

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 618**

21 Número de solicitud: 201731066

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/28 (2015.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.09.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.03.2019

71 Solicitantes:

INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (100.0%)
Avda. de Monforte de Lemos, 5
28029 MADRID ES

72 Inventor/es:

GARCÍA CASTRO, Javier;
CEJALVO GOYANES, Teresa;
PERISÉ BARRIOS, Ana Judih;
GAMBERA, Stefano y
MORALES MOLINA, Álvaro

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **Producto de combinación que comprende una célula madre mesenquimatosa modificada y una sustancia antigénica.**

57 Resumen:

La presente solicitud proporciona un producto de combinación para el tratamiento de cáncer. El producto de combinación comprende (i) una célula madre mesenquimatosa modificada, y (ii) una sustancia antigénica. Además, la presente solicitud también proporciona un método para la producción de una célula madre mesenquimatosa modificada que comprende un parásito intracelular y un kit que comprende (a) una célula madre mesenquimatosa, (b) una sustancia antigénica y (c) un inhibidor del receptor de tipo Toll 4 y/o del receptor de tipo Toll 9.

ES 2 702 618 A1

DESCRIPCIÓN

Producto de combinación que comprende una célula madre mesenquimatosa modificada y una sustancia antigénica

5

Campo técnico

La presente solicitud se refiere a un producto de combinación que comprende una célula madre mesenquimatosa modificada y una sustancia antigénica. El producto de combinación puede usarse como medicamento, en particular, como medicamento para el tratamiento de cáncer. La presente solicitud también se refiere a un método para producir una célula madre mesenquimatosa modificada que comprende un parásito intracelular y a un kit que comprende una célula madre mesenquimatosa, una sustancia antigénica y un inhibidor del receptor de tipo Toll 4 (TLR4) y/o del receptor de tipo Toll 9 (TLR9).

15

Técnica anterior

La viroterapia oncolítica es una modalidad de tratamiento emergente que usa virus competentes para la replicación para atacar células cancerosas. El objetivo principal de este tipo de terapia consiste en usar un virus oncolítico que es capaz de infectar y eliminar células cancerosas sin provocar daños al tejido sano. Aunque la actividad oncolítica del virus es importante, otra cuestión importante es la respuesta inmunitaria que puede ejercer la terapia sobre un paciente (Russell *et al*, 2012).

Aunque el interés en la viroterapia ha aumentado a lo largo de los años (Litchy *et al*, 2014), la idea de usar un virus para tratar el cáncer ya tiene 50 años. La observación de que la administración de determinados virus retrasaba el crecimiento de tumores ya intrigó a los científicos hace 50 años (Kelly y Russell, 2007; Asada, 1974). Sin embargo, en la mayoría de los casos la viroterapia siguió siendo ineficaz porque el virus se aclaraba por el sistema inmunitario o la terapia producía efectos secundarios no deseados.

Estos problemas todavía limitan el uso de viroterapia en la actualidad. La propia respuesta inmunitaria del paciente frente al virus puede provocar la eliminación del virus y sus efectos terapéuticos tras la primera dosis. Además, la incapacidad del virus para alcanzar micrometástasis tras la administración sistémica y el aclaramiento del virus por

el hígado y el bazo (Underhill y Ozinsky, 2002) también reducen la eficacia del virus en el tratamiento de metástasis.

La solución a las limitaciones anteriores se basa en el uso de un portador. El portador debe transportar el virus al sitio tumoral al tiempo que camufla el virus oncolítico. Mediante esta estrategia de tipo “caballo de Troya” puede ocultarse al virus oncolítico del sistema inmunitario del huésped y puede aumentarse la semivida del virus oncolítico. Además, el uso de células que migran hacia el microentorno del tumor aumenta la carga viral en los sitios tumorales relevantes tras la administración sistémica del portador y del virus.

Se ha mostrado que las células madre mesenquimatosas (MSC) migran hacia tumores y sitios de inflamación (Ling *et al*, 2010; Murphy *et al*, 2013; Ramírez *et al*, 2015). Por tanto, se han implementado MSC en terapias contra el cáncer. En un caso, se han usado MSC como portador para un virus del sarampión oncolítico (ClinicalTrials.gov ID: NCT02068794) y en otro caso se han usado MSC como portador para un adenovirus oncolítico (ClinicalTrials.gov ID: NCT01844661). La terapia con “Celyvir” comprende el uso de células madre mesenquimatosas como portadores para un adenovirus modificado por ingeniería y se ha usado para tratar pacientes que padecen tumores que no responden al tratamiento (Melen *et al*, 2016).

Actualmente existe la necesidad de un producto de combinación que pueda usarse para tratar diferentes tipos de cáncer. Un objetivo de la presente solicitud es proporcionar un producto de combinación que pueda usarse para tratar diferentes tipos de cáncer.

Bibliografía

Asada, T (1974). Treatment of human cancer with mumps virus. Cancer 34, 1907-1928.

Kelly, EJ y Russell SJ (2007). History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. Mol Ther 15 (4), 651-659.

Ling, X, Marini F, Konopleva M, Schober W, Shi Y, Burks J, Clise-Dwyer K, Wang RY, Zhang W, Yuan X, Lu H, Caldwell L, y Andreeff M (2010). Mesenchymal stem cells overexpressing IFN- β inhibit breast cancer growth and metastases through Stat3 signaling in a syngeneic tumor model. Cancer Microenviron 3, 83-95.

Litchy BD, Breitbach CJ, Stojdl DF y Bell JC (2014). Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 14 (8), 559-567.

Melen GJ, Franco-Luzon L, Ruano D, Gonzalez-Murillo A, Alfranca A, Casco F, Lassaletta A, Alonso M, Madero L, Alemany R, García-Castro J y Ramírez M (2016). Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. *Cancer Lett* 371, 161-170.

Murphy MB, Moncivais K, y Caplan AI (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsible therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 45:e54.

Ramírez M, García-Castro J, Melen GJ, González-Murillo A y Franco-Luzón L (2015). Patient-derived mesenchymal stem cells as delivery vehicles for oncolytic virotherapy: novel state-of-the art technology. *Oncolytic Virotherapy* 4, 149-155.

Russell, SJ, Peng KW y Bell JC (2012). Oncolytic virotherapy. *Nat Biotech* 30 (7), 658-670.

Underhill, DM y Ozinsky, A (2002). Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Ann Rev Immunology* 20, 825-852.

Figuras

Figura 1: Caracterización de MSC murinas derivadas de tejido adiposo (mMSC). Las mMSC cultivadas se caracterizan por una morfología de tipo fibroblasto. La imagen de microscopio corresponde a mMSC BL6.

Figura 2: Activación de la ruta de NF- κ B. a) Se transdujeron las MSC murinas (mMSC) con un sistema de lentivirus para detectar la activación de la ruta de NF- κ B mediante la expresión de luciferasa tras la infección con ICOVIR-5. Las sombras más oscuras de gris corresponden a Celyvir (células infectadas). La expresión de luciferasa en células TLR4^{-/-} fue significativamente mayor tras la infección con ICOVIR-5. b) La proporción de expresión de luciferasa en células infectadas (Celyvir) con respecto a células no infectadas (mMSC) muestra que la ruta de NF- κ B se activó en todos los tipos de célula sometidos a prueba tras la infección con ICOVIR-5. La proporción de expresión de la ruta de NF- κ B en células TLR4^{-/-} tras la infección con ICOVIR-5 fue significativamente mayor

en comparación con células BL6 y BL10. Se consideró que $P < 0,05$ (*) y $P < 0,01$ (**) eran estadísticamente significativos.

Figura 3: Detección de Akt y Jun fosforilados. Se realizó una inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos para pAkt y pJun en células infectadas (Celyvir) 24 horas tras la infección y en células no infectadas (mMSC). Se usó actina como control de carga.

Figura 4: Migración de mMSC infectadas y no infectadas hacia tumores derivados de la línea celular CMT64. a) Imagen de microscopio de células infectadas (Celyvir) y células no infectadas (mMSC) migradas, el campo de visión era de 10X. b) Gráfico que muestra el número de Celyvir y mMSC que migraron hacia las células tumorales CMT 64. Las sombras más oscuras de gris corresponden a Celyvir (células infectadas). c) La proporción de células migradas en Celyvir con respecto a mMSC muestra que la migración era similar en todos los tipos de célula sometidos a prueba tras la infección con ICOVIR-5. Se consideró que $P < 0,05$ (*) era estadísticamente significativo.

Figura 5: Desarrollo de experimento para someter a prueba la eficacia de tratamientos con Celyvir. a) Cronograma de los experimentos realizados *in vivo*. Se inocularon ratones C57BL/6J con tumores derivados de CMT64-Luc y se trataron cada 5 días con Celyvir. Tras la cuarta dosis, se detuvo el tratamiento con Celyvir y se realizó un seguimiento del desarrollo del tumor. b) Visualización *in vivo* de los tumores CMT64-Luc para establecer grupos homogéneos. Las imágenes son de 6 ratones al azar y sirven como ejemplos.

Figura 6: Desarrollo del tumor durante el tratamiento con dosis bajas de Celyvir. a) Gráfico que muestra el aumento del volumen del tumor a lo largo del tiempo. Celyvir usando mMSC TLR4^{-/-} y TLR9^{-/-} como portadores ralentizó el crecimiento del tumor en comparación con los demás grupos. b) Gráfico que muestra el aumento del volumen de tumores tratados individuales a lo largo del tiempo en comparación con la media de volumen tumoral del grupo de PBS (línea de color azul oscuro). c) Gráfico que muestra el volumen final de los tumores. Las mMSC TLR4^{-/-} y TLR9^{-/-} redujeron el tamaño final del tumor. d) Gráfico que muestra el peso final de los tumores. El peso de los tumores se correlacionó con su volumen.

Figura 7: Desarrollo del tumor durante el tratamiento con dosis altas de Celyvir. Gráfico que muestra el aumento del volumen del tumor a lo largo del tiempo. El gráfico muestra

una reducción del 59,3% del volumen tumoral en el grupo tratado con Celyvir TLR4^{-/-} en comparación con el grupo al que se le administró PBS. b) Gráfico que muestra el aumento del volumen de tumores tratados individuales a lo largo del tiempo en comparación con la media del volumen tumoral del grupo de PBS (línea de color azul oscuro).

Figura 8: Análisis de la población de células inmunitarias que se infiltraron en el tumor usando citometría de flujo. a) Porcentaje de población de células CD45⁺ que se infiltraron en el tumor. b) Porcentaje de población de células CD3⁺ que se infiltraron en el tumor. c) Porcentaje de población de células CD4⁺/CD8⁺ que se infiltraron en el tumor. Las sombras más oscuras de gris corresponden a células CD4⁺. d) Proporción de células CD4⁺/CD8⁺ que se infiltraron en el tumor. e) Porcentaje de población de células NK que se infiltraron en el tumor. f) Porcentaje de población de células dendríticas que se infiltraron en el tumor. g) Porcentaje de población de macrófagos (M1 es proinflamatorio, M2 es antiinflamatorio) que se infiltraron en el tumor. Las sombras más oscuras de gris corresponden a células M2. h) Porcentaje de población de neutrófilos (N1 y N2) que se infiltraron en el tumor. Las sombras más oscuras de gris corresponden a células N2. Se consideró que $P < 0,05$ (*) era estadísticamente significativo.

Figura 9: Histología de tumores CMT64-Luc. a) Los tumores tratados con Celyvir TLR4^{-/-} tenían linfocitos infiltrados en su periferia. b) También se observaron eosinófilos infiltrados (flechas) en tumores tratados con Celyvir TLR4^{-/-}. c) Esta imagen corresponde a un tumor que no se trató. No se observó ninguna infiltración similar de células inmunitarias en esta muestra ni en el resto de las muestras estudiadas. Todas las muestras se fijaron y se trataron con tinte de hematoxilina/eosina.

Figura 10: Cuantificación de las citocinas proinflamatorias secretadas. a) Perfil de expresión representativo de citocinas proinflamatorias en células BL10 y TLR4^{-/-} en el estado basal (mMSC) y tras la infección con ICOVIR-5 (Celyvir). En general, el perfil de secreción de células BL10 es mayor que el de células TLR4^{-/-}. b) Semicuantificación de citocinas proinflamatorias secretadas en células BL10 y TLR4^{-/-} en el estado basal (mMSC) y tras la infección con ICOVIR-5 (Celyvir). c) Cuantificación de la expresión de CXCL10 en células BL10 y TLR4^{-/-} mediante ELISA en un estado basal (mMSC) y tras la infección con ICOVIR-5 (Celyvir). La expresión de CXCL10 en células TLR4^{-/-} es significativamente menor que en células BL10. La expresión de CXCL10 mediante ELISA se correlacionó con su expresión semicuantificada en el panel de matriz de citocinas. Se

consideró que $P < 0,05$ (*) y $P < 0,01$ (**) eran estadísticamente significativos.

Sumario de la invención

5 La presente solicitud proporciona un producto de combinación, su uso como medicamento y su uso como medicamento para el tratamiento de cáncer. El producto de combinación comprende (i) una célula madre mesenquimatosa modificada (MSC) en la que TLR4 y/o TLR9 están inhibidos, y (ii) una sustancia antigénica. La MSC modificada y la sustancia antigénica pueden comercializarse juntas o por separado. Además, la MSC
10 modificada puede actuar como portador de la sustancia antigénica y la presente solicitud también comprende un método de producción de MSC modificadas que comprenden un parásito intracelular. La presente solicitud también proporciona un kit que comprende una MSC, una sustancia antigénica y un inhibidor de TLR4 y/o TLR9.

15 Descripción detallada de la invención

Definiciones

El término “producto de combinación” puede referirse a (i) un producto compuesto por
20 dos o más componentes regulados que están combinados o mezclados de manera física, química o de otro modo y producidos como una única entidad; (ii) dos o más productos separados envasados juntos en un único envase o como una unidad y compuestos por productos farmacológicos y de dispositivo, productos de dispositivo y biológicos, o productos biológicos y farmacológicos; (iii) un producto farmacológico, de dispositivo o
25 biológico envasado por separado que según su plan de investigación o etiquetado propuesto está previsto para su uso únicamente con un producto farmacológico, de dispositivo o biológico aprobado y especificado de manera individual en el que se requieren ambos para lograr el uso previsto, la indicación o el efecto y en el que tras la aprobación del producto propuesto se necesitará cambiar el etiquetado del producto
30 aprobado, por ejemplo, para reflejar un cambio en el uso previsto, forma de dosificación, concentración, vía de administración o cambio significativo de la dosis; o (iv) cualquier producto farmacológico, de dispositivo o biológico de investigación envasado por separado que, según su etiquetado propuesto, es para su uso únicamente con otro producto farmacológico, de dispositivo o biológico de investigación especificado de
35 manera individual en el que se requieren ambos para lograr el uso previsto, la indicación o el efecto.

Los términos “tratamiento” y “terapia”, tal como se usan en la presente solicitud, se refieren a un conjunto de medios higiénicos, farmacológicos, quirúrgicos y/o físicos usados con la intención de curar y/o aliviar una enfermedad y/o síntomas con el objetivo de remediar el problema de salud. Los términos “tratamiento” y “terapia” incluyen métodos preventivos y curativos, dado que ambos van dirigidos al mantenimiento y/o restablecimiento de la salud de un individuo o animal. Independientemente del origen de los síntomas, enfermedad y discapacidad, la administración de un medicamento adecuado para aliviar y/o curar un problema de salud debe interpretarse como una forma de tratamiento o terapia dentro del contexto de esta solicitud.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de materia de un producto de combinación que tiene un efecto terapéutico y que es capaz de tratar el cáncer.

Los términos “individuo”, “paciente” o “sujeto” se usan de manera intercambiable en la presente solicitud y no se pretende que sean limitativos de ninguna manera. El “individuo”, “paciente” o “sujeto” puede ser de cualquier edad, sexo y condición física. El término “animal”, tal como se usa en la presente solicitud, se refiere a cualquier ser heterótrofo eucariota multicelular que no es un humano.

El término “modificado” se refiere a cualquier materia que se ha alterado con respecto a su forma original. En la presente solicitud el término “modificado” se refiere a cualquier alteración que se basa en la intervención humana.

El término “célula madre mesenquimatosa” (“MSC”) se refiere a células progenitoras multipotentes derivadas del mesodermo. Tienen la capacidad de diferenciarse en células que componen el tejido adiposo, óseo, de cartílago y muscular. Los criterios mínimos establecidos por la Sociedad internacional de terapia celular es que las MSC son positivas para CD70, CD90 y CD105, y negativas para CD34. Pueden encontrarse en casi todos los tejidos, preferiblemente médula ósea, sangre periférica, sangre menstrual, glándula salivar, piel y prepucio, líquido sinovial, endometrio, tejido dental, tejido adiposo y tejidos asociados con recién nacidos incluyendo placenta, cordón umbilical, sangre del cordón umbilical, líquido amniótico y membrana amniótica.

El término “receptor de tipo Toll 4” (“TLR4”) se refiere a una proteína transmembrana que puede reconocer lipopolisacáridos e iniciar la ruta intracelular de NF-κB. Puede

encontrarse más información referente a esta proteína en humanos en la base de datos UniProt (UniProtKB - O00206; a la que se accedió el 23 de marzo de 2017).

El término “receptor de tipo Toll 9” (“TLR9”) se refiere a una proteína transmembrana que puede reconocer ADN viral y bacteriano e iniciar la ruta intracelular de NF- κ B. Puede encontrarse más información referente a esta proteína en humanos en la base de datos UniProt (UniProtKB - Q9NR96; a la que se accedió el 23 de marzo de 2017).

El término “inhibidor del receptor de tipo Toll 4” (“inhibidor de TLR4”) se refiere a cualquier materia que puede reducir la cantidad y/o actividad de TLR4. Esto puede incluir inhibidores de molécula pequeña bioactivos que inhiben la activación del receptor y/o su capacidad para iniciar la ruta de NF- κ B, anticuerpos neutralizantes que provocan la internalización de TLR4 y su degradación o que inhiben la capacidad de TLR4 para unirse a un agonista bloqueando el sitio de unión extracelular, o el uso de ARNip o terapia génica para regular por disminución la cantidad de TLR4 presente en la célula o para eliminar completamente la presencia de TLR4 en una célula, es decir desactivación.

El término “inhibidor del receptor de tipo Toll 9” (“inhibidor de TLR9”) se refiere a cualquier materia que puede reducir la cantidad y/o actividad de TLR9. Esto puede incluir inhibidores de molécula pequeña bioactivos que inhiben la activación del receptor y/o su capacidad para iniciar la ruta de NF- κ B, anticuerpos neutralizantes que provocan la internalización de TLR9 y su degradación o que inhiben la capacidad de TLR9 para unirse a un agonista bloqueando el sitio de unión extracelular, o el uso de ARNip o terapia génica para regular por disminución la cantidad de TLR9 presente en la célula o para eliminar completamente la presencia de TLR9 en una célula, es decir desactivación.

El término “sustancia antigénica” se refiere a cualquier sustancia que puede provocar una respuesta inmunitaria. Esto incluye proteínas inmunogénicas, ADN, ARN, lipopolisacáridos y cualquier parásito intracelular que comprende sustancias antigénicas. Por ejemplo, la MSC modificada puede modificarse para expresar una proteína antigénica y puede modificarse con un interruptor de emergencia que se activa cuando la MSC modificada está en un entorno hipóxico tal como el entorno que se encuentra comúnmente en tumores sólidos. En un ejemplo alternativo, la MSC modificada puede infectarse con un parásito intracelular que se libera en el sitio tumoral para inducir una respuesta inmunológica dirigida.

El término “parásito intracelular” se refiere a cualquier microparásito que es capaz de crecer y replicarse dentro de una célula huésped. Los ejemplos incluyen: bacterias, virus, protozoos y hongos.

- 5 El término “virus oncolítico” se refiere a cualquier virus que infecta preferiblemente y destruye células cancerosas. Los ejemplos incluyen: adenovirus, reovirus, virus del sarampión, virus del herpes simple, virus de la enfermedad de Newcastle, virus vaccinia, virus de Cocksackie y virus del valle del Séneca.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, “portador farmacéuticamente aceptable” o “diluyente farmacéuticamente aceptable” significa todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para principios farmacéuticamente activos se conoce
15 bien en la técnica. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los sujetos receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y, sin limitar el alcance de la presente invención, incluyen: agentes tamponantes adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos de metales (por ejemplo,
20 complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones formadores de sales, tales como sodio, alcoholes de azúcar polihidroxilados; aminoácidos, tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico y treonina; alcoholes de azúcares o azúcares orgánicos, tales como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa,
25 ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitales (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrófilos, tales
30 como polivinilpirrolidona.

El término “adyuvante farmacéuticamente aceptable” se refiere a todas y cada una de las sustancias que potencian la respuesta inmunitaria del organismo frente a un antígeno. Ejemplos no limitativos de adyuvantes farmacéuticamente aceptables son: alumbre,
35 adyuvante incompleto de Freund, MF59, análogos sintéticos de ARNbc tales como poli(I:C), lipopolisacáridos bacterianos, flagelina bacteriana, imidazolquinolinas,

oligodesoxinucleótidos que contienen motivos de CpG específicos, fragmentos de paredes celulares bacterianas tales como muramil dipéptido y Quil-A.

El término “agente quimioterápico” se refiere a cualquier fármaco que puede usarse para
 5 tratar una enfermedad. En la presente solicitud, el término “agente quimioterápico” se refiere a cualquier fármaco que puede usarse para tratar el cáncer. Los ejemplos no limitativos incluyen: actinomicina, ácido todo-trans-retinoico, azacitidina, azatioprina, bleomicina, bortezomib, carboplatino, capecitabina, cisplatino, clorambucilo, ciclofosfamida, citarabina, daunorubicina, docetaxel, doxifluridina, doxorubicina,
 10 epirubicina, epotilona, etopósido, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiaurea, idarubicina, imatinib, irinotecán, mecloretamina, mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, tenipósido, tioguanina, topotecán, valrubicina, vemurafenib, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina.

15 El término “cáncer” se refiere a un grupo de enfermedades que implican crecimiento celular anómalo con el potencial de invadir o propagarse a otras partes del organismo. Los ejemplos no limitativos incluyen: leucemia granulocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, adenocarcinoma, cáncer suprarrenal, astrocitoma anaplásico, angiosarcoma, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma de células
 20 basales, linfoma de células B, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de médula ósea, cáncer del intestino, cáncer de cerebro, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, cáncer de mama, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, colangiocarcinoma, condrosarcoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma
 25 cutáneo, melanoma cutáneo, astrocitoma difuso, carcinoma ductal *in situ*, cáncer endometrial, ependimoma, sarcoma epitelioides, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, cáncer de las trompas de Falopio, fibrosarcoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal, tumor de células
 30 germinales, glioblastoma multiforme, glioma, tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, hemangioendoteloma, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular infiltrante, cáncer de mama inflamatorio, cáncer intestinal, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de mama invasivo/infiltrante, cáncer de células del islote, cáncer de mandíbula, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de
 35 laringe, leiomioma, metástasis leptomeningeas, leucemia, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, carcinoma lobular *in situ*, astrocitoma de grado bajo,

cáncer de pulmón, cáncer de ganglios linfáticos, linfoma, cáncer de mama masculino, carcinoma medular, meduloblastoma, melanoma, meningioma, carcinoma de células de Merkel, condrosarcoma mesenquimatoso, mesenquima, mesotelioma, cáncer de mama metastásico, melanoma metastásico, cáncer de cuello escamoso metastásico, gliomas mixtos, cáncer de boca, carcinoma mucinoso, melanoma de la mucosa, mieloma múltiple, micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal, cáncer nasofaríngeo, cáncer de cuello, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de células en grano de avena, cáncer ocular, melanoma ocular, oligodendroglioma, cáncer bucal, cáncer de la cavidad bucal, cáncer orofaríngeo, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer epitelial de ovarios, tumor de células germinales de los ovarios, carcinoma peritoneal primario de los ovarios, tumor del estroma de los cordones sexuales del ovario, enfermedad de Paget, cáncer pancreático, carcinoma papilar, cáncer del seno paranasal, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer pélvico, cáncer de pene, cáncer de los nervios periféricos, cáncer peritoneal, cáncer faríngeo, feocromocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor de la región pineal, cáncer de hipófisis, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de pelvis renal, rabdomiosarcoma, cáncer de la glándula salivar, sarcoma, sarcoma óseo, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, cáncer de senos, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer del intestino delgado, cáncer espinal, cáncer de la columna vertebral, cáncer de la médula espinal, tumor espinal, carcinoma de células escamosas, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, linfoma de células T, cáncer de testículos, cáncer de garganta, timoma/carcinoma del timo, cáncer tiroideo, cáncer de lengua, cáncer de amígdalas, cáncer de células de transición, cáncer de mama triple negativo, cáncer de trompas, carcinoma tubular, cáncer uretral, adenocarcinoma uterino, cáncer uterino, cáncer vaginal y cáncer de vulva.

El término “tumor sólido” se refiere a una masa anómala de tejido que habitualmente no contiene quistes o zonas líquidas. Los ejemplos no limitativos incluyen adenocarcinoma, cáncer suprarrenal, astrocitoma anaplásico, angiosarcoma, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma de células basales, linfoma de células B, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de médula ósea, cáncer del intestino, cáncer de cerebro, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, cáncer de mama, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, colangiocarcinoma, condrosarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo, melanoma cutáneo, astrocitoma difuso, carcinoma ductal *in situ*, cáncer endometrial, ependimoma,

sarcoma epiteliode, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer del conducto biliar
 extrahepático, cáncer de ojo, cáncer de las trompas de Falopio, fibrosarcoma, cáncer de
 la vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de carcinoide
 gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal, tumor de células germinales,
 5 glioblastoma multiforme, glioma, cáncer de cabeza y cuello, hemangioendotelioma,
 linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular
 infiltrante, cáncer de mama inflamatorio, cáncer intestinal, cáncer del conducto biliar
 intrahepático, cáncer de mama invasivo/infiltrante, cáncer de células del islote, cáncer de
 mandíbula, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leiomiosarcoma,
 10 metástasis leptomeníneas, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, carcinoma
 lobular *in situ*, astrocitoma de grado bajo, cáncer de pulmón, cáncer de ganglios linfáticos,
 linfoma, cáncer de mama masculino, carcinoma medular, meduloblastoma, melanoma,
 meningioma, carcinoma de células de Merkel, condrosarcoma mesenquimatoso,
 mesenquima, mesotelioma, cáncer de mama metastásico, melanoma metastásico,
 15 cáncer de cuello escamoso metastásico, gliomas mixtos, cáncer de boca, carcinoma
 mucinoso, melanoma de la mucosa, mieloma múltiple, micosis fungoide, síndrome
 mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal, cáncer nasofaríngeo, cáncer de cuello,
 neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de
 células no pequeñas, cáncer de células en grano de avena, cáncer ocular, melanoma
 20 ocular, oligodendroglioma, cáncer bucal, cáncer de la cavidad bucal, cáncer orofaríngeo,
 sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cáncer de ovarios, cáncer epitelial de ovarios,
 tumor de células germinales de los ovarios, carcinoma peritoneal primario de los ovarios,
 tumor del estroma de los cordones sexuales del ovario, enfermedad de Paget, cáncer
 pancreático, carcinoma papilar, cáncer del seno paranasal, cáncer de la glándula
 25 paratiroidea, cáncer pélvico, cáncer de pene, cáncer de los nervios periféricos, cáncer
 peritoneal, cáncer faríngeo, feocromocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor de la región
 pineal, cáncer de hipófisis, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de
 próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer de pelvis renal,
 rabdomiosarcoma, cáncer de la glándula salivar, sarcoma, sarcoma óseo, sarcoma de
 30 tejidos blandos, sarcoma uterino, cáncer de senos, cáncer de piel, cáncer de pulmón de
 células pequeñas, cáncer del intestino delgado, cáncer espinal, cáncer de la columna
 vertebral, cáncer de la médula espinal, tumor espinal, carcinoma de células escamosas,
 cáncer de estómago, sarcoma sinovial, linfoma de células T, cáncer de testículos, cáncer
 de garganta, timoma/carcinoma del timo, cáncer tiroideo, cáncer de lengua, cáncer de
 35 amígdalas, cáncer de células de transición, cáncer de mama triple negativo, cáncer de
 trompas, carcinoma tubular, cáncer uretral, adenocarcinoma uterino, cáncer uterino,

cáncer vaginal y cáncer de vulva.

El término “quimioterapia” se refiere al uso de un agente quimioterápico para tratar una enfermedad. En la presente solicitud, el término “quimioterapia” se refiere al uso de un agente quimioterápico para tratar el cáncer.

El término “radioterapia” se refiere a una terapia que usa radiación ionizante para controlar o destruir células malignas y se usa generalmente como parte de un tratamiento contra el cáncer.

Producto de combinación

En un primer aspecto, la presente solicitud proporciona un producto de combinación que comprende: (i) una MSC modificada en la que TLR4 y/o TLR9 están inhibidos, y (ii) una sustancia antigénica.

En una realización preferida, el producto de combinación es una composición. En la composición, el producto de combinación compuesto por (i) la MSC modificada en la que TLR4 y/o TLR9 están inhibidos y (ii) la sustancia antigénica se mezclan y se producen como una única entidad. Preferiblemente, la MSC modificada en la que TLR4 y/o TLR9 están inhibidos es un portador de la sustancia antigénica.

El término “portador” en la presente solicitud puede referirse a un organismo que porta una sustancia antigénica. En una realización preferida, la MSC modificada en la que TLR4 y/o TLR9 están inhibidos está infectada, transducida y/o transformada con la sustancia antigénica.

En una realización preferida una MSC modificada en la que TLR4 y/o TLR9 están inhibidos y una sustancia antigénica pueden comercializarse por separado o juntas. Si la MSC modificada y la sustancia antigénica se comercializan juntas, pueden comercializarse en un único vial o en dos viales separados envasados en un recipiente y pueden incluir instrucciones sobre cómo combinar la MSC modificada con la sustancia antigénica. Si la MSC modificada y la sustancia antigénica se comercializan por separado, se comercializan con una etiqueta que explica resumidamente que los dos productos deben usarse en conjunto y/o con instrucciones que explican resumidamente el uso de los dos productos en conjunto.

TLR4 puede inhibirse usando un inhibidor de TLR4. En una realización preferida, TLR4 se inhibe usando: (i) ARNip, (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9, (iii) un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 4 seleccionado del grupo que
 5 consiste en 3,4,6-triacetato de isopropil-2-(acetilamino)-2-desoxi- α -D-glucopiranosido, resatorvid, eritorán y un péptido con la secuencia KYSFKLILAEYRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 1), y/o (iv) un anticuerpo neutralizante que se une a la región extracelular de TLR4. Preferiblemente, TLR4 se inhibe usando: (i) ARN de interferencia pequeño y/o (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que
 10 comprenden el sistema CRISPR/Cas9. Lo más preferiblemente, TLR4 se inhibe usando vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9.

TLR9 puede inhibirse usando un inhibidor de TLR9. En una realización preferida, TLR9
 15 se inhibe usando: (i) ARN de interferencia pequeño, (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9, (iii) un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 9 seleccionado del grupo que consiste en un nucleótido que comprende la secuencia TTAGGG, ODN 2088, ODN 4084-F, ODN INH-1, ODN-INH-18, ODN A151, G-ODN, 3-[4-(6-(3-(
 20 (dimetilamino)propoxi)benzo[d]oxazol-2-il)fenoxi]-N,N-dimetilpropan-1-amina, 6-[3-(pirrolidin-1-il)propoxi)-2-(4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)fenil]benzo[d]oxazol, y/o (iv) un anticuerpo neutralizante que se une a la región extracelular de TLR9. Preferiblemente, TLR9 se inhibe usando: (i) ARN de interferencia pequeño y/o (ii) vectores para terapia
 25 génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9. Lo más preferiblemente, TLR9 se inhibe usando vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9.

El término “ARN de interferencia pequeño” (“ARNip”) se refiere a una clase de moléculas
 30 de ARN, de habitualmente 20-25 pares de bases de longitud, que pueden regular por disminución la traducción de una proteína. En la técnica se conocen métodos para diseñar ARNip adecuados que pueden regular por disminución TLR4 y/o TLR9 (Birmingham *et al*, 2007. Nat. Protoc. 2(9): 2068-78).

El término “vectores para terapia génica” se refiere a cualquier molécula de ADN usada
 35 como vehículo para transportar de manera artificial material genético foráneo al interior de otra célula, en la que puede replicarse y/o expresarse, en el que el material genético

foráneo es capaz de modificar el genoma de la célula huésped. Los ejemplos de material genético foráneo capaz de modificar el genoma de la célula huésped incluyen material genético que comprende nucleasas de dedos de zinc (Porteus y Carroll, 2005. Nat. Biotech. 23(8): 967-73) y/o el sistema CRISPR/Cas9 (Ran *et al*, 2013. Nat. Protoc. 8(11): 2281-308). En una realización preferida, el vector para terapia génica comprende el sistema CRISPR/Cas9. En la técnica se conocen métodos para diseñar un sistema CRISPR/Cas9 adecuado que puede regular por disminución TLR4 y/o TLR9 (Ran *et al*, 2013. Nat. Protoc. 8(11): 2281-308; Chari *et al*, 2015. Nat. Met. 12(9): 823-6; Aach *et al*, 2014. CasFinder: Flexible algorithm for identifying specific Cas9 targets in genomes. BioRxiv).

La sustancia antigénica puede ser cualquier sustancia que puede producirse por la MSC modificada, produce una respuesta inmunogénica y puede liberarse en el sitio tumoral para producir una respuesta inmunogénica localizada. En una realización preferida, la sustancia antigénica es un parásito intracelular. Preferiblemente, el parásito intracelular se selecciona del grupo que consiste en bacterias, virus, protozoos y hongos. Más preferiblemente, la sustancia antigénica es un virus oncolítico.

El virus oncolítico puede ser cualquier virus que infecta preferiblemente y destruye células cancerosas. En una realización preferida, el virus oncolítico se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, reovirus, virus del sarampión, virus del herpes simple, virus de la enfermedad de Newcastle, virus vaccinia, virus de Coxsackie y virus del valle del Séneca. Preferiblemente, el virus oncolítico es un adenovirus. Más preferiblemente, el virus oncolítico es ICOVIR-5.

El término "ICOVIR-5" se refiere a un adenovirus oncolítico modificado que tiene una actividad que depende de la cantidad de E2F libre en la célula (Casallo *et al*, 2007. Mol. Ther. 15(9): 1607-15). En la técnica se conoce un método para producir ICOVIR-5 (Casallo *et al*, 2007. Mol. Ther. 15(9): 1607-15).

En una realización preferida, las MSC derivan de médula ósea, placenta, cordón umbilical, membrana amniótica, sangre menstrual, sangre periférica, glándula salivar, piel y prepucio, líquido sinovial, líquido amniótico, endometrio, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical y/o tejido dental. Preferiblemente, las MSC derivan de tejido adiposo y/o médula ósea. Más preferiblemente, las MSC derivan de médula ósea. En el estado de la técnica se conocen métodos para obtener MSC a partir de los tejidos anteriores (Ullah *et*

al, 2015. Biosci. Rep. 35(2): e00191).

En una realización preferida, la MSC es alogénica o autóloga con respecto al individual que padece o corre el riesgo de padecer cáncer. Preferiblemente, la MSC es autóloga.

5

En un segundo aspecto, la presente solicitud proporciona una composición farmacéutica que comprende una composición y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable, en la que la composición comprende una MSC modificada en la que TLR4 y/o TLR9 están inhibidos, y (ii) una sustancia antigénica.

10

TLR4 puede inhibirse usando un inhibidor de TLR4. En una realización preferida, TLR4 se inhibe usando: (i) ARNip, (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9, (iii) un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 4 seleccionado del grupo que consiste en 3,4,6-triacetato de isopropil-2-(acetilamino)-2-desoxi- α -D-glucopiranosido, resatorvid, eritorán y un péptido con la secuencia KYSFKLILAEYRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 1), y/o (iv) un anticuerpo neutralizante que se une a la región extracelular de TLR4. Preferiblemente, TLR4 se inhibe usando: (i) ARN de interferencia pequeño y/o (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9. Lo más preferiblemente, TLR4 se inhibe usando vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9.

15

20

25

30

35

TLR9 puede inhibirse usando un inhibidor de TLR9. En una realización preferida, TLR9 se inhibe usando: (i) ARN de interferencia pequeño, (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9, (iii) un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 9 seleccionado del grupo que consiste en un nucleótido que comprende la secuencia TTAGGG, ODN 2088, ODN 4084-F, ODN INH-1, ODN-INH-18, ODN A151, G-ODN, 3-[4-(6-(3-(dimetilamino)propoxi)benzo[d]oxazol-2-il)fenoxi]-N,N-dimetilpropan-1-amina, 6-[3-(pirrolidin-1-il)propoxi]-2-(4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)fenil]benzo[d]oxazol, y/o (iv) un anticuerpo neutralizante que se une a la región extracelular de TLR9. Preferiblemente, TLR9 se inhibe usando: (i) ARN de interferencia pequeño y/o (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9. Lo más preferiblemente, TLR9 se inhibe usando vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema

CRISPR/Cas9.

La sustancia antigénica puede ser cualquier sustancia que puede producirse por la MSC modificada, produce una respuesta inmunogénica y puede liberarse en el sitio tumoral para producir una respuesta inmunogénica localizada. En una realización preferida, la sustancia antigénica es un parásito intracelular. Preferiblemente, el parásito intracelular se selecciona del grupo que consiste en bacterias, virus, protozoos y hongos. Más preferiblemente, la sustancia antigénica es un virus oncolítico.

El virus oncolítico puede ser cualquier virus que infecta preferiblemente y destruye células cancerosas. En una realización preferida, el virus oncolítico se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, reovirus, virus del sarampión, virus del herpes simple, virus de la enfermedad de Newcastle, virus vaccinia, virus de Cocksackie y virus del valle del Séneca. Preferiblemente, el virus oncolítico es un adenovirus. Más preferiblemente, el virus oncolítico es ICOVIR-5.

En una realización preferida, las MSC derivan de médula ósea, placenta, cordón umbilical, membrana amniótica, sangre menstrual, sangre periférica, glándula salivar, piel y prepucio, líquido sinovial, líquido amniótico, endometrio, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical y/o tejido dental. Preferiblemente, las MSC derivan de tejido adiposo y/o médula ósea. Más preferiblemente, las MSC derivan de médula ósea. En el estado de la técnica se conocen métodos para obtener MSC a partir de los tejidos anteriores (Ullah *et al*, 2015. Biosci. Rep. 35(2): e00191).

En una realización preferida, la MSC es alogénica o autóloga con respecto al individuo que padece o corre el riesgo de padecer cáncer. Preferiblemente, la MSC es autóloga.

En una realización preferida, la composición farmacéutica puede comprender además un agente quimioterápico.

Para su uso como medicamento o para su uso en el tratamiento de cáncer

En un tercer aspecto, el producto de combinación y/o la composición farmacéutica de la presente solicitud pueden usarse como medicamento. En un cuarto aspecto, el producto de combinación y/o la composición farmacéutica de la presente solicitud pueden usarse en el tratamiento de un tumor sólido.

En una realización preferida, el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma, cáncer suprarrenal, astrocitoma anaplásico, angiosarcoma, cáncer de apéndice, astrocitoma, carcinoma de células basales, linfoma de células B, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de médula ósea, cáncer del

5 intestino, cáncer de cerebro, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, cáncer de mama, tumores carcinoides, cáncer de cuello uterino, colangiocarcinoma, condrosarcoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo, melanoma cutáneo, astrocitoma difuso, carcinoma ductal *in situ*, cáncer endometrial, ependimoma, sarcoma epiteliode, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, cáncer del

10 conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, cáncer de las trompas de Falopio, fibrosarcoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de carcinoide gastrointestinal, tumores del estroma gastrointestinal, tumor de células germinales, glioblastoma multiforme, glioma, cáncer de cabeza y cuello, hemangioendotelioma, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, carcinoma ductal

15 infiltrante, carcinoma lobular infiltrante, cáncer de mama inflamatorio, cáncer intestinal, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de mama invasivo/infiltrante, cáncer de células del islote, cáncer de mandíbula, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leiomiosarcoma, metástasis leptomenígeas, cáncer de labio, liposarcoma, cáncer de hígado, carcinoma lobular *in situ*, astrocitoma de grado bajo, cáncer de

20 pulmón, cáncer de ganglios linfáticos, linfoma, cáncer de mama masculino, carcinoma medular, meduloblastoma, melanoma, meningioma, carcinoma de células de Merkel, condrosarcoma mesenquimatoso, mesenquima, mesotelioma, cáncer de mama metastásico, melanoma metastásico, cáncer de cuello escamoso metastásico, gliomas mixtos, cáncer de boca, carcinoma mucinoso, melanoma de la mucosa, mieloma múltiple,

25 micosis fungoide, síndrome mielodisplásico, cáncer de la cavidad nasal, cáncer nasofaríngeo, cáncer de cuello, neuroblastoma, tumores neuroendocrinos, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de células en grano de avena, cáncer ocular, melanoma ocular, oligodendroglioma, cáncer bucal, cáncer de la cavidad bucal, cáncer orofaríngeo, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cáncer de

30 ovarios, cáncer epitelial de ovarios, tumor de células germinales de los ovarios, carcinoma peritoneal primario de los ovarios, tumor del estroma de los cordones sexuales del ovario, enfermedad de Paget, cáncer pancreático, carcinoma papilar, cáncer del seno paranasal, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer pélvico, cáncer de pene, cáncer de los nervios periféricos, cáncer peritoneal, cáncer faríngeo, feocromocitoma, astrocitoma

35 pilocítico, tumor de la región pineal, cáncer de hipófisis, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer rectal, carcinoma de células renales, cáncer

de pelvis renal, rabdomiosarcoma, cáncer de la glándula salivar, sarcoma, sarcoma óseo, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma uterino, cáncer de senos, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer del intestino delgado, cáncer espinal, cáncer de la columna vertebral, cáncer de la médula espinal, tumor espinal, carcinoma de células
 5 escamosas, cáncer de estómago, sarcoma sinovial, linfoma de células T, cáncer de testículos, cáncer de garganta, timoma/carcinoma del timo, cáncer tiroideo, cáncer de lengua, cáncer de amígdalas, cáncer de células de transición, cáncer de mama triple negativo, cáncer de trompas, carcinoma tubular, cáncer uretral, adenocarcinoma uterino, cáncer uterino, cáncer vaginal y cáncer de vulva. Preferiblemente, el tumor sólido es un
 10 cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de ovarios y/o cáncer de hígado.

En una realización preferida, el producto de combinación y/o la composición farmacéutica de la presente solicitud pueden usarse en el tratamiento de cáncer de cerebro y/o cáncer
 15 de pulmón. Preferiblemente, el cáncer de cerebro es un neuroblastoma y/o el cáncer de pulmón es un carcinoma de pulmón.

En una realización preferida, el producto de combinación y/o la composición farmacéutica de la presente solicitud pueden usarse en el tratamiento de cáncer de cerebro.
 20 Preferiblemente, el cáncer de cerebro es un neuroblastoma.

En una realización preferida, el producto de combinación y/o la composición farmacéutica de la presente solicitud pueden usarse en el tratamiento de cáncer de pulmón. Preferiblemente, el cáncer de pulmón es un carcinoma de pulmón.

25 En una realización preferida, el producto de combinación y/o la composición farmacéutica de la presente solicitud pueden usarse en combinación con quimioterapia y/o radioterapia.

30 Administración

El producto de combinación y/o la composición farmacéutica pueden administrarse a animales y/o humanos. Preferiblemente, el producto de combinación y/o la composición farmacéutica pueden administrarse a un individuo humano. Más preferiblemente, el
 35 producto de combinación y/o la composición farmacéutica pueden administrarse a un individuo que es un niño. En una realización preferida, el producto de combinación se

administra a un individuo que padece o corre el riesgo de padecer cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de ovarios y/o cáncer de hígado.

En una realización preferida, el producto de combinación se administra para prevenir la aparición de cáncer. Por ejemplo, el producto de combinación puede administrarse a un animal o individuo que corre el riesgo de desarrollar cáncer. En una realización preferida, el producto de combinación se administra para tratar el cáncer. Por ejemplo, el producto de combinación puede administrarse a un animal o individuo que padece cáncer.

En una realización preferida, el producto de combinación se prepara para las vías de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea y/o transdérmica, preferiblemente vías intravenosas.

En una realización preferida, el producto de combinación se administra una vez por semana, mes o año. Preferiblemente, el producto de combinación se administra al menos una vez por semana.

Método para la producción de MSC modificadas que comprenden un parásito intracelular

En un quinto aspecto, la presente solicitud proporciona un método para la producción de células madre mesenquimatosas modificadas que comprenden un parásito intracelular, que comprende las etapas de:

(1) aislar células madre mesenquimatosas a partir de una muestra aislada;

(2) cultivar las células madre mesenquimatosas;

(3) inhibir el receptor de tipo Toll 4 y/o el receptor de tipo Toll 9 de las células madre mesenquimatosas aisladas; y

(4) infectar las células madre mesenquimatosas con un parásito intracelular.

En una realización preferida, el método comprende además una etapa de irradiación de rayos X entre las etapas (3) y (4).

En una realización preferida, se aíslan MSC a partir de médula ósea, placenta, cordón

umbilical, membrana amniótica, sangre menstrual, sangre periférica, glándula salivar, piel y prepucio, líquido sinovial, líquido amniótico, endometrio, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical y/o tejido dental aislados. Preferiblemente, las MSC se aíslan a partir de tejido adiposo y/o médula ósea aislados. Más preferiblemente, las MSC se aíslan a partir de médula ósea aislada. En el estado de la técnica se conocen métodos para obtener MSC a partir de los tejidos anteriores (Ullah *et al*, 2015. Biosci. Rep. 35(2): e00191).

En una realización preferida, las MSC aisladas son autólogas o alogénicas. Preferiblemente, las MSC aisladas son autólogas. En una realización preferida, las MSC se aíslan a partir de un tejido de médula ósea autólogo aislado, en el que el tejido de médula ósea se obtuvo del paciente que padece o corre el riesgo de padecer cáncer.

En una realización preferida, las MSC se cultivan en una placa de cultivo celular. Preferiblemente, el medio es medio de Eagle modificado por Dulbecco. Más preferiblemente, el medio también se complementa con suero bovino fetal, preferiblemente al 10% (p/v). Lo más preferiblemente, las células se cultivan a 37°C en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂.

TLR4 puede inhibirse usando un inhibidor de TLR4. En una realización preferida, TLR4 se inhibe usando: (i) ARNip, (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9, (iii) un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 4 seleccionado del grupo que consiste en 3,4,6-triacetato de isopropil-2-(acetilamino)-2-desoxi- α -D-glucopiranosido, resatorvid, eritorán y un péptido con la secuencia KYSFKLILAEYRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 1), y/o (iv) un anticuerpo neutralizante que se une a la región extracelular de TLR4. Preferiblemente, TLR4 se inhibe usando: (i) ARN de interferencia pequeño y/o (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9. Lo más preferiblemente, TLR4 se inhibe usando vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9.

TLR9 puede inhibirse usando un inhibidor de TLR9. En una realización preferida, TLR9 se inhibe usando: (i) ARN de interferencia pequeño, (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9, (iii) un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 9 seleccionado del grupo que consiste en un nucleótido que comprende la secuencia TTAGGG, ODN

2088, ODN 4084-F, ODN INH-1, ODN-INH-18, ODN A151, G-ODN, 3-[4-(6-(3-(dimetilamino)propoxi)benzo[d]oxazol-2-il)fenoxi]-N,N-dimetilpropan-1-amina, 6-[3-(pirrolidin-1-il)propoxi]-2-(4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)fenil]benzo[d]oxazol, y/o (iv) un anticuerpo neutralizante que se une a la región extracelular de TLR9. Preferiblemente, TLR9 se inhibe usando: (i) ARN de interferencia pequeño y/o (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9. Lo más preferiblemente, TLR9 se inhibe usando vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9.

En una realización preferida, la MSC aislada se infecta usando una multiplicidad de infección (MOI) de entre 1 y 1000. Preferiblemente, la MOI es de entre 10 y 500, 50 y 300, 150 y 250 o la MOI es de 200. Preferiblemente, la MOI es de al menos 1, 10, 50, 150 ó 200 y la MOI es como máximo de 1000, 500, 300 ó 250. Más preferiblemente, la MOI es de 200.

En una realización preferida, el parásito intracelular se selecciona del grupo que consiste en bacterias, virus, protozoos y hongos. Más preferiblemente, la sustancia antigénica es un virus oncolítico.

El virus oncolítico puede ser cualquier virus que infecta preferiblemente y destruye células cancerosas. En una realización preferida, el virus oncolítico se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, reovirus, virus del sarampión, virus del herpes simple, virus de la enfermedad de Newcastle, virus vaccinia, virus de Cocksackie y virus del valle del Séneca. Preferiblemente, el virus oncolítico es un adenovirus. Más preferiblemente, el virus oncolítico es ICOVIR-5.

Kit

En un sexto aspecto, la presente solicitud proporciona un kit que comprende (a) una célula madre mesenquimatosa, (b) una sustancia antigénica y (c) un inhibidor de TLR4 y/o TLR9 seleccionado del grupo que consiste en: (i) ARNip, (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9, (iii) un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 4 seleccionado del grupo que consiste en 3,4,6-triacetato de isopropil-2-(acetilamino)-2-desoxi- α -D-glucopiranosido, resatorvid, eritorán y un péptido con la secuencia

KYSFKLILAEYRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 1), y/o un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 9 seleccionado del grupo que consiste en un nucleótido que comprende la secuencia TTAGGG, ODN 2088, ODN 4084-F, ODN INH-1, ODN-INH-18, ODN A151, G-ODN, 3-[4-(6-(3-(dimetilamino)propoxi)benzo[d]oxazol-2-il)fenoxi]-N,N-dimetilpropan-1-amina, 6-[3-(pirrolidin-1-il)propoxi]-2-(4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)fenil]benzo[d]oxazol, y (iv) un anticuerpo neutralizante que se une a la región extracelular del receptor de tipo Toll 4 y/o del receptor de tipo Toll 9.

3,4,6-Triacetato de isopropil-2-(acetilamino)-2-desoxi- α -D-glucopiranosido se comercializa por Sigma (n.º de producto: SML0832, número CAS: 40592-88-9). Resatorvid se comercializa por Cayman chemical (n.º de producto: SML0832, número CAS: 243984-11-4). Eritorán se comercializa por Eisai Co. (n.º de producto: E5564, número CAS: 185955-34-4). ODN 2088 se comercializa por InvivoGen (n.º de producto: tlr-2088-1). ODN 4084-F se comercializa por InvivoGen (n.º de producto: tlr-4084). ODN INH-1 se comercializa por InvivoGen (n.º de producto: tlr-inh1). ODN-INH-18 se comercializa por InvivoGen (n.º de producto: tlr-inh18). ODN A151 se comercializa por InvivoGen (n.º de producto: tlr-ttag151). G-ODN se comercializa por InvivoGen (n.º de producto: tlr-godn). 3-[4-(6-(3-(Dimetilamino)propoxi)benzo[d]oxazol-2-il)fenoxi]-N,N-dimetilpropan-1-amina puede sintetizarse por Eisai Inc. (AT791; Lamphier *et al*, 2014. Mol. Pharmacol. 85(3): 429-40). 6-[3-(Pirrolidin-1-il)propoxi]-2-(4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)fenil]benzo[d]oxazol puede sintetizarse por Eisai Inc. (E6446; Lamphier *et al*, 2014. Mol. Pharmacol. 85(3): 429-40).

En una realización preferida, el inhibidor de TLR4 y/o TLR9 se selecciona del grupo que consiste en: (i) ARNip y (ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9. Preferiblemente, el inhibidor de TLR4 y/o TLR9 son vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9.

La sustancia antigénica puede ser cualquier sustancia que puede producirse por la MSC modificada, produce una respuesta inmunogénica y puede liberarse en el sitio tumoral para producir una respuesta inmunogénica localizada. En una realización preferida, la sustancia antigénica es un parásito intracelular. Preferiblemente, el parásito intracelular se selecciona del grupo que consiste en bacterias, virus, protozoos y hongos. Más preferiblemente, la sustancia antigénica es un virus oncolítico.

El virus oncolítico puede ser cualquier virus que infecta preferiblemente y destruye células cancerosas. En una realización preferida, el virus oncolítico se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, reovirus, virus del sarampión, virus del herpes simple, virus de la enfermedad de Newcastle, virus vaccinia, virus de Coxsackie y virus del valle del Sóneca.

5 Preferiblemente, el virus oncolítico es un adenovirus. Más preferiblemente, el virus oncolítico es ICOVIR-5.

Ejemplos

10 Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de mMSC

Se obtuvieron mMSC a partir de tejido adiposo abdominal e inguinal de ratones de diferentes razas: ratones C57BL/6J (mMSC BL6), C57BL/10J (mMSC BL10), C57BL/10TLR4^{-/-} (mMSC TLR4^{-/-}) y C57BL/10TLR9^{-/-} (mMSC TLR9^{-/-}). Se digirió el tejido

15 adiposo con colagenasa B (2 mg/ml; Roche) durante 45 min a 37°C y se filtró a través de un tamiz celular de malla de nailon de 70 µm estéril (Fisher Scientific). Se sembraron las células en una placa de cultivo celular y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco completo (DMEM) (Lonza): DMEM complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% (Sigma-Aldrich), estreptomycin (100 mg/ml; Lonza), penicilina (100 U/ml;

20 Lonza) y glutamina (2 mM; Lonza) a 37°C en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂. Se caracterizó que las mMSC tenían una morfología de tipo fibroblasto (véase la figura 1).

Ejemplo 2: Infección viral con ICOVIR-5

25 Se infectaron las mMSC con ICOVIR-5 (un adenovirus oncolítico) a una multiplicidad de infección (MOI) de 200 en 1 ml por 1x10⁶ células durante 2 h a 37°C. La infección se realizó en suspensión en DMEM sin FBS. Se lavaron las células 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min para

30 eliminar el virus del sobrenadante de cultivo celular. Las mMSC infectadas se denominan Celyvir.

Ejemplo 3: Activación de la ruta de NF-κB, ensayo de luciferasa

35 Se evaluó la activación de NF-κβ usando un sistema de indicador de luciferasa. Se sembraron 1x10⁵ mMSC en una placa de 6 pocillos con 700 µl por pocillo de DMEM

complementado con FBS al 10% y se transdujeron con un vector lentiviral no replicativo durante la noche. El vector lentiviral contiene el plásmido pHAGE NF- κ B-TA-LUC-UBC-GFP-W (plásmido de Addgene n.º 49343), cuya estructura codifica para la secuencia de unión consenso a NF- κ B en el sentido de 5' del promotor de TA mínimo del virus del herpes simple seguido por el gen de luciferasa de luciérnaga así como el gen de eGFP en el sentido de 5' del promotor de ubiquitina-C. Se evaluó la eficacia de la transducción mediante cuantificación de la expresión de GFP mediante citometría de flujo. Se infectaron las células transducidas con ICOVIR-5 tal como se describió anteriormente y se sembraron 1×10^4 células por pocillo en placas de 96 pocillos con DMEM complementado con FBS al 10%. Tras 24 h, se llevó a cabo la lisis celular para la extracción de proteínas totales y se sometió a ensayo la actividad luciferasa con el sistema de ensayo de luciferasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.).

La activación de la ruta de NF- κ B es el principal acontecimiento inmunológico inicial que se produce en respuesta a un patógeno. Tal como puede observarse en la figura 2, las células mMSC TLR4^{-/-} mostraron una cantidad aumentada de actividad luciferasa tras la infección con ICOVIR-5. Por tanto, la infección de las células mMSC TLR4^{-/-} con ICOVIR-5 activó la ruta de NF- κ B.

Ejemplo 4: Inmunotransferencia de tipo Western

Se sembraron 5×10^5 mMSC o Celyvir por pocillo en placas de 6 pocillos con DMEM complementado con FBS al 10%. Tras 3 y 24 h de tratamiento, se extrajeron las proteínas totales con tampón de muestra de SDS (Tris 62,5 mM, pH 6,8, dodecilsulfato de sodio al 2% (SDS), glicerol al 10%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (PMSF), fluoruro de sodio 5 mM (NaF), β -glicerofosfato 20 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM y cóctel de inhibidores de proteasa 1:100 (Sigma-Aldrich)) y se congelaron los lisados totales. Se sometieron las muestras a ebullición a 95°C durante 5 min y se sonicaron tres veces durante 30 s cada vez en hielo. Se determinó la concentración de proteínas usando el ensayo de proteínas DC (Bio-Rad). Se añadieron 100 mM de ditiotretitol (DTT) y el 0,1% de azul de bromofenol (BPB) a las muestras y se sometieron a ebullición a 95°C durante 5 min.

Se separaron las proteínas mediante electroforesis en electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato de sodio al 10% (SDS-PAGE)), se transfirieron a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) (Bio-Rad, Hercules, CA) y se bloquearon con leche al 2% en solución salina tamponada con tris (TBS). Los anticuerpos

primarios que se usaron fueron anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-Jun a una dilución de 1:1000, anticuerpo anti- β -actina (clon AC-15; Sigma-Aldrich) a 1:100000 y anticuerpo monoclonal de conejo anti-fosfo-Akt (Ser473, clon 2118; Epitomics) a una dilución de 1:1000. Se lavaron las membranas tres veces con TBS con Tween 20 al 0,1% (TBS-T) durante 10 min. Los anticuerpos secundarios fueron inmunoglobulinas policlonales de cabra anti-conejo y anti-ratón/HRP (Dako) a una dilución de 1:3000, y se incubaron durante 1 h a TA. Se detectó la señal de HRP con sustrato de HRP quimioluminiscente de tipo Western Immobilon (Millipore, Darmstadt, Alemania) y se reveló usando un Hyperprocessor de rayos X (Amersham Pharmacia Biotech). Se digitalizaron las membranas y se cuantificó la expresión de proteínas midiendo el valor gris medio de las bandas en el software Image J. Se restó el fondo de cada membrana de los valores obtenidos.

Akt y Jun se fosforilan como resultado de la activación de TLR4 y TLR9. Akt y Jun se fosforilaron en todas las células 24 horas tras la infección con ICOVIR-5 (véase la figura 3). La ausencia de los TLR en las mMSC no parece modificar la respuesta de las células a una infección con ICOVIR-5.

Ejemplo 5: Ensayo de migración *in vitro*

Se estudió la capacidad de migración de mMSC y Celyvir usando un ensayo *in vitro*. Se recubrieron placas Transwell de 24 pocillos (filtros con poros de 8 μ m, BD Biosciences) con gelatina al 0,1% (Sigma-Aldrich) y se sembraron 5×10^4 células por pocillo con DMEM sin FBS en la cámara superior. Se sembraron 1×10^5 células CMT 64 por pocillo con DMEM sin FBS en la cámara inferior como estímulos. Se incubaron insertos durante 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂. Se realizó un ensayo de control negativo incubando mMSC en la cámara superior en presencia de DMEM sin células en la cámara inferior. Tras 24 h, se lavaron las placas Transwell y se eliminaron las células que no migraron con un hisopo humidificado con PBS. Se fijaron las células migradas con formaldehído al 10% durante 10 min y se tiñeron con violeta cristal. Se contaron las células de 13 campos de alta potencia (HPF) para cada condición.

Las células BL6 y BL10 infectadas con ICOVIR-5 tenían una mayor tendencia a migrar hacia las células CMT 64. Este efecto no pudo medirse en células TL4^{-/-} o TLR9^{-/-} que migraron hacia las células CMT64 independientemente de si estaban infectadas o no (véase la figura 4).

Ejemplo 6: Inducción de tumor y tratamiento antitumoral

Se obtuvo la línea celular CMT 64, un carcinoma de pulmón de células no pequeñas murino, de la colección general ECACC (ECACC 10032301) y se cultivó en DMEM
 5 completo a 37°C en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂. Para la monitorización *in vivo*, se transdujeron células CMT 64 con un vector lentiviral no replicativo que contenía un casete de luciferasa de luciérnaga (CMT 64-Luc). Para experimentos *in vivo*, se establecieron tumores subcutáneos de células CMT 64-Luc mediante inyección de 1x10⁶ células diluidas en 100 µl de PBS en ratones C57BL/6J
 10 hembra de 7 semanas de edad. Tras 6 días desde la inoculación del tumor, se midió la luminiscencia de los tumores y se establecieron cinco grupos homogéneos (véase la figura 5b) de la siguiente manera: PBS (n=4), Celyvir BL6 (n=6), Celyvir BL10 (n=5), Celyvir TLR4^{-/-} (n=4) y Celyvir TLR9^{-/-} (n=6).

15 Se realizó un total de dos experimentos *in vivo*, cada uno de ellos con diferentes dosis: Celyvir de dosis baja (3x10⁴ células/ratón) y Celyvir de dosis alta (5x10⁵ células/ratón) resuspendidos en 200 µl de PBS e inyectados por vía intraperitoneal (i.p.). Se administró un total de 4 dosis, separadas 7 días unas de otras. Se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral midiendo la longitud (L), anchura (W) y altura (H) con un calibre cada
 20 3-5 días. Se calculó el volumen tumoral como (LxWxH)π/6, suponiendo que los tumores eran aproximadamente semielipsoides. Tras 30 días desde la inoculación del tumor, se sacrificaron los ratones y se extirparon los tumores y se procesaron para la citometría de flujo y el análisis de histología.

25 El estudio recibió la aprobación del comité de ética de experimentación con animales en cumplimiento con la directiva de la Unión Europea 86/609. El cuidado y los experimentos con animales se llevaron a cabo según las directrices detalladas en el Real Decreto 1201/2005 de España.

30 Se compararon los grupos tratados con Celyvir con los grupos de control tratados con PBS. Se usó Celyvir BL6 como control positivo ya que su eficacia se había demostrado anteriormente. En los experimentos realizados con dosis bajas de Celyvir (véase la figura 6), Celyvir TLR4^{-/-} y Celyvir TLR9^{-/-} presentaron los mejores rendimientos. Ambas de estas líneas celulares infectadas disminuyeron tanto el volumen como el peso de los
 35 tumores. Se obtuvieron resultados similares con Celyvir TLR4^{-/-} cuando se usaron dosis altas (véase la figura 7).

Ejemplo 7: Citometría de flujo

Se digirieron los tumores extraídos con colagenasa IV (1 mg/ml) en agitación durante 1 h a 37°C y se homogeneizaron mecánicamente usando una mano de mortero de PTFE de Potter-Elvehjem cuando fue necesario. Se aplastaron los bazo mecánicamente y se usaron como control positivo para las diferentes poblaciones de células inmunitarias. Se filtraron las suspensiones celulares a través de un tamiz celular de malla de nailon de 70 µM estéril usando el extremo de caucho de una jeringa de 3 ml en PBS helado y se sometieron los glóbulos rojos a lisis mediante incubación con tampón Quicklysis (Cytognos). Se bloquearon las suspensiones celulares con reactivo de bloqueo de FcR de ratón (Miltenyi) durante 20 min y se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón diluidos en PBS durante 20 min a 4°C: anticuerpo anti-CD45 (clon 30-F11), anticuerpo anti-CD3 (clon 145-2C11), anticuerpo anti-CD4 (clon GK1.5), CD8 (clon 53-6.7), CD11b (clon M1/70), CD11c (clon N418), CD206 (clon C068C2), MHCII (clon M5/114.15.2), Ly6C (clon AL-21), Ly6G (clon 1A8-Ly6g) y NK1.1 (clon PK136), todos ellos de eBioScience. Tras la incubación, se lavaron las células y se marcaron con el marcador de viabilidad 7-aminoactinomicina (7AAD) (Fisher Scientific, Waltham, MA) durante 10 min a TA. Se adquirieron muestras con el citómetro de analizador MACSQuant® y se analizaron usando software de análisis MACSQuantify (Miltenyi Biotec). Se definieron poblaciones inmunitarias de la siguiente manera: leucocitos (CD45+); linfocitos T totales (CD45+ CD3+), subclasificados como linfocitos T cooperadores (CD4+) y linfocitos T citotóxicos (CD8+); células NK (NK1.1+); células dendríticas (NK1.1- CD11b+ CD11c+); macrófagos (CD45+ CD11b+ MHCII+ Ly6G-), subclasificados como M1 proinflamatorio (CD206-) y M2 antiinflamatorio (CD206+); y neutrófilos (CD45+ CD11b+ MHCII- Ly6G+), subclasificados como N1 proinflamatorio (CD206-) y N2 antiinflamatorio (CD206+).

En general, los ratones tratados con Celyvir TLR4^{-/-} mostraron una mayor infiltración de leucocitos en el sitio tumoral (figura 8a). De manera similar, el porcentaje de células CD4+ dentro de la población de células CD3+ parece estar aumentado en comparación con los demás grupos (figura 8c) y la proporción de células CD4+/CD8+ aumenta de manera notable (figura 8d). Tal como se muestra en la figura 8e, los grupos tratados con Celyvir tienen una mayor tendencia a contener un porcentaje superior de células NK en la muestra, especialmente los grupos tratados con Celyvir TLR9^{-/-}. El porcentaje de células dendríticas también aumenta en los grupos tratados con Celyvir, especialmente el grupo tratado con Celyvir TLR4^{-/-} (véase la figura 8f).

Los macrófagos y los monocitos son poblaciones heterogéneas que comprenden un subtipo M1 proinflamatorio y un subtipo M2 antiinflamatorio. Aunque los niveles de M1 y M2 aumentaron en el grupo tratado con Celyvir BL10, la proporción entre los dos subtipos parece ser similar a la encontrada en el grupo tratado con PBS (figura 8g). Por otro lado, en el grupo tratado con Celyvir TLR4^{-/-} la proporción de células M1 aumenta, mientras que en el grupo tratado con TLR9^{-/-} parece producirse lo contrario. En los grupos tratados con Celyvir que son deficientes en TLR, hay una tendencia a observar un aumento en el porcentaje de neutrófilos (figura 8h), en el que la proporción de N1/N2 se mantiene en el grupo tratado con Celyvir TLR4^{-/-} y la proporción disminuyó en el grupo tratado con Celyvir TLR9^{-/-} (figura 8h).

Por tanto, parece que la terapia con Celyvir se basa en la inducción de una respuesta inmunitaria en el sitio tumoral. Por tanto, resulta verosímil que también puedan usarse mMSC que comprenden otros parásitos intracelulares o antígenos para tratar tumores.

Ejemplo 8: Histología de los tumores extirpados

Se fijaron muestras de tumores extirpados en disolución de formaldehído tamponada al 10% durante la noche, se lavaron con PBS y se sumergieron en disolución de sacarosa al 30%, se incrustaron en medio de temperatura de corte óptima (OCT) (Tissue-Tek) y se congelaron. Se obtuvieron secciones de 8 µm de grosor en un criostato y después se tiñeron con tinción con hematoxilina y eosina siguiendo protocolos de tinción convencionales.

Se validó que podía observarse un mayor grado de infiltración de leucocitos en el sitio tumoral en el grupo tratado con Celyvir TLR4^{-/-} (véase la figura 9). En las muestras, podía incluso observarse la infiltración de lo que parecían ser eosinófilos, lo que no se observó en las muestras de tumor sin tratar.

Ejemplo 9: Micromatriz de citocinas

Se analizó el patrón de citocinas proinflamatorias en Celyvir y mMSC BL10 y TLR4^{-/-} mediante ensayo de matriz de citocinas. Se sembraron 4x10⁴ células por pocillo en placas de 24 pocillos con 1 ml de DMEM complementado con FBS al 10%. Tras 24 h, se recogieron los sobrenadantes y se analizó el patrón de citocinas proinflamatorias usando un kit de panel de matriz de ratón A Proteome Profiler según las indicaciones del

fabricante (R&D Systems, Mineápolis, MN). Se digitalizaron las imágenes de matrices y se midió la cuantificación del perfil de citocinas mediante densidad de píxeles de puntos duplicados usando un analizador de matriz de proteínas para el software ImageJ.

- 5 Se midió mediante ELISA la cuantificación de citocina CXCL10 secretada por mMSC y Celyvir. Se sembraron 4×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos en 1 ml de DMEM complementado con FBS al 20%. Tras 24 h, se recogieron los sobrenadantes y se midieron los niveles de proteína CXCL10 usando el kit de ELISA CRG-2/IP-10 Ray Bio de ratón (RayBiotech, Norcross, GA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la
10 cuantificación leyendo la absorbancia a 450 nm usando el lector Infinite[®] 200 (Tecan, Zúrich, Suiza).

Tal como puede observarse en la figura 10, mMSC TLR4^{-/-} y Celyvir TLR4^{-/-} secretaron generalmente menos citocinas proinflamatorias. De las citocinas estudiadas, hubo un
15 cambio en los niveles de expresión de IL-6, CXCL10, CXCL1, CCL2, CXCL2, CCL5, TIMP-1 y CXCL12. Sólo CXCL12 se secretó más en mMSC TLR4^{-/-} y Celyvir TLR4^{-/-}.

Por tanto, parece que la inhibición/eliminación de TLR4^{-/-} hace que la mMSC infectada sea menos propensa a que la detecte el sistema inmunitario antes de llegar al sitio
20 tumoral. En el sitio tumoral, la mMSC libera el virus que contiene antígeno, lo que induce una respuesta inmunitaria dirigida.

REIVINDICACIONES

1. Producto de combinación que comprende:
 - (i) una célula madre mesenquimatosa modificada en la que el receptor de tipo Toll 4 y/o el receptor de tipo Toll 9 están inhibidos; y
 - (ii) una sustancia antigénica.
2. Producto de combinación según la reivindicación 1, en el que el receptor de tipo Toll 4 está inhibido.
3. Producto de combinación según la reivindicación 1, en el que el receptor de tipo Toll 9 está inhibido.
4. Producto de combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la sustancia antigénica es un parásito intracelular.
5. Producto de combinación según la reivindicación 4, en el que el parásito intracelular es un virus oncolítico, preferiblemente el virus oncolítico se selecciona del grupo que consiste en adenovirus, reovirus, virus del sarampión, virus del herpes simple, virus de la enfermedad de Newcastle, virus vaccinia, virus de Cocksackie y virus del valle del Séneca.
6. Producto de combinación según la reivindicación 5, en el que el virus oncolítico es ICOVIR-5.
7. Producto de combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la célula madre mesenquimatosa deriva de médula ósea, placenta, cordón umbilical, membrana amniótica, sangre menstrual, sangre periférica, glándula salivar, piel y prepucio, líquido sinovial, líquido amniótico, endometrio, tejido adiposo, sangre del cordón umbilical y/o tejido dental.
8. Producto de combinación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de combinación es una composición.

9. Composición farmacéutica que comprende la composición según la reivindicación 8, y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- 5 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, en la que la composición farmacéutica comprende además un agente quimioterápico.
11. Producto de combinación según las reivindicaciones 1-8 o composición farmacéutica según las reivindicaciones 9 ó 10 para su uso como medicamento.
- 10 12. Producto de combinación según las reivindicaciones 1-8 o composición farmacéutica según las reivindicaciones 9 ó 10 para su uso en el tratamiento de un tumor sólido.
- 15 13. Producto de combinación o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en los que el tumor sólido es un cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer de ovarios y/o cáncer de hígado.
- 20 14. Producto de combinación o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en los que el tratamiento se usa en combinación con quimioterapia y/o radioterapia.
- 25 15. Método para la producción de células madre mesenquimatosas modificadas que comprenden un parásito intracelular, que comprende las etapas de:
 - (1) aislar células madre mesenquimatosas a partir de una muestra aislada;
 - (2) cultivar las células madre mesenquimatosas;
 - 30 (3) inhibir el receptor de tipo Toll 4 y/o el receptor de tipo Toll 9 de las células madre mesenquimatosas aisladas; y
 - (4) infectar las células madre mesenquimatosas con un parásito intracelular.
- 35 16. Método según la reivindicación 15, que comprende además una etapa de irradiación con rayos X entre las etapas (3) y (4).

17. Kit que comprende:

(a) una célula madre mesenquimatosa;

5 (b) una sustancia antigénica; y

(c) un inhibidor del receptor de tipo Toll 4 y/o del receptor de tipo Toll 9 seleccionado del grupo que consiste en:

10 (i) ARN de interferencia pequeño;

(ii) vectores para terapia génica, preferiblemente vectores para terapia génica que comprenden el sistema CRISPR/Cas9;

15 (iii) un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 4 seleccionado del grupo que consiste en 3,4,6-triacetato de isopropil-2-(acetilamino)-2-desoxi- α -D-glucopiranosido, resatorvid, eritorán y un péptido con la secuencia KYSFKLILAEYRRRRRRRRR (SEQ ID NO: 1), y/o un inhibidor de molécula pequeña bioactivo del receptor de tipo Toll 9
20 seleccionado del grupo que consiste en un nucleótido que comprende la secuencia TTAGGG, ODN 2088, ODN 4084-F, ODN INH-1, ODN-INH-18, ODN A151, G-ODN, 3-[4-(6-(3-(dimetilamino)propoxi)benzo[d]oxazol-2-il)fenoxi]-N,N-dimetilpropan-1-amina, 6-[3-(pirrolidin-1-il)propoxi)-2-(4-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)fenil]benzo[d]oxazol; y

25 (iv) un anticuerpo neutralizante que se une a la región extracelular del receptor de tipo Toll 4 y/o el receptor de tipo Toll 9.

18. Kit según la reivindicación 17, en el que la sustancia antigénica es un parásito
30 intracelular.

Figura 1

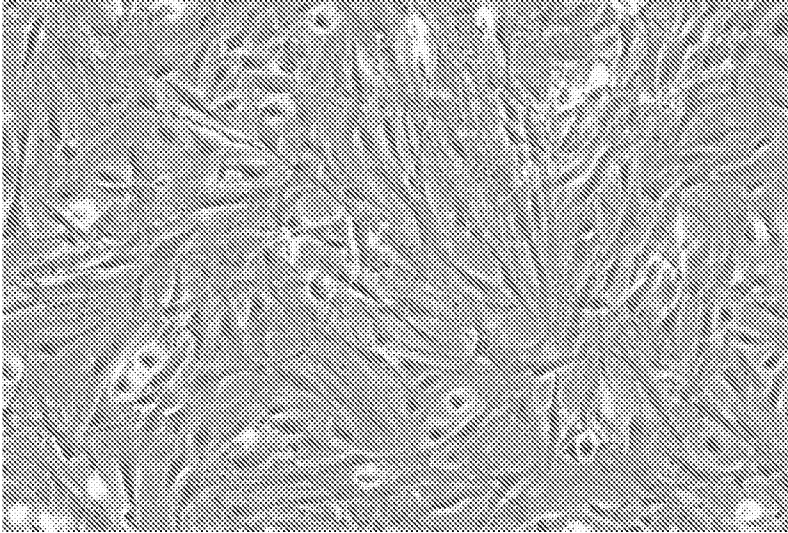


Figura 2

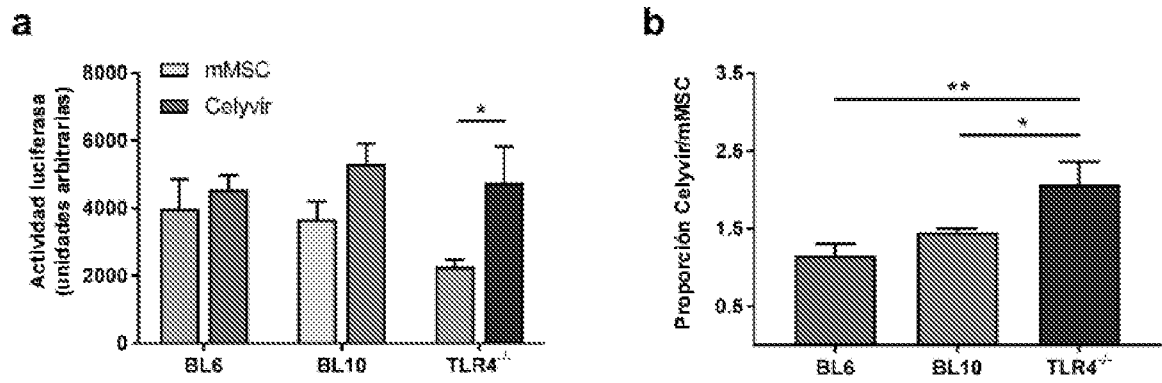


Figura 3

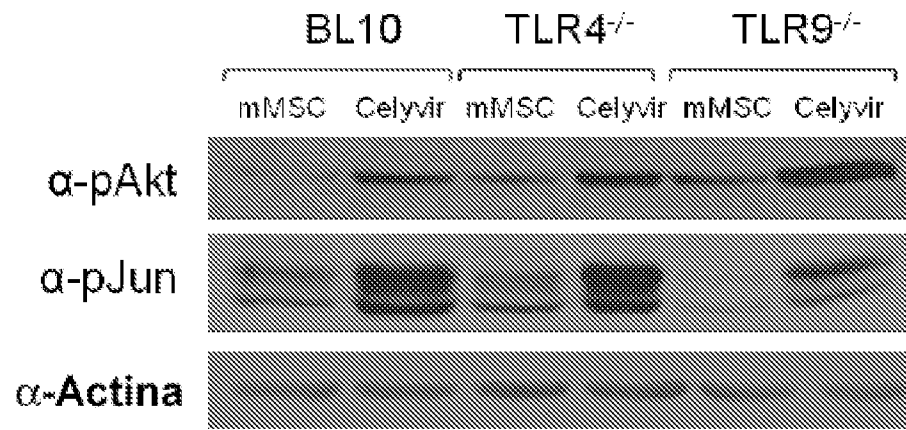


Figura 4

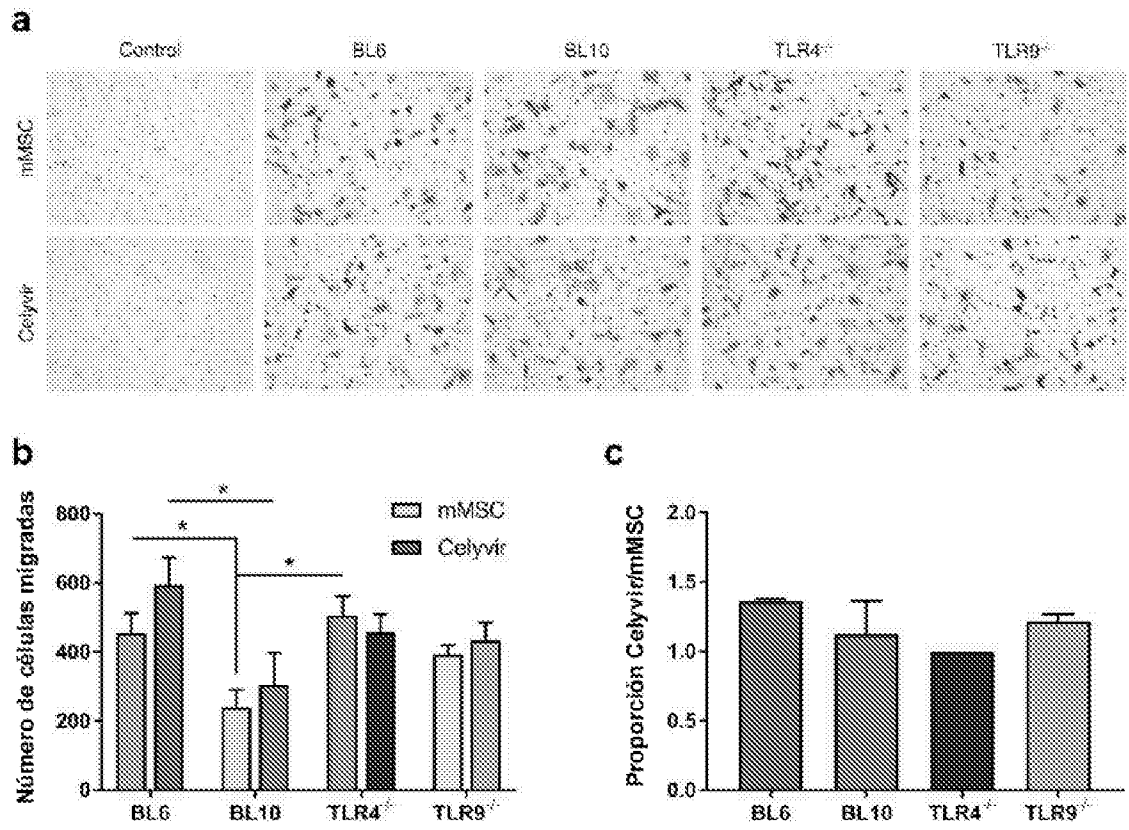


Figura 5

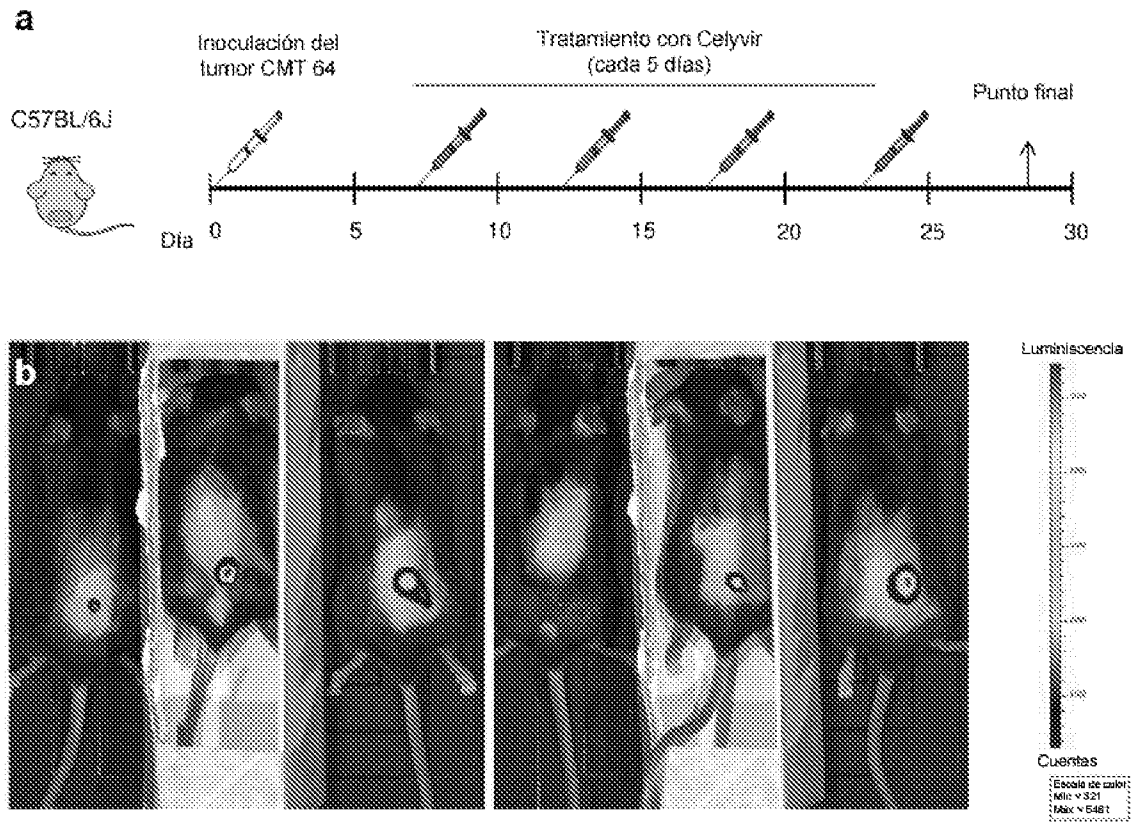


Figura 6

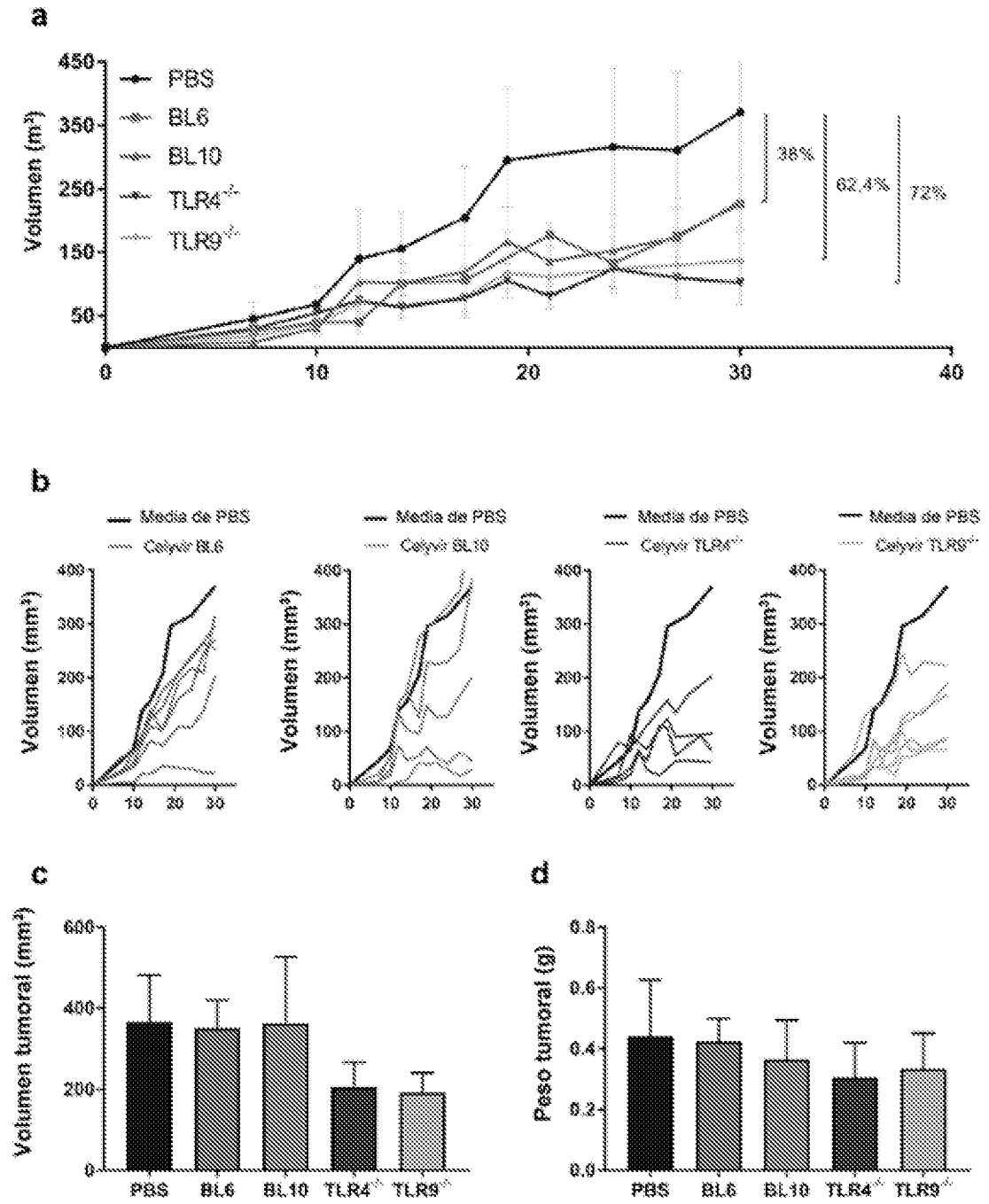


Figura 7

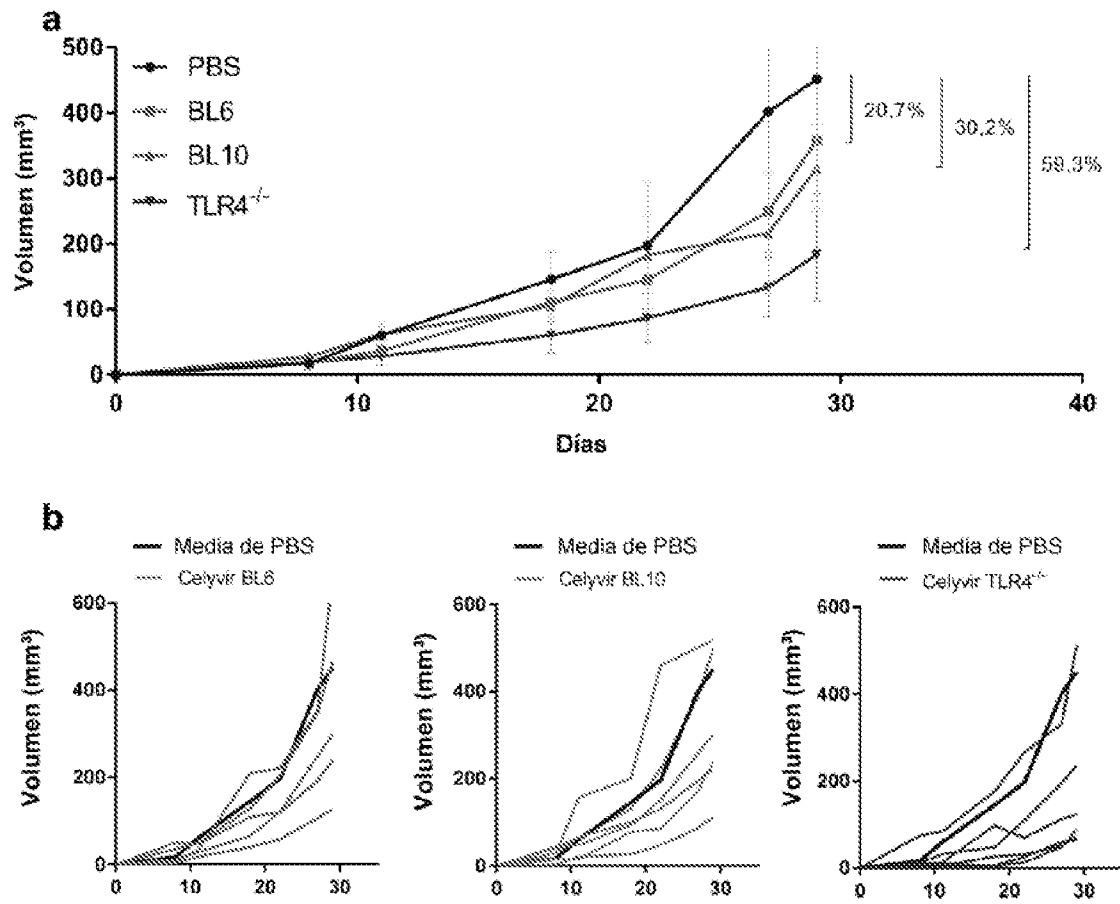


Figura 8

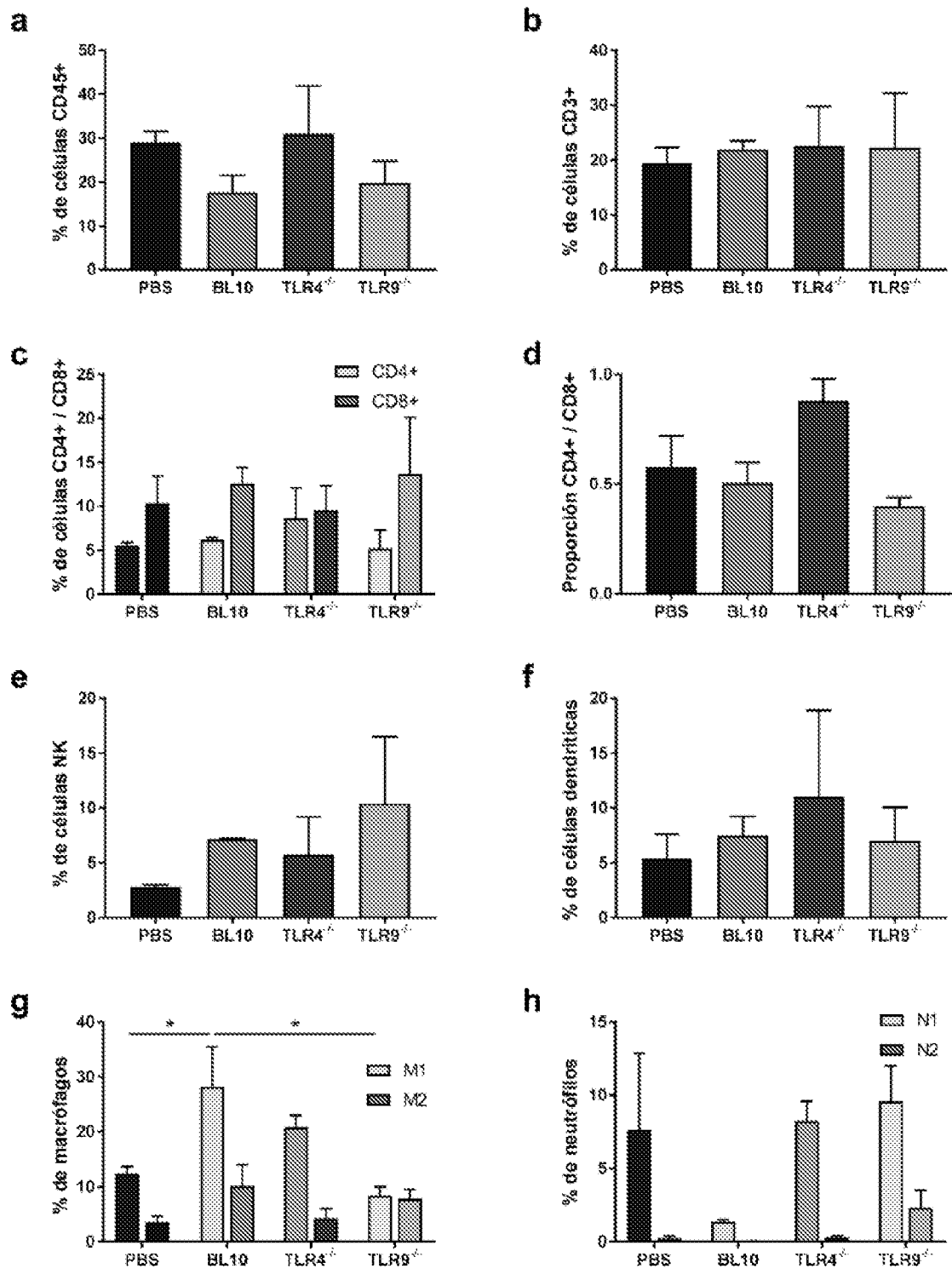
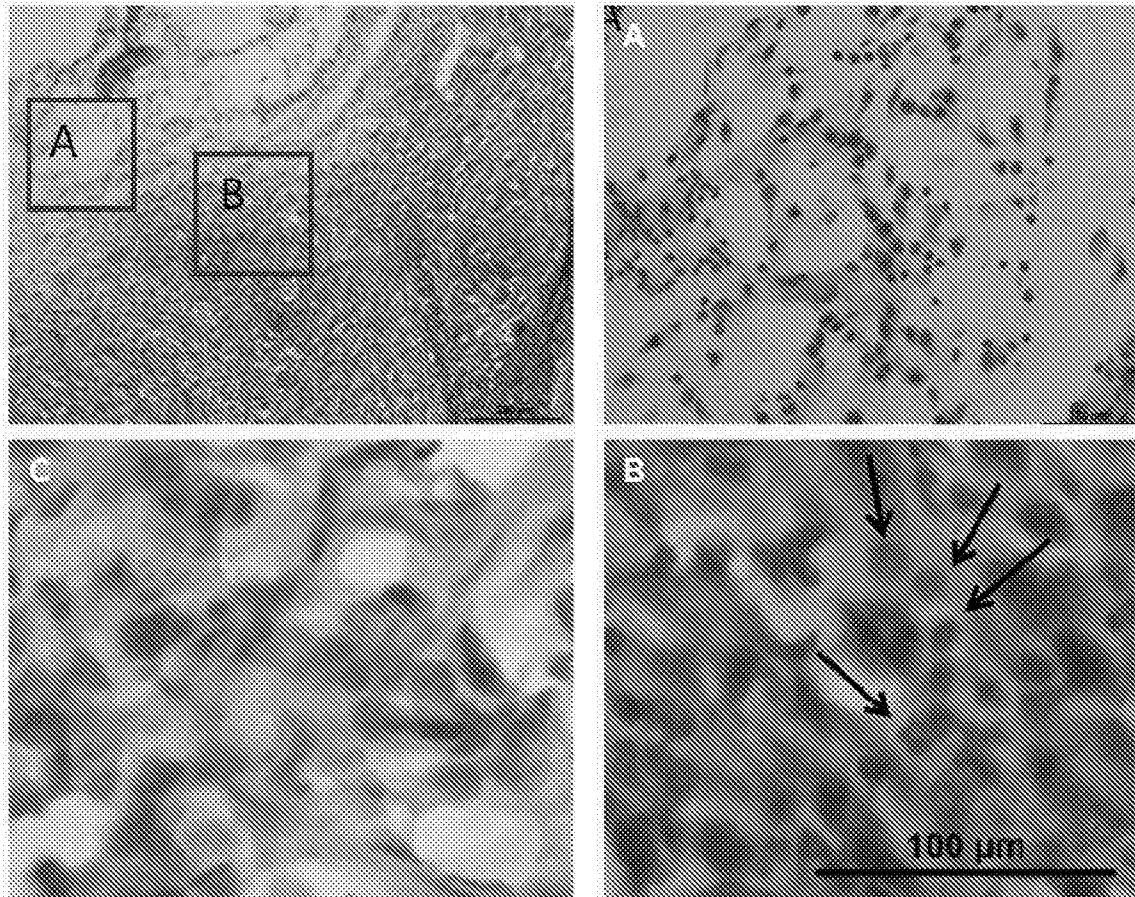


Figura 9



a

Heatmap showing cytokine expression levels (0 to 140000) for mMSC BL10, Celyvir BL10, mMSC TLR4, and Celyvir TLR4 across 26 cytokines. The cytokines are: CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCL17, CXCL18, CXCL19, CXCL20, CXCL21, CXCL22, CXCL23, CXCL24, CXCL25, CXCL26, CXCL27, CXCL28, CXCL29, CXCL30, CXCL31, CXCL32, CXCL33, CXCL34, CXCL35, CXCL36, CXCL37, CXCL38, CXCL39, CXCL40, CXCL41, CXCL42, CXCL43, CXCL44, CXCL45, CXCL46, CXCL47, CXCL48, CXCL49, CXCL50, CXCL51, CXCL52, CXCL53, CXCL54, CXCL55, CXCL56, CXCL57, CXCL58, CXCL59, CXCL60, CXCL61, CXCL62, CXCL63, CXCL64, CXCL65, CXCL66, CXCL67, CXCL68, CXCL69, CXCL70, CXCL71, CXCL72, CXCL73, CXCL74, CXCL75, CXCL76, CXCL77, CXCL78, CXCL79, CXCL80, CXCL81, CXCL82, CXCL83, CXCL84, CXCL85, CXCL86, CXCL87, CXCL88, CXCL89, CXCL90, CXCL91, CXCL92, CXCL93, CXCL94, CXCL95, CXCL96, CXCL97, CXCL98, CXCL99, CXCL100, CXCL101, CXCL102, CXCL103, CXCL104, CXCL105, CXCL106, CXCL107, CXCL108, CXCL109, CXCL110, CXCL111, CXCL112, CXCL113, CXCL114, CXCL115, CXCL116, CXCL117, CXCL118, CXCL119, CXCL120, CXCL121, CXCL122, CXCL123, CXCL124, CXCL125, CXCL126, CXCL127, CXCL128, CXCL129, CXCL130, CXCL131, CXCL132, CXCL133, CXCL134, CXCL135, CXCL136, CXCL137, CXCL138, CXCL139, CXCL140, CXCL141, CXCL142, CXCL143, CXCL144, CXCL145, CXCL146, CXCL147, CXCL148, CXCL149, CXCL150, CXCL151, CXCL152, CXCL153, CXCL154, CXCL155, CXCL156, CXCL157, CXCL158, CXCL159, CXCL160, CXCL161, CXCL162, CXCL163, CXCL164, CXCL165, CXCL166, CXCL167, CXCL168, CXCL169, CXCL170, CXCL171, CXCL172, CXCL173, CXCL174, CXCL175, CXCL176, CXCL177, CXCL178, CXCL179, CXCL180, CXCL181, CXCL182, CXCL183, CXCL184, CXCL185, CXCL186, CXCL187, CXCL188, CXCL189, CXCL190, CXCL191, CXCL192, CXCL193, CXCL194, CXCL195, CXCL196, CXCL197, CXCL198, CXCL199, CXCL200, CXCL201, CXCL202, CXCL203, CXCL204, CXCL205, CXCL206, CXCL207, CXCL208, CXCL209, CXCL210, CXCL211, CXCL212, CXCL213, CXCL214, CXCL215, CXCL216, CXCL217, CXCL218, CXCL219, CXCL220, CXCL221, CXCL222, CXCL223, CXCL224, CXCL225, CXCL226, CXCL227, CXCL228, CXCL229, CXCL230, CXCL231, CXCL232, CXCL233, CXCL234, CXCL235, CXCL236, CXCL237, CXCL238, CXCL239, CXCL240, CXCL241, CXCL242, CXCL243, CXCL244, CXCL245, CXCL246, CXCL247, CXCL248, CXCL249, CXCL250, CXCL251, CXCL252, CXCL253, CXCL254, CXCL255, CXCL256, CXCL257, CXCL258, CXCL259, CXCL260, CXCL261, CXCL262, CXCL263, CXCL264, CXCL265, CXCL266, CXCL267, CXCL268, CXCL269, CXCL270, CXCL271, CXCL272, CXCL273, CXCL274, CXCL275, CXCL276, CXCL277, CXCL278, CXCL279, CXCL280, CXCL281, CXCL282, CXCL283, CXCL284, CXCL285, CXCL286, CXCL287, CXCL288, CXCL289, CXCL290, CXCL291, CXCL292, CXCL293, CXCL294, CXCL295, CXCL296, CXCL297, CXCL298, CXCL299, CXCL300, CXCL301, CXCL302, CXCL303, CXCL304, CXCL305, CXCL306, CXCL307, CXCL308, CXCL309, CXCL310, CXCL311, CXCL312, CXCL313, CXCL314, CXCL315, CXCL316, CXCL317, CXCL318, CXCL319, CXCL320, CXCL321, CXCL322, CXCL323, CXCL324, CXCL325, CXCL326, CXCL327, CXCL328, CXCL329, CXCL330, CXCL331, CXCL332, CXCL333, CXCL334, CXCL335, CXCL336, CXCL337, CXCL338, CXCL339, CXCL340, CXCL341, CXCL342, CXCL343, CXCL344, CXCL345, CXCL346, CXCL347, CXCL348, CXCL349, CXCL350, CXCL351, CXCL352, CXCL353, CXCL354, CXCL355, CXCL356, CXCL357, CXCL358, CXCL359, CXCL360, CXCL361, CXCL362, CXCL363, CXCL364, CXCL365, CXCL366, CXCL367, CXCL368, CXCL369, CXCL370, CXCL371, CXCL372, CXCL373, CXCL374, CXCL375, CXCL376, CXCL377, CXCL378, CXCL379, CXCL380, CXCL381, CXCL382, CXCL383, CXCL384, CXCL385, CXCL386, CXCL387, CXCL388, CXCL389, CXCL390, CXCL391, CXCL392, CXCL393, CXCL394, CXCL395, CXCL396, CXCL397, CXCL398, CXCL399, CXCL400, CXCL401, CXCL402, CXCL403, CXCL404, CXCL405, CXCL406, CXCL407, CXCL408, CXCL409, CXCL410, CXCL411, CXCL412, CXCL413, CXCL414, CXCL415, CXCL416, CXCL417, CXCL418, CXCL419, CXCL420, CXCL421, CXCL422, CXCL423, CXCL424, CXCL425, CXCL426, CXCL427, CXCL428, CXCL429, CXCL430, CXCL431, CXCL432, CXCL433, CXCL434, CXCL435, CXCL436, CXCL437, CXCL438, CXCL439, CXCL440, CXCL441, CXCL442, CXCL443, CXCL444, CXCL445, CXCL446, CXCL447, CXCL448, CXCL449, CXCL450, CXCL451, CXCL452, CXCL453, CXCL454, CXCL455, CXCL456, CXCL457, CXCL458, CXCL459, CXCL460, CXCL461, CXCL462, CXCL463, CXCL464, CXCL465, CXCL466, CXCL467, CXCL468, CXCL469, CXCL470, CXCL471, CXCL472, CXCL473, CXCL474, CXCL475, CXCL476, CXCL477, CXCL478, CXCL479, CXCL480, CXCL481, CXCL482, CXCL483, CXCL484, CXCL485, CXCL486, CXCL487, CXCL488, CXCL489, CXCL490, CXCL491, CXCL492, CXCL493, CXCL494, CXCL495, CXCL496, CXCL497, CXCL498, CXCL499, CXCL500, CXCL501, CXCL502, CXCL503, CXCL504, CXCL505, CXCL506, CXCL507, CXCL508, CXCL509, CXCL510, CXCL511, CXCL512, CXCL513, CXCL514, CXCL515, CXCL516, CXCL517, CXCL518, CXCL519, CXCL520, CXCL521, CXCL522, CXCL523, CXCL524, CXCL525, CXCL526, CXCL527, CXCL528, CXCL529, CXCL530, CXCL531, CXCL532, CXCL533, CXCL534, CXCL535, CXCL536, CXCL537, CXCL538, CXCL539, CXCL540, CXCL541, CXCL542, CXCL543, CXCL544, CXCL545, CXCL546, CXCL547, CXCL548, CXCL549, CXCL550, CXCL551, CXCL552, CXCL553, CXCL554, CXCL555, CXCL556, CXCL557, CXCL558, CXCL559, CXCL560, CXCL561, CXCL562, CXCL563, CXCL564, CXCL565, CXCL566, CXCL567, CXCL568, CXCL569, CXCL570, CXCL571, CXCL572, CXCL573, CXCL574, CXCL575, CXCL576, CXCL577, CXCL578, CXCL579, CXCL580, CXCL581, CXCL582, CXCL583, CXCL584, CXCL585, CXCL586, CXCL587, CXCL588, CXCL589, CXCL590, CXCL591, CXCL592, CXCL593, CXCL594, CXCL595, CXCL596, CXCL597, CXCL598, CXCL599, CXCL600, CXCL601, CXCL602, CXCL603, CXCL604, CXCL605, CXCL606, CXCL607, CXCL608, CXCL609, CXCL610, CXCL611, CXCL612, CXCL613, CXCL614, CXCL615, CXCL616, CXCL617, CXCL618, CXCL619, CXCL620, CXCL621, CXCL622, CXCL623, CXCL624, CXCL625, CXCL626, CXCL627, CXCL628, CXCL629, CXCL630, CXCL631, CXCL632, CXCL633, CXCL634, CXCL635, CXCL636, CXCL637, CXCL638, CXCL639, CXCL640, CXCL641, CXCL642, CXCL643, CXCL644, CXCL645, CXCL646, CXCL647, CXCL648, CXCL649, CXCL650, CXCL651, CXCL652, CXCL653, CXCL654, CXCL655, CXCL656, CXCL657, CXCL658, CXCL659, CXCL660, CXCL661, CXCL662, CXCL663, CXCL664, CXCL665, CXCL666, CXCL66



②① N.º solicitud: 201731066

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.09.2017

②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MELEN GUSTAVO J <i>et al.</i> Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. CANCER LETTERS, 20151203 NEW YORK, NY, US. Su Changqing; Wang Hongyang, 03/12/2015, Vol. 371, Páginas 161 - 170, ISSN 0304-3835, <DOI: doi:10.1016/j.canlet.2015.11.036>. página 162, columna izquierda, primer párrafo; páginas 166-168.	1-18
A	LIZHANG <i>et al.</i> The role of toll-like receptor 3 and 4 in regulating the function of mesenchymal stem cells isolated from umbilical cord. International journal of molecular medicine, vol 35, 2015, páginas 1003-1010. página 1003, columna derecha; página 1008, columna derecha; página 1010, columna izquierda; resumen.	1-18
A	CERULLO VINCENZO <i>et al.</i> An Oncolytic Adenovirus Enhanced for Toll-like Receptor 9 Stimulation Increases Antitumor Immune Responses and Tumor Clearance. Molecular Therapy NOV 2012. , 31/10/2012, Vol. 20, Páginas 2076-2086, ISSN 1525-0016(print) ISSN 1525-0024(electronic), <DOI: doi:10.1038/mt.2012.137>. página 2076, columna derecha, tercer párrafo; página 2077, columna izquierda, segundo párrafo y página 2084, columna izquierda, segundo párrafo.	1-18
A	GARCIA-CASTRO J <i>et al.</i> Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. Cancer Gene Therapy JUL 2010. , 30/06/2010, Vol. 17, Páginas 476-483, ISSN 0929-1903, <DOI: doi:10.1038/cgt.2010.4>. páginas 476, 479 y 480.	1-18
A	RINCON ESTHER <i>et al.</i> Mesenchymal stem cell carriers enhance antitumor efficacy of oncolytic adenoviruses in an immunocompetent mouse model. Oncotarget JUL 11 2017. , 11/07/2017, Vol. 8, Páginas 45415-45431, ISSN 1949-2553(print) ISSN 1949-2553(electronic), <DOI: doi:10.18632/oncotarget.17557>. página 45415; página 45416, columna izquierda, segundo párrafo y página 45420, columna izquierda, tercer párrafo; página 45422, columna izquierda, primer y segundo párrafo; resumen	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
16.04.2018

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/077 (2010.01)

C12N5/0775 (2010.01)

A61K35/12 (2015.01)

A61K35/28 (2015.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL, INTERNET