótidos.

7. Vacina de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 6, que compreende um veículo farmacêuticamente compatível.

8. Vacina de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que as células tumorais alogénicas são seleccionadas de

carcinoma colorrectal, carcinoma do pulmão de células pequenas e não pequenas, carcinoma da próstata, carcinoma da mama, carcinoma dos ovários e carcinoma das células renais, assim como melanoma maligno.

9. Vacina de acordo com uma ou mais das reivindicações 1 a 8, em que as células tumorais derivam da linha de células do carcinoma do rim, que está depositada com o número DSM ACC 2635 na DSMZ.

10. Procedimento para a preparação de uma vacina de acordo com as reivindicações 1 a 8 para o tratamento de pacientes com doenças tumorais, em que se transfectam células tumorais alogénicas ex-vivo com moléculas de ácido nucleico que codificam

a) interleucina-7 (IL-7), factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), CD40L/CD154 e B7.1/CD80 ou

b) interleucina-7 (IL-7), factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e CD40L/CD154

e em seguida se adicionam oligodesoxirribonucleótidos imunomoduladores como adjuvante e depois se transfere para uma composição farmacêutica que se possa administrar.

11. Procedimento de acordo com a reivindicação 10, em que o oligodesoxirubonucleótido imunomodulador compreende um ácido desoxirribonucleico de cadeia circular com uma sequência de bases antiparalela

parcialmente complementar entre si, e está configurado em forma de haltere.

12. Procedimento de acordo com a reivindicação 10 ou 11, em que o oligodesoxirribonucleótido imunomodulador compreende uma sequência com sequência de bases $N^1N^2CGN^3N^4$, sendo N^1N^2 um elemento seleccionado do grupo que compreende GT, GG, GA, AT ou AA, N^3N^4 um elemento seleccionado do grupo que compreende CT ou TT, assim como C desoxicitosina, G desoxiguanosina, A desoxiadenosina e T desoxitimidina.

13. Procedimento de acordo com a reivindicação 12, estando posicionada a sequência com a sequência de bases $N^1N^2CGN^3N^4$ na região de cadeia simples do oligodesoxirribonucleótido e compreende entre 40 a 200 nucleótidos.

14. Procedimento de acordo com a reivindicação 10, em que a molécula de ácido nucleico está presente numa ou em várias construções de expressão.

15. Procedimento de acordo com uma ou mais das reivindicações 10 a 14, caracterizado pelo facto de a transfecção ser efectuada mediante transferência balística, transfecção de poliacetilinas, precipitação com fosfato de cálcio, microinjecção, fusão de protoplastos, fusão de lipossomas, sistemas de transfecção virais, lipofecção e/ou electroporação.

16. Procedimento de acordo com a reivindicação 10, em que as células tumorais alogénicas são seleccionadas

do carcinoma colorrectal, carcinoma do pulmão de células pequenas e não pequenas, carcinoma da próstata, carcinoma da mama, carcinoma dos ovários e carcinoma das células dos rins, assim como melanoma maligno.

17. Procedimento de acordo com a reivindicação 10, em que as células tumorais derivam de vários pacientes com o mesmo quadro clínico.

18. Procedimento de acordo com uma das reivindicações 10 a 17, em que se usam as células tumorais da linha de células do carcinoma dos rins que está depositada com o número DSM ACC 2635 na DSMZ.

19. Célula tumoral humana que foi transfectada ex-vivo com moléculas de ácido nucleico que codificam

a) interleucina-7 (IL-7), factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), CD40L/CD154 e B7.1/CD80 para ou

b) interleucina-7 (IL-7), um factor estimulante de colónias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e CD40L/CD154

e apresenta construções de expressão correspondentes.

20. Célula tumoral humana de acordo com a reivindicação 19, em que a construção de expressão

a) é um plasmídeo, ou

b) é uma cassette de expressão fechada covalente, de cadeia dupla linear, que é composta apenas por um promotor de CMV, um intrão, a sequência genética

codificante e uma sequência de poliadenilação, que está fechada covalentemente nas duas extremidades da cadeia dupla mediante uma alça curta de resíduos de nucleótidos de cadeia única.

21. Célula tumoral humana de acordo com a reivindicação 19 e 20, que é uma célula tumoral alogénica de uma linha de células do carcinoma das células renais.

22. Célula tumoral humana de acordo com a reivindicação 21, que é uma célula tumoral da linha do carcinoma das células renais, que está depositada com o número DSM ACC 2635 no DSMZ.

23. Célula tumoral humana de acordo com uma ou mais das reivindicações 19 a 22 para uso como vacina para o tratamento de doenças tumorais.

Figura 1

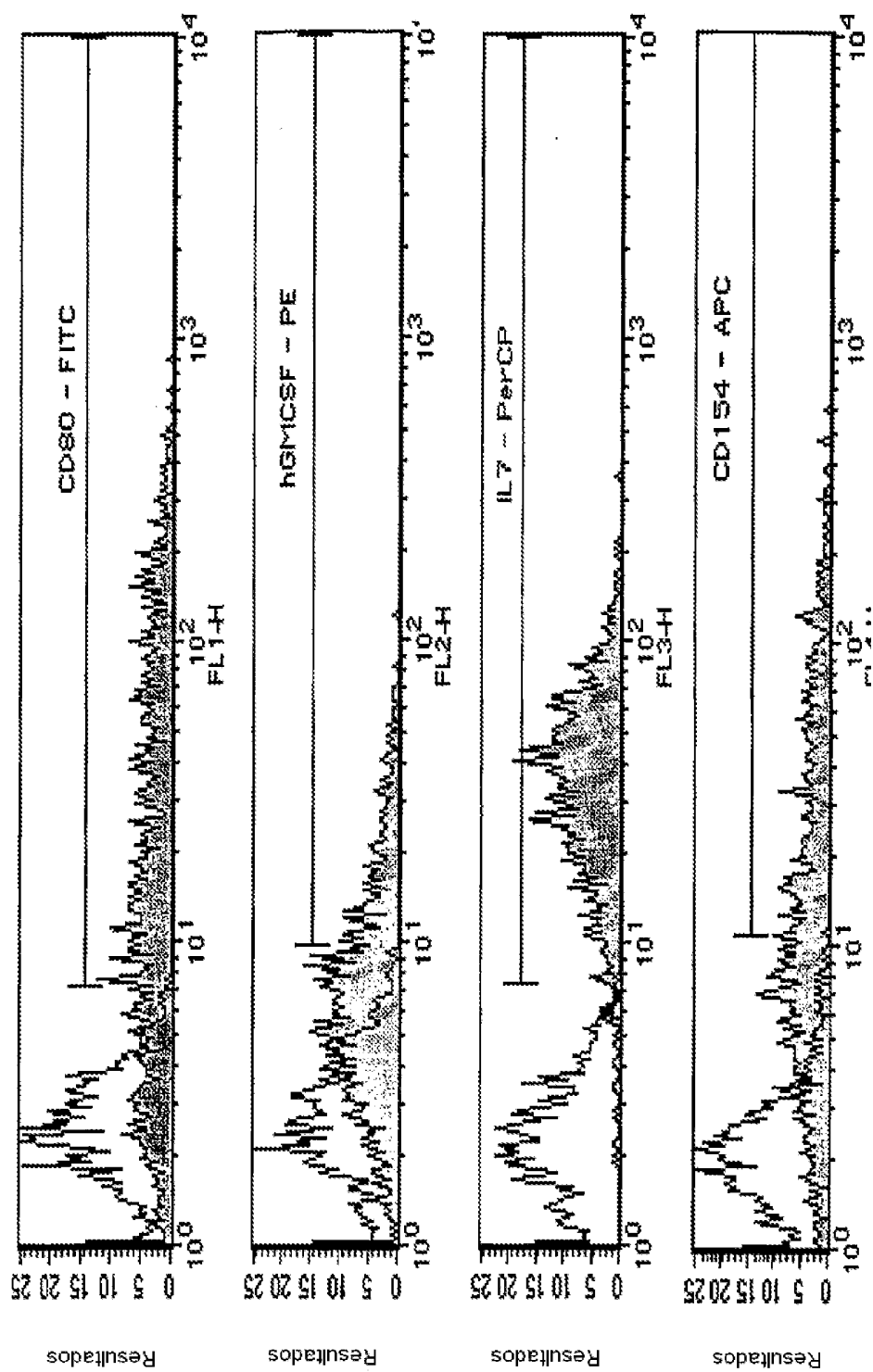


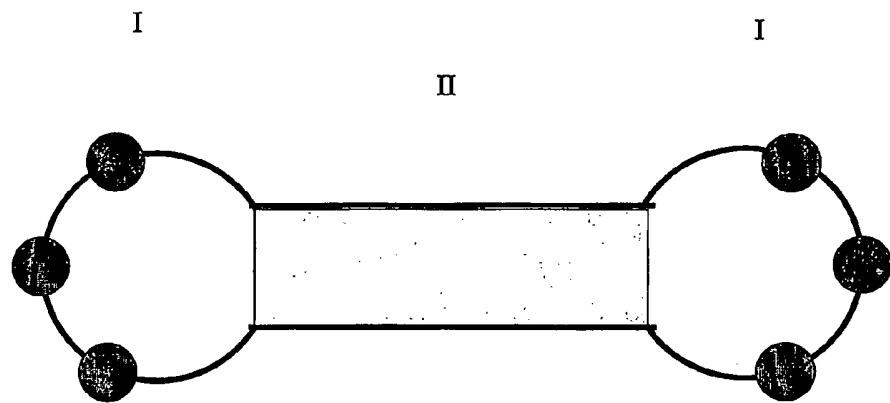
Fig. 2 a

Fig. 2 b

