

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 205**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12N 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.11.2011 E 11188494 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2591798**

54 Título: **Vacuna para su uso en inmunoterapia tumoral**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.12.2014**

73 Titular/es:

**LUBITZ, WERNER (100.0%)  
Hauptstrasse 88  
3420 Klosterneuburg/Kritzendorf, AT**

72 Inventor/es:

**LUBITZ, WERNER;  
KUDELA, PAVOL y  
MICHALEK, JAROSLAV**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 525 205 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Vacuna para su uso en inmunoterapia tumoral

- 5 La presente invención se refiere a una vacuna que comprende células presentadoras de antígenos profesionales, antígenos asociados a tumores y fantasmas bacterianos para su uso en inmunoterapia tumoral.

10 La terapia basada en células dendríticas usa células tumorales para estimular la inmunidad antitumoral. De este modo, las células dendríticas se incuban con células tumorales, en particular, con células tumorales autólogas (es decir, las propias células tumorales del paciente) para estimular la inmunidad antitumoral. Las células dendríticas incubadas con células tumorales extraen antígenos directamente de las células tumorales. Las células dendríticas que portan los antígenos asociados a tumores se usan a continuación como vacuna para estimular el sistema inmune contra el tumor. Mientras que las células dendríticas son necesarias para activar una respuesta contra el

15 peligroso. Mediante la activación de las células dendríticas, usando un estímulo externo, se crean células dendríticas que presentan los antígenos asociados al tumor relevantes y, por lo tanto, inducen una respuesta antitumoral efectiva.

20 Dicho enfoque se describe, por ejemplo, en el documento U.S. 2008/0031900. En este respecto, las células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas, se activan con GM-CSF e interferón alfa en presencia de una o más células cancerosas.

Aunque se han hecho progresos considerables con dichas composiciones, aún se desea una mejora adicional.

- 25 Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición para su uso como se especifica en la reivindicación 1.

30 De acuerdo con la invención, se ha descubierto que la efectividad de células presentadoras de antígenos y, en particular, células dendríticas como vacunas antitumorales pueden mejorarse proporcionando una composición para su uso que contenga adicionalmente fantasmas bacterianos.

Los fantasmas bacterianos (FB) son envueltas celulares bacterianas vacías de bacterias, en particular, de bacterias gram-negativas. Las bacterias preferidas son *E. coli* o *Shigella flexneri* 2a y, en particular, *E. coli* Nissle 1917.

35 Los FB pueden producirse mediante la expresión controlada de genes heterólogos que causan la disrupción de la integridad de la membrana bacteriana y causando la lisis de la bacteria. Un ejemplo de gen lítico es el gen E de bacteriófago PhiX174 que codifica un polipéptido que activa la fusión de las membranas interna y externa de las células bacterianas y que forma un túnel transmembrana que se extiende por toda la envuelta celular, a través del cual todo el contenido citoplásmico se expulsa debido al cambio en la presión osmótica entre el interior celular y el

40 medio de cultivo, mientras que las estructuras de las membranas interna y externa se conservan y permanecen intactas (consúltese el documento U.S. 7.968.323 B2). El tamaño de la estructura del túnel transmembrana depende de las condiciones de lisis y el diámetro interno está en el intervalo de 20-400 nm. El cuerpo vacío de los FB carece de ácidos nucleicos, ribosomas y otros constituyentes, mientras que las estructuras esenciales de la membrana interna y externa, incluyendo las moléculas antigénicas, por ejemplo, las proteínas de la membrana externa,

45 adhesinas, LPS y peptidoglucanos no están desnaturalizados y permanecen intactos. No hay absolutamente ningún riesgo de que vuelvan a la forma patógena después de la inducción del proceso de lisis controlada.

Los fantasmas bacterianos pueden prepararse mediante un método que comprende las siguientes etapas:

- 50 (a) proporcionar células bacterianas que comprenden un gen que codifica una proteína lítica capaz de formar una estructura de túnel en la envuelta celular bacteriana,
- (b) cultivar opcionalmente las células bacterianas en condiciones en las que el gen lítico no se expresa,
- 55 (c) someter a la célula bacteriana a condiciones en las que el gen lítico se expresa y los componentes citoplásmicos de las células bacterianas se liberan y,
- (d) obtener los fantasmas bacterianos resultantes.

60 Un ejemplo preferido de gen que codifica a la proteína lítica es el gen E de bacteriófago phiX174.

De manera particularmente preferida, las células bacterianas usadas para el método anteriormente descrito de preparación de fantasmas bacterianos codifican de manera adicional una enzima capaz de hidrolizar componentes citoplásmicos en la célula bacteriana, tal como se describe en el documento WO 03/006630. El método correspondiente de preparación de fantasmas bacterianos comprende las siguientes etapas adicionales:

65

(a) cultivar opcionalmente las células bacterianas en condiciones en las que el gen de la enzima no se expresa,

(b) someter a la célula bacteriana a condiciones en las que el gen de la enzima se expresa y los componentes citoplásmicos de las células bacterianas se degradan.

5 El gen que codifica la enzima hidrolítica es preferentemente un gen de nucleasa, en particular, un gen de nucleasa de *Staphylococcus aureus* (documento WO 03/006630).

10 Los FB no muestran impactos citotóxicos o genotóxicos en la viabilidad y actividad metabólica en un amplio abanico de células probadas incluyendo macrófagos, células dendríticas, células tumorales, células endoteliales y células epiteliales. Los FB con sus estructuras superficiales intactas se reconocen de manera eficiente y se fagocitan por CPA profesionales, por ejemplo, células dendríticas y macrófagos mediante varios receptores de superficie, por ejemplo, receptores de complemento y receptores de tipo Toll. Además, los estudios adicionales que usaron CD como modelo de las células presentadoras de antígenos más profesionales (CPA profesionales) revelaron que su actividad fagocítica y captación de FB depende de la cepa bacteriana usada para la producción de FB.

20 Aunque el proceso de lisis es muy efectivo, todavía puede haber una contaminación potencial con aproximadamente una célula bacteriana intacta por cada 10.000 FB. Para evitar la presencia de cualquier célula viva en la preparación de FB, en particular, justo antes de la liofilización de las muestras de FB, se añade preferentemente un agente alquilante, tal como beta-propiolactona que reacciona y causa alteraciones en los ácidos nucleicos, al sistema de fermentación antes de la recolección final de FB. Se divulga un proceso de producción que usa beta-propiolactona para la inactivación final que cumple con los criterios para su aplicación en medicina humana y veterinaria se divulga en la Solicitud de Patente N° PCT/EP2009/000272.

25 El uso de fantasmas bacterianos como vacuna o adyuvantes y la preparación de fantasmas bacterianos recombinantes que portan proteínas heterólogas en sus estructuras de envuelta celular se divulgan en la Solicitud de Patente N° PCT/EP98/04723.

30 El uso de fantasmas bacterianos como transportador o vehículo de direccionamiento de compuestos activos se divulga en la Solicitud de Patente N° PCT/EP00/01906.

35 La composición para su uso de acuerdo con la invención comprende como componente (i) células presentadoras de antígenos profesionales. En una realización preferida, la composición para su uso comprende monocitos y, lo más preferentemente, células dendríticas (CD). En particular, la composición para su uso de la invención después de incubación y lista para su administración comprende células dendríticas presentadoras de antígenos tumorales maduras.

40 Las CD son las CPA profesionales más potentes, así como potentes iniciadoras y moduladoras de las respuestas de los linfocitos T *in vivo* incluyendo la sensibilización de linfocitos T restringidos a CMH, desarrollo de producción de anticuerpos dependientes de linfocitos T, e inducción de tolerancia inmunológica. Las CD tienen una alta actividad fagocítica tanto en tejido periférico como en tejidos linfoides secundarios, y capturan antígenos (Ag) mediante varios mecanismos, incluyendo macropinocitosis y endocitosis mediada por receptores. El papel principal de las CD está relacionado con el reconocimiento de señales de peligro potencial proporcionadas por antígenos externos, su internalización, procesamiento y presentación dentro de complejo de moléculas de clase I y II del CMH. En la mayoría de los casos en condiciones fisiológicas normales, las CD están presentes en su estado inmaduro caracterizado por alta capacidad fagocítica, baja expresión de moléculas coestimuladoras y de presentación de Ag, y baja producción de citocinas. La fagocitosis de antígenos solubles mediante receptores de manosa (captación de Ag glucosilados) y receptores Fc (captación de inmunoglobulinas) potencia fuertemente la eficiencia de presentación de antígenos. Además, las CD pueden presentar antígenos en concentraciones 100 veces más bajas después de que el complejo de Ag con anticuerpo se internaliza mediante receptores Fc en comparación con Ag solubles internalizados mediante macropinocitosis. La estimulación efectiva de linfocitos T está estrictamente conectada con la maduración de CD, lo que afecta a la producción de citocinas, a la expresión de moléculas coestimuladoras y a la presentación de complejos péptido-CMH. La endocitosis de antígenos extracelulares y su procesamiento mediante la vía endosomal-lisosomal da normalmente como resultado la presentación de fragmentos de antígeno dentro de la clase II de moléculas del CMH. Sin embargo, la endocitosis de antígenos extracelulares mediada por receptores Fc permite la presentación de antígenos restringidos a la clase I y la clase II de CMH e induce la maduración de CD. La presentación de antígenos extracelulares en el contexto de moléculas de clase I de CMH se conoce como presentación cruzada o cebado cruzado. La presentación eficiente de antígenos mediante moléculas del CMH junto con la expresión de moléculas coestimuladoras y secreción de citocinas da lugar a la estimulación de varios tipos de linfocitos T, por ejemplo, Th1, Th2, Treg o Th17. Para la activación de linfocitos Th1 y su proliferación, es importante la producción suficiente de IL-12 por CD maduras. La polarización hacia la respuesta inmune de linfocitos T de tipo Th1 se considera como uno de los factores más importantes necesarios para la inducción de respuestas inmunes antitumorales efectivas que conducen al reconocimiento y eliminación de células tumorales.

65 Los FB muestran una excelente capacidad para ser reconocidos e internalizados por CPA profesionales, incluyendo CD. Los FB cargados de ADN estimulan de manera más eficiente las respuestas inmunes tanto humorales como

específicas de Ag que el ADN desnudo en ratones. Se observó un aumento de linfocitos T CD8+ específicos de Ag que producen IFN-gamma en animales vacunados con FB cargados con ADN en respuesta a la reestimulación mediante CPA pulsadas con péptido que contiene el epítipo inmunodominante de clase I de CMH. Además, los FB potenciaron la expresión de moléculas de clase I de CMH y de moléculas coestimuladoras en CD. La presentación

5 cruzada de Ag asociados a tumores administrados a CD por FB puede activar a linfocitos T tanto CD4+ como CD8+ y estimula al sistema inmune para potenciar una respuesta inmune contra Ag asociados a tumores expresados por tumores.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) potencia la maduración de CD, afecta a la acidificación endosomal de CD y también mejora la presentación cruzada de Ag. Las estructuras de la membrana interna y externa de FB que incluyen LPS permanecen intactos después de la lisis mediada por proteína E de bacterias gram-negativas, por lo tanto, además de una alta capacidad de carga, los FB también "portan" en la superficie una molécula de LPS elevadamente efectiva para la estimulación de presentación cruzada por CD.

10

Por consiguiente, la interacción entre CPA y FB en la composición de la invención para su uso da como resultado la estimulación, activación y, por lo tanto, maduración de las CPA.

15

La composición para su uso de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un antígeno asociado a tumor (componente (iii)). Los antígenos asociados a tumor (AAT) pueden proporcionarse, por ejemplo, mediante un lisado de células tumorales. Preferentemente, se proporciona un listado de células tumorales autólogo, es decir, un lisado de un tumor derivado del paciente que se va a tratar. Sin embargo, también es posible usar antígenos asociados a tumores a partir de una línea celular de tumor. Preferentemente, se usa una línea celular del mismo tipo de tumor que el tumor que se va a tratar. Preferentemente, se incluyen al menos dos lisados de células tumorales distintas en la composición para su uso de acuerdo con la invención.

20

El tumor o células cancerosas son preferentemente de cánceres seleccionados del grupo que consiste en fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, sarcoma de Kaposi, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, rabdosarcoma, carcinoma colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, mieloma, linfoma, y leucemia.

25

Más preferentemente, se usa un listado de células tumorales T98G.

40

La composición para el uso de la invención puede comprender células tumorales chocadas por calor y/o muertas.

La composición para el uso de la invención contiene opcionalmente de manera adicional una citocina, en particular, GM-CSF. Además, contiene opcionalmente interferón alfa.

45

La invención, en particular, se refiere a una vacuna antitumoral hecha de células dendríticas (CD) derivadas de monocitos, al menos uno, preferentemente al menos dos lisados de células tumorales distintos del mismo tipo de tumor, fantasmas bacterianos (FB) y, opcionalmente, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos humano recombinante (GM-CSF), e interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) para su uso en inmunoterapia tumoral.

50

Las células presentadoras de antígenos en la composición para su uso de acuerdo con la invención se activan o maduran mediante incubación con antígenos asociados a tumor (AAT) y fantasmas bacterianos (FB). En particular, se activan una o más células presentadoras de antígenos que presentan uno o más antígenos cancerosos e inducen la activación de linfocitos T mediante incubación de las una o más células presentadoras de antígenos en presencia de una o más células cancerosas, preferentemente, en presencia de uno o más lisados de células tumorales o cancerosas, y en presencia de fantasmas bacterianos.

55

Una ventaja de la presente aplicación es que las CD pueden incubarse en presencia de lisado tumoral obtenido de células tumorales autólogas del paciente y/o líneas celulares preparadas a partir de tipos tumorales histológicamente idénticos. Por consiguiente, puede entrenarse a las CD para el tipo de cáncer respectivo a tratar. El uso de células tumorales autólogas minimiza el riesgo de infecciones o transmisión de otras enfermedades.

60

Otra ventaja está ocasionada por la incubación de CD en presencia de lisados tumorales preparados de dos o más líneas celulares distintas obtenidas de tipos tumorales idénticos. De este modo, el intervalo de antígenos presentados por las CD puede aumentarse.

65

Las estructuras inmunoestimuladoras superficiales intactas de los FB, opcionalmente junto con IFN- $\alpha$  y/o GM-CSF estimula la maduración completa de CD y suscitan la producción de IL-12. GM-CSF es la citocina usada típicamente para la generación de CD maduras.

5 Pueden obtenerse monocitos a partir de la sangre periférica de pacientes mediante extracción de sangre o leucoforesis, lo que garantiza una cantidad suficiente de células.

La incubación con uno o más lisados tumorales proporciona la presencia de varios antígenos tumorales asociados a tumores (AAT) y produce la estimulación de respuestas inmunes específicas de AAT más amplias.

10 Los lisados de tumor pueden prepararse bien a partir de una muestra autóloga o a partir de tejido tumoral obtenido durante la cirugía al paciente o a partir de líneas celulares tumorales generadas a partir del tipo tumoral idéntico. Se evalúan los donantes de tejido antes de la cirugía para ETS, por ejemplo, VIH, VHC, VHB, sífilis, y solo se consideran a los pacientes negativos como donantes de tejido.

15 La vacuna antitumoral basada en CD, lisado de tumor y FB puede aplicarse como tratamiento para pacientes con tumores, en particular, con glioblastoma, carcinoma renal, carcinoma de ovario, carcinoma de próstata y melanoma. Preferentemente, los lisados tumorales se preparan a partir de los tipos celulares y/o líneas celulares tumorales respectivas.

20 La composición para su uso de acuerdo con la invención comprende preferentemente fantasmas bacterianos vacíos como componente (iii). Sin embargo, también es posible usar fantasmas bacterianos que están cargados, en particular, con un activador o silenciador del sistema inmune. Los fantasmas bacterianos pueden cargarse, en particular, con un agente farmacéutico y/o ADN.

25 La composición para su uso puede contener opcionalmente lipopolisacárido bacteriano (LPS).

Se ha descubierto que las CPA, en particular, células dendríticas contenidas en la composición de la invención para su uso y que se incuban con AAT y FB producen citocinas específicas, en particular, IL-23, IL-17 y/o IL-1 $\beta$ .

30 Cuando se administran las CPA maduras, en particular, CD a un paciente, se induce una respuesta inmunológica. Se ha descubierto, en particular, que la composición de la invención para su uso induce una respuesta de Th17 que no se ha observado cuando se administran composiciones de células presentadoras de antígenos que no se han incubado con fantasmas bacterianos.

35 La composición para su uso de acuerdo con la invención contiene preferentemente al menos un fantasma bacteriano, más preferentemente, al menos cinco fantasmas bacterianos y más preferentemente al menos 10 fantasmas bacterianos por cada célula presentadora de antígenos, en particular, por célula dendrítica. La composición para su uso puede contener hasta 10.000 fantasmas bacterianos, preferentemente, hasta 1.000 fantasmas bacterianos y más preferentemente hasta 500 fantasmas bacterianos por célula dendrítica.

40 Mediante la administración de dicha vacuna, se suscita una respuesta inmunológica contra células cancerosas. Cuando se administra, la composición para su uso de acuerdo con la invención y, en particular, las células presentadoras de antígenos contenidas en esta inducen un reconocimiento de antígenos tumorales aumentado y, por lo tanto, la eliminación específica de tumores por linfocitos T autólogos.

45 Para su administración, una vacuna comprende preferentemente de aproximadamente 1 a 10 millones de células, en particular, de 4 a 6 millones de células por dosis. Se administran preferentemente de 5 a 15, en particular, de 6 a 10 dosis. La administración puede tener lugar a lo largo de varias semanas. Preferentemente, las primeras dos o tres dosis se administran semanalmente, seguido de una administración mensual de las dosis restantes.

50 Para su almacenamiento, la composición está preferentemente congelada, en particular, liofilizada.

55 La administración puede efectuarse de cualquier modo adecuado, por ejemplo, por vía sistémica, subcutánea, intranodal, intradérmica o intratumoral.

60 Para su administración, los fantasmas bacterianos pueden contener un agente activo para activar o silenciar el sistema inmune. Para madurar la CPA, el fantasma bacteriano puede contener ingredientes adicionales, tales como lisados tumorales, péptidos tumorales, antígenos tumorales o citocinas. La incubación de células presentadoras de antígenos con fantasmas bacterianos y antígeno asociado a tumores tiene lugar preferentemente en un intervalo de tiempo de 10 minutos a 12 horas, preferentemente, de 15 minutos a 6 horas, y más preferentemente, de 3 horas a 5 horas.

65 En una realización particularmente preferida, las células dendríticas se cultivan en medio CellGro<sup>®</sup> DC GMP medio libre de suero comercialmente disponible optimizado para la generación de CD, uso clínico *ex vivo*, estandarizado, fabricado, probado y comercializado cumpliendo con las orientaciones GMP.

La preparación de la vacuna antitumoral de acuerdo con la combinación anteriormente mencionada de agentes estimuladores y CD se efectúa preferentemente mediante incubación de monocitos, en particular, CD obtenidas de la sangre periférica de pacientes en un incubador humidificado con CO<sub>2</sub> al 5 % a +37 °C en medio CellGro suplementado con ADNasa durante 2 horas, seguido de incubación durante 3 días en medio CellGro suplementado con GM-CSF humano recombinante e IFN- $\alpha$  para obtener una población de CD inmaduras. Al menos un lisado tumoral, y preferentemente al menos dos lisados tumorales, preparados a partir de dos líneas celulares distintas de idénticos tipos tumorales se mezclan con FB, se agitan vorticialmente y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con agitación suave. Posteriormente, se mezclan GM-CSF humano recombinante e IFN- $\alpha$  con la mezcla de FB y lisados tumorales, y se añaden a CD inmaduras y se incuban en un incubador humidificado con CO<sub>2</sub> al 5 % a +37 °C.

Después de 4 horas de incubación, los lisados tumorales y FB no internalizados se retiran cuidadosamente mediante recolección cuidadosa del medio de las CD a un tubo estéril de 50 ml y se centrifuga a 700 RPM/5 minutos/TA. Mientras tanto, se añade medio CellGro fresco suplementado con GM-CSF humano recombinante e IFN- $\alpha$  al resto de células. Después de la centrifugación, se retira el sobrenadante rápida y cuidadosamente, el precipitado se resuspende en medio CellGro suplementado con GM-CSF e IFN- $\alpha$  y las células se devuelven al matraz de cultivo. Las CD se incuban durante 6 horas adicionales en un incubador humidificado con CO<sub>2</sub> al 5 % a +37 °C antes de la ultracongelación de la vacuna.

La invención se describe adicionalmente por las Figuras adjuntas y los siguientes Ejemplos.

**Figura 1. Expresión de marcadores de superficie celular en CD.** Se prepararon CD inmaduras mediante incubación de monocitos obtenidos de sangre periférica en medio CellGro DC suplementado con IFN- $\alpha$  (3000 UI/ml) y GM-CSFhr (1000 UI/ml) durante 3 días. Los marcadores de maduración de las CD se analizaron mediante citometría de flujo multicolor 48 horas después de la estimulación corta (4 horas) de CD inmaduras con FB de *E. coli Nissle* 1917 (10 y 100 FB/1CD) en presencia de IFN- $\alpha$  y GM-CSFhr. Las CD inmaduras incubadas con IFN- $\alpha$  y GM-CSFhr suplementado con lipopolisacárido (LPS) (200 ng/ml) o sin estímulos adicionales de maduración sirvieron como controles. El eje y representa el porcentaje de células que expresan antígeno de diferenciación específico. Los datos representan la media  $\pm$  DE de 4 experimentos independientes efectuados usando células obtenidas de diferentes donantes.

CD14 es un indicador de maduración de células dendríticas. Mientras que los monocitos muestran expresión de CD14, las células dendríticas maduras muestran poca o ninguna expresión de CD14.

CCR7 es un marcador para atrayentes de las células al nódulo linfático. Como puede observarse en la Fig. 1, la expresión del marcador CCR7 aumenta para células dendríticas incubadas con fantasmas bacterianos, lo que muestra su movilidad. CD83 es un marcador de células dendríticas maduras.

CD80, CD86, CD1a, CD11c y HLA-DR son marcadores para células dendríticas.

**Figura 2. Capacidad migratoria de CD después de incubación con LPS o estimulación corta con FB.** Las quimiotaxis de distintas poblaciones de CD en respuesta a CCL21 se determinaron como el número de células que migraron a la parte inferior de un sistema Transwell que contenía diferentes concentraciones de CCL21 y se contaron mediante citometría de flujo. Cada barra representa la media del número de células migradas  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes efectuados usando células obtenidas de diferentes donantes.

**Figura 3. Perfil de citocinas de CD maduras con adición de LPS, incubación corta con FB o sin estímulos extra de maduración.** Las CD se estimularon con LPS pura (200 ng/ml) o durante un tiempo breve (4 h) con FB de *E. coli Nissle* 1917 (10 y 100 FB/1CD) antes de medir las citocinas liberadas a los sobrenadantes después de incubaciones de 24, 48, y 72 horas. Las células incubadas sin estímulos de maduración adicionales sirvieron como control negativo. Los niveles de citocinas liberadas a partir de CD se midieron usando un dispositivo FACSArray Bioanalyzer. Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes efectuados usando células obtenidas de diferentes donantes.

IL-12p70 e IFN- $\gamma$  son marcadores de activación para linfocitos L.

IL-23, IL-17 e IL-1 $\beta$  son marcadores para linfocitos Th17. La Fig. 3 muestra que los linfocitos T colaboradores se inducen por composiciones de acuerdo con la invención.

IL-6 y TNF- $\alpha$  son marcadores de inflamación.

**Figura 4. Capacidades auto- y aloestimuladoras de CD analizadas.** La incubación corta de CD con FB (4 horas) potenció significativamente la capacidad de las CD para estimular la proliferación de linfocitos T autólogos en comparación con CD maduras con adición de LPS puro o sin estímulos de maduración. Las capacidades inmunoestimuladoras autólogas y alogénicas de las CD maduras con adición de LPS puro (200 ng/ml), incubación breve con FB de *E. coli Nissle* 1917 (10 y 100 FB/1CD) o sin estímulos extra se determinaron después de 6 días de incubación en presencia de linfocitos T autólogos o alogénicos marcados con CFSE a una proporción de CD:linfocitos T = 1:10. Las células estimuladas se tiñeron después de la incubación con un panel de anticuerpos monoclonales (anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8) y la proliferación de linfocitos T tanto autólogos como alogénicos se determinó mediante citometría de flujo multicolor. Los valores se calcularon como el porcentaje de células proliferadas espontáneamente restado del porcentaje de células proliferadas después de la estimulación con distintas poblaciones de CD. Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos

independientes efectuados usando células obtenidas de diferentes donantes.

**Figura 5. Reconocimiento de células tumorales y efectos citotóxicos de linfocitos T alogénicos y autólogos inducidos por CD cargadas con lisado de tumor después de estimulación breve con FB.** Se incubaron linfocitos T autólogos o alogénicos durante 6 días en presencia de lisado CD cargadas con células tumorales T98G preestimuladas con LPS puro (200 ng/ml), incubación breve (4 horas) con FB de *E. coli* Nissle 1917 (10 y 100 FB/1CD) o sin estímulos extra de maduración. Posteriormente, se añadieron linfocitos T a distintos tipos de células tumorales frescas marcadas con CFSE incluyendo células usadas para cargar CD y tres tipos histológicos diferentes de tumor a una proporción de efector:diana de 10:1. La lisis específica de células tumorales se determinó 24 horas después de la coincubación mutua mediante citometría de flujo. Los datos representan la media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes efectuados usando células obtenidas de diferentes donantes.

En particular, los resultados del tratamiento de células tumorales T98G muestra una potenciación considerable de CD+FB en comparación con CD solas o CD+LPS.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1. Fantasmas bacterianos.**

Los fantasmas bacterianos se preparan de acuerdo con la Solicitud de Patente N° PCT/EP2009/000272.

#### **Ejemplo 2. Preparación de lisado tumoral.**

Se almacena tejido tumoral obtenido de un paciente con cáncer o de placas de cultivo tisular (matraces) rellenos con NaCl (cloruro de sodio al 0,9 % en agua para inyección "Fresenius"). El tubo con tejido tumoral o células se almacenó a +4 °C y se procesó hasta 3 días después de la cirugía. El tubo se irradió (120 Gy) antes del procesamiento del tejido. Se evaluó a los donantes (pacientes) para ETS, por ejemplo, VIH, VHC, VHB, sífilis, y se excluyó a los pacientes con detección positiva de cualquiera de las enfermedades mencionadas. El tejido tumoral obtenido de los pacientes se transfiere a una placa de Petri estéril cargada con 5-10 ml de HBSS (solución salina equilibrada de Hank: Lonza, N°: 10-547F o 10-527F; fabricado de acuerdo con las regulaciones de cGMP). Los tejidos necrótico y conectivo se retiran con bisturí y pinzas. El tejido tumoral restante se corta en pequeños trozos de aproximadamente 5 mm y se trituran con un émbolo de jeringa estéril. La suspensión de células obtenidas se homogeniza adicionalmente haciendo pasar la suspensión a través de una aguja del calibre 20 (0,9 mm) unida a una jeringa estéril varias veces hasta que se obtiene una suspensión homogénea. La suspensión de células se filtra a continuación a través de un filtro de nylon (100  $\mu$ m) y se recoge en un tubo estéril de 50 ml. La placa de Petri se lava con el HBSS restante, se filtra a través de un filtro de nylon y se combina con las células filtradas. La suspensión celular se centrifuga a 1600 RPM durante 7 minutos a +4 °C. El sobrenadante se decanta rápida y cuidadosamente y se resuspende un precipitado en 2 ml de agua estéril para inyección. La suspensión de células individuales se divide a partes iguales en microtubos. Los microtubos se ponen en N<sub>2</sub> líquido o en una mezcla de hielo seco y metanol durante aproximadamente 3 minutos. Posteriormente, se descongelan las células congeladas a temperatura ambiente (TA) durante 15-30 minutos hasta que el precipitado de células se derrite por completo (las células no deben mantenerse a TA demasiado tiempo para evitar la degradación de células tumorales). El procedimiento de congelación-descongelación debe repetirse 5 veces. El lisado de células se sonica en un baño ultrasónico durante 5 minutos. Los restos celulares, junto con el lisado celular, se recoge en un tubo, se centrifuga a 10000-15000 RPM durante 10 minutos, seguido de una recolección rápida y cuidadosa del sobrenadante (lisados celulares) usando una aguja fina separando el precipitado. Los lisados celulares no deben filtrarse y todas las etapas tienen que efectuarse en condiciones estériles. Los lisados celulares no filtrados se alicuotan y almacenan a -80 °C hasta su uso posterior. El lisado de células se diluye con DPSB 10x (salino tamponado con fosfato de Dulbecco, PBS 10x, Lonza, N°: 17-515F). Se usa un espectrofotómetro para la determinación de concentración de proteínas.

#### **Ejemplo 3. Cultivo de células dendríticas derivadas de monocitos para la preparación de vacunas antitumorales.**

Se aíslan monocitos obtenidos de sangre periférica de pacientes bien mediante elutriación (sistema de separación de células Elutra, CaridianBCT Europe NV/SA) o mediante separación magnética (CliniMACS, Miltenyi Biotec GmbH). Se disuelve GM-CSF en CellGro para obtener una concentración final de  $1 \times 10^5$  UI/ml y se alicuota en microtubos (700  $\mu$ l por tubo) y se almacena a -80 °C. Se alicuota IFN- $\alpha$  (Roche, ROFERON-A  $12 \times 10^6$  UI) en microtubos (17,5  $\mu$ l por tubo) y se almacena a entre +2 °C y +8 °C. Se alicuotan medios de congelación de criopreservación CryoStor CS2 o CryoStor CS5 en condiciones estériles en los microtubos (1,5 ml por tubo). Los monocitos separados se resuspenden en medio de cultivo y se añaden a un matraz de cultivo, aproximadamente  $167 \times 10^6$  monocitos en 70 ml de medio de cultivo. Se necesitan aproximadamente 150  $\mu$ g de lisado tumoral para un matraz de cultivo o lisado tumoral de células correspondiente a un número de células tumorales a tres veces la cantidad de CD inmaduras (monocitos). La suspensión de células monocíticas de matraces de cultivo se centrifuga a 1500 RPM durante 10 minutos a TA. Después de la decantación del sobrenadante, el precipitado celular se resuspende en un volumen pequeño de CellGro y se completa con CellGro hasta 35 ml. La suspensión de células se

transfiere a un matraz de cultivo. Se añaden GM-CSF (700  $\mu$ l/7 x 10<sup>4</sup> UI) e IFN- $\alpha$  (17,5 ml/2,1 x 10<sup>5</sup> IU) en 35 ml de CellGro a la suspensión de células monocíticas. El contenido del matraz de cultivo se mezcla con cuidado moviendo suavemente el matraz de un lado a otro. Las células se incuban en un incubador humidificado con CO<sub>2</sub> al 5 % a +37 °C durante 3 días.

5 La suspensión celular preparada de CD inmaduras se recoge y distribuye en 3 tubos estériles de 50 ml. Se añade mientras tanto medio de cultivo CellGro fresco (5 ml) en cada matraz de cultivo para evitar la muerte de las células adheridas a la superficie del matraz de cultivo. La suspensión de células se centrifuga a 1500 RPM durante 10 minutos a TA. EL sobrenadante se decanta rápida y cuidadosamente y el precipitado de células se resuspende en 2 ml de medio CellGro y las células de los matraces de cultivo se transfieren a 1 tubo. Cada uno de los tubos usado para la centrifugación de células se enjuaga con 4 ml de medio CellGro y el contenido se transfiere al tubo con células recogidas. Se mezcla lisado tumoral (5 ml) obtenido de tejido tumoral o líneas celulares tumorales (proporción de células tumorales:CD = 3:1; 501 x 10<sup>6</sup>:167 x 10<sup>6</sup>) con 167 x 10<sup>8</sup> fantasmas bacterianos preparados a partir de *E. coli* Nissle 1917 (proporción de FB:CD = 100:1), se agitan vorticialmente de manera intensa y se incuban con agitación suave a TA durante 60 minutos. La mezcla de FB y lisado de células tumorales suplementado con GM-CSF (25  $\mu$ l/2,5 x 10<sup>4</sup> UI) y se añade IFN- $\alpha$  (6,25  $\mu$ l/7,5 x 10<sup>4</sup> UI) a la suspensión de CD. Posteriormente, la suspensión de células con todos los reactivos se transfiere a un matraz de cultivo. El tubo que contenía la suspensión de células se enjuaga con 5 ml de CellGro y el medio se transfiere al matraz de cultivo y se mezcla cuidadosamente con agitación suave de un lado a otro. Las células se incuban en un incubador humidificado con CO<sub>2</sub> al 5 % a +37 °C durante 4 horas para permitir la internalización de FB y lisado tumoral y para dar comienzo al proceso de maduración. Después de 4 horas de incubación, las células se transfieren a un tubo de 50 ml y el matraz de cultivo se enjuaga cuidadosamente con medio CellGro. El medio usado para enjuagar los matraces se transfiere al tubo con suspensión de células. Se añade mientras tanto medio de cultivo CellGro fresco (5 ml) en el matraz de cultivo para evitar la muerte de las células adheridas a la superficie del matraz de cultivo. La suspensión de células se centrifuga a 1500 RPM durante 10 minutos a TA. El sobrenadante se decanta rápida y cuidadosamente y los precipitados de células se resuspenden en 20 ml de medio CellGro fresco suplementado con GM-CSF (25  $\mu$ l/2,5 x 10<sup>4</sup> UI) e IFN- $\alpha$  (6,25  $\mu$ l/7,5 x 10<sup>4</sup> UI). La suspensión de células se transfiere al matraz de cultivo original que se agita suave y cuidadosamente de un lado a otro, y las células se incuban en un incubador humidificado con CO<sub>2</sub> al 5 % a +37 °C durante 6 horas adicionales.

**Ejemplo 4. Almacenamiento de preparaciones de vacuna antitumoral.**

Se agita intensamente un matraz de cultivo con CD estimuladas obtenido en el Ejemplo 3 para liberar las células adheridas a las paredes del matraz. La suspensión de células se transfiere por completo a un tubo de 50 ml marcado. El matraz de cultivo se enjuaga con dos volúmenes adicionales del mismo HBSS (10 ml) usado para la preparación de lisado tumoral, en caso de que sea posible, y el volumen completo de HBSS se transfiere al tubo con suspensión celular. El matraz de cultivo original se rellena con 5 ml de HBSS y se pone de nuevo en un incubador. El volumen de suspensión de células se enrasa hasta 50 ml con HBSS y se mezcla suavemente invirtiendo el tubo. La suspensión de células se centrifuga a 1500 RPM durante 10 minutos a +4 °C. El sobrenadante se decanta rápida y cuidadosamente y los precipitados de células se resuspenden primero en 5 ml de HBSS, seguido de la adición de 45 ml adicionales de HBSS y se mezcla bien invirtiendo el tubo. Se usan 10  $\mu$ l de suspensión de células para determinar el número de células, usando una cámara de conteo Burkner. Si la concentración de células en la suspensión es inferior a 1,4 x 10<sup>6</sup>/ml, debe usarse acutasa para liberar a las células restantes del matraz de cultivo, en caso contrario, las alícuotas de células conteniendo cada una 5 x 10<sup>6</sup> células se congelarán para su futura administración al paciente. Es obligatorio preparar al menos 6 alícuotas para su administración al paciente, una alícuota para control de calidad, una alícuota para control inmunológico, una alícuota para ensayo de *mycoplasma* y tres alícuotas para arbitraje. La suspensión de células se centrifuga a 1500 RPM durante 10 minutos a +4 °C. Se transfieren criotubos a un MiniCooler previamente enfriado. El sobrenadante se decanta rápida y cuidadosamente; el precipitado de células se resuspende en medio de congelación de criopreservación CryoStor CS2 y se transfiere a criotubos. Inmediatamente después de alícuotar la preparación de vacuna antitumoral, todos los criotubos se ponen en una caja de isopropanol a -80 °C. Después de 24 horas a -80 °C, toda la preparación de vacuna congelada se transfiere a un contenedor Dewar relleno con nitrógeno líquido especialmente configurado para su uso exclusivo con el fin de preparación de vacunas antitumorales.

**Tabla 1- Estándares de aceptabilidad de preparaciones de vacuna antitumoral antes de su administración a un paciente.**

Prueba	Criterio para pasar el control de calidad
Esterilidad de preparación de vacuna antitumoral	ESTÉRIL
Detección de <i>mycoplasma</i>	NEGATIVO
Recuento de células (x 10 <sup>6</sup> )	1 x 10 <sup>6</sup> -5 x 10 <sup>6</sup>
Viabilidad (%)	70-100 %

ES 2 525 205 T3

Prueba		Criterio para pasar el control de calidad
Pureza de CD (%)		70-100 %
Contaminación de células	CD3 (%)	Cantidad total (CD3 <sup>+</sup> + CD19 <sup>+</sup> ) 0-30%
	CD19 (%)	
Fenotipo de CD*	CD80 (%)	60-100 %
	CD86 (%)	60-100 %
	CMH clase II (%)	60-100 %
	CD83 (%)	60-100 %
	CD14 (%)	0-40%
Producción de IL-12 (pg/ml)		≥ 100 pg/ml
MLR alogénico - linfocitos T activados (%)**	Relación CD:PBMC 1:5	≥ 30 %
	Relación CD:PBMC 1:10	≥ 30 %
	Relación CD:PBMC 1:20	≥ 15%
<p>* al menos 3 de 5 marcadores fenotípicos deben cumplir los criterios para pasar el control de calidad antes de la administración de preparación de vacuna antitumoral a un paciente</p> <p>**al menos 2 de las 3 proporciones examinadas de CD:PBMC en las pruebas de MLR alogénico deben cumplir los criterios para pasar el control de calidad antes de la administración de preparación de vacuna antitumoral a un paciente</p>		

**REIVINDICACIONES**

1. Preparación de vacuna que comprende:

- 5 (i) células presentadoras de antígenos profesionales,  
(ii) antígenos asociados con tumores, y  
(iii) fantasmas bacterianos

para su uso en inmunoterapia.

10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde las células presentadoras de antígenos comprenden monocitos.

15 3. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde las células presentadoras de antígenos comprenden células dendríticas.

4. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprenden uno o más lisados tumorales.

20 5. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende fantasmas bacterianos obtenidos de células bacterianas que comprenden un gen que codifica una proteína lítica.

6. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende fantasmas bacterianos que se han tratado con  $\beta$ -propiolactona.

25 7. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende fantasmas bacterianos de bacterias gram-negativas, en particular, de *E. coli* y, más preferentemente, de *E. coli Nissle* 1917.

30 8. La composición para el uso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende fantasmas bacterianos cargados con un activador o silenciador del sistema inmunitario, un agente farmacéutico y/o ADN.

9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de 1 a 10.000, en particular, de 10 a 1.000 fantasmas bacterianos por célula presentadora de antígenos.

35 10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de 1 a 10 millones de células presentadoras de antígenos por dosis.

11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende células presentadoras de antígenos que inducen reconocimiento de antígenos tumorales y eliminación específica de tumor por linfocitos T.

40 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende células presentadoras de antígenos autólogas.

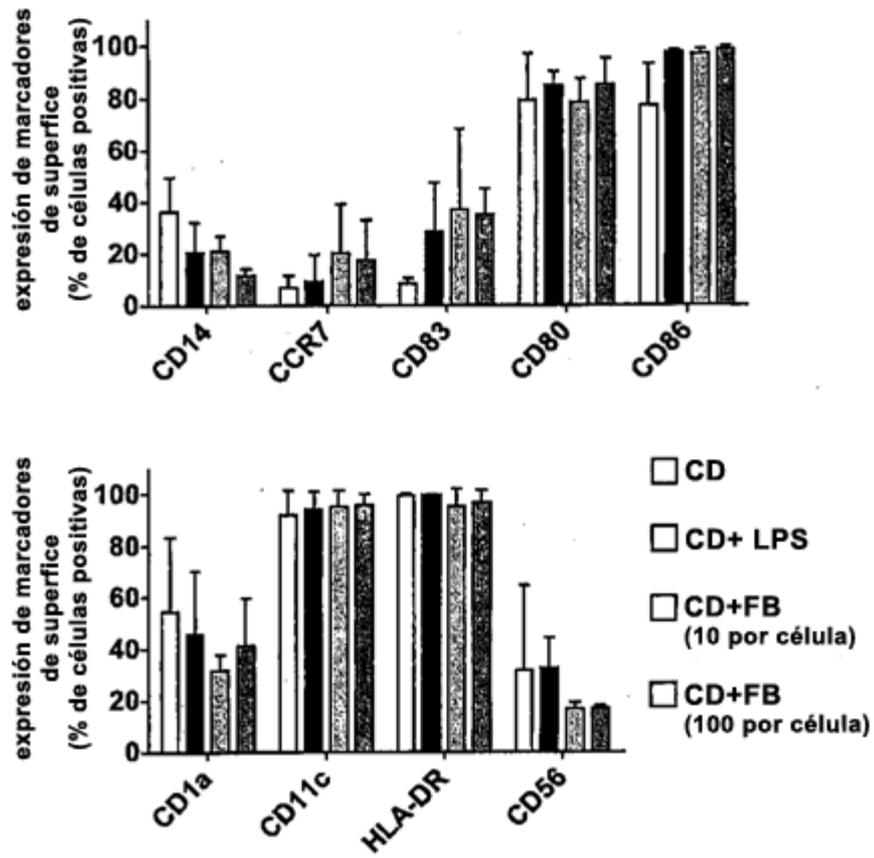


Figura 1

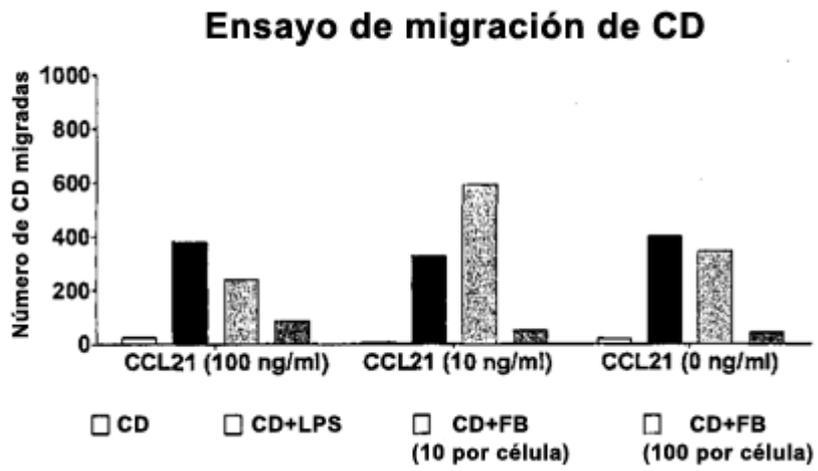


Figura 2

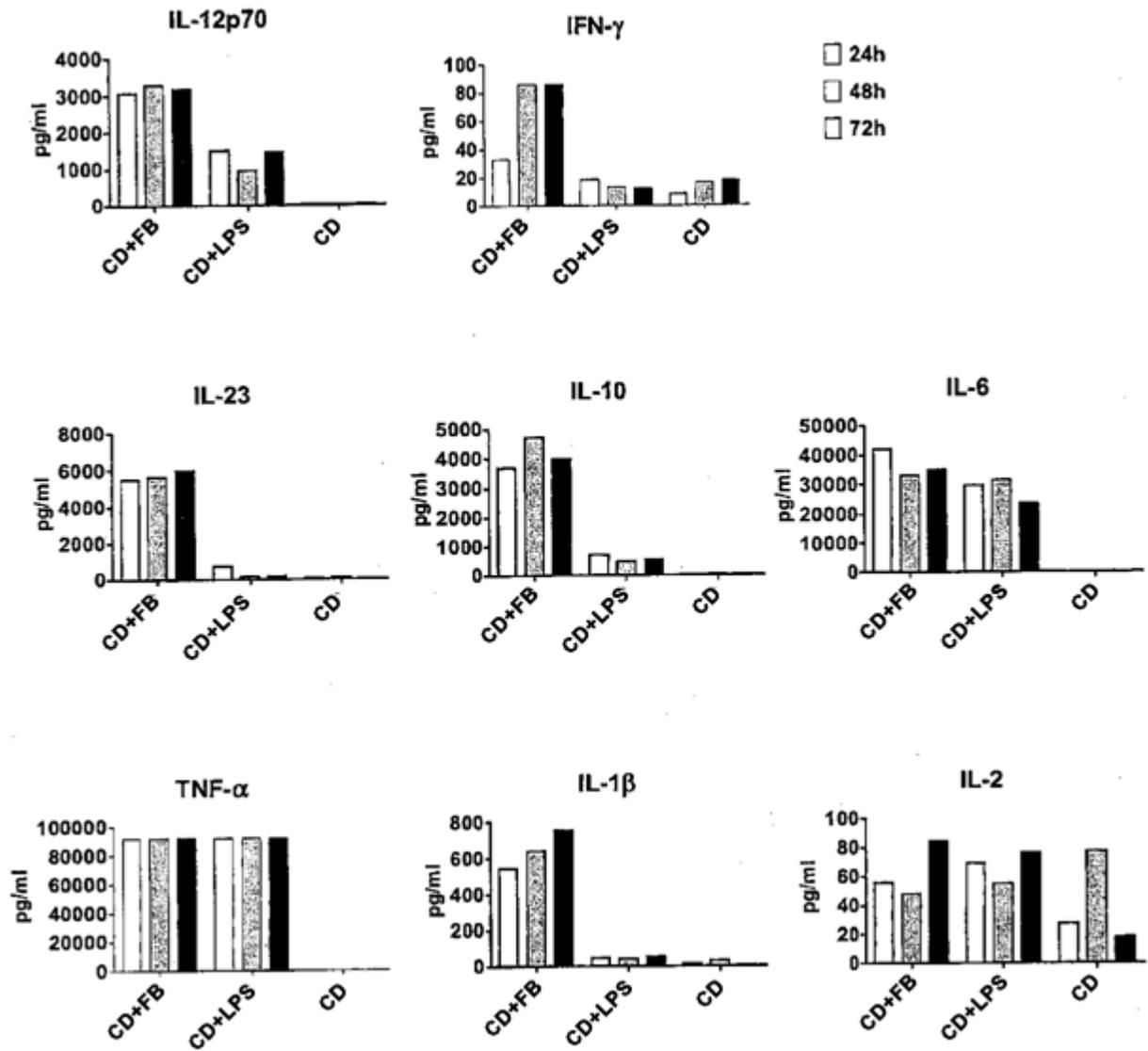


Figura 3

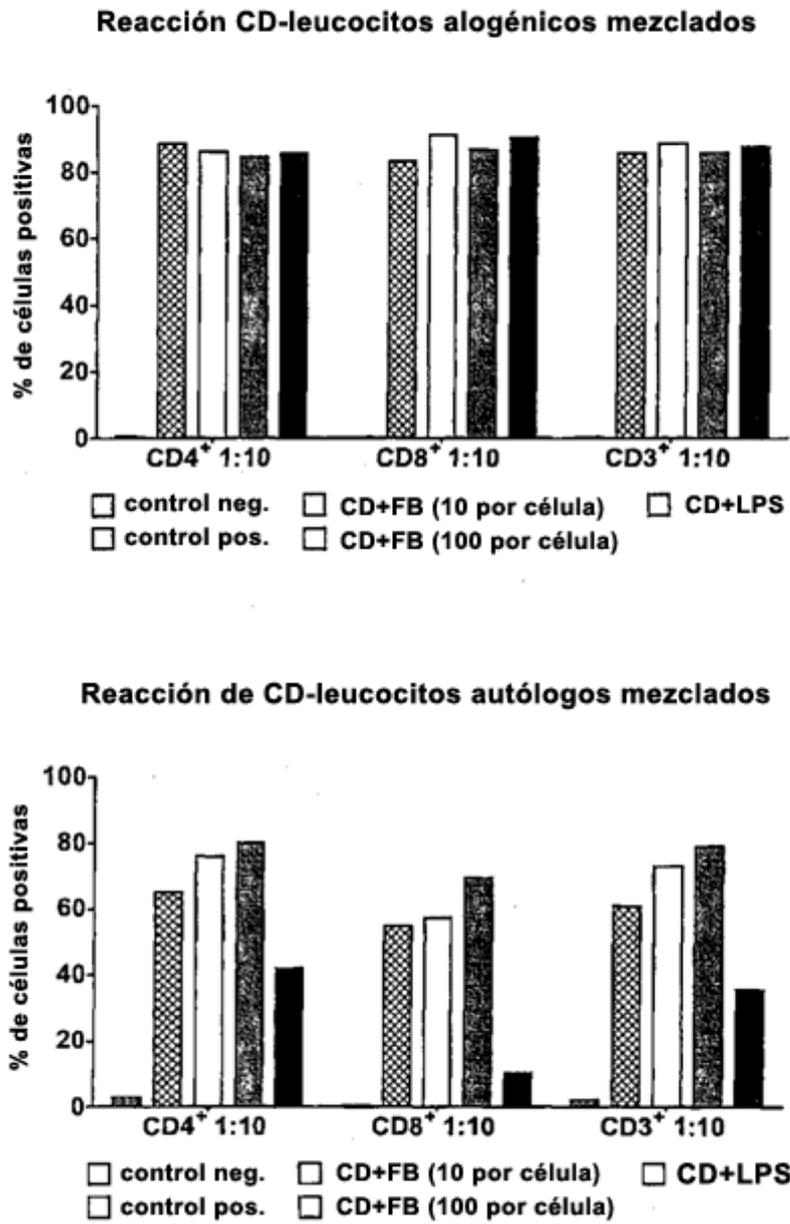


Figura 4

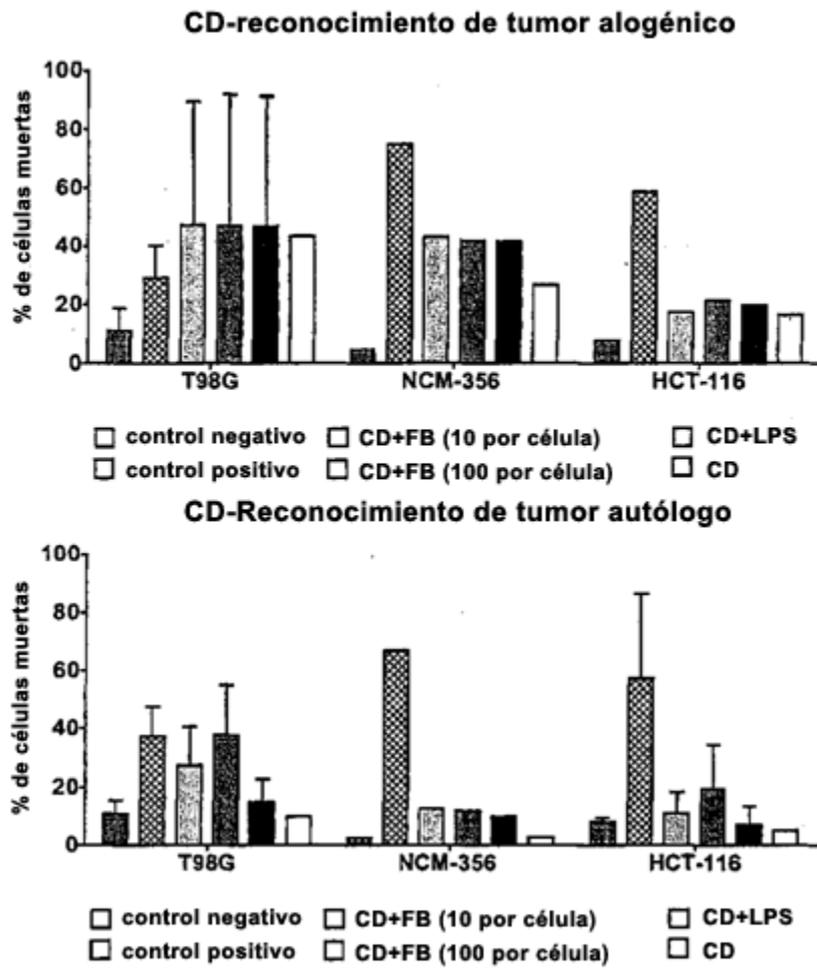


Figura 5A

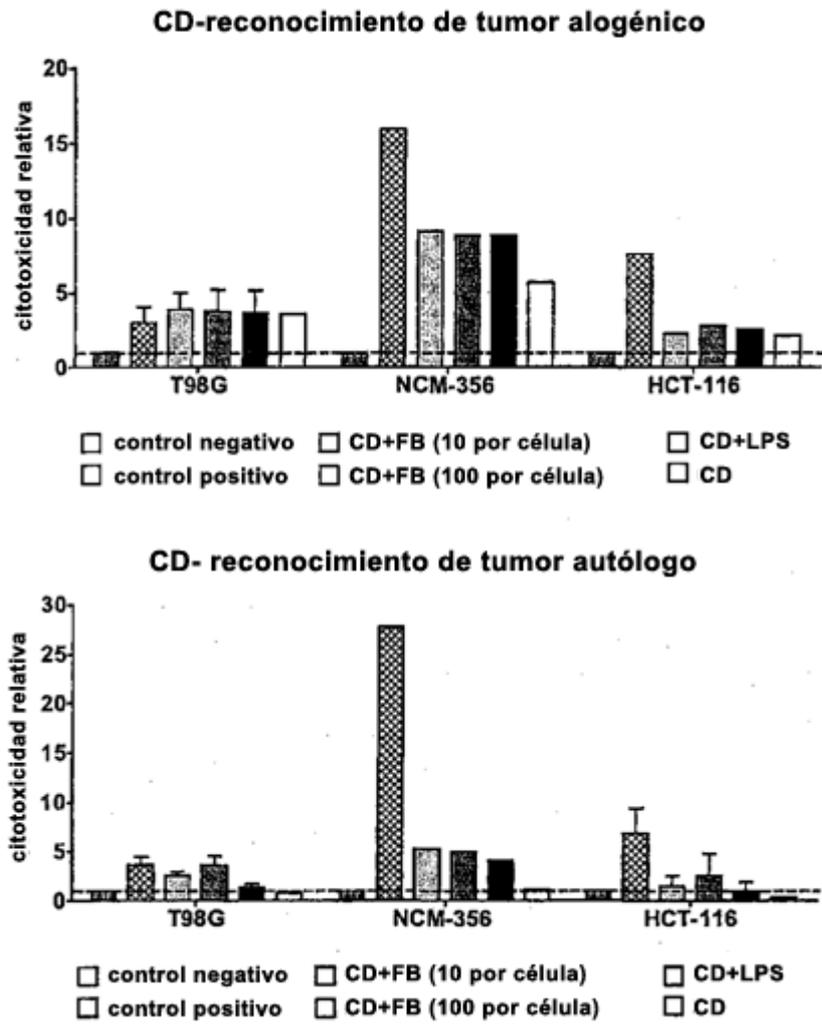


Figura 5B