



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2691110 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 39/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.02.09
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.10.29
(86)	Europeisk søknadsnr	12734884.5
(86)	Europeisk innleveringsdag	2012.07.04
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2014.02.05
(30)	Prioritet	2011.07.05, EP, 11172622 2011.07.05, US, 201161504387 P
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Sotio a.s., Jankovcova 1518/2, 170 00 Prague 7, CZ-Den tsjekkiske republikk
(72)	Oppfinner	BARTUNKOVÁ, Jirina, Vladislavova 8, 110 00 Praha 1, CZ-Den tsjekkiske republikk SPÍSEK, Radek, Velké Kunratické 1312/6, 148 00 Praha 4, CZ-Den tsjekkiske republikk
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Midler og metoder for aktiv cellulær immunoterapi av cancer ved anvendelse av tumorceller drept ved høyt hydrostatisk trykk og dendrittceller
(56)	Anførte publikasjoner	EVA-MARIA WEISS ET AL: "Ex vivo- and in vivo-induced dead tumor cells as modulators of antitumor responses", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 1209, no. 1, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 109-117, XP055012402, ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05743.x WEISS E M ET AL: "High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogenic features", JOURNAL OF IMMUNOTOXICOLOGY, TAYLOR AND FRANCIS GROUP, vol. 7, no. 3, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 194-204, XP009154173, ISSN: 1547-691X WO-A2-2006/095330 B1 MAYU O. FRANK ET AL: "Harnessing Naturally Occurring Tumor Immunity: A Clinical Vaccine Trial in Prostate Cancer", PLOS ONE, vol. 5, no. 9, 1 January 2010 (2010-01-01) , page E12367, XP055009541, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0012367 MINARIK I ET AL: "C40 PHASE I/II OF CLINICAL STUDY OF PROSTATE CANCER IMMUNOTHERAPY USING DENDRITIC CELL VACCINATION STRATEGY - FIRST RESULTS", EUROPEAN UROLOGY SUPPLEMENTS, XX, XX, vol. 9, no. 6, 1 September 2010 (2010-09-01), page 629, XP027279666, ISSN: 1569-9056 [retrieved on 2010-09-01]

Bakgrunn for oppfinnelsen

Sykdommer forårsaket av forskjellige tumorer er fremdeles et stort problem innen medisinsk og human helse. Kombinasjonen av kirurgi, kjemoterapi og radioterapi forbedret i stor grad prognosen hos cancerpasienter. Til tross for at dette ofte

5 resulterte i en signifikant reduksjon av tumormasse, vil en liten populasjon av forløpertumorer eller cancerstamceller overleve, og deretter føre til en ny populasjon av tumorceller som fører til et tilbakefall. Selv om hovedtumoren er fjernet ved kirurgi og/eller andre behandlinger, kan små mengder av sirkulerende tumorceller føre til metastatiske tumorer i forskjellige områder av kroppen. Det eksisterer derfor

10 et permanent behov for alternative medikamenter og behandlingsmetoder som kan anvendes alene, eller foretrukket kan kombineres med andre metoder for tumorbehandling.

Kjent teknikk

15 WO 2006/095330 beskriver metoder for å inhibere vekst av cellepopulasjoner ved termisk, mekanisk og/eller kjemisk ødeleggelse av antigenbærende celler, og innføring av nevnte celler som aggregat med antigenpresenterende celler i pasienter.

Frank et al. "Harnessing Naturally Occuring Tumor Immunity; A Clinical Vaccine Trial

20 in Prostate Cancer", PLOS ONE, bind 5, nr. 9, 1. Januar 2010 (2010-01-01), side E12367, beskriver en tumorvaksine som omfatter autologe dendritiske celler og apoptotiske UV-bestrålte LNCaP-celler.

Minarik et al. "Phase I/II of Clinical Study of Prostate Cancer Immunotherapy Using

25 Dendritic Cell Vaccination Strategy – First Results, European Urology Supplements, bind 9, nr. 6, 1. september 2010, side 629, beskriver de preliminære resultater av et fase I/II klinisk studie av prostatacancerimmunoterapi ved anvendelse av dendritiske celler som er pulset med apoptotiske LNCaP-celler som drept ved UVA-bestråling.

30 Weiss et al. "Ex vivo- and in vivo-induced dead tumor cells as modulators of antitumor responses", Annals of the New York Academy of Sciences, bind 1209, nr. 1, 1. oktober 2010 (2010-10-01), sidene 109-117, beskriver høyhydrostatisk trykkbehandling av tumorceller. De døde tumorcellene anvendes direkte som cancervaksiner i dyremodeller.

35 Weiss et al. "High hydrostatic pressure treatment generates inactivated mammalian tumor cells with immunogenic features", Journal of Immunotoxicology, bind 7, nr. 3,

1. september 2010, sidene 194-204, beskriver at hydrostatisk trykkbehandling inducerer apoptose, hvor tumorceller er inaktive og immunogene. Antistoffer rettet mot tumorceller er blitt fremstilt og identifisert I en musemodell.

- 5 US 2008/0286314 beskriver cancervaksiner som omfatter antigenpresenterende celler lastet med varmesjokkbehandlede cancerceller som er ikke-apoptotiske, og som kan anvendes for å behandle cancerpasienter.

10 Den foreliggende oppfinnelse angår farmasøytiske preparater som kan anvendes for induksjon av anti-tumor immunrespons, særlig ved tumorvaksinasjon som gjør at kroppen produserer en immunogen reaksjon mot tumorceller. Oppfinnelsen er definert ved kravene.

15 Tumorceller som drept ved standard modaliteter slik som bestråling, er normalt ikke-immunogene. Dersom anvendt for dannelsen av cancerimmunoterapiprodukter, må bestrålte tumorceller administreres i kombinasjon med en potent adjuvans. Når anvendt for pulsing av antigenpresenterende celler, slik som dendritiske celler, vil bestrålte drepte tumorceller ikke tilveiebringe et aktiveringssignal. Dendritiske celler må således aktiveres ved hjelp av en annen substans, slik som patogenavlede

20 molekyler.

En ny fremgangsmåte er omtalt, som inducerer en immunogen død av humane tumorceller, særlig ovarie- og prostatacancer celler, og ved akutt lymfoblastisk leukemiceller av human opprinnelse. Tumorceller drept ved høyt hydrostatisk trykk (i

25 det etterfølgende også: HHP) tilveiebringer et potent aktiveringsstimuli for dendritiske celler, særlig overfor umodne dendritiske celler, selv i fravær av ytterligere stimuli. Tumorceller som drepes ved denne metode uttrykker høye nivåer av immunogene celledødmarkører, og dendritiske celler lastet med disse immunogene tumorceller inducerer et høyt antall tumorspesifikke T-lymfocytter uten å ekspandere uønskede

30 regulerende T-lymfocytter. De eksperimentelle data av den foreliggende oppfinnelse viser at kombinasjonen av tumorceller drept ved anvendelse av høyt hydrostatisk trykk, og dendritiske celler resulterte i fagocytose og effektiv presentasjon av tumorantigener, og induksjon av sterke anti-tumorimmunresponser.

35 Tumorceller er ikke, eller kun svakt immunogene, og de har vanligvis ikke kapasitet til å indusere en tumorspesifikk immunrespons om anvendt i fravær av en kraftig adjuvans. Nylige studier har vist at tumorceller drept ved enkelte kjemoterapeutika,

slik som bortezomib, oksaliplatin og antrasykliner, kan indusere en tumorspesifikk immunrespons. Denne immunogene celledød er kjennetegnet ved molekulære hendelser som deles av alle beskrevne kjemoterapeutika. Innen timer etter initiering av immunogen celledød, vil preapoptotiske tumorceller translokere kalrektikulin og varmesjokkproteiner fra det endoplastiske retikulum til celleoverflaten sammen med andre molekyler som tjener som "eat me" signaler (fosfatidylserin).

Samtidig vil tumorceller som gjennomgår immunogen tumorcelledød nedregulere ekspresjonen av "don't eat me" signaler (slik som overflate CD47) for å forenkle tumorcellegjenkjenning og oppsluking ved dendrittiske celler. I tillegg, etter permeabilisering av plasmamembranen, vil celler frigi "late apoptosis marker high mobility group box 1" (HMGB1) inn i det ekstracellulære miljøet. HMGB1 kan binde en rekke "pattern recognition receptors (PRR'er), slik som Toll-liknende reseptor 2 (TLR 2), TLR 4, og reseptor for fremskredne glykosyleringsendeprodukter (RAGE). Frigivelse av dette protein synes å være nødvendig for optimal presentasjon av antigener fra døende tumorceller, T-cellepriming ved dendrittiske celler, og deretter T-cellemediert eliminering av tumoren.

Anvendelse av tumorceller drept på en slik måte at de blir immunogene, er ekstremt viktig for designen av cancerimmunoterapeutiske strategier. Administrering av immunogene tumorceller kan indusere en tumorspesifikk immunrespons, som deretter vil kontrollere veksten av tumorceller. Dette vil moderere, og til og med stabilisere, progresjonen av sykdommen, og forbedre prognosen hos cancerpasienter. Det er også antatt at fordelingen av tumorceller som sirkulerer i kroppen og dannelsen av metastaser i det minste kan reduseres vesentlig.

Foretrukne utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelse

En ny metode og farmasøytiske preparater er angitt som induserer immunogen celledød av humane tumorer, særlig ovarie- og prostatacancer celler, og akutt lymfoblastisk leukemiceller i et mye større omfang enn de til nå beskrevne kjemoterapeutika. Tumorceller drept ved denne metoden og fanget ved dendrittiske celler uttrykker høye nivåer av immunogene celledødmarkører, og induserer et høyt antall tumorspesifikke T-lymfocytter uten å indusere regulerende T-celler, som vil kunne inhibere anti-tumorimmunrespons. Man har funnet at graden av anti-tumorimmunrespons oppnådd i kombinasjon av tumorceller behandlet ifølge den foreliggende oppfinnelse, og dendrittiske celler er omtrent 10-ganger høyere enn immunresponsen indusert ved immunogene tumorceller alene.

Det generelle prinsipp for en foretrukket cancerimmunoterapiprotokoll basert på administreringen av modne dendrittske celler (DC'er) lastet med drepte tumorceller er vist i figur 1. Alle trinn i dannelsen av det endelige farmasøytiske preparat er gjennomført under Good Manufacturing Practice betingelser i GMP-anlegg.

I en foretrukket utførelsesform er det første trinnet i fremgangsmåten for danne farmasøytiske preparater for hver pasient en leukaferese gjennomført for det formål å samle et stort antall monocytter fra det perifere blod. I en foretrukket utførelsesform blir leukafereseproduktet deretter fortynnet i en passende buffer, slik som PBS+1 mM EDTA (Lonza, Vierviers, Belgia), og mononukleære celler separeres ved Premium Ficoll Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) gradientsentrifugering. Samlede mononukleære celler (PBMC) vaskes deretter [f.eks. i PBS+1 mM EDTA (Lonza)], resuspenderes i Cell Gro medium, og utplates i triple kolber (f.eks. NUNC, Roskilde, Danmark) ved 1×10^6 celler pr. cm^2 overflateareal. Etter to timer vaskes ikke-adherente celler med PBS (Lonza). Adherente monocytter dyrkes i 6 dager i Cell Gro medium med 20 ng/ml IL-4 (Gentaur) og 500 U/ml GM-CSF (Gentaur), friske cytokiner tilsettes på dag 3.

Umodne DC'er høstes på dag 6, og lastes med drepte tumorceller (f.eks. prostatacancer cellelinje, ovariecancer cellelinje, akutt lymfoblastisk leukemicellelinje). Nyttint, umodne DC'er (dag 3-6) føres med tumorceller ved fast DC:tumorcelleforhold på 5:1 i 4 timer. Forholdet mellom dendrittske celler og behandlede tumorceller er foretrukket innen et område mellom 1:1 opp til 10:1, mer foretrukket mellom omtrent 4:1 og 6:1.

Ifølge den foreliggende oppfinnelse kan dendrittske celler som er i forskjellige stadier av differensiering, maturasjon og/eller aktivering anvendes. Maturasjonsstadiet for de dendrittske cellene kan påvirkes ved maturasjonsfaktorer.

Tumorcellepulsede DC'er modnes deretter foretrukket ved 25 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C under over-natten inkubasjon og kryopreserveres og lagres i flytende nitrogen. Før administrering blir 1×10^7 modne DC'er pulset med tumorceller resuspendert i 0,9 % NaCl (Baxter) og injisert subkutan i det inguinale brakialområdet i løpet av 12 timer, foretrukket fra 30 minutter opp til 12 timer. Administrering av denne form for cancerimmunoterapi gjentas foretrukket med jevne intervaller på 2-6 uker for å kontinuerlig booste immunresponsen. Det antas at metoden som omtalt her forhindrer

reetablering av tumorindusert immuntoleranse. Den terapeutiske effektiviteten av denne form for immunoterapi er blitt dokumentert i pasienter med prostatacancer i distinkte kliniske stadier, biokjemiske tilbakefall av prostatacanceren, og kastreringsresistent metastatisk prostatacancer, antakelig også i metastatisk hormonsensitivt stadium.

Den ovenfor beskrevne foretrukne utførelsesform er imidlertid på ingen måte begrensende. Innenfor den bredeste rammen, kan oppfinnelsen gjennomføres på alternierende måte, avhengig av de spesifikke behovene for tumorbehandling. Den ovenfor identifiserte foretrukne utførelsesform beskriver oppfinnelsen, hvorved tumorcellene enten oppnås fra pasienten som skal behandles, eller fra tumorcellelinjer eller tumorcellelinjebanker. Dendritiske celler oppnås også foretrukket fra pasienten som skal behandles.

Mer generelt angår imidlertid den foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk preparat for å indusere en immunrespons mot tumorceller som omfatter:

- a) tumorceller som er apoptotiske, hvorved apoptose bevirkes ved behandling med hydrostatisk trykk, og
- b) dendritiske celler.

Det er et viktig aspekt ved den foreliggende oppfinnelse at tumorcellene som anvendes i det farmasøytiske preparat er apoptotiske celler, og ikke nekrotiske celler. Fagmannen på området er oppmerksom på forskjellene mellom apoptose versus nekrose. Celledød, og deretter post-mortem forandringer, kalt nekrose, er integrerte deler av normal utviklings- og maturasjonssyklus. Til tross for viktigheten av denne prosess, er mekanismen som ligger bak celledød fremdeles dårlig forstått, skjønt der er en rekke publikasjoner som vedrører mekanismene som skjer når en celle dør. Apoptose i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse skal forstås som en programmert, styrt form av celledød, hvorved nekrose er en ikke-ordnet og tilfeldig form av celledød.

I den foreliggende oppfinnelse skal apoptose forstås som en celledød måte som skjer under normale fysiologiske betingelser, og hvor cellen er en aktiv deltaker i sin egen avslutning. Celler som gjennomgår apoptose viser karakteristiske morfologiske og biokjemiske trekk. Disse trekk inkluderer kromatinaggregering, nukleær og cytoplasmisk kondensasjon, fordeling av cytoplasma og kjerne i membranbundne vesikler (apoptotiske legemer) som inneholder ribosomer, morfologisk intakte

mitokondrier, og kjermemateriale. Da disse apoptotiske legemer blir normalt gjenkjent og fagocyttert av enten makrofager eller nærliggende epitelceller in vivo, er det viktig at tumorcellene som anvendes i den foreliggende metode er så like som mulige til mulige apoptotiske tumorceller. Apoptose er vanligvis begrenset til individuelle celler, og fører ikke til inflammatoriske responser.

Nekrose skjer på den annen side når celler eksponeres for ekstreme fysiologiske betingelser som kan resultere i skade av plasmamembranen. Nekrose begynner med en svekkelse av cellenes evne til å opprettholde hemostase, som leder til innstrømming av vann og ekstracellulære ioner. Intracellulære organeller, særlig mitokondriene, og hele cellen sveller og brister. På grunn av den ultimate nedbryting av plasmamembranen blir det cytoplasmiske innhold som inkluderer lysosomale enzymer frigitt inn i det ekstracellulære fluid. Derfor er nekrotisk celledød in vivo ofte assosiert med omfattende vevsskade, som resulterer i en intens inflammatorisk respons. Det er viktig at tumorcellen som anvendes i de farmasøytiske preparater er apoptotiske, og ikke nekrotiske.

Ifølge den foreliggende oppfinnelse blir de apoptotiske cellene produsert ved behandling med høyt hydrostatisk trykk. Et høyt hydrostatisk trykk som forstått i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse, er definert som en trykkehøyde lik eller større enn 10 MPa [$1 \text{ MPa} = 10 \text{ bar} = 0,86923 \text{ atm} = 145,0377 \text{ psi}$]. Høyt hydrostatisk trykk kan produseres ved et utstyr som f.eks. er beskrevet i Weiss et al., Journal of Immunotoxicology, 2010, sidene 194-209, særlig i figur 1.

Høyt hydrostatisk trykkbehandling av tumorceller gjennomføres foretrukket i en trykkautoklav. Tumorcellen plasseres i passende kryogene rør som fylles fullstendig med cellesuspensjon, og som lukkes tett, hvorved tilsynekomsten av luftbobler må unngås. Etterpå forsegles rørene med en fleksibel film (f.eks. parafilm®), og de preparerte rørene plasseres i trykkammeret som fylles med et trykktransmitterende medium. Etterpå blir det høye trykket produsert med en passende anordning, og cellene holdes i en tilstrekkelig tid under slikt høyt trykk.

Det hydrostatiske høye trykk holdes i minst 10 minutter ved et trykk på minst 100 MPa. Tumorcellene opprettholdes i et tidsområde på 10 minutter til 2 timer, foretrukket 10 minutter til 1 time, og særlig foretrukket 10 til 30 minutter, ved et trykk som foretrukket er i området 200-300 MPa, mer foretrukket 200-250 MPa.

Tumorcellene for anvendelse i det farmasøytiske preparat kan avledes fra forskjellige kilder. I én særlig utførelsesform er tumorcellene avledet fra en primær tumor, eller fra en metastatisk tumor, fra pasienten som behandles. Tumorcellene kan oppnås ved biopsi eller kirurgi. Vevet disintegreres og separeres, og rensede tumorceller kan anvendes umiddelbart. Det er også foretrukket å etablere en cellelinje av den primære tumoren, og å anvende de således oppnådde celler for tumorvaksinasjon. Alternativt kan tumorcellene oppnås fra passende tumorcellelinjer. Slike tumorcellelinjer kan fremstilles fra den autologe tumor. Alternativt kan tumorceller anvendes som er kommersielt tilgjengelige fra deponeringsinstitusjoner, slik som f.eks. ATCC.

10

Den andre komponenten i det farmasøytiske preparatet er dendrittiske celler. Ifølge den foreliggende oppfinnelse kan dendrittiske celler i forskjellige stadier anvendes. Det er mulig å anvende enten dendrittiske celler som direkte er oppnådd fra pasienten ved å separere de dendrittiske cellene blodet. Det er imidlertid også mulig å ytterligere klassifisere de dendrittiske celler avhengig av deres stadium. I én utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse blir umodne dendrittiske celler differensiert fra perifert blodmonocyttene anvendt for fremstillingen av tumorvaksinen.

15

Det er kjent at der er tre hovedtyper av antigenpresenterende celler i de perifere lymfoide organer som kan aktivere T-celler, nemlig dendrittiske celler, makrofager og B-celler. Den sterkeste av disse er dendrittiske celler viss kjente funksjon er å presentere fremmede antigener for T-celler. Umodne dendrittiske celler er lokalisert i vev gjennom hele kroppen, som inkluderer hud, tarmkanal og respirasjonskanal. Dendrittiske celler eksisterer i to funksjonelt og fenotypisk distinkte stadier, umodne og modne dendrittiske celler. Umodne dendrittiske celler har en høy endocytisk aktivitet, er spesialisert i antigenfanging, og oppholder seg i perifere vev in vivo. Umodne dendrittiske celler spiller en avgjørende rolle ved induksjon og opprettholdelse av perifer toleranse. Ved eksponering overfor patogenavlede produkter eller naturlige pro-inflammatoriske signaler, mister dendrittiske celler deres fagocytiske aktivitet, og migrerer til drenerende lymfeknuter mens de blir modne dendrittiske celler. Modne dendrittiske celler har en høy antigenpresenterende evne, og T-cellestimulerende evne som skyldes ekspresjon av høye nivåer av antigenpresenterende, adhesjons- og ko-stimulerende molekyler, så vel som andre dendrittisk celledifferensierende markører, slik som CD83 og DC-LAMP.

20

25

30

35

De umodne dendrittiske celler for anvendelse i det farmasøytiske preparat kan oppnås fra forskjellige kilder. I en foretrukket utførelsesform blir de umodne dendrittiske celler

differensiert fra monocyttene til pasienten som skal behandles. Alternativt kan imidlertid de umodne dendritiske cellene oppnås fra andre kilder, slik som kommersielt tilgjengelige blodprodukter oppnådd fra blodsamlingsorganisasjoner.

5 For fremstillingen av et farmasøytisk preparat ifølge den foreliggende oppfinnelse, fremstilles passende umodne farmasøytiske celler. Dendritiske celler (DC'er) kan fremstilles ved forskjellige metoder, og kan utvise forskjellige egenskaper. I en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse blir dendritiske celler oppnådd fra monocytter isolert ved leukaferese.

10

DC'er omfatter mindre enn 1 % mononukleære celler i det perifere blod. Leukaferese kan anvendes for å isolere omtrent 10^6 til 10^7 dendritiske celler, og kan kombineres med positive eller negative seleksjonsteknikker. Mens den direkte isolasjon av dendritiske celler fra det perifere blod tillater rask fremstilling av dendritiske celler,

15 kan det være nødvendig med gjentatte leukafereser dersom multiple immuniseringer er nødvendig i en protokoll.

20

I en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse blir monocytter anriket fra leukaferese ved adherens på plastmateriale. De dendritiske cellene differensieres i nærvær av cytokiner, foretrukket en cocktail av forskjellige cytokiner, hvorved en granulocyttmakrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF) kombinert med interleukin 4 er foretrukket.

25

En særlig foretrukket metode for å fremstille dendritiske celler er å generere dem ex vivo. Monocytter er dendritiske celleforløpere som kan anrikes fra perifert blodmononukleære celler ved teknikker slik som leukaferese, plastadherens, densitetsgradientsentrifugering, positiv seleksjon av CD14+-celler, negativ seleksjon av B- og T-celler, og kombinasjoner derav. DC kan dyrkes og differensieres ved å behandle en anriket forløpercellepopulasjon i omtrent 3-7, foretrukket 7 dager med

30 cytokiner, særlig med granulocyttmakrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF) + interleukin 4 eller interleukin 13. En fordel med denne utførelsesform er at mer enn 10^9 DC kan fremstilles fra et enkelt leukafereseprodukt, og et slikt preparat kan anvendes for multiple ytterligere vaksinasjoner ved kryopreservering av DC-preparatet, foretrukket i flytende nitrogen. Mens DC'er kan dyrkes i en rekke medier,

35 er det foretrukket å anvende enten serumfrie medier, eller medier som inneholder autologt serum. For industriell fremstilling av det farmasøytiske preparat, er det særlig foretrukket å fremstille de umodne dendritiske celler i stor skala på en slik måte at

forekomst av anafylaktiske reaksjoner f.eks. skyldes føtalt kalveserum, eller kontamineringen av virus unngås.

I det neste trinn for fremstillingen av det farmasøytiske preparat, blir de umodne
 5 dendrittske celler lastet med de apoptotiske tumorcellene som er oppnådd ved
 behandling med høyt hydrostatisk trykk. I en foretrukket utførelsesform er de umodne
 dendrittske celler som er brakt i kontakt med passende tumorceller modnet ved å
 anvende en rekke stimuli, slik som tilsetning av tumornekrosefaktor α (TNF- α) eller
 lipopolysakkarid eller poly I:C.

10

Det oppnådde farmasøytiske preparat kan preserves for administrering, foretrukket
 ved kryopreservering. Kryopreserveringen av biologiske prøver er omfattende
 praktisert innen den kliniske medisin, og biomedisinsk forskning. Påvirkning av denne
 prosess på cellelevedyktighet og særlig funksjon, kan imidlertid noen ganger være
 15 undervurdert. Den anvendte metode med frysing av cellepreparatet før anvendelse i
 cancertvaksiner bør derfor vurderes med forsiktighet. Effekten av kryopreservering
 avhenger bestemt av de spesifikke cellene som anvendes, og det er blitt undersøkt om
 den biologiske aktiviteten til det farmasøytiske preparatet endres ved
 kryopreserveringen. Det kan være nødvendig å tilsette beskyttende komponenter, slik
 20 som ikke-immunogene polysakkarider eller DMSO.

Det farmasøytiske preparat ifølge oppfinnelsen kan administreres intravenøst (IV),
 intradermalt, subkuttant eller intralymfatisk, hvor subkuttant er særlig foretrukket.

25 Den optimale dosen og hyppigheten av immunisering på det farmasøytiske preparat
 avhenger av typen av tumor, alder og tilstand hos pasienten, og progresjonsstadiet til
 tumorsykdommen. I en foretrukket utførelsesform anvendes der først en
 immuniseringsdose av det farmasøytiske preparat, som kan oppfølges av
 langtidsadministrering av boosterinjeksjoner tilført ved intervaller som strekker seg fra
 30 2 til 8 uker.

Tumortvaksinasjon som beskrevet her, kan vellykket anvendes for alle former av
 tumorer. I foretrukne utførelsesformer er de farmasøytiske preparater for anvendelse i
 behandling av cancerpasienter som er i et sent stadium av cancer, men også i det
 35 tidlige stadium av cancer. I en særlig foretrukket utførelsesform anvendes
 tumortvaksinasjonen på pasienter på et sent stadium av prostatacancer, med
 hormonbehandlingsresistent metastatisk prostatacancer. Under "tidlig stadium av

cancer” skal slike cancerformer forstås hvor diagnose er mulig. Ofte viser pasienten ikke noen tegn på sykdommen. I “sene stadier av cancer” lider pasienten ofte av alvorlige konsekvenser av sykdommen, slik som smerte eller svakhet.

5 Skjønt det er kjent innen teknikken å anvende adjuvansmidler ved tumorterapivaksinasjon, er det under den foreliggende oppfinnelse foretrukket å ikke anvende noen ytterligere adjuvans, slik som lipopolysakkarid, ufullstendig Friends adjuvans, eller varmesjokkproteiner.

10 Det er et viktig aspekt ved den foreliggende oppfinnelse at tumorceller behandlet med høyt hydrostatisk trykk er i en slik tilstand at de ikke kan vokse og danne en metastatisk tumor etter tilførsel til pasienten. Dette er blitt bevist med en rekke eksperimentelle forsøk som inkluderer klonogene analyser.

15 Det farmasøytiske preparat som beskrevet her, kan anvendes for behandlingen av et menneske ved hjelp av cancerimmunterapi (vaksinasjon). Tumorceller som kan avledes fra en pasient som skal behandles, bringes til et apoptotisk stadium med høyt hydrostatisk trykkbehandling, som beskrevet ovenfor. Alternativt anvendes passende tumorcellelinjer. Umodne dendritiske celler oppnås foretrukket ved leukaferese fra
20 den samme pasienten, og celler dyrkes ex vivo ved behandling med cytokiner. En passende mengde slike umodne dendritiske celler (f.eks. 10^7 - 10^8 celler) lastes med de apoptotiske tumorcellene hvorved det optimale området av umodne dendritiske celler: apoptotiske tumorceller er 10:1 til 1:1, foretrukket 5:1 til 3:1.

25 Etter maturasjon av de dendritiske cellene, kan det farmasøytiske preparat tilføres pasienten. Dendritiske celler som har fanget tumorceller drept ved høyt hydrostatisk trykk, kan anvendes direkte for tumorvaksinasjon. Det er imidlertid mulig å ytterligere aktivere eller modne cellene, f.eks. ved behandling med cytokiner for administrering til pasienten.

30 Ifølge den foreliggende oppfinnelse blir de følgende materialer og metoder foretrukket anvendt:

35 Det har blitt vist at en behandling av ovarie- og prostatacancer celler og akutt lymfoblastisk leukemiceller i 10 minutter med høyt hydrostatisk trykk (200 MPa) ved omtrent 21°C fører til induksjonen av immunogen celledød av tumorceller. Tumorceller drept ved HHP (høyt hydrostatisk trykk) er immunogene i mye større grad enn

tumorceller drept ved antracykliner, det eneste cytostatikum som er kjent til å indusere immunogen celledød, eller ved UV-bestråling. HHP-drepte immunogene celler fagocytoseres voldsomt ved antigenpresenterende celler, og induserer deres maturasjon, selv i fravær av ytterligere patogendrevne stimuli, slik som LPS.

5 Antigenpresenterende celler lastet med HHP-drepte tumorceller induserer en robust CD4- og CD8-mediert tumorspesifikk T-cellerespons, og induserer ikke potensielle skadelige regulerende T-celler. HHP-drepte tumorceller representerer således et kraftig verktøy i forbindelse med kliniske cancerimmunoterapier.

10 Til tross for den kontinuerlige introduksjonen av nye legemidler og ytterligere forbedringer av kjemoterapiprotokoller, er det sannsynlig at, på et visst punkt, vil kjemoterapien nå sine grenser, og klinisk effekt vil utjevne seg. Dessuten, til tross for den unektelige suksess ved behandling av noen maligniteter, er, ved noen tumorer, særlig faste tumorer, kjemoterapi sjelden helbredende. En kombinasjon av
15 behandlingsmodaliteter er blitt en standard strategi for cancerbehandling, hvor kombinasjonen av kirurgi sammen med kjemoterapi eller radioterapi er et klassisk eksempel. Man bør gjøre forsøk på ikke bare å designe moderne immunoterapeutiske strategier, men også å innlemme immunoterapitilnærmingsmåter i nåværende kjemoterapiprotokoller. Kjemoterapi og immunoterapi bør heretter ikke betraktes som
20 antagonistiske terapiformer, og det er mulig at deres rasjonelle kombinasjon vil i alt vesentlig forbedre prognosen til cancerpasienter.

Foretrukne cellelinjer: Akutt lymfoblastisk leukemicellelinjer (REH, DSMZ, Braunschweig, Tyskland), ovariecancerceller (OV90, ATCC, Teddington, UK),
25 prostatacancerceller (LNCap, ATCC, Teddington, UK) ble anvendt. Alle cellelinjer ble dyrket i RPMI 1640 medium (Gibco). Alle medier var supplert med 10 % varmeinaktivert føtalt bovint serum (Lonza), 100 U/ml penicillin og 2 mmol/L L-glutamin.

30 Isolering av primære tumorceller: Primære ovarie- og prostatacancerceller ble oppnådd fra pasienter som gjennomgikk kirurgi. Leukemi blaster fra pasienter med akutt lymfoblastisk leukemi ble oppnådd fra benmarg (ALL) til pasienter ved hjelp av gradientsentrifugering på Ficoll-gradient.

35 Apoptoseinduksjon og deteksjon: Tumorcelledød ble indusert ved 10 minutters behandling med høyt hydrostatisk trykk. For sammenlikningstester ble tumorcelledød indusert ved UV-lyseksponering. I dette tilfellet ble en energi på 7,6 J/cm² tilført i 10

minutter. Celledød ble vurdert ved anneksin V fluoresceinisotiocyanatfarging. Kort ble 2×10^5 celler pr. prøve samlet, vasket i PBS, pelletert og resuspendert i en inkubasjonsbuffer som inneholdt anneksin V fluoresceinisotiocyanatantistoff. Prøvene ble holdt i mørket, og inkubert i 15 minutter før tilsetning av ytterligere 400 μ l 0,1 % propidiumjodidinkubasjonsbuffer, og påfølgende analyse på en Aria fluorescensaktivert cellesorterer (BD Bioscience) ved anvendelse av FlowJo software.

Flowcytometrianalyser av hsp70, hsp90 og CRT (kalsretikulin) på celleoverflaten: En total på 10^5 celler ble utplatet i 12-brønns plater, og behandlet den etterfølgende dag med de indikerte midler, eller hvor, som en kontroll, UV-bestråling ($7,6 \text{ J/cm}^2$) i 6, 12 eller 24 timer, eller ble behandlet i 10 minutter med høyt hydrostatisk trykk ved 21°C . Cellene ble samlet og vasket to ganger med PBS. Cellene ble inkubert i 30 minutter med primært antistoff fortynnet i kald blokkeringsbuffer (2 % føtalt bovint serum i PBS), etterfulgt av vasking og inkubasjon med Alexa 648-konjugert monoklonalt sekundært antistoff i en blokkeringsoppløsning. Hver prøve ble deretter analysert ved FACScan (BD Bioscience) for å identifisere celleoverflate hsp70, hsp90 og CRT.

Deteksjon av HMGB1-frigivelse: HMGB1-enzymbundet immunosorbent assay II kit ble oppnådd fra SHINO-TEST CORPORATION (Tokyo, Japan). REH-celler, OV90-celler, LNCap-celler, primære ovarieceller og leukemiblaste (10^6) ble utplatet i 1 ml fullmedium, som er passende for celletypen. Supernatanter ble samlet på forskjellige tidspunkter, døende tumorceller ble fjernet ved sentrifugering, og supernatantene ble isolert og frosset umiddelbart. Kvantifisering av HMGB1 i supernatantene ble vurdert ved enzyumbundet immunosorbent assay i henhold til produsentes instruksjoner.

Fluorescensmikroskopi: Immunfluorescens: For overflatedeteksjon av CRT, ble cellene plassert på is, vasket to ganger med PBS, og fiksert i 0,25 % paraformaldehyd i PBS i 5 minutter. Cellene ble deretter vasket to ganger i PBS, og et primært antistoff fortynnet i kald blokkeringsbuffer ble tilsatt i 30 minutter. Etter to vaskinger i kald PBS, ble cellene inkubert i 30 minutter med det passende Alexa 648-konjugerte sekundære antistoff. Cellene ble fiksert med 4 % paraformaldehyd i 20 minutter, vasket i PBS i 20 minutter, og anbrakt på preparatglass.

For fagocytose ble DC'ene farget med Vybrant® DiO-cellemerkingsløsning (Invitrogen). Tumorcellene ble farget med Vybrant® Dil-cellemerkingsløsning (Invitrogen) og dyrket i nærvær av antrasyklin, UV-lyseksponering, eller 10 minutters behandling med høyt hydrostatisk trykk ved 21°C . Umodne DC'er (dag 5) ble tilført tumorceller ved et

DC/tumorcelleforhold på 1,5. Cellene ble fiksert med 4 % paraformaldehyd i 20 minutter, vasket i PBS i 20 minutter, og anbrakt på preparatglass med ProLong Gold antifadereagens (Invitrogen).

5 Dannelsen av tumorlastede DC'er og induksjon av tumorcelledød: DC'er ble dannet ved dyrking av rensede CD14⁺-celler og isolert fra buffy coats i nærvær av granulocyt-makrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF) (Gentaur, Brussel, Belgia) og interleukin-4 (IL-4) (Gentaur, Brussel, Belgia). Tumorceller ble drept ved 10 minutters behandling med høyt hydrostatisk trykk ved 21°C, eller, som kontroller, ved UV-bestråling eller ved antrasykliner. Omfanget av apoptose ble målt ved anneksin V/PI-farging. Cellene ble omfattende vasket før tilførsel til DC'er. Umodne DC'er (dag 5) fikk tilført tumorceller ved et DC/tumorcelleforhold på 1:5. I noen forsøk ble pulsede DC'er stimulert med 100 ng/ml lipopolysakkarid (LPS) (Sigma) i 12 timer eller 25 µg/ml av Poly I:C (oppnådd fra Invivogen).

15 FACS-analyse av DC fenotype etter interaksjon med drepte tumorceller: Fenotypen av DC'er dyrket med tumorceller ble målt ved flow cytometri. Tumorceller ble drept ved et valgt cytostatisk middel eller UV-bestråling (sammenlikningseksempler) eller 10 minutters behandling med et høyt hydrostatisk trykk ved 21°C (ifølge den foreliggende oppfinnelse) og ble kodyrket i 24 timer med umodne DC'er. For noen forsøk ble DC'er og tumorceller fargemerket før ko-dyrking for å måle fagocytose. Monoklonale antistoffer (mAb'er) mot de etterfølgende molekyler ble anvendt: CD80-FITC, CD83-FITC, CD86-PE, CD14-PE (Immunotech, Marseille, Frankrike), CD11c-PE, HLA-DR (BD Biosciences, San Jose, CA).

25 DC'ene ble farget i 30 minutter ved 4°C, vasket to ganger i fosfatbufret saltvann (PBS), og analysert ved å anvende FACS Aria (BD Biosciences) ved å anvende FlowJo software. DC'ene ble "gated" i henhold til FSC- og SSC-egenskapene. De passende isotypekontrollene ble inkludert, og 50000 levedyktige DC'er ble oppnådd for hvert forsøk.

35 Evaluering av IFN-γ-produserende tumorspesifikke T-celler: Ikke-pulsede eller tumorcellelastede DC'er ble tilsatt til autologe T-celler i et forhold på 1:10 på dag 0 og 7 av dyrking. IL-2 (25-50 internasjonale enheter/mL; PeproTech) ble tilsatt på dagene 2 og 7 av dyrking. Kulturene ble testet for nærvær av tumorspesifikke T-celler 7 til 9 dager etter siste stimulering med DC'er. Induksjonen av tumorreaktive, interferon (IFN)-γ-produserende T-celler av prostataspesifikt antigen (PSA) reaktivt overfor T-

celler ved tumorlastede DC'er ble bestemt ved flow cytometri. T-cellene ble farget med anti-human CD8/IFN- γ . Hyppighet av regulerende T-lymfocytter i kulturen ble analysert ved farging med CD4/CD25 og FoxP3. Regulerende T-celler ble identifisert ved flow cytometri som CD4-positive, CD25-positive, og FoxP3-positive.

5

Oppfinnelsen og resultatene oppnådd ved forsøkene er illustrert i figurene:

Figur 1

Den skjematiske tegning viser hvordan et farmasøytisk preparat ifølge oppfinnelsen kan oppnås. Tumorceller oppnådd fra enten pasienten eller fra cellelinjene behandles med høyt trykk, hvorved cellene blir apoptotiske.

10

Dendritiske celler isoleres via leukaferese. Umodne dendritiske celler og apoptotiske tumorceller kombineres, hvorved de modne dendritiske celler produseres som kan anvendes som vaksine.

15

Figur 2

Høyt hydrostatisk trykk induserer ekspresjonen av varmesjokkproteiner på tumorceller. Oppsummeringen av totalt fem forsøk er vist. **P*-verdi for sammenlikning med bestrålte tumorceller, $P < 0,05$. Den tidsavhengige ekspresjonen av markørene HSP70, HSP90 og kalretikulin på to tumorcellelinjer (OV90 og LNCap) bevirket ved ulike behandlinger er vist.

20

Figur 3

Høyt hydrostatisk trykk induserer fritivelse av HMGB1 (høy-mobilitetgruppe protein B1) fra behandlede tumorceller (OV90 og LNCap). HMGB1 er en cytokinmediator for inflammasjon. Oppsummering av totalt fem forsøk er vist. **P*-verdi for sammenlikning med bestrålte tumorceller, $P < 0,05$. Figur 3 viser at når det gjelder den tidsavhengige frigivelse av HMGB1 er HHP-behandlingen mye mer effektiv enn andre konvensjonelle behandlinger.

25

30

Figur 4

Kinetikken for fagocytose av høyt hydrostatisk trykkbehandlede tumorceller ved umodne DC'er. Oppsummering av fem uavhengige forsøk og representative resultater er vist. I forsøket ble enten OV90 eller LNCap tumorceller anvendt. HHP-behandling er sammenliknet med UV-behandling ved 0°C og 37°C.

35

Figur 5

Fenotypen av dendrittiske celler basert på markørene OD86 og HLA-DR etter interaksjon med høyt hydrostatisk trykkdrepte tumorceller (OV90 og LNCap) er vist. Dag 5 umodne DC'er ble dyrket i 24 timer med tumorceller drept ved HHP eller bestråling. Etter 24 timer, ble ekspresjonen av maturasjonsassosierte molekyler på DC'er analysert ved flow cytometri. LPS ble anvendt som kontroll. Gjennomsnittlig fluorescensintensitet (MFI) er vist. **P*-verdi for sammenlikning med bestrålt tumorcellelastede DC'er, *P* < 0,05.

Figur 6

Induksjonen av tumorspesifikke T-celler ved dendrittiske celler lastet med hydrostatisk trykkdrepte tumorceller (LNCap og OV90) sammenliknes med dendrittiske celler lastet med tumorcellerdrept UV-bestråling. Dataene viser en oppsummering av fem uavhengige forsøk. **P*-verdi for sammenlikning med bestrålte tumorceller, *P* < 0,05.

Figur 7

Figur 7 viser overlegenheten av behandlingen av tumorceller med høyt hydrostatisk trykk (HHP) sammenliknet med tumorceller drept ved UV-bestråling (UV irr). Testene er blitt gjennomført med prostatacancercellelinje (LNCap) og med ovariecancercellelinje (OV90). Kontroller er blitt gjennomført med dendrittiske celler alene, og celler stimulert med Poly I:C.

Resultatene oppsummert i figur 7 viser induksjonen av prostataspesifikt antigen (PSA)-spesifikke T-celler ved dendrittiske celler lastet med høyt hydrostatisk trykkdrepte tumorceller (henholdsvis LNCap og OV90). En sammenlikning ble gjort mellom høyt hydrostatisk trykkdrepte tumorceller alene, og dendrittiske celler lastet med tumorceller drept ved UV-bestråling. Dataene presentert i figur 7 viser en oppsummering av fem uavhengige forsøk. **P*-verdi for sammenlikning med bestrålte tumorceller, *P* < 0,05. Figur 7 oppsummerer resultatene oppnådd i eksempel 7.

Figur 8

Induksjon av regulerende T-celler ved høyt hydrostatisk trykkdrepte tumorceller er sammenliknet med induksjonen av Tregs ved UV-bestrålte tumorceller. Dataene viser en oppsummering av fem uavhengige forsøk.

Forsøkene oppsummert i figur 8 viser at læren ifølge den foreliggende oppfinnelse kan anvendes på forskjellige typer av tumorer. Den øvre del av figur 8 viser forsøkene

gjennomført på ovariecancer celler (OV90). Den nedre delen viser forsøkene gjennomført med prostatacancer celler (LNCap). I forsøkene er konsentrasjonen av Fox P3 (Forkhead Box P3) blitt bestemt for ytterligere å differensiere de regulerende T-celler (Tregs). Forsøkene viser at tumorceller behandlet i henhold til oppfinnelsen med HHP faktisk induserer lavere antall regulerende T-celler enn UV-bestrålte tumorceller.

Figur 9

Resultatene av en in vivo studie er vist, hvor pasienter ble behandlet med en tumorvaksinasjon som omtalt her. Alle pasienter hadde radikal prostatektomi eller radioterapi. Som relevant parameter er PSA-fordoblingstiden bestemt. I henhold til Antonarakis et al., BJU Int. 2011, **108(3)**, s. 378-385, er PSA-fordoblingstiden den sterkeste determinanten av metastasefri overlevelsestid og total overlevelsestid for pasienter med prostataspesifikt antigen (PSA)-tilbakevendende prostatacancer. PSA-fordoblingstid betyr tidsforskjellen hvor PSA-verdien er fordoblet. Desto høyere PSA-fordoblingstiden er, desto bedre er overlevelsesmuligheten for den behandlede pasient. Ved å anvende tumorvaksinasjonen ifølge foreliggende oppfinnelse, kunne PSA-fordoblingstiden forlenges vesentlig.

**P*-verdi for sammenlikning med bestrålte tumorceller, $P < 0,05$.

Figur 10

Figur 10 er en Kaplan-Meier overlevelseskurve for pasienter med et sent stadium av prostatacancer som ble behandlet ifølge den foreliggende oppfinnelse.

I Kaplan-Meier overlevelseskurven bevirket hvert dødsfall av en pasient et fall hvor prosent overlevelse startet fra 100 % til lavere verdier. Halabi-nomogrammet er den normale forventede reduksjon av overlevelse, hvorved medium overlevelsestid er 12 måneder.

Den aktive cancerimmunoterapien ved anvendelse av cancervaksine som beskrevet her, resulterer i en forlengelse av medium overlevelsestid til 23 måneder

Den foreliggende oppfinnelse er videre illustrert ved hjelp av de etterfølgende eksempler som imidlertid ikke er begrensende:

Eksempel 1

Ekspresjon av immunogene celledødmærker hsp70, hsp90 og kalretikulin ved humane cancercellelinjer og humane primære tumorceller etter behandling med høyt hydrostatisk trykk

Leukemi-, ovarie- og prostatacancercellelinjer og primære tumorceller ble behandlet i 10 minutter med høyt hydrostatisk trykk (HHP, 200 MPa) ved 21°C, og ekspresjonen av de kjente immunogene celledødmærkene hsp70, hsp90 og kalretikulin ble målt ved 6, 12 og 24 timer. Signifikant ekspresjon av kalretikulin, hsp70 og hsp90 ble detektert 6, 12 og 24 timer etter HHP-behandling, for alle de testede tumormodellene. Ekspresjonen av immunogene molekyler var signifikant høyere enn ekspresjonen induert ved antrasykliner, de eneste kjente induksjonsmidler av immunogen celledød (figur 2). Økt ekspresjon av kalretikulin og varmesjokkproteiner etter HHP-behandling ble forbundet med deres translokasjon til celleoverflaten. HHP-behandling induerte også en rask og vesentlig frigivelse av HMGB1, en oppløselig markør for immunogen celledød. Frigivelse av HMGB1 var mye høyere enn i tilfellet av UV-bestråling eller antrasykliner (figur 3).

Maksimal frigivelse av HMGB1 nukleære protein ble detektert 48 timer etter induksjon av tumorcelledød.

Eksempel 2

Behandling av tumorceller ved høyt hydrostatisk trykk øker deres fagocytose ved antigenpresenterende celler

Sett på bakgrunn av den etablerte rollen til kalretikulin som et "eat me" signal, ble raten for fagocytose av tumorceller drept ved høyt hydrostatisk trykk ved hjelp av dendritiske celler (DC'er) undersøkt, de mest effektive antigenpresenterende celler som er avgjørende for initieringen av en immunrespons. Høyt hydrostatisk trykkbehandlede tumorceller ble fagocytosert ved en hurtigere rate, og i et større omfang enn tumorcellene drept ved andre modaliteter, slik som antrasykliner eller UV-bestråling. Etter 12 timer var omfanget av fagocytose av leukemiceller behandlet med HHP 4 ganger høyere enn til celler drept ved UV-bestråling (figurer 4a og 4b).

Eksempel 3

Fagocytose av høyt hydrostatisk trykkbehandlede tumorceller induserer maturasjonen av DC'er

Evnen hos DC'er til å aktivere immunresponsen avhenger av deres aktiveringsstatus og ekspresjonen av ko-stimulerende molekyler. Under normale tilfeller er den mest effektive maturasjon av DC'er induert ved molekyler avledet fra patogener, slik som

lipopolysakkarider (LPS) fra Gram negative bakterier. Kun aktiverte (modne) DC'er som uttrykker høye nivåer av ko-stimulerende molekyler, kan inhibere immunresponsen. Vi analyserte fenotypen av DC'er som fagocytoserte tumorceller drept ved HHP. Interaksjonen av DC'er med HHP-behandlede tumorceller induserte oppreguleringen av ko-stimulerende molekyler (CD86, Cd83) og maturasjonsassosierte molekyler (HLA-DR) i et tilsvarende omfang som aktivering ved LPS (figur 5). Således kan tumorceller drept ved HHP indusere DC-maturasjon som sammenliknbar med patogenavledet LPS.

10 **Eksempel 4**

DC'er som presenterer høyt hydrostatisk trykkbehandlede tumorceller induserer tumorspesifikke T-celler, og induserer et lavt antall inhiberende regulerende T-celler

For å undersøke om tumorceller behandlet med HHP og som uttrykker immunogene celledødmærker induserer anti-tumorimmunitet, evaluerte vi evnen hos tumorcellelastede DC'er til å aktivere tumorspesifikke T-celleresponser. Tumorceller drept ved HHP ble ko-dyrket med umodne DC'er med eller uten påfølgende maturasjon ved LPS. Disse DC'er ble deretter anvendt som stimulatorer av autologe T-celler, og hyppigheten av IFN- γ -produserende T-celler ble analysert én uke senere etter restimulering med tumorcellelastede DC'er. DC'er pulset med HHP drepte tumorceller induserte et større antall tumorspesifikke IFN- γ -produserende T-celler sammenliknet med DC'er pulset med bestrålte celler, selv i fravær av ytterligere maturasjonsstimulus (LPS).

I tillegg ble hyppigheten av regulerende T-celler (Tregs) indusert i DC og T-celleko-kulturer også testet. Induksjon av Tregs er uønsket i tilfellet av tumorimmunoterapi, da Tregs inhiberer immunresponsen rettet mot tumoren. DC'er pulset med tumorceller drept ved HHP hadde en lavere kapasitet til å ekspandere regulerende T-celler når sammenliknet med både umodne DC'er og LPS-aktiverede DC'er (figur 8). FoxP3 overflatemarkøren er spesifikk for regulerende T-celler.

Eksempel 5

Aktiv cellulær immunoterapi kan administreres som en enkelt behandlingsmodalitet i tilfellet av minimal residual sykdom etter primær behandling av tumoren ved kirurgi eller radioterapi. Ved prostatacancer kan det vedrøre pasienter med tegn på biokjemisk tilbakefall (økte nivåer av prostataspesifikt antigen PSA i det perifere blod målt ved ultrasensitiv metode).

De beste resultatene i forbindelse med den foreliggende oppfinnelse kan oppnås når den primære tumoren er fjernet fra pasienten ved kirurgi. Det farmasøytiske preparatet som beskrevet i den foreliggende søknad kan fremstilles fra tumorcellene
5 som er blitt isolert fra tumorvevet eller fra tumorcellelinjene.

En pasient (68 år gammel) som led av prostatacancer ble diagnostisert på et tidlig stadium av tumorutviklingen. Tumoren ble fjernet, men noen få måneder etter kirurgi ble økte nivåer av PSA detektert. Pasienten gjennomgikk således leukaferese, og
10 umodne dendritiske celler ble differensiert fra isolerte monocytter. Tumorceller fra prostatacancerellelinjen ble gjort apoptotiske ved behandling med høyt hydrostatisk trykk som beskrevet her, og de apoptotiske tumorcellene brakt i kontakt med de umodne dendritiske celler for å fremstille vaksinepreparatet.

15 Det farmasøytiske preparatet ble oppdelt i prøver som ble frosset i flytende nitrogen inntil bruk. Den første tilførsel av tumorvaksinasjonen skjedde fire uker etter deteksjonen av biokjemisk tilbakefall av prostatacanceren. Boosterapplikasjoner fulgte hver fjerde uke i en periode på ett år.

20 Vaksinasjon induserte en immunrespons mot det lille antall overlevende tumorceller som har ført til en vesentlig avtakende ny vekst av tumorceller, som resulterte i forlengelse av overlevelsen til pasienten.

Eksempel 6

25 I pasienter med fremskreden cancer bør aktivert cellulær immunoterapi kombineres med kjemoterapi (dvs. dosetaksel ved prostatacancer) i forhold til konseptet for kjemoimmunoterapi.

En pasient (76 år gammel) som lider av fremskreden prostatacancer ble behandlet i
30 henhold til den foreliggende oppfinnelse. Den vanlige kjemoterapi ble kombinert med aktiv cellulær immunoterapi som omtalt her. Pasienten er blitt behandlet ved en alder på 65 år med prostatatumor. Etter fjerning av tumoren ved kirurgi og hormonbehandling, ble PSA-nivået (prostata spesifikt antigen) holdt ved et lavt nivå, som viser at prostatacancercellene ikke vokste. Etter 12 måneders hormonterapi,
35 utviklet det seg metastatisk prostatacancer forskjellige steder i kroppen (særlig i ben) og tumoren ble hormonrefraktær. Pasienten ble godkjent for behandling med

hormonrefraktær prostatacancer med dosetaksel i kombinasjon med aktiv cellulær immunoterapi basert på dendrittiske celler.

5 Før kjemoterapien startet, ble umodne dendrittiske celler dannet fra monocytter oppnådd under leukaferese. Tumorceller fra prostatacancer cellelinjer ble behandlet med hydrostatisk trykk i 30 minutter ved et trykk på 210 MPa ved 21°C. 10⁹ tumorceller behandlet i henhold til den foreliggende oppfinnelse ble anvendt ved å pulse de 10⁹ umodne dendrittiske celler, og prøver av modne dendrittiske celler som tidligere er blitt pulset med disse tumorceller ble dypfrys i flytende nitrogen anvendt
10 for senere applikasjoner.

Aktiv cancerimmunoterapi ble administrert hver fjerde til sjette uke i alternerende sykluser, med standard kjemoterapi ved dosetaksel og alene (etter endt dosetakselbehandling) i en periode på ett år. Kombinert kjemoimmunoterapi førte til
15 stabilisering av sykdommen, intensiteten av benmargsmetastaser og lengre enn forventet overlevelse. Pasienten har nå overlevd i over tre år, sammenliknet med den forventede overlevelse på seks måneder på begynnelsen av terapien.

Eksempel 7

20 In vitro forsøk som viser overlegenheten av HHP-drepte tumorceller versus UV-drepte tumorceller

I in vitro forsøkene ble evnen hos umodne dendrittiske celler, poly I:C aktiverte modne dendrittiske celler, og dendrittiske celler lastet med tumorceller som var enten HHP-behandlet eller UV-bestrålt, undersøkt med hensyn til deres evne til å indusere
25 tumorspesifikk immunitet. Tumorspesifikk immunitet ble målt som prosent tumorspesifikke T-cellelymfocytter.

Dendrittiske celler med HHP-drepte tumorceller ble direkte sammenliknet med HHP-drepte tumorceller alene, og dendrittiske celler lastet med tumorceller drept ved UV-bestråling. Resultatene fra forsøkene er vist i figur 7.
30

For å teste evnen til å indusere tumorspesifikke T-celler, ble upulsede eller lastet med tumorceller dendrittiske celler tilsatt til autologe T-celler i et forhold på 1:10 på dag 0 og 7 av dyrking. 25-50 internasjonale enheter/ml av IL2 (PeproTech) ble tilsatt på
35 dager 2 og 7 av dyrkingen. Kulturene ble testet for tilstedeværelse av tumorspesifikke T-celler 7-9 dager etter den siste stimuleringen med DC'er. Induksjonen av tumorreaktive, interferon (IFN)- γ -produserende T-celler av prostataspesifikt antigen

(PSA) reaktive T-celler ved tumorlastede DC'er ble bestemt ved flow cytometri. T-cellene ble farget med anti-human CD8/IFN- γ .

Induksjonen av prostataspesifikt antigen (PSA)-spesifikke T-celler ved dendritiske celler ble lastet med høyt hydrostatisk trykkdrepte tumorceller (LNCap) sammenliknet med høyt hydrostatisk trykkdrepte tumorceller alene, og med dendritiske celler lastet med tumorceller drept ved UV-bestråling.

Resultatene fra forsøkene er vist i figur 7. Den øvre del av figur 7 viser at DC'er lastet med HHP-drepte tumorceller kan indusere tumorspesifikke T-celler selv i fravær av et maturasjonssignal. DC'er lastet med tumorceller drept ved UV-behandling eller HHP-drepte tumorceller alene induserer ikke tumorimmunitet. Det er overraskende at kun HHP-behandlede tumorceller (ifølge oppfinnelsen) og umodne dendritiske celler kan indusere tumorspesifikke immunrespons, mens dette resultatet ikke kan oppnås ved UV-behandlede tumorceller og umodne dendritiske celler. Uten at man ønsker å være bundet av en teori, synes det som om kun HHP-behandlede tumorceller kan, sammen med umodne dendritiske celler, indusere den tumorspesifikke T-celleresponsen. De HHP-behandlede tumorceller synes å virke som en type av aktivator for de umodne dendritiske celler, mens UV-behandlede tumorceller ikke har denne effekt.

20

Den nedre del av figur 7 viser at når Poly I:C-behandling anvendes, kan de behandlede HHP-tumorcellene bedre indusere spesifikke T-cellelymfocytter enn tumorcellene bestrålt med UV.

25

Eksempel 8

In vivo data oppnådd med tumorvaksinasjon ifølge den foreliggende oppfinnelse

30

Dendritiske celler ble oppnådd fra en gruppe pasienter tilsvarende dem som er beskrevet ovenfor. De dendritiske cellene ble pulset med drepte tumorceller som beskrevet ovenfor, og tumorvaksinasjonen ble gjentakende administrert i opptil 12 doser i 4-6 ukers intervaller til pasienter med et biokjemisk tilbakefall av prostatacancer etter radikal prostatektomi eller radioterapi. Progresjonen av sykdommen i hver enkelt pasient hadde blitt evaluert ved PSA-fordoblingstiden. Under PSA-fordoblingstiden er tidsperioden som forstås som den som er nødvendig for at PSA-verdien fordobler seg. PSA-fordoblingstiden er vist som den sterkeste og mest pålitelige determinanten av den totale overlevelse og den metastasefrie overlevelse hos menn med prostatacancer. Kort PSA-fordoblingstid korrelerer med en kort

35

overlevelse, og med kortere tid til metastaseforekomst (Antonarakis et al., BJU Int., 2012, **108(3)**, sidene 378-385.

5 Som vist i figur 9 førte den kontinuerlige administreringen av tumorvaksinasjonen ifølge den foreliggende oppfinnelse pasienter med biokjemisk tilbakefall av
prostatacancer etter radikal prostatektomi eller radioterapi til en signifikant forlengelse av PSA-fordoblingstiden. Det har blitt funnet at ved å anvende tumorvaksinasjonen som beskrevet her, øker gjennomsnittlig PSA-fordoblingstid fra 5 måneder før
10 initieringen av cancerimmunoterapi til 30 måneder etter 12 måneders immunoterapi. Dette representerer en signifikant fordel hos pasienter med biokjemisk tilbakefall av prostatacanceren.

Eksempel 9

Klinisk forsøk med pasienter i sent stadium av prostatacancer

15 I dette kliniske forsøk ble dendritiske celler pulset med drepte tumorceller som beskrevet her. Tumorvaksinasjonen ble administrert gjentatte ganger til pasienter på et sent stadium av prostatacancer. De nevnte pasienter led av kastreringsresistent metastatisk prostatacancer. I disse pasienter ble cancerimmunoterapi administrert i
alternierende doser med dosetakselkemoterapi.

20

Overlevelsen av den behandlede gruppe ble sammenliknet med den historiske gruppen, eller med overlevelsen estimert av Halabi-nomogram. Det er blitt vist at den kontinuerlige administreringen av aktiv cancerimmunoterapi signifikant forlenger overlevelsestiden til behandlede pasienter (middels overlevelse på 23 måneder)
25 sammenliknet med gruppen av historiske kontroller basert på den forventede overlevelsen beregnet av Halabi-nomogram (13 måneder).

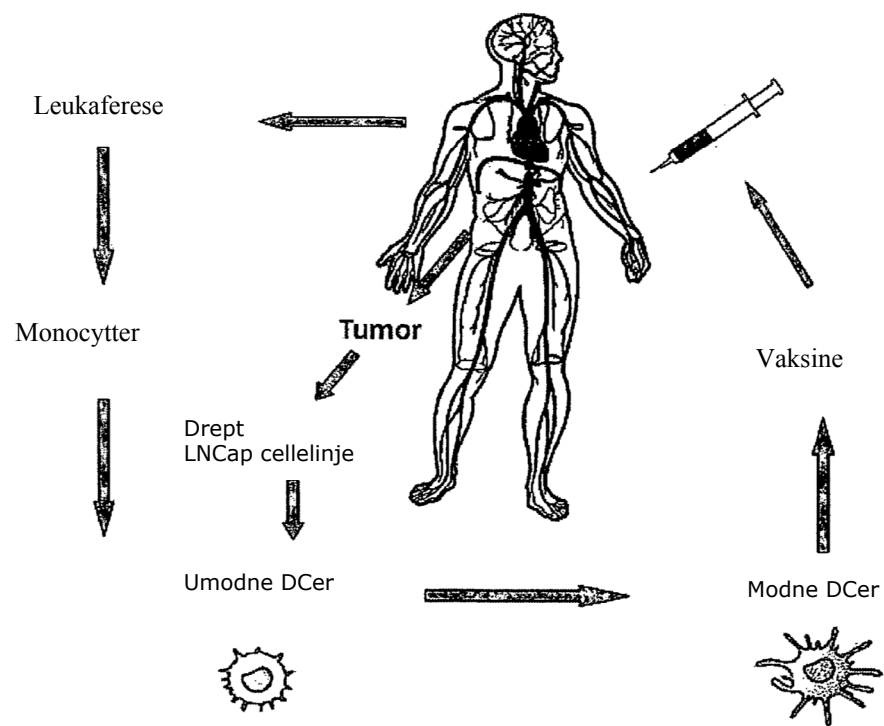
Dette forsøk viser at tumorvaksinasjonen ifølge den foreliggende oppfinnelse vesentlig forlenger overlevelsestiden hos pasienter som er i et sent stadium av prostatacancer.
30 Den gjennomsnittlige forventede overlevelse hos slike pasienter er 13 måneder uten behandling, sammenliknet med 23 måneder etter behandling med tumorvaksinasjon ifølge den foreliggende oppfinnelse. Dette representerer en vesentlig forbedring for slike pasienter som det er ekstremt vanskelig å medisinere på en vellykket måte.

PATENTKRAV

1. Farmasøytisk preparat for å indusere immunrespons mot tumorceller som omfatter
 - 5 a) tumorceller som er apoptotiske bevirket ved behandling med høyt hydrostatisk trykk som er lik eller større enn 100 MPa i 10 minutter til 2 timer, og
 - b) dendrittiske celler.
2. Farmasøytisk preparat ifølge krav 1,
 - 10 k a r a k t e r i s e r t v e d at tumorcellene ble behandlet med hydrostatisk trykk i minst 10 minutter ved et trykk på minst 200 MPa.
3. Farmasøytisk preparat ifølge krav 1,
 - 15 k a r a k t e r i s e r t v e d at tumorcellene ble behandlet med hydrostatisk trykk ved 200-300 MPa.
4. Farmasøytisk preparat ifølge hvilket som helst av kravene 1-3,
 - k a r a k t e r i s e r t v e d at de apoptotiske tumorcellene ikke er nekrotiske.
5. Farmasøytisk preparat ifølge ethvert av de foregående krav,
 - 20 k a r a k t e r i s e r t v e d at tumorcellene ble avledet fra tumorcellelinjer.
6. Farmasøytisk preparat ifølge ethvert av kravene 1-4,
 - 25 k a r a k t e r i s e r t v e d at tumorcellene ble avledet fra en tumor isolert fra pasienten som skal behandles.
7. Farmasøytisk preparat ifølge ethvert av kravene 1-6,
 - 30 k a r a k t e r i s e r t v e d at de umodne dendrittiske celler ble lastet med apoptotiske tumorceller, som er blitt behandlet med høyt hydrostatisk trykk.
8. Farmasøytisk preparat ifølge krav 7,
 - k a r a k t e r i s e r t v e d at de umodne dendrittiske celler ble oppnådd ved leukaferese.
9. Farmasøytisk preparat ifølge krav 8,
 - 35 k a r a k t e r i s e r t v e d at de umodne dendrittiske celler ble oppnådd ved leukaferese og dyrking in vitro i nærvær av cytokiner.

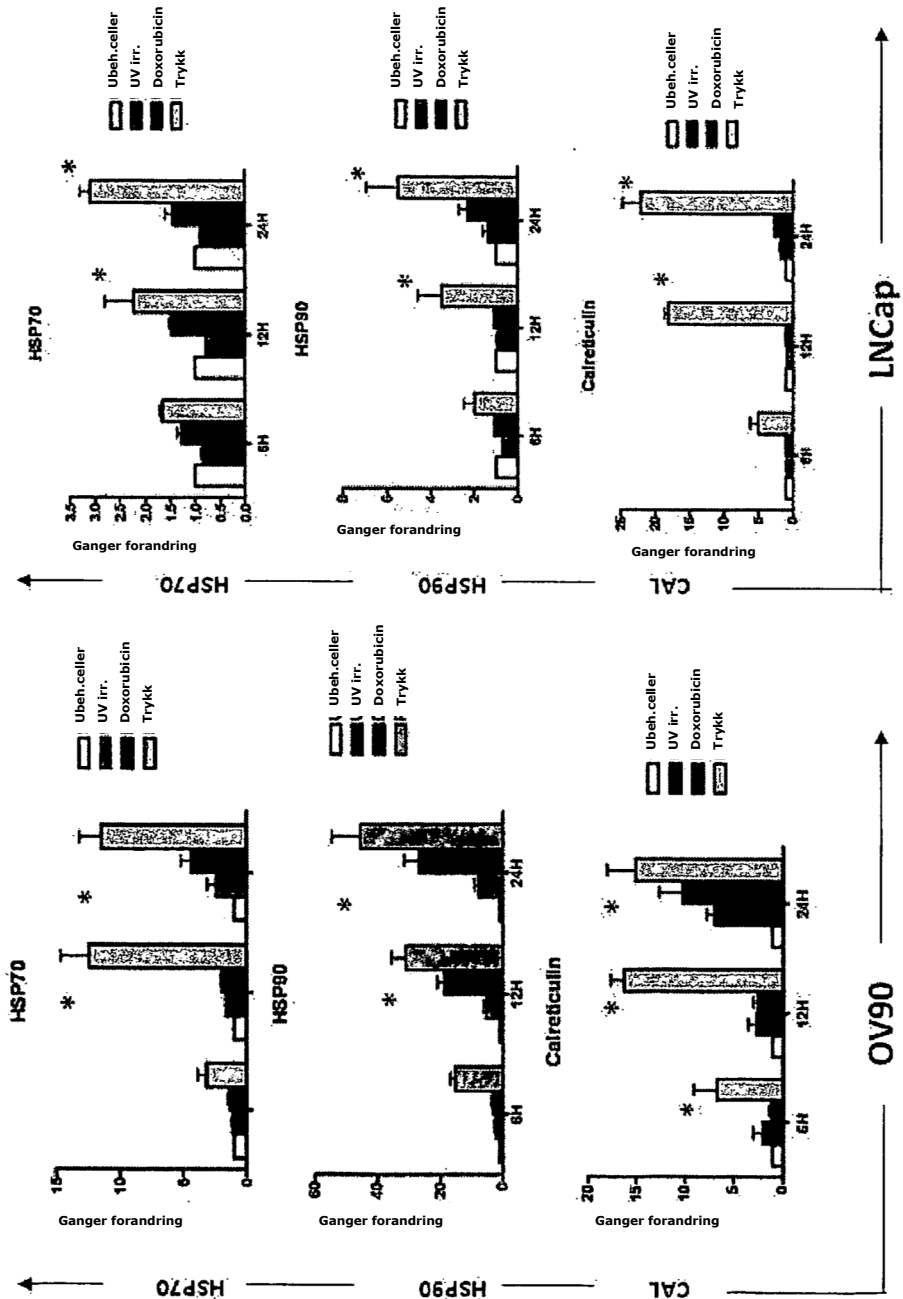
10. Farmasøytisk preparat ifølge ethvert av kravene 1-9, for anvendelse i pasienter som lider av tidlig stadium, så vel som sent stadium, cancer.
- 5 11. Farmasøytisk preparat ifølge ethvert av kravene 1-9 for anvendelse i behandling av cancer som omfatter prostatacancer, ovariecancer eller akutt lymfoblastisk leukemi.
- 10 12. Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge ethvert av kravene 1-9,
k a r a k t e r i s e r t v e d at de umodne dendrittiske celler lastes med apoptotiske tumorceller som er blitt behandlet med høyt hydrostatisk trykk som er lik eller større enn 100 MPa, og påfølgende maturasjon av de dendrittiske celler.
- 15 13. Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 12, for anvendelse i human cervikalsvulst, som omfatter å laste umodne dendrittiske celler med tumorceller, hvorved nevnte tumorceller omdannes til et apoptotisk stadium ved behandling i 10 minutter til 2 timer med høyt hydrostatisk trykk, som er lik eller større enn 100 MPa, hvorved de dendrittiske celler eventuelt modnes før det
20 farmasøytiske preparat tilføres.
- 25 14. Fremgangsmåte for fremstilling av et farmasøytisk preparat ifølge krav 12, for anvendelse i human cervikalsvulst som omfatter lasting av umodne dendrittiske celler med tumorceller oppnådd fra en tumorcellelinje som er omdannet til et apoptotisk stadium ved behandling i 10 minutter til 2 timer med høyt hydrostatisk trykk, som enten er lik eller større enn 100 MPa, hvorved de dendrittiske cellene eventuelt modnes før det farmasøytiske preparat tilføres.

Figur 1

Design for cancerimmunoterapi

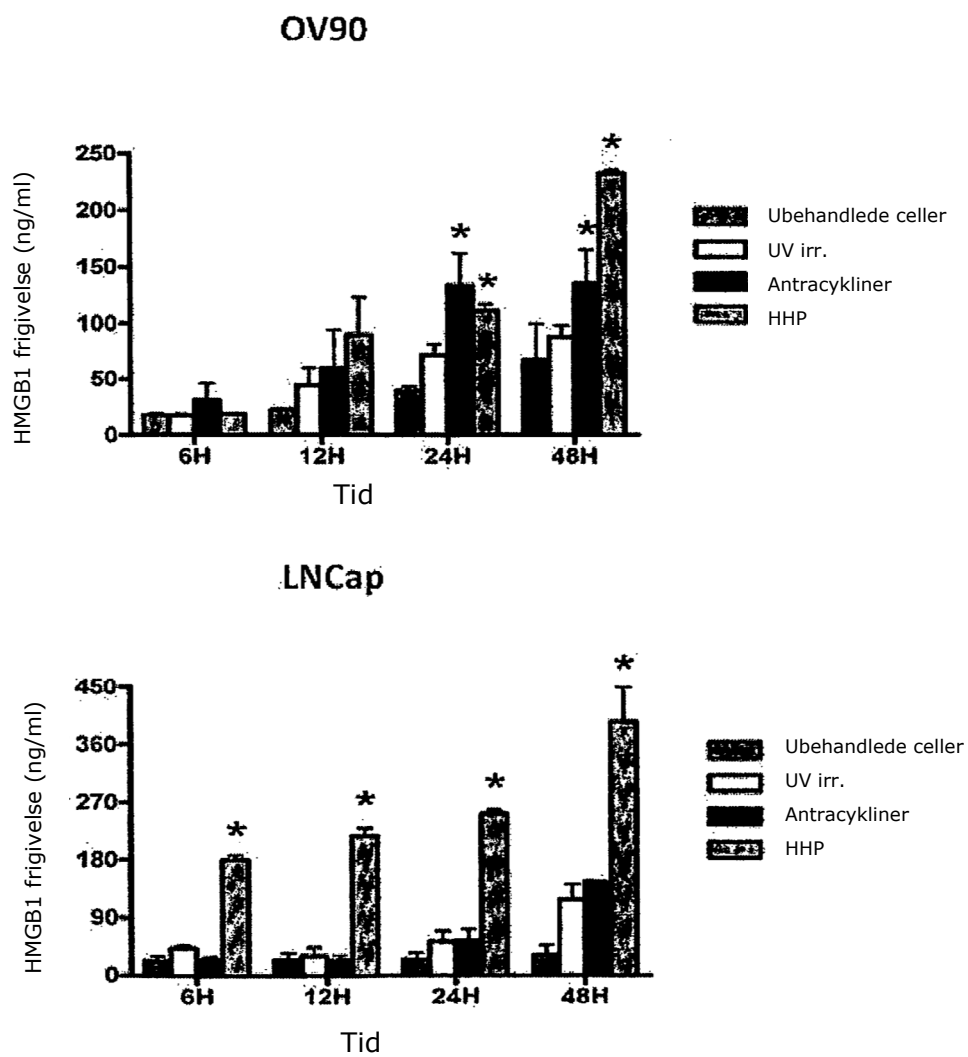
Figur 2

Ekspresjon av immunogen celledød markører etter HHP behandling

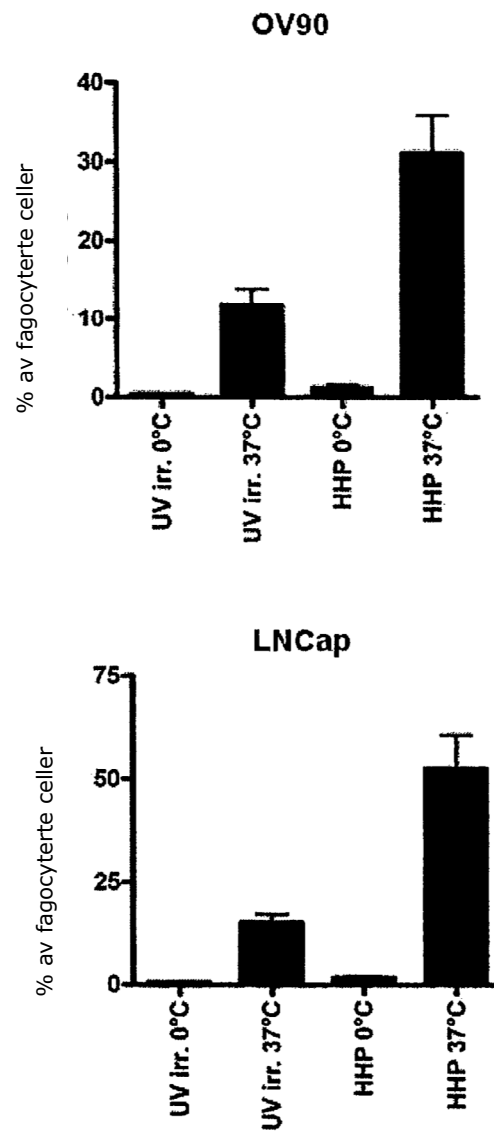


Figur 3

Deteksjon av HMGB1 frigivelse etter HHP behandling

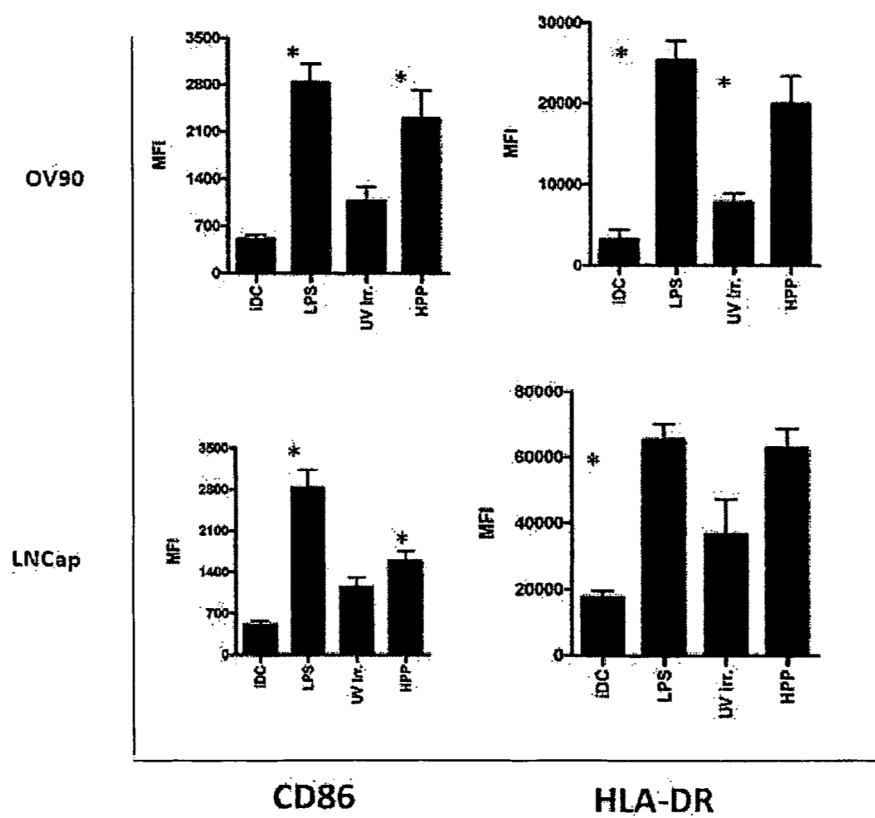


Figur 4

HHP behandling øker fagocytose av døde tumorceller ved DCer

Figur 5

Interaksjon med HHP drepte tumorceller induserer ekspresjon av aktiveringsmarkører på dendrittceller

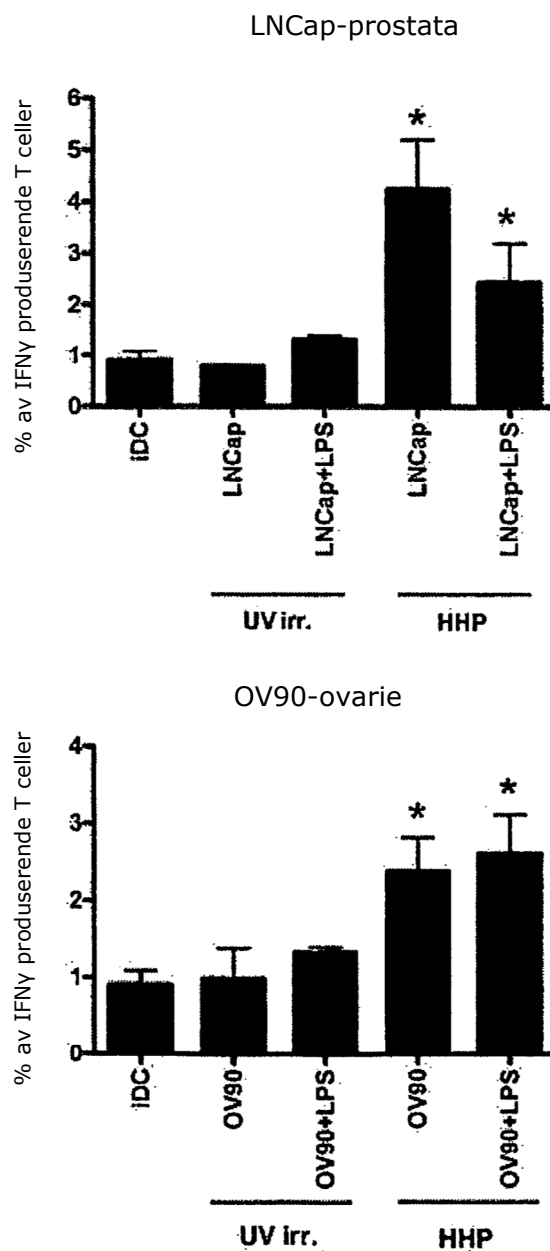


30

6/10

Figur 6

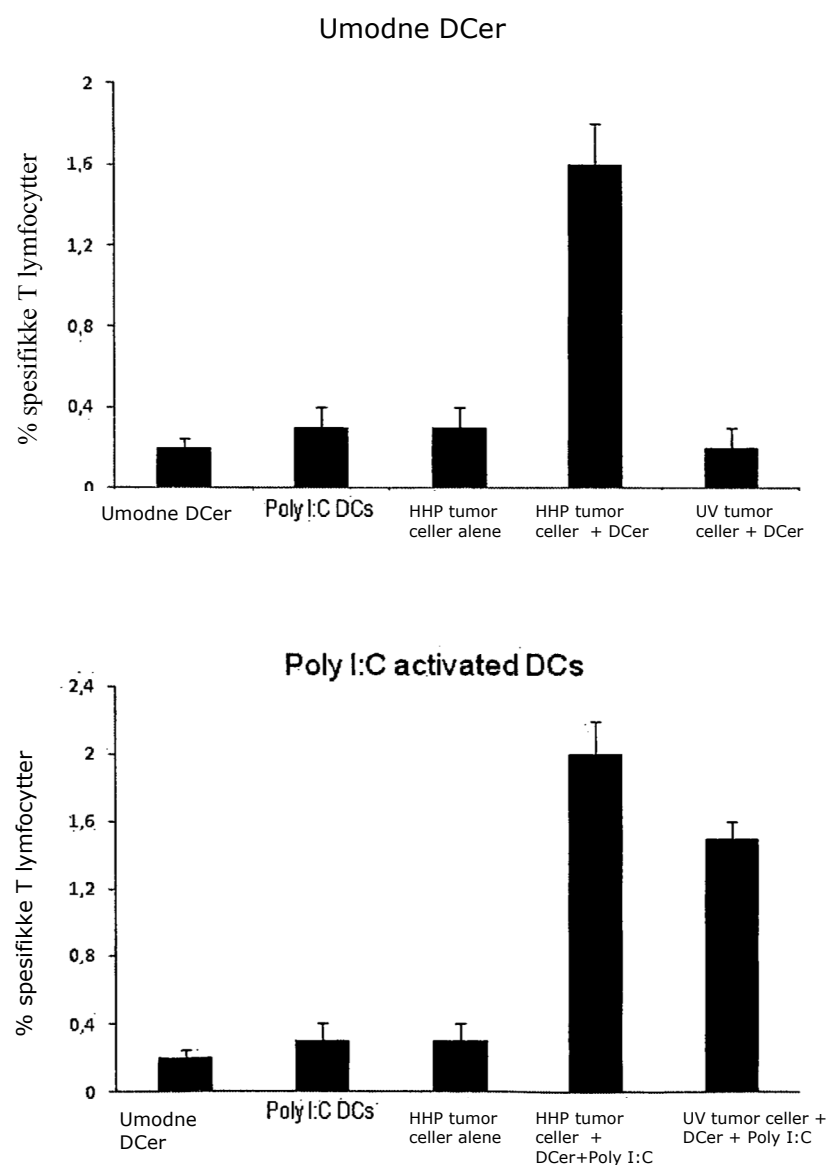
Kombinasjon av HHP drepte tumorceller og dendrittceller inducerer prostata- og ovariecancerceller spesifikk immunrespons



31

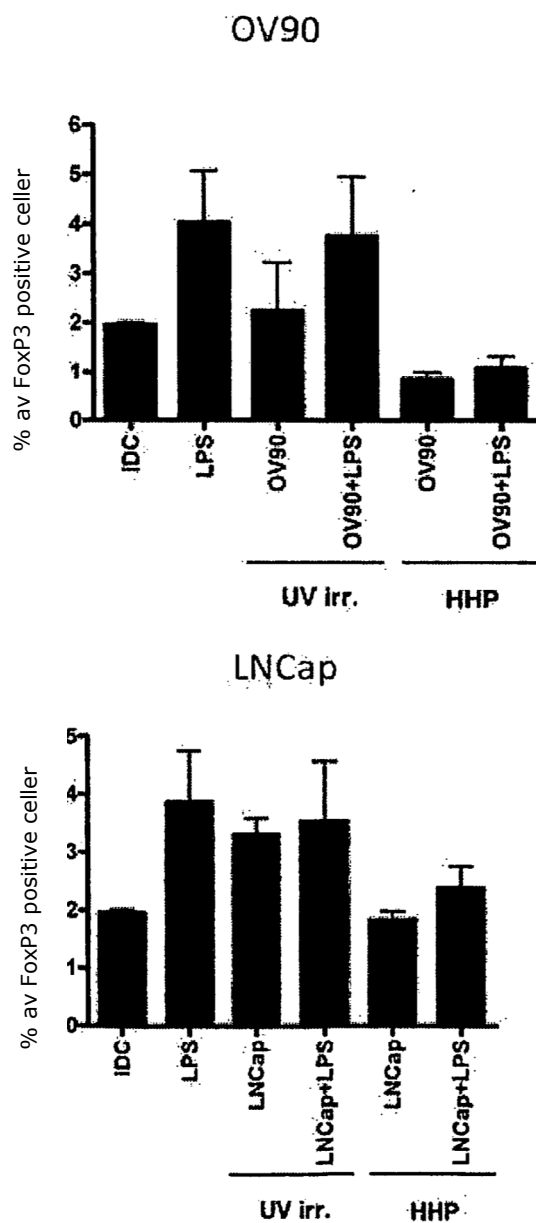
7/10

Figur 7

Kombinasjon av HHP drepte tumorceller og dendrittceller induserer PSA spesifikk immunrespons

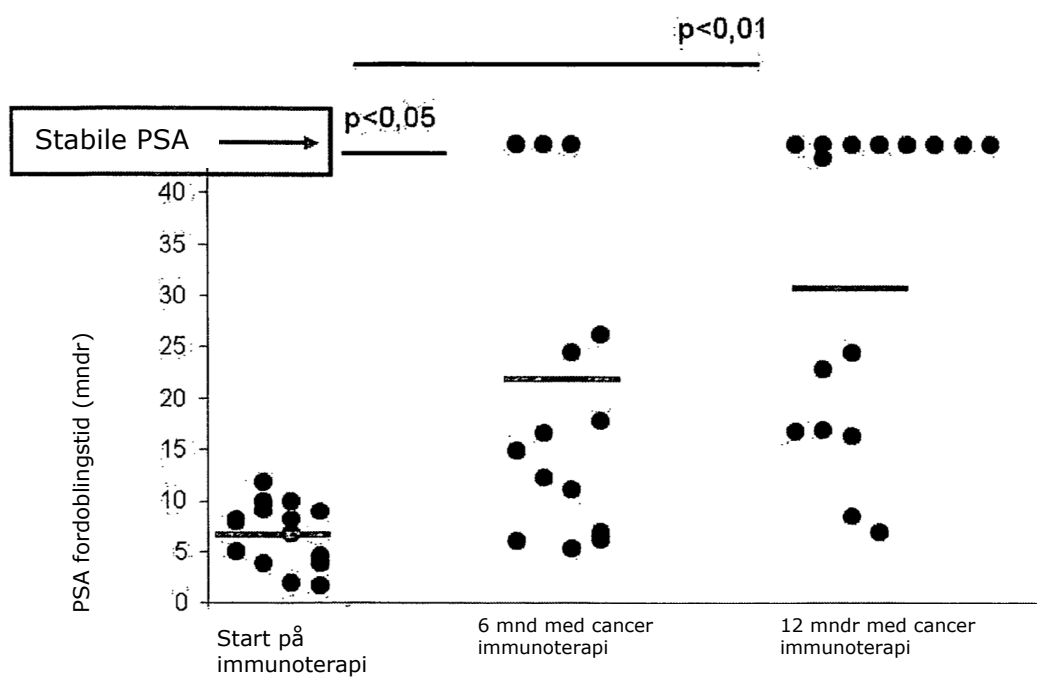
Figur 8

Kombinasjon av HHP drepte tumorceller med dendrittceller induserer lavt antall av regulatoriske T celler.



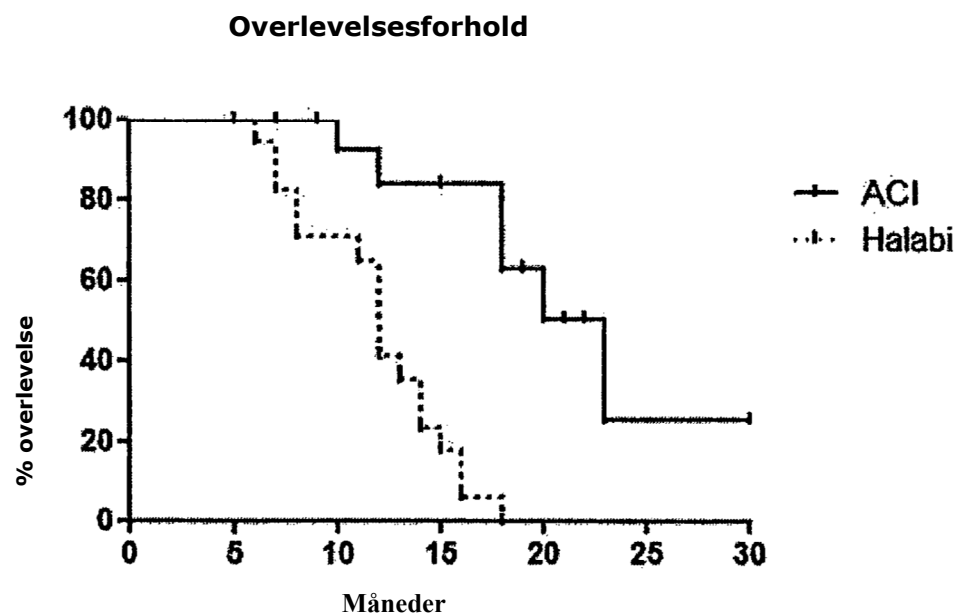
Figur 9

Gjentatt administrering av kombinasjon av HHP drepte tumorceller med dendrittceller signifikant forlenger PSA fordoblingstiden for pasienter med biokjemisk tilbakefall av prostatacancer, $p < 0,0001$



Figur 10

Kaplan-Meier overlevelseskurve av pasienter behandlet med aktiv cancerimmunoterapi (ACI) versus forventet overlevelse beregnet ved bruk av Halabi nomogram, $p < 0,0001$



Median overlevelse:

Aktiv cancerimmunoterapi: 23 måneder

Halabi nomogram: 12 måneder