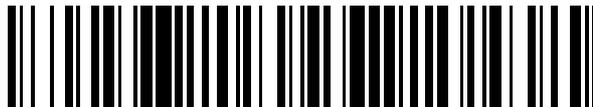


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 458**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2008 E 08804137 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2201100**

54 Título: **Mejoramiento de la capacidad estimuladora de las células T de las células que presentan antígeno humano y su uso en vacunación**

30 Prioridad:

14.09.2007 WO PCT/EP2007/059732

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

08.06.2016

73 Titular/es:

**VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (100.0%)
PLEINLAAN 2
1050 BRUSSEL, BE**

72 Inventor/es:

**THIELEMANS, KRIS MARIA MAGDALENA y
BONEHILL, AUDE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 573 458 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

Mejoramiento de la capacidad estimuladora de las células T de las células que presentan antígeno humano y su uso en vacunación

Campo de la invención

5 La invención se sitúa en el campo de la inmunoterapia que utiliza células que presentan antígeno de un paciente, modificadas de tal manera que ellas son capaces de presentar un antígeno específico de un blanco en el paciente, conduciendo a una respuesta inmune mediada por huésped a las células que expresan el blanco. La invención se relaciona especialmente con incrementar el efecto inmunoestimulador de las células que presentan antígeno en vista de la vacunación de pacientes que sufren de cáncer o trastornos infecciosos.

10 Antecedentes de la invención

15 Durante años, las células que presentan antígeno tales como las células dendríticas (DC) han emergido como jugadores clave en orquestar respuestas inmunitarias y en particular en introducir respuestas primarias en pacientes en general. Actualmente, los DC se pueden generar a gran escala en sistemas cerrados, que producen suficientes números de células para uso en ensayos clínicos. Simultáneamente, se han identificado los antígenos derivados de microorganismos infecciosos y muchos diferentes antígenos asociados a tumores que son selectiva o preferencialmente expresados en células tumorales. También, se ha diseñado un rango completo de estrategias para cargar los DC con tales antígenos. Juntos, estos hallazgos posibilitan el inicio de estudios clínicos con DC cargados con antígeno en pacientes de cáncer y en pacientes que sufren de infecciones. Sin embargo, satisfacer las respuestas inmunológicas y los resultados clínicos hasta ahora no se ha logrado.

20 Un problema principal utilizando los DC cargados con el antígeno específico de blanco como células que presentan antígeno (APC) es que ellas son insuficientes para provocar una respuesta inmune fuerte tanto in vitro como in vivo. Una causa de esta inmunoestimulación insuficiente es la complicada manipulación in vitro de los DC antes de su uso, conduciendo a la pérdida de sus propiedades características tales como la secreción de citocinas y otros factores que disparan las respuestas inmunes. Otro problema es que los DC artificialmente hechos a menudo no expresan los marcadores celulares necesarios sobre su superficies celular necesaria para activar una respuesta de la célula T al antígeno específico del blanco presentados por los DC solucionando de esta manera la frecuente tolerancia a la célula T que ocurre hacia los antígenos específicos de blanco.

Por lo tanto es el objeto de la presente invención suministrar una solución a los problemas establecidos anteriormente.

Resumen de la invención.

30 Los inventores han establecido que la capacidad estimuladora de la célula T de las células que presentan antígeno pulsadas con péptido antigénico o las células que presentan antígeno (co-) electroporadas con mARN que codifica un antígeno específico de blanco pueden ser mejoradas mayormente al suministrarles tres diferentes adyuvantes moleculares a través de la electroporación con una mezcla de moléculas de mARN o ADN que codifican dos o más factores inmunoestimuladores.

35 La invención suministra la prueba del concepto de tal manera que las células que presentan antígeno modificado pulsadas con un péptido específico de blanco o coelectroporadas con mARN que codifica un antígeno específico de blanco pueden estimular las células T específicas de antígeno tanto in vitro como después de la vacunación y formar así una nueva promisoría aproximación para inmunoterapia antitumoral, antiviral, antibacteriana, o antifungosa.

40 La invención suministra así un método para mejorar las características inmunoestimuladoras de las células que presentan antígeno que comprenden la introducción simultánea de al menos dos diferentes moléculas de mARN o ADN que codifican proteínas que modifican la funcionalidad de los APC, caracterizadas porque entre las proteínas funcionales al menos se introducen dos antígenos, seleccionados del grupo que comprende de CD40L, CD70, caTLR4, IL-12p70, EL-selectina, CCR7, y/o 4-1 BBL; o en combinación con moléculas que inhiben la expresión o función SOCS, A20, PD-L1 o STAT3. En una realización específica, las estimulaciones específicas de antígeno se efectúan sin la adición de ningún IL-2 y/o IL-7 exógeno para soportar la proliferación y la supervivencia de células T. En ciertas realizaciones, las células que presentan antígeno son adicionalmente estimuladas con factores solubles seleccionados del grupo que consiste de los ligandos TLR, IFN-gama, TNF-alfa, IL-6, IL-1 beta y/o PGE2.

45 Preferiblemente, el método utilizado para la introducción simultánea de al menos dos diferentes moléculas de mARN o ADN se selecciona del grupo de electroporación, transducción viral, lipofección y transfección del mARN o ADN que codifica los antígenos inmunoestimuladores

50 La invención suministra además un método para preparar un agente de inmunoterapia que comprende las etapas de.

a) obtener o suministrar células que presentan antígeno,

b) modificar in vitro dicho grupo de células que presentan antígeno de la etapa a) con al menos dos antígenos inmunoestimuladores seleccionados del grupo que comprende CD40L, CD70, caTLR4, IL-12p70, EL-selectina, CCR7, y/o 4-1BBL; y/o la inhibición de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3; y

5 c) modificar in vitro el grupo de células que presentan antígeno de la etapa b) de tal manera que ellas presentan epítopos derivados de antígeno específicos de blanco. En realizaciones preferidas, el método de modificación utilizado en la etapa b) y/o c) se selecciona del grupo de electroporación, transducción viral, lipofección o transfección de mRNA o ADN que codifica los antígenos inmunoestimuladores.

10 Preferiblemente, las proteínas inmunoestimuladoras específicas y los antígenos de blanco se introducen a través de un mecanismo de una etapa. En una realización preferida, se utiliza coelectroporación del mRNA o ADN que codifica un antígeno específico de blanco con el mRNA o ADN que codifica los factores inmunoestimuladores.

En otra realización, la proteína o péptido que pulsa se utiliza para cargar el antígeno específico de blanco o sus péptidos antigénicos derivados sobre las células que presentan antígeno.

15 Una combinación preferida de los factores inmunoestimuladores utilizados en los métodos de la invención es el uso de las moléculas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLR4, que se denominarán "TriMix" en lo sucesivo.

Las células que presentan antígeno utilizadas en los métodos de la invención se seleccionan del grupo que consiste de células dendríticas específicas de pacientes (DC) o células B; o líneas celulares dendríticas establecidas o líneas de células B.

20 La invención suministra además una vacuna que comprende un agente de inmunoterapia obtenido por cualquiera de los métodos de la invención mencionados anteriormente, que comprende además adyuvante o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

25 En una realización específica, el agente de inmunoterapia se dirige a un antígeno específico de blanco que puede ser un antígeno tumoral, un antígeno bacteriano, viral o fungoso. Dicho antígeno específico de blanco se puede derivar de uno cualquiera de: mRNA total aislado de (a) célula o células blanco, una o más moléculas de mRNA de blanco específicas, lisados de proteína de (a) célula o células blanco, proteínas específicas de (a) célula o células de blanco, o un péptido o proteína específica de blanco sintético y un mRNA o ADN sintético que codifica un antígeno específico de blanco o sus péptidos derivados.

30 La invención comprende además el uso de una preparación de células que presentan antígeno obtenidas mediante el método de la invención o el agente de inmunoterapia obtenido por el método de la invención en la fabricación de una vacuna capaz de provocar una respuesta inmune en un paciente necesitado de ello.

35 La invención suministra además un método para tamizar nuevos epítopos específicos de blanco que se puedan utilizar para vacunación de pacientes utilizando células que presentan antígeno obtenidas mediante el método de inmunestimulación de la invención que comprende; a) estimular células T proveniente de donadores saludables o pacientes (previamente vacunados o no con una vacuna antiblanco) con células que presentan antígeno obtenidas mediante el método de inmunestimulación de la invención; b) identificar células T específicas para antígeno de blanco utilizado; y c) identificar el epítipo derivado de antígeno de blanco para el cual la célula T es específica.

40 Además, la invención suministra un método para seguir los efectos del tratamiento con una vacuna antiblanco en un paciente; que comprende la detección y análisis de la respuesta inmune hacia el antígeno específico de blanco elicitada en un sujeto previamente inyectado con la vacuna antiblanco obtenida por cualquiera de los métodos de la invención. En realizaciones preferidas, el paciente sufre de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo de: cáncer, infección bacteriana, viral o fungosa, por ejemplo infección por VIH o hepatitis.

45 La invención también suministra un kit para mejorar las características inmunoestimuladoras de las células que presentan antígeno que comprende una combinación de al menos dos diferentes moléculas de mRNA o ADN que codifican proteínas inmunoestimuladoras funcionales que comprenden una combinación de al menos dos diferentes moléculas de mRNA o ADN que codifican proteínas inmunoestimuladoras funcionales seleccionadas del grupo que consiste de CD40L, CD70, caTLR4, IL-12p70, EL-selectina, CCR7, y /o 4-1 BBL, y opcionalmente que comprende moléculas que inhiben la expresión o función SOCS, A20, PD-L1 o STAT3. En una realización preferida, el kit comprende moléculas de mRNA o ADN que codifican CD40L, CD70 y caTLR4, que resultan en la así llamada "TriMix". En ciertas realizaciones, el kit de la invención comprende una molécula de mRNA o ADN única, en donde dichas dos o más moléculas de mRNA o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras se combinan. Preferiblemente, la molécula de mRNA o ADN simple es capaz de expresar las dos o más proteínas inmunoestimuladoras simultáneamente por ejemplo las dos o más moléculas de mRNA o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras están ligadas a

la molécula de mRNA o ADN simple mediante un sitio de entrada ribosomal interno (IRES) o una secuencia de codificación de péptido 2a auto hendido.

Además, la invención suministra un método ex vivo de amplificar las células T específicas de antígeno de un paciente. El paciente puede ser previamente vacunado o no. El grupo amplificado de células T se puede entonces utilizar para una nueva o adicional vacunación (refuerzo) del paciente. La invención suministra así un método para la amplificación ex vivo de un grupo de células T de un paciente que comprende;

a) obtener células T de un paciente que fue vacunado antes del aislamiento o no.

b) llevar las células T a contacto con el agente de inmunoterapia de la invención, que comprende las células que presentan antígeno de la invención, y

c) identificar, aislar y expandir las células T ex vivo que son específicas para el antígeno presentado en las células que presentan antígeno con la que ellas están en contacto. Opcionalmente, el método comprende las siguientes etapas adicionales.

d) administración de éstas células T específicas de antígeno estimuladas y expandidas in vitro al paciente es una configuración de transferencia de célula T adoptiva.

La invención además suministra métodos para utilizar las células que presentan antígeno modificado de la invención para tratar enfermedades cancerosas o infecciosas tales como infecciones virales, bacterianas o fungosas, por ejemplo, VIH y hepatitis. En el caso de inmunoterapia activa para cáncer o enfermedades infecciosas, el tratamiento con las células que presentan antígeno de la invención se pueden combinar o seguir mediante un tratamiento no específico de inmunomodulación con el fin de reforzar el sistema inmune del paciente. En el caso de tratamiento de cáncer, este puede ser unos anticuerpos anti-CTLA4 o IFN-alfa u otros métodos de inmunomodulación con el fin de reforzar el sistema inmune del paciente.

Suministrar el antígeno que presentan las células tal como las células dendríticas (DC), células B, líneas celulares dendríticas, o líneas de células B con una señal de maduración a través de la electroporación mRNA ofrece varias ventajas:

Primero no existe necesidad de preincubar las células que presentan antígeno durante hasta 48 horas con señales de maduración solubles como las citosinas proinflamatorias o los ligandos TLR para lograr la activación de las células que presenta antígeno, la cual puede ocasionar que las células se "agoten" e inferior para propósitos de vacunación. Como resultado, las células que presentan antígeno electroporadas con mRNA o ADN que codifican dos o más factores inmunoestimuladores (por ejemplo el TriMix del CD40L, CD70 y el caTLA4), que se puede inyectar en el paciente en unas pocas horas después de la electroporación, madurará y secretará la mayoría de sus citosinas inmunoestimuladoras y las quimiocinas in situ.

Segundo, se ha postulado que la maduración de las células que presentan antígeno in situ se asemeja más cercanamente a los procesos fisiológicos involucrados a la respuesta a la infección con patógeno, y por lo tanto que la maduración in situ puede conducir a una inmunidad de célula T mejorada. Pulsar dichas células que presentan antígeno con resultados de péptido específicos de blanco en la presentación de dicho péptido al sistema inmune del paciente.

Además, los inventores muestran que las células que presentan antígeno electroporadas con mRNA o ADN que codifica dos o más factores inmunoestimuladores (por ejemplo el TriMix del CD40L, CD70 y el caTLA4), puede ser electroporado con mRNA que codifica antígeno en lugar de ser pulsado con péptidos antigénicos. Esta aproximación ofrece varias ventajas adicionales:

Primero, la maduración y la carga del antígeno de las células que presentan antígeno se puede combinar en una etapa simple. Obviar la etapa de pulsar el péptido en la producción de vacuna resulta así en menor manipulación de las células y en menor pérdida celular y riesgo de contaminación.

Segundo, al utilizar mRNA que codifica antígeno de longitud completa todos los posibles epítopos antigénicos del TAA se presentarán en lugar de algunos epítopos seleccionados. Consecuentemente, ésta estrategia podría introducir una respuesta de célula T específica de antígeno más amplia y no dependiente del (conocimiento de) cada haplotipo HLA del paciente o de identificación previa de los epítopos derivados de antígeno.

Tercero, el plásmido que codifica el antígeno se puede modificar genéticamente al agregar la secuencia blanco clase II HLA. Esto no solo enruta el antígeno a los compartimentos clase II HLA para procesamiento y presentación de los péptidos derivados de antígeno restringido clase II HLA, sino también mejora el procesamiento y la presentación en el contexto de las moléculas clase I HLA.

Se estableció además que, las células que presentan antígeno TriMix (es decir electroporadas con mARN que codifican CD40L, CD70 y caTLR4) pueden casi igualmente ser células T específicas MelanA bien estimuladas cuando se coelectroporan con mARN que codifica MelanA completo que cuando son pulsadas con péptido derivado de MelanA. Más aún, las células que presentan antígeno TriMix pueden estimular células T específicas para otros antígenos con menor frecuencia precursora tanto in vitro como in vivo.

Descripción de las figuras

Figura 1. Expresión transgen después de electroporación mARN. (A) los DC se electroporaron con CD40L solo o en combinación con CD70 y/o caTLR4. Inmediatamente después de la electroporación, se bloqueó el transporte de proteína con un tapón Golgi y después de 4h, se tiñeron las células intracelulares para CD40L. Los DC inmaduros electroporados con mARN irrelevantes se utilizaron como control negativo. Los resultados son representativos para tres experimentos independientes. (B) los DC se electroporaron con CD70 solo o en combinación con CD40L y CD40L junto con caTLR4. En varios puntos de tiempo después de la electroporación, los DC se tiñeron para expresión CD70. Los DC inmaduros electroporados con mARN irrelevante se utilizaron como control negativo. Los resultados son representativos para tres experimentos independientes.

Figura 2. Ensayo de activación en NF-kappaB. Células 293T se transfectaron con un plásmido de gen reportero (pNFconluc, que codifica el gen luciferasa de la luciérnaga impulsado por un promotor de respuesta NF y un kappaB mínimo) y el plásmido pHR-GLuc-YFP (que codifica la luciferasa Gaussia secretada humanizada fusionada a una proteína fluorescente amarilla). Cuando se indicó las células fueron cotransfectadas con el plásmido de expresión pcDNA3-caTLR4 o pcDNA3-CD27. De anotar, las células 293T expresaron endógenamente CD40. Las transfecciones se efectuaron por triplicado y las cantidades totales de plásmido se mantuvieron constantes al agregar plásmido pcDNA3 vacío. Luego de la transfección, 1×10^5 DC electroporadas con CD40L o CD70 mARN se agregaron cuando se indicó. Después de 24h, se determinaron las actividades de la luciferasa y se normalizó sobre la base de la actividad de luciferasa de Gaussia secretada. Los resultados se muestran como la DE más o menos media y son representativas para 3 experimentos independientes.

Figura 3. DC inmaduros electroporantes con mARN CD40L y/o caTLR4 induce la maduración fenotípica, la secreción IL-12 mejorada y la estimulación de células T CD4⁺ no diferenciadas para diferenciar en células que secretan IFN-gama. (A) los DC electroporados con diferentes combinaciones de mARN de CD40L, CD70 y caTLR4 se tiñeron después de 24h para las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83 y CD86 para las moléculas clase I HLA. Se indica el porcentaje de células positivas y la intensidad de fluorescencia media. Los resultados son representativos para al menos 8 experimentos independientes. (B) el IL-12p70 producido dentro de las 24h después de la electroporación se dosificó en el sobrenadante. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica por medio de una línea horizontal. (C) los DC electroporados se utilizaron para estimular células T CD4⁺ no diferenciadas CD45RA⁺ alogénicas. Seis días más tarde, las células TCD4⁺ se reestimularon con glóbulos expansores de célula T CD3/CD28. Después de 24h se evaluó la secreción de IFN-gama en el sobrenadante mediante ELISA. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica por una línea horizontal.

Figura 4. Inducción incrementada de las células T CD8⁺ específicas de MelanA restringidas HLA-A2, las células T CD8⁺ citolíticas y las células T CD8⁺ que secretan IFN-gama/TNF-alfa mediante los DC electroporados con diferentes combinaciones de mARN CD40L CD70 y caTLR4 y pulsadas con péptido MelanA-A2. (A) Las células T CD8⁺ no diferenciadas se estimularon 3 veces con los DC pulsados con péptido electroporado. Luego, las células T se contaron y tiñeron para especificidad CD8 y MelanA. Se muestra el incremento doblado sobre los DC inmaduros electroporados con mARN irrelevante. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica por una línea horizontal. (B) la actividad citolítica de las células T específicas de MelanA se determinaron mediante un ensayo de movilización CD107a. Las células T cebadas fueron estimuladas con células T2 pulsadas con un péptido gag o MelanA en la presencia de un anti-CD107-PE-Cy5 mAb y un Golgi-parada. Después de cultivo durante toda la noche, las células fueron cosechadas, teñidas con anti-CD8-FITC y analizadas mediante citometría de flujo. Las células T fueron separadas sobre características FSC/SSC y positividad CD8. (C) la producción de IFN-gama/TNF-alfa intracelular mediante células T CD8⁺ cebadas con MelanA se midió mediante citometría de flujo. Las células T cebadas fueron reestimuladas con células T2 pulsadas con péptido gag o MelanA en la presencia de un tapón Golgi. Después de cultivo durante toda la noche, las células T se tiñeron para positividad CD8, IFN-gama y TNF-alfa. Las células T fueron separadas por las características FSC/SSC y positividad CD8. El porcentaje de células que secreta IFN-gama y/o TNF-alfa es dado después de la sustracción de la respuesta de trasfondo inducida por T2 pulsada con péptido gag. Los resultados en los paneles (B) y (C) se dan para el experimento 2 (ver Tabla 2). Se indica el porcentaje de las células positivas de tetrámero MelanA-A2. Para todos los otros experimentos, la positividad CD 107a y la secreción de IFN-gama/TNF-alfa correlacionada con el porcentaje de células T específicas para MelanA presente en el cultivo. (D) El fenotipo de células T CD8 específico para MelanA. Las células T fueron teñidas para CD8 y positividad de tetrámero MelanA-A2 en combinación con los siguientes marcadores de célula T: CD45RA, CD45RO, CD27, CD28, CCR7 y CD62L. Los resultados se muestran para células T CD8⁺ específicas de MelanA inducidas por los DC electroporados con mARN, CD40L, CD70 y caTLR4 y son representativas para todas las células T CD8 más específicas de MelanA, sin importar cuales DC se utilizaron para estimulación.

Figura 5. Eficiencia de electroporación, fenotipo y secreción de IL-12p70 mediante los DC electroporados con mANR TriMix solo o en combinación con mARN tumorantígeno. (A) los DC fueron electroporados con TriMix (mARN que codifica CD40L, CD70 y caTLR4) solos o en combinación con mARN tumorantígeno. Veinticuatro horas después, se investigó la eficiencia de electroporación mediante teñir para la expresión CD70 de superficie. Los DC inmaduros electroporados con mARN NGFR irrelevante se utilizaron como control negativo. Los resultados son representativos para al menos 5 experimentos independientes. (B) Veinticuatro horas después de la electroporación, los DC fueron teñidos para las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83 y CD86 y para las moléculas clase I y II HLA. Se indica el porcentaje de células positivas y la intensidad de la fluorescencia media. El fenotipo se comparó con los DC inmaduros y madurados con coctel de y citosina electroporado con mARN NGFR irrelevante. Los resultados son representativos para al menos 5 experimentos independientes. (C) El OL-12p70 producido dentro de las 24h después de la electroporación se dosificó en el sobrenadante. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica mediante una línea horizontal.

Figura 6. Inducción in vitro de células T CD8⁺ específicas de MelanA restringidas HLA-A2, células T CD8⁺ activadas/citolíticas y células T CD8⁺ que secretan IFN-gama/TNF-alfa mediante los DC electroporados con mARN TriMix (mARN que codifica CD40, CD70 y caTLR4) pulsada con péptido antigénico o coelectroporada con mARN tumorantígeno. (A) las células T CD8⁺ no diferenciadas se estimularon 3 veces, con un intervalo semanal con los DC TriMix, es decir los DC electroporados con una mezcla de moléculas mARN que codifican las proteínas inmunostimuladoras CD40L, CD70 y caTRLA4. Cada semana, se contaron las células T, se teñieron para CD8 y especificidad MelanA y se calculó el número absoluto de células CD8⁺ específicas de MelanA presentes en el cultivo. El porcentaje relativo en comparación con el número de células T CD8⁺ específicas de MelanA obtenido después de 3 estimulaciones con los DC TriMix pulsados con el péptido MelanA-A2 (estableció un 100 por ciento) se muestra. (B) estado de activación de la actividad citolítica de las células T específicas de MelanA se determinó mediante el ensayo CD 137/CD107a. Las células T cebadas fueron reestimuladas con células T2 pulsadas con péptido gag o MelanA en la presencia de anti-CD107- PE-Cy5 mAb y Golgi parada. Después de cultivo durante toda la noche, las células fueron cosechadas, teñidas con CD137 con anti-CD8-FITC, CD137-PE y analizadas mediante citometría de flujo, Las células T fueron separadas por las características FSC/SSC y positividad CD8. El porcentaje de células positivas dobles CD137/CD107a, se da después de la sustracción de la respuesta de trasfondo inducida por T2 pulsada con péptido gag. (C) se midió la producción de IFN-gama/TNF-alfa intracelular mediante las células T CD8⁺ cebadas de MelanA mediante citometría de flujo. Las células T cebadas fueron reestimuladas durante toda la noche con células T2 pulsadas con péptido gag o MelanA en la presencia del tapón Golgi. Entonces, las células T fueron teñidas para positividad CD8, IFN-gama y TNF-alfa. Las células T fueron separadas por las características FSC/SSC y la positividad CD8. Se da el porcentaje de células que secretan IFN-gama y/o TNF-alfa, después de la sustracción de la respuesta de trasfondo inducida por T2 pulsado con péptido gag. Los resultados en los paneles B y C se dan para el experimento 1 (ver Tabla 3). En cada experimento la positividad CD137/CD107a y la secreción de IFN-gama/TNF-alfa correlacionada con el porcentaje de células T específicas de MelanA presentes en el cultivo.

Figura 7. Capacidad estimuladora de las células CD4⁺ y de los DC TriMix pulsados con péptido antigénico o coelectroporado con mARN tumorantígeno. Los DC fueron pulsados con péptido Mage-A3-DP4 y coelectroporados con mARN MageA3-DCLamp. Cuatro horas después las células fueron cocultivadas con células T restringidas HLA-DP4 específicas para Mage-A3 durante 20 h. Los DC inmaduros electroporados con mARN NGFR irrelevantes se utilizaron como control negativo. Se muestra la producción de IFN-gama. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica mediante una línea horizontal.

Figura 8. Inducción de las células T CD8⁺ específicas para otros antígenos que MelanA en pacientes con melanoma tanto in vitro como in vivo. (A) los DC TriMix tal como se prepararon para vacunación fueron utilizados para estimular células T CD8⁺ aisladas de la sangre con pacientes con melanoma HLA-A2⁺ antes de vacunación. Los DC madurados con coctel de citosina pulsados con HLA-A2 restringido, Mage-A3, Mage-C2, tirosinasa o péptido específico gp 100 se utilizaron como control después de estimulaciones de 3 semanas, las células fueron teñidas con un panel de tetrámeros HLA-A2 cargados con diferentes péptidos específicos Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp-100 y anti-CD8 Ab. Las células T CD8⁺ específicas para TAA fueron entonces identificados mediante citometría de flujo. Se sustrajo el trasfondo que se tiñe con tetrámeros HLA-A2 específicos para NY-ESO-1. (B) el estado de activación y la actividad citolítica de las células T CD8⁺ de los pacientes con melanoma antes o después de la vacunación con los DC TriMix se determinó mediante un ensayo CD107a/137. Las células T CD8⁺ aisladas de la sangre de pacientes con melanoma HLA-A2⁺ antes o después de la vacunación con los DC TriMix fueron estimulados dos veces in vitro con los mismos DC como se utilizaron para vacunación. Una semana después de la última estimulación, las células fueron reestimuladas durante toda la noche con los DC maduros electroporados con mRNA TAA o NGFR como control irrelevante en la presencia de anti-CD107-PE-Cy5 mAb y Golgi-parada. Las células fueron cosechadas, teñidas con anti-CD8-FIT, CD 137-PE y analizadas mediante citometría de flujo. Las células T fueron separadas por las características FSC/SSC y positividad CD8. Se da el porcentaje de células positivas dobles CD137/CD107a. (C) la producción de citosina de células T CD8⁺ proveniente de pacientes con melanoma antes o después de la vacunación con los DC TriMix se determinó mediante teñido de citosina intracelular. Las células T CD8⁺ aisladas de la sangre de pacientes con melanoma HLA-A2⁺ antes o después de la vacunación con los DC TriMix se estimuló dos veces in vitro con los mismos DC como se utilizaron para vacunación. Una semana después de la última estimulación, las células fueron reestimuladas durante toda la noche con los DC maduros electroporados con mARN TAA o NGFR como control irrelevante en la presencia de un tapón Golgi.

Luego, las células T fueron teñidas para positividad CD8, IFN-gama y TNF-alfa. Las células T fueron separadas por las características FSC/SSC y la positividad CD8. Se da el porcentaje de células que secretan IFN-gama y/o TNF-alfa.

Descripción detallada de la invención

5 En la búsqueda de nuevos métodos para elaborar vacunas anti cáncer, los inventores investigaron si el estado de activación de los DC es un factor crítico para determinar si los DC que presentan el antígeno específico de blanco serán inductores potentes de la respuesta inmune anti blanco después de la vacunación o no. Los inventores inesperadamente encontraron que la efectividad de los protocolos de vacunación DC utilizada habitualmente podría mejorarse significativamente al suministrar los DC con una señal de activación más potente y al utilizar un proceso de manipulación más corto.

10 En toda la invención, el término "TriMix" representa una mezcla de moléculas mRNA que codifican las proteínas inmunoestimuladoras CD40L, CD70, y caTLRA4.

En toda la invención el término "DC TriMix" o células que presentan "TriMix" representan células dendríticas respectivamente o células que presentan antígeno que se han modificado para expresar la mezcla TriMix de las moléculas mRNA que codifican proteínas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLRA4.

15 El término "blanco" utilizado en toda la descripción no se limita a ejemplos específicos que se puedan describir aquí. Cualquier agente infeccioso tal como un virus, una bacteria y un hongo pueden ser blanco. Además cualquier célula tumoral o cancerígena puede ser blanco.

20 El término "antígeno específico de blanco" utilizado en toda la descripción no se limita a ejemplos específicos que puedan ser descritos aquí. Será claro para la persona experta que la invención está relacionada con la inducción de inmunoestimulación en células que presentan antígeno, sin importar el antígeno específico de blanco que esté presente. El antígeno que va a estar presente dependerá del tipo de blanco del cual alguien pretenda provocar una respuesta inmune en un sujeto. Los ejemplos típicos de antígenos específicos de blanco son marcadores expresados o secretados que son específicos para tumores, para células tumorales, bacterianas y fungosas o para proteínas virales específicas o estructuras virales.

25 Sin querer estar limitado por el alcance de protección de la invención, se listan algunos ejemplos de posibles marcadores.

30 El término "célula que presenta antígeno" utilizada en toda la descripción incluye células que presentan antígeno. Ejemplos no limitantes específicos son células dendríticas, líneas celulares dendríticas, células B, o líneas de célula B. Las células dendríticas o las células B se pueden aislar o generar de la sangre de pacientes o sujetos saludables. El paciente o sujeto puede haber sido el sujeto de vacunación previa o no.

35 Los términos "cáncer" y/o "tumor" utilizados en toda la descripción no pretenden estar limitados a los tipos de cáncer o tumores que pueden haber sido ejemplificados. El término por lo tanto comprende todos los trastornos proliferativos tales como neoplasma, displasia, lesiones premalignas o precancerosas, crecimientos de células anormales, tumores benignos, tumores malignos, cáncer o metástasis, en donde el cáncer se selecciona del grupo de: leucemia, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer del SNC, melanoma, cáncer de ovario, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de Mama, glioma, cáncer de Colon, cáncer de Vejiga, Sarcoma, cáncer Pancreático, cáncer Colorectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de Hígado, cáncer de Huesos, cáncer de Medula Ósea, cáncer de Estómago, cáncer de Duodeno, cáncer Esofágico, cáncer de Tiroides, cáncer Hematológico, y Linfoma. Antígenos específicos para Cáncer pueden por ejemplo ser MelanA/MART1, antígenos de línea germinal de Cáncer, gp100, Tirosinasa, CEA, PSA, Her-2/neu, survivin, telomerasa.

45 El término "enfermedad infecciosa" o "infección" utilizado en toda la descripción no pretende estar limitado a los tipos de infecciones que pueden haber sido ejemplificados aquí. El término por lo tanto comprende todos los agentes infecciosos para los cuales la vacunación sería benéfica para el sujeto. Ejemplos no limitantes son las siguientes infecciones o trastornos originados por virus: Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida- Infecciones Adenovirales- Infecciones de Alfavirus- Infecciones de Arbovirus- Parálisis de Bell- Enfermedad de Borna- Infecciones de Bunyavirus- Infecciones de Calciavirus- Viruela de Pollo- Resfriado Común- Condiloma Acuminata- Infecciones de Coronavirus- Infecciones de virus por virus de coxsackie- infecciones de Citomegalovirus- Dengue- Infecciones con Virus de ADN- Ectima contagioso- Encefalitis- Encefalitis, Arbovirus- Encefalitis, Herpes Simplex- Infecciones de Virus de Epstein –Bar- Eritema Infeccioso- Exantema Súbito- Síndrome de fatiga- Crónico- Infecciones con Hantavirus- Fiebres Hemorrágicas, Virales- Hepatitis Viral Humana- Herpes Labialis- Herpes Simplex- Herpes Zoster- Herpes Zoster Oticus- Infecciones por Virus del Herpes- Infecciones por VIH- Mononucleosis Infecciosa- Influenza en Pájaros- Influenza Humana- Fiebre de Lassa- Sarampión- Meningitis Viral- Moluscum Contagioso- Viruela de Monos- Paperas- Mielitis- Infecciones por Papilomavirus- Infecciones por paramixovirus- Fiebre por flebotomus- Poliomieltis- Infecciones de Poliomavirus- Síndrome de Postpoliomielitis- Rabia- Infecciones del Virus Sincitial respiratorio- Fiebre del Valle de Rift- Infecciones por Virus ARN-

Rubeola- Síndrome Respiratorio Agudo Severo- Enfermedades por Virus Lento- Viruela- Panencefalitis Esclerosante Subaguda- Enfermedades causadas por Garrapatas- Infecciones por Virus Tumorales- Verrugas- Fiebre de Nilo Occidental- Enfermedades Virales- Fiebre Amarilla- Zoonosis- Etc. Los antígenos específicos para los virus pueden ser VIH- gag- tat- rev- o nef, o antígenos de la hepatitis C.

5 Ejemplos adicionales no limitantes son las siguientes infecciones o trastornos causados por bacterias u hongos: Abscesos- Actinomicosis- Anaplasmosis- Antrax- Artritis Reactiva- Aspergilosis- Bacteremia- Infección Bacterial y Micosis- Infecciones por Bartonella- Botulismo- Abscesos cerebrales- Brucelosis- Infecciones de Burcolderia- Infecciones por Campilobacter- Candidiasis- Candidiasis Vulvovaginal- Enfermedad por arañazo de Gato- Celulitis- Infecciones del sistema Nervioso Central- Cancroide- Infecciones por Clamidia- Infecciones por Clamidiacea- Cólera- Infecciones por Clostridium- Coccidioidomicosis- Úlcera de la Córnea- Infección cruzada- Criptococosis- Dermatomicosis- Difteria- Eriquiosis- Empiema Pleural- Endocarditis Bacteriana- Endoftalmis- Enterocolitis Seudomembranosa- Erisipelas- Infecciones por Escherichia Coli- Fascitis Necrotizante- Gangrena de Fournier- Forunculosis- Infecciones por Fusobacteria- Gangrena Gaseosa- Gonorrea- Infecciones Bacterianas Gram Negativas- Infecciones Bacterianas Gram Positivas- Granuloma Inguinal- Hidradenitis Supurativa- Histoplasmosis- Hordeolum- Impetigo- Infecciones por Klebsiella- Legionelosis- Lepra- Leptospirosis- Infecciones de Listeria- Anginas de Ludwig- Absceso Pulmonar- Enfermedad de Lime- Linfocitoma Venéreo- Maduromicosis- Melioidosis- Meningitis Bacteriana- Infecciones Micobacterianas- Infecciones de Micoplasma- Micosis- Infecciones por Nocardia- Onicomosis- Osteomielitis- Paroniquia- Enfermedad Inflamatoria Pélvica- Plaga- Infecciones Neumococicas- Infecciones por Seudomonas- Sitacosis- Infección Purpúrea- Fiebre Q- Fiebre por Mordedura de Rata- Fiebre Relapsante- Infecciones del Tracto Respiratorio- Absceso Retrofaringeo- Fiebre Reumática- Rinoscleroma- Infecciones por Rickettsia- Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas- Infecciones por Salmonela- Fiebre Escarlatina- Tifus de los Matorrales- Sepsis- Enfermedades Bacterianas Transmitidas Sexualmente- Enfermedades Bacterianas Transmitidas Sexualmente- Choque Séptico- Enfermedades Bacterianas de la Piel- Enfermedades Infecciosas de la Piel- Infecciones por Estafilococo- Infecciones por Estreptococo- Sífilis- Sífilis Congénita- Tétano- Enfermedades producidas por la Garrapata- Tinea- Tinea Versicolor- Tracoma- Tuberculosis- Tuberculosis Espinal- Tularemia- Fiebre Tifoidea- Tifo Epidémico producido por Piojos- Infecciones del Tracto Urinario- Enfermedad de Whipple- Tos Ferina- Infecciones por Vibrio- Yaws- Infecciones por Yersinia- Zoonosis- Zigomicosis- Etc.

30 La presente invención suministra nuevos métodos para mejorar las capacidades inmunoestimuladoras de los DC humanos a través de la transfección con al menos dos diferentes moléculas de mRNA o ADN que codifican adyuvantes moleculares seleccionados de la lista CD40L, CD70, caTLR4, IL-12p70, EL-selectina, CCR7 y/o 4-1 BBL; o en combinación con la inhibición de la expresión o función de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3, por ejemplo a través de una transfección siARN.

35 El uso de la combinación de CD40L y caTLR4 en los DC inmaduros derivados de monocito a través de electroporación de mRNA genera DC maduros que secretan citosina/quimiocinas, como se ha mostrado para el CD 40 y el ligado de TLR4 a través de la adición de CD40L soluble y LPS.

La introducción de CD70 en los DC suministra una señal coestimuladora para las células T no diferenciadas CD27⁺ al inhibir la apoptosis de la célula T activada y al soportar la proliferación de células T.

40 Como una alternativa al caTRL4, se podían utilizar otros receptores similares a Toll (TLR). Para cada TLR, se conoce una forma activa constitutiva, y se podían posiblemente introducir en los DC con el fin de provocar una respuesta inmune de huésped. En nuestra visión, sin embargo, el caTRL4 es la molécula activante más potente y por lo tanto la preferida.

La introducción del mRNA que codifica una citosina adicional tal como IL-12p70 en los DC podría ser benéfica para incrementar adicionalmente la excreción de citosina de los DC, posteriormente además estimulando la respuesta inmune de huésped.

45 La introducción adicional de la EL-selectina o el CCR 7 en los DC podría ser benéfica para promover la migración in vivo de los DC manipulados hacia los nodos linfáticos, en lugar donde la respuesta inmune se inicia naturalmente en el huésped.

Moléculas coestimuladoras adicionales tales como 4-1 BBL o una forma constitutivamente activa del Akt también se podría introducir en los DC.

50 Además, la expresión y/o función de las moléculas inhibitorias tales como SOCS, A20, PD-L1, STAT3 podría ser disminuida o detenida a través de la introducción adicional de moléculas inhibitorias específicas tales como las moléculas siARN específica en los DC.

La incubación in vitro adicional de los DC con factores solubles tales como los ligandos TLR, IFN-gama, TNF-alfa, IL-6, PGE2 y/o IL-1 beta también se podrían utilizar para la maduración de los DC.

La invención preferiblemente utiliza los DC derivados de células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) directamente aisladas de la sangre del paciente, pero alternativas tales como los DC diferenciados fuera de las células positivas CD34 o las líneas celulares dendríticas comercialmente disponibles también se podrían utilizar.

5 El método de la invención utiliza la electroporación de mARN, la transducción viral (por ejemplo a través del lentivirus, adenovirus, o virus de vaccinia), la lipofección de mARN o la transfección de ADN para introducir moléculas inmunoestimuladoras y antígenos específicos de blanco en los DC. La electroporación de mARN es especialmente preferida debido a su alta eficiencia y su uso ampliamente aceptado en configuraciones clínicas en contraste con la transducción viral. Para la introducción de los antígenos específicos de blanco, pulsar las células con los péptidos específicos de antígeno o con proteínas se podría utilizar como una alternativa a la electroporación de mARN. La introducción del mARN puede ser una secuencia específicamente sintetizada basada en los marcadores específicos tumorales conocidos, o puede ser aislada de (a) líneas celulares tumorales o de biopsia tumoral del paciente.

Para la producción de los DC, la invención preferiblemente utiliza plasma autólogo obtenido del paciente, pero el suero AB humano, que es comercialmente disponible también se puede utilizar.

15 La introducción simultánea de CD40L y CD70 en los DC, conduce a efectos inmunoestimuladores incrementados de los DC. En una realización preferida, la combinación específica de CD40L, CD70 y caTLR4 se utiliza para mejorar los efectos inmunoestimuladores de los DC. En ambas realizaciones, cualquiera de los siguientes marcadores se podría introducir simultáneamente: IL-12p70, EL-selectina, CCR7, 4-1 BBL para la expresión incrementada o la inhibición los SOCS, A20, PD-L1 STAT3. Además de los adyuvantes moleculares, el antígeno específico de blanco o sus epítopos derivados son introducidos en los DC con el fin de posibilitarles provocar una respuesta inmune a la célula T hacia un antígeno específico de blanco. Varias de las combinaciones listadas anteriormente se muestran por tener efectos inmunoestimuladores altamente inesperados sobre los DC.

20 Varios obstáculos se tuvieron que saltar con el fin de hacer el método trabajar. Primero evaluamos la expresión transgénica del CD40L después de la electroporación en células K562 y los DC. Aunque el CD40L podría ser fácilmente detectado sobre la membrana de las células K562 electroporadas hasta 24 h después de la electroporación, fuimos incapaces de detectarla en la membrana DC. Esto se debe probablemente al hecho de que la proteína CD40L recientemente sintetizada encuentra rápidamente CD40 en la membrana DC y es reinternalizada, un proceso que no puede tener lugar en las células que K562 negativas CD40. De hecho, cuando el tráfico de trans-Golgi de CD40L se bloqueó con brefeldin A, pudimos detectar la proteína CD40L intracelular en los DC.

30 Aunque la expresión fuerte del CD40 sobre los DC de murinos maduros ha sido reportada después de ligación CD40 y TLR sola o en combinación, se sabe muy poco acerca de la expresión de los CD70 en los DC humanos. En nuestras manos los DC inmaduros, los DC madurados con coctel de citosina o los DC electroporados con CD40L y/o TLR4 no expresaron CD70. Aún después de la ligación de CD40 combinada a través de CD40L asociado con 3T6 y una ligación TLR a través de LPS o dsARN solo un porcentaje menor de los DC mostró expresión CD70. Si esta expresión CD70 baja mediante los DC humanos es un fenómeno general o podría estar relacionada con nuestro protocolo de generación DC estar pendiente por establecerse.

40 Estos experimentos claramente muestran que la simple extrapolación del concepto inmunoestimulador de ratón a la situación humana no es de ninguna manera directa. En contraste, tuvimos que inducir de manera explícita la expresión CD70 a través de la electroporación de mARN CD 70 en los DC humanos. Solamente entonces podríamos establecer una fuerte expresión que persistió durante varios días, la cual debe posibilitarle a los DC para que interactúe con las células T CD27⁺ durante un periodo prolongado de tiempo.

45 Aunque fuimos técnicamente incapaces de investigar la expresión de la proteína caTLR4, el ensayo de activación de NF-kappaB indica que la electroporación de mARN de nuestro plásmido caTLR4 conduce a la expresión de una proteína funcional. En paralelo nosotros podríamos también mostrar que los plásmidos CD40L y CD70 codifican proteínas funcionales ya que los DC electroporados CD40L y CD70 activan la senda de señalización en NF-kappaB después de la ligación CD40 y CD27, respectivamente.

En un experimento adicional, los inventores investigaron el efecto de electroporación de CD40L, CD70 y caTLR4 en diferentes combinaciones sobre el fenotipo de DC, su patrón de secreción de citoquinas/quimioquinas y su capacidad para estimular las células T CD4⁺ no tratadas. Para las tres propiedades probadas, se pueden sacar las mismas conclusiones:

50 [1] La electroporación de CD40L y caTLR4 en las DC induce maduración fenotípica, mejora la secreción de citoquina/quimioquina y estas DC sometidas a electroporación estimulan células T CD4⁺ sin tratar para convertirse en células T tipo Th1 que producen IFN-gamma,

[2] la combinación de electroporación de CD40L con electroporación de caTLR4 refuerza el efecto aún más, mientras que

[3] la (co)electroporación de CD70 no tuvo ningún efecto sobre el fenotipo y la secreción de quimiocina/citoquina (que es como se esperaba debido a que las DC no expresan el ligando de CD70 (CD27).

En el nivel fenotipo, se observó una mejora de la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83, CD86 y las moléculas de clase I HLA. Es de destacar que la participación de CD40 a través de electroporación de CD40L no perjudica la regulación ascendente de la expresión de CD40. En el nivel de secreción de citoquinas, se encontró una regulación ascendente marcada en la secreción de la citoquina Th1 IL-12p70, se observaron diversas citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa), factores de crecimiento hematopoyéticos (G-CSF, GM-CSF), IFN-gamma, e IL-10. En el nivel de secreción de quimiocinas, aumento de la secreción de IL-8 (reclutamiento de neutrófilos), MIP-1 alfa (reclutamiento de monocitos y células T), IP-10 (proteína de 10 kDa inducible por IFN-gamma; reclutamiento de monocitos y células T) y RANTES (reclutamiento de células T, basófilos y eosinófilos). MIP-1 alfa, RANTES e IP-10 son todos quimiotáctico para las células T, pero se ha demostrado que la MIP-1 alfa y RANTES son producidos por DC que promueven Th1/Th2, mientras que la producción de IP-10 se limita a las DC que promueven TM. La (co)electroporación de CD70 no induce cambios fenotípicos o mejora de secreción de citoquinas/quimiocinas por DC, ya que las DC carecen de expresión de su ligando de señalización CD27.

El patrón de secreción de citoquinas y quimiocinas sugiere que las DC sometidas a electroporación con mARN de CD40L y/o caTLR4 inducirían preferencialmente células Th1 que producen IFN-gamma, un hallazgo que fue confirmado en la estimulación alogénica de células T CD45RA⁺ CD4⁺. De hecho, las células T estimuladas con DC sometidas a electroporación con CD40L y caTLR4, solas o en combinación, producen cantidades muy elevadas de IFN-gamma, pero casi no IL-4 e IL-10, cuya secreción no se aumentó en comparación con las células T estimuladas con DC sometidas a electroporación con el mARN irrelevante. No observamos un aumento de la secreción de IFN-gamma por las células T CD4⁺ estimuladas con DC sometidas a (co)electroporación con CD70, lo que demuestra que las DC que expresan CD70 humano, no instruyen directamente para el desarrollo de Th1 y secreción de IFN-gamma. No obstante, las DC que expresan CD70 humano pueden sensibilizar a las células T CD4⁺ sin tratar hacia el desarrollo de Th1 a través de la inducción de T-bet y IL-12Rbeta2.

En un siguiente experimento, los inventores analizaron si las DC sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de mARN de CD40L, CD70 y caTLR4 ejercen funciones coestimuladoras en una configuración específica a antígeno. De hecho hemos podido mostrar que las DC impulsadas por el péptido MelanA-A2 que expresan CD40L, CD70 y caTLR4 en diferentes combinaciones inducen un aumento del número de células T CD8⁺ específicas MelanA-, con la combinación de todas las tres moléculas se produce mejor estimulación. Las DC sometidas a electroporación con solo CD70 no estimularon un aumento en el número de células T CD8⁺ específicas a MelanA en comparación con las DC sometidas a electroporación con mARN de NGFR. Por el contrario, la co-electroporación de CD70 con CD40L, junto o sin caTLR4, indujo un aumento adicional de células T específicas a MelanA cuando se compara con las DC sometidas a electroporación con CD40L juntos o no con caTLR4. Esto es probablemente debido a un efecto de supervivencia inducido por la ligadura de CD70 en las DC con CD27 sobre las células T durante la estimulación.

Después de haber establecido que la expresión de CD40L, caTLR4 y CD70 por las DC aumenta su capacidad para estimular las células T CD8⁺ específicas a MelanA, hemos investigado las propiedades funcionales y fenotípicas de las células T estimuladas. En correlación con el aumento del número de células T CD8⁺ específicas a MelanA, se generaron más células que producen IFN-gamma/TNF-alfa y se podría detectar un aumento en la cantidad de células T CD8⁺ con una capacidad citolítica. Al analizar el fenotipo de las células T CD8⁺ específicas a MelanA, todas las células parecían ser CD45RA⁺ CD45RO⁺ CD27⁺ CD28⁺, junto con una expresión variable de CD62L y CCR7. Esto indica que se han inducido las células T de memoria central (CD62L⁺ y CCR7⁺), así como las células T de memoria efectoras tempranas o células EM₁ (CD62L⁺ y CCR7⁻), dependiendo de la nomenclatura.

Los resultados de los experimentos enumerados adelante en los ejemplos claramente establecen una prueba de principio de que las DC sometidas a coelectroporación con proteínas de mARN que codifican múltiples proteínas estimulantes y impulsadas con péptido antigénico son mejores estimuladores de células T inmaduras o que las DC inmaduras o maduras en cóctel de citoquina. Más aún, es posible coelectroporar estas DC con antígeno específico a objetivo que codifica mARN, proporcionando así su espectro antigénico completo. Los datos adicionales cuando las DC se coelectroporan con mARN de CD40L, CD70, y caTLR4 junto con el mARN que codifica el antígeno MelanA ligado a la señal de dirección de de HLa clase II de DCLamp indican que estas células también son superiores en inducir células T CD8⁺ específicas a MelanA, lo que lleva a un aumento de 300 veces en comparación con DC inmaduras. Los datos sugieren que las DC sometidas a coelectroporación con mARN de CD40L, CD70 y caTLR4 también son capaces de cebar células T específicas para antígenos asociados objetivo distintos de MelanA, en particular para MAGE-A3, gp100 y tirosinasa; antígenos para los cuales se han reportado más bajas frecuencias precursoras de células T. Es evidente que la presente invención no se debe considerar como limitada a los ejemplos utilizados para la prueba del concepto de utilizar las células que presentan antígeno de la invención para crear una respuesta inmunitaria en un sujeto. Cualquier antígeno posible al cual una respuesta inmunitaria podría ser beneficiosa para un sujeto se puede prever y es una parte integral de la invención. Los marcadores pueden ser marcadores específicos a tumor o pueden ser específicos a virus, específicos a bacteria o específicos a hongos.

La invención proporciona por cebadora vez evidencia de que las DC modificadas genéticamente que expresan por lo menos dos moléculas de estimulación seleccionadas del lote de CD40L, CD70 y caTLR4, IL-12p70, EL-selectina, CCR7, 4-1 gargantas; o en combinación con la supresión de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3 ofrecen una vacuna basada en DC que posee todas las características que se consideran necesarias para la inducción de respuestas inmunitarias reactivas a objetivo óptimas. En una realización preferida de la invención la combinación de moléculas de estimulación es el TriMix de CD40L, CD70 y caTLR4.

De importancia es que, en los métodos de la invención, todas las estimulaciones específicas a antígeno se realizaron sin la adición de ningún IL-2 y/o IL-7 exógeno para apoyar la proliferación y supervivencia de células T, que está en contraste con la mayoría de los estudios que reportan estimulaciones in vitro. En nuestra opinión, la omisión de citoquinas exógenas crea un ambiente menos artificial y está más cerca de la situación in vivo. De hecho, se ha demostrado que la adición de 50 UI/ml de IL-2 durante la estimulación específica a antígeno no tuvo ningún efecto sobre el número de células T específicas a antígeno inducidas, pero no influyeron en el perfil funcional de las células T específicas inducidas, a saber, al aumentar el número de células T líticas y de células T que secretan IFN-gamma/TNF-alfa, lo que indica que la adición de citoquinas exógenas a estimulaciones de células T puede alterar el resultado de técnicas de monitorización.

El uso de los métodos de la invención tiene una ventaja adicional sobre la técnica anterior en que la manipulación in vitro de las DC se reduce a un mínimo con el fin de prevenir la excreción de citoquinas fisiológicamente relevantes en el medio de cultivo in vitro. Esto se logra al utilizar un método de transducción de una etapa altamente eficiente, preferiblemente a través de electroporación de mARN, lo que permite la introducción simultánea de por lo menos dos moléculas de mARN que codifican adyuvantes moleculares (posiblemente en combinación con un antígeno específico a objetivo). Esto permite que las DC liberen sus citoquinas naturales en su medio futuro, ya sea in vitro para los experimentos o in vivo en el paciente, lo que lleva a un aumento de la respuesta inmunitaria de células T.

En una realización adicional, las DC de la invención son útiles en métodos para identificar nuevos marcadores específicos a objetivo. Se pueden utilizar DC modificadas para estimular las células T de donantes sanos o pacientes que tienen cáncer o una enfermedad infecciosa, que fueron vacunados o no previamente con una vacuna que contiene un antígeno específico a objetivo. Posteriormente, después de una o más estimulaciones con DCs modificadas, las células T específicas a antígeno objetivo se pueden identificar y se puede caracterizar el epítipo derivado de antígeno a objetivo contra el que están respondiendo las células T.

Se mostró en cebador lugar que las DC humanas, derivadas de monolitos, sometidas a electroporación con mARN que codifica mARN de CD40L, CD70 y caTLR4 (creando de esta manera DC TriMix), adquieren un fenotipo maduro, aumentan su secreción de citoquinas y quimioquinas y tienen un aumento de capacidad para sesgar CD4⁺ sin tratar para una respuesta Th1 y para inducir células T CD8⁺ específicas a MelanA cuando se pulsan con el péptido MelanA-A2 inmunodominante.

Adicionalmente, los inventores muestran que las DC TriMix pueden ser sometidas a coelectroporación con mARN que codifica antígeno de tumor en lugar de ser impulsadas con péptidos antigénicos. Este método ofrece varias ventajas adicionales. En cebador lugar, la maduración y carga de antígeno de tumor de las DC se puede combinar en una única etapa. De esta manera, obviar la etapa de pulsación de péptido en la producción de vacuna resulta en una menor manipulación de las células y menor pérdida de células y riesgo de contaminación. En segundo lugar, al utilizar mARN que codifica antígeno de tumor de longitud completa se presentarán todos los posibles epítopos de antígeno de del antígeno de tumor en lugar de algunos epítopos seleccionados. En consecuencia, esta estrategia podría inducir una respuesta de células T específicas a antígeno de tumor más amplia y no es dependiente del conocimiento de cada haplotipo HLA del paciente o de la identificación previa de epítopos derivados de antígeno de tumor. En tercer lugar, el plásmido que codifica antígeno de tumor se puede modificar genéticamente al agregar una secuencia de dirección de HLa clase II. Esto no sólo enruta el antígeno de tumor a los compartimentos de HLa clase II para procesamiento y presentación de péptidos derivados de antígeno de tumor restringidos a HLa clase II, sino que también mejora el procesamiento y presentación en el contexto de las moléculas HLA de clase I.

Los inventores confirmaron que no hubo diferencias en la eficiencia de electroporación, potencial de maduración y secreción de citoquinas cuando se prepararon DC TriMix como tal o se co-electroporaron con mARN de antígeno de tumor.

Adicionalmente, los inventores mostraron la capacidad de las DC TriMix sometidas a coelectroporación con mARN de antígeno de tumor para estimular las células T CD8⁺ restringidas por HLA-A2, específicas a MelanA y compararlas con las DC TriMix impulsadas por péptido. Se observó que las DC TriMix sometidas a coelectroporación con mARN sig-MelanA-DCLamp eran de hecho capaces de cebar células T CD8⁺ específicas a MelanA de la sangre de donantes sanos y que, al igual que sus homólogas impulsadas por péptido, eran mucho más potentes que las DC inmaduras o maduras en cóctel de citoquinas.

Cuando se comparó con las DC TriMix impulsadas por péptido, los inventores observaron que después de 1 ó 2 estimulaciones, las DC TriMix sometidas a coelectroporación con mARN de antígeno de tumor eran ligeramente menos

potentes que las DC TriMix impulsadas por péptido, mientras que después de 3 estimulaciones eran igualmente potentes en 2 de los 4 experimentos. Aunque parece que las DC TriMix sometidas a coelectroporación inducen a un menor número de células T específicas a epítipo que sus homólogas impulsadas por péptido en esta configuración, esto no necesariamente significa que vayan a ser menos eficientes cuando se utilizan para propósitos de vacunación, y esto por varias razones. En cebador lugar, al investigar la funcionalidad cualitativa de las células T inducidas, se observó consistentemente que las células T estimuladas con DC TriMix sometidas a coelectroporación inducen más células que secretan tanto IFN-gamma como TNF-alfa. Más aún, se aumentó la intensidad de fluorescencia media de la tinción de IFN-gamma intracelular, lo que indica que se han producido más citoquinas por célula. Estos datos sugieren que estas células T son multifuncionales, que se han correlacionado con una mejor función efectora. En segundo lugar, como se discutió anteriormente, al electroporar mARN de antígeno de tumor de longitud completa ligado a una señal de dirección HLA clase II en las DC se introducen todos los epítipos de antígenos, incluyendo epítipos no identificados y epítipos restringidos a todos los posibles haplotipos HLA que son HLA clase I, así como clase II. Por lo tanto, este método es propenso a inducir una respuesta de células T específicas a TAA más amplia.

El péptido inmunodominante restringido a HLA-A2 de MelanA es un epítipo para el que existe una frecuencia de precursor muy alta en la sangre. Luego, evaluamos si las DC TriMix sometidas a coelectroporación con otros antígenos de tumor serían capaces de inducir respuestas de células T CD8⁺ específicas a antígeno. Dado que este trabajo es parte de la evaluación preclínica de un estudio de vacunación, donde las DC TriMix sometidas a coelectroporación con Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o mARN de gp100 se inyectarán en los pacientes con melanoma, se investigó si podían inducir respuestas específicas para estos antígenos tanto in vitro en la sangre de pacientes con melanoma no vacunados como in vivo después de vacunación. Hemos observado que en pacientes no vacunados, las DC TriMix de hecho podrían estimular las células T específicas a TAA y al igual que para el antígeno MelanA, ya que son más potentes que las DC maduras en cóctel de citoquinas. No obstante, sólo pudimos observar las respuestas específicas para el epítipo Tirosinasa restringido por HLA-A2, como se demuestra por tinción de tetrámero. No se observaron respuestas para los epítipos Mage-A3, Mage-C2 o gp100 restringidos por HLA-A2 probados. Más aún, los ensayos funcionales no mostraron que las DC TriMix han inducido células T específicas para otros epítipos que las que se han probado en la tinción de tetrámero, aunque en estos experimentos resultados positivos podrían haber sido ocultado por la relativamente alta activación de células T no específicas por DC TriMix. Esta activación de células T no específicas parece inherente a DC TriMix y se produce tanto in vitro como in vivo. La razón de esta observación no es clara en este punto. Por una parte, puede ser debido al hecho de que las DC sometidas a electroporación con CD40L y caTLR4 secretan muy altas cantidades de citoquinas y quimiocinas, lo que podría atraer y activar las células T de una manera no específica. Por otro lado, se ha mostrado que la estimulación crónica de células T no tratadas por las células que presentan antígeno que expresan continuamente CD70, conduce a la activación del grupo de células T y a la conversión en células efectoras de memoria. En este modelo de ratón transgénico CD70, la activación de células T eventualmente lleva al agotamiento del grupo de células T no tratadas y a la inmunodeficiencia letal. Aunque también utilizamos células que presentan antígeno que expresan de forma continua CD70, no esperamos esto en nuestro estudio de vacunación porque el grupo de células T no se estimula continuamente con CD70, ya que las DC se inyectan dos veces por semana y tienen una vida útil limitada in vivo.

Cuando se compara con la inducción masiva de células T específicas a MelanA mediante DC TriMix, la inducción de células T específicas para otros antígenos específico a objetivo in vitro es bastante pobre. Esto se debe muy probablemente a la baja frecuencia precursora de este último. En general, los informes sobre la inducción de células T CD8⁺ específicas a Mage-A3, Mage -C3, Tirosinasa o gp100 por las DC son escasos y las comparaciones con nuestros resultados son difíciles de hacer porque el IL-2 y/o IL-7 exógeno comúnmente se agregan durante estas estimulaciones, que apoyan la activación y proliferación de células T y por lo tanto crean un entorno estimulante de células T artificial.

Aunque las respuestas inducidas en células T CD8⁺ de pacientes no vacunados fueron muy pobre, se observó que las DC TriMix son capaces de inducir respuestas sólidas para los antígenos Mage-A3, Mage-C2 y Tirosinasa mediante vacunación. La tinción de tetrámeros mostró que estas respuestas no se dirigieron hacia los epítipos restringidos a HLA-A2 conocidos probados, lo que evidencia la ventaja de utilizar mARN de antígeno de tumor de longitud completa.

Aunque es evidente que las DC TriMix inducen preferiblemente células T CD4⁺ TM, que no habían investigado si también eran capaces de procesar y presentar péptidos restringidos a HLA clase II de mARN que codifica antígeno específico a objetivo electroporado. La invención muestra adicionalmente que las DC TriMix sometidas a coelectroporación con Mage-A3 ligadas a una secuencia de dirección de HLA clase II de hecho puede estimular las células T CD4⁺ específicas a Mage-A3 restringidas a HLA-DP4 establecidas. Más aún, su capacidad para hacerlo es similar a la capacidad estimuladora de células T CD4⁺ de células impulsadas por péptido.

Por lo tanto claramente la invención proporciona la prueba de concepto de que DC TriMix impulsada con un péptido específico a objetivo o co-electroporada con el mARN que codifica un antígeno específico a objetivo puede estimular las células T específicas a antígeno tanto in vitro como después de vacunación y por lo tanto forma un nuevo método prometedor para inmunoterapia antitumor, antivírica, antibacteriana o antifúngica.

El objetivo final de la invención es proporcionar una vacuna anti-objetivo que es capaz de provocar o potenciar una respuesta inmunitaria de específica a anfitrión, ya sea en un paciente con cáncer o en un paciente infectado con un

5 virus, bacteria u hongo. Para este fin, las DC se modifican con por lo menos dos moléculas inmunoestimuladoras y un antígeno específico a objetivo o epítomos derivados de antígeno específico a objetivo in vitro y reintroducidos en la vía intradérmica del paciente. En el paciente, las DC son capaces de estimular las células T y provocar una respuesta inmunitaria mediada por el anfitrión debido a sus características inmunoestimuladoras específicas. La reacción
 10 inmunitaria en el anfitrión se puede analizar a través de técnicas conocidas. Analizando el aumento del punto de marcadores inflamatorios para el establecimiento de una reacción inmunitaria en el anfitrión, probablemente dirigido hacia el antígeno objetivo. Con el fin de comprobar si la respuesta inmunitaria se dirige específicamente hacia el antígeno objetivo presentado por las DC en la preparación de vacunas, se pueden utilizar diversas técnicas conocidas tales como tinción de citoquinas intracelular a través de citometría de flujo, ELISPOT o Ensayos Inmuno-absorbentes
 15 ligados a Enzima (ELISA) utilizando fragmentos de péptidos del antígeno objetivo o el antígeno completo con el fin de capturar y detectar células T de anfitrión específicas a antígeno. La respuesta inmunitaria se puede monitorizar en la sangre periférica del paciente o en la piel, después de la inducción de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y posterior biopsia de la región DTH.

15 La invención abarca adicionalmente un método para seguir los efectos del tratamiento con una vacuna contra el cáncer en un paciente de cáncer, que comprende la detección y análisis de la respuesta inmunitaria hacia el antígeno específico a tumor provocado en el sujeto previamente inyectado con la vacuna contra el cáncer obtenible u obtenida por los métodos de la invención.

20 Adicionalmente, la invención abarca además un método para seguir los efectos del tratamiento con una vacuna antivírica, antibacteriana o antifúngica en un paciente, respectivamente, infectado o en riesgo de estar infectado con un virus, bacteria u hongo, que comprende la detección y análisis de la respuesta inmunitaria hacia el antígeno específico a objetivo provocado en el sujeto previamente inyectado con la vacuna obtenible u obtenida por los métodos de la invención.

25 La invención proporciona adicionalmente un equipo para mejorar las características inmunoestimuladoras de las células que presentan antígeno que comprenden una combinación de por lo menos dos moléculas funcionales de mRNA o ADN diferentes que codifican proteínas inmunoestimuladoras seleccionados de entre el grupo que consiste de CD40L, CD70, caTLR4, IL-12p70, EL-selectina, CCR7, y/o 4-1 de BBL; o en combinación con moléculas que inhiben expresión o función de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3. En una realización preferida, la combinación comprende mRNA que codifica moléculas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLR4.

30 En una realización adicional, las dos o más moléculas de mRNA o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras son parte de una molécula de mRNA o ADN sencilla. Esta molécula de mRNA o ADN sencilla es preferiblemente capaz de expresar las dos o más proteínas de forma independiente. En una realización preferida, las dos o más moléculas de mRNA o ADN que codifican proteínas inmunoestimuladoras están ligadas en la molécula de mRNA o ADN sencilla por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES), lo que permite la traducción independiente de
 35 cada una de las dos o más secuencias de mRNA en una secuencia de aminoácidos. Alternativamente, una secuencia que codifica péptido 2a de auto división se incorpora entre las secuencias de codificación de los diferentes factores inmunoestimuladores. De esta manera, se pueden codificar dos o más factores por una molécula de mRNA o ADN sencilla. Los datos preliminares donde las células se someten a electroporación con mRNA que codifica CD40L y CD70 ligados por una secuencia IRES o un péptido 2a de auto división muestra que este método es de hecho factible.

40 Por lo tanto la invención proporciona adicionalmente de una molécula de mRNA que codifica dos o más factores inmunoestimuladores, en donde los dos o más factores inmunoestimuladores o bien se traducen por separado de la molécula de mRNA sencilla a través del uso de un IRES entre los dos o más secuencias de codificación. Alternativamente, la invención proporciona una molécula de mRNA que codifica dos o más factores inmunoestimuladores separadas por una secuencia que codifica el péptido 2a de auto división, lo que permite la división de dos secuencias de proteínas después de traducción.

45 Adicionalmente, la invención proporciona un método ex vivo para amplificar células T específicas a antígeno de un paciente. Este paciente podría ser vacunado previamente o no. Este grupo amplificado ex vivo de las células T luego se puede utilizar para el propósito de "transferencia celular adoptiva". La transferencia celular adoptiva de células inmunitarias autólogas que se amplificaron ex vivo con la ayuda de la invención se podría realizar en pacientes que experimentaron o no un tratamiento de acondicionamiento (tal como, pero no restringido a la quimioterapia no
 50 mieloablativa) y se podría realizar con o sin administraciones concomitantes de la invención o con o sin tratamientos inmunomoduladores adicionales (tales como, pero no restringidas a la administración de citoquinas o moléculas que modifican señales coestimuladoras). De esta manera, la invención proporciona un método para la amplificación ex-vivo de un grupo de células inmunitarias autólogas de un paciente, que comprende;

a) obtener o proporcionar células T de un paciente que fue vacunado antes de aislamiento o no,

55 b) llevar las células T ex vivo en contacto con células que presentan antígeno o agente de inmunoterapia obtenido por el método de acuerdo con la invención,

c) identificar, aislar y expandir células T ex vivo que son específicas para el antígeno presentado por las células que presentan antígeno se contactaron con (estos antígenos o bien podría ser definida o no definida, como sería el caso si se puede utilizar ARN de tumor total como una fuente de antígeno).

5 d) administración de estas células T específicas a antígeno estimuladas y expandidas in vitro para el paciente es una configuración de un protocolo de tratamiento de transferencia de células T adoptivas que implica ya sea o no regímenes de acondicionamiento previo y el tratamiento inmunomodulador concomitante.

La invención proporciona adicionalmente métodos de tratamiento de un paciente en necesidad del mismo con un grupo de células que presentan antígeno de la invención o con la vacuna de la invención.

10 La invención proporciona adicionalmente métodos para utilizar las células que presentan antígeno modificadas de la invención para tratar cáncer o enfermedades infecciosas (tales como infecciones víricas, bacterianas o fúngicas, por ejemplo, VIH e infecciones de virus de hepatitis). En el caso de inmunoterapia activa para el cáncer o enfermedades infecciosas, el tratamiento con células que presentan antígeno de la invención puede estar precedida por, combinadas con o seguidas por cualquier tratamiento no específico de inmunomodulación con el fin de mejorar la actividad de la invención en sí misma o al explotar cualquier sinergia entre las diferentes modalidades de tratamiento (por ejemplo, al mejorar la respuesta inmunitaria a la invención a través de estimulación no específica del sistema inmunitario del paciente con citoquinas (por ejemplo, interleucina-2 o interferón alfa-2b) o TLR-ligandos, o por ejemplo, por combinación de la invención con un fármaco que modifica la señal coestimuladora tal como ipilimumab o tremelimumab); o cualquier otra forma de inmunoterapia. La invención también proporciona regímenes de tratamiento complejos en los que la invención en sí y un número definido de otros tratamientos inmunomoduladores se utilizan para dar lugar a un plan de tratamiento más activo (por ejemplo, el uso secuencial de la invención con la modalidad 1 (por ejemplo, una citoquina) seguido por el uso de la invención para la expansión ex vivo de células inmunitarias de vacuna seguido por una transferencia celular adoptiva de estas células, seguido por un tratamiento de combinación de la invención con una modalidad adicional (por ejemplo, un modificador de señal de receptor coestimulador) o cualquier combinación posible de uso concomitante y/o secuencial de la invención y los tratamientos inmunomoduladores adicionales.

25 Ejemplos

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes

Ejemplo 1: Generación de Células dendríticas inmaduras a de células mononucleares de la sangre del paciente (PBMCs).

30 Día 0: En la manipulación in vitro de PBMCs: después de que el paciente se sometió a leucoféresis con el fin de obtener un número significativo de PBMC, el producto de leucoféresis se lava a fondo y pos se siembra en cámaras de cultivo, para permitir que se adhieran al plástico de las cámaras durante dos horas a 37°C, en un medio apropiado, tal como medio X-VIVO, suplementado con un 1 por ciento de plasma autólogo, previamente obtenido del mismo paciente. Después de estas dos horas, las cámaras de cultivo se lavan con, por ejemplo, regulador salino fosfato (PBS) con el fin de eliminar las células no adherentes. Las células adherentes a su vez se cultivan adicionalmente en un medio de cultivo que comprende factores de diferenciación de células dendríticas, tales como GM-CSF (en una concentración de aproximadamente 1000 U/ml) e IL-4 (en una concentración de 500 U/ml) en un medio apropiado (por ejemplo RPMH 640) suplementado con 1 por ciento de plasma autólogo del paciente.

Día 2 y 4: En los días 2 y 4, el medio se complementa de nuevo con GM/CSF e IL-4, en las mismas cantidades que en el día 0.

40 Día 6: Las células dendríticas inmaduras se cosechan de las cámaras de cultivo y pueden ser criopreservadas ya sea para uso o utilización futura o inmediatamente.

La crioconservación se realiza en un medio apropiado tal como 1 ml de plasma del paciente autólogo complementa con 10 por ciento de DMSO y 2 por ciento de glucosa. Entre 5 y 20 10^6 células dendríticas se congelan por contenedor y la congelación se realiza de acuerdo con técnicas estándar en nitrógeno líquido a -192°C.

45 Ejemplo 2: Modificación de las células dendríticas obtenidas de tal manera que expresan un péptido derivado de antígeno de tumor y factores inmunoestimuladores CD40L, CD70 y TLR4 para obtener una vacuna anti-tumor.

Materiales y métodos:

Construcciones genéticas.

50 Se ha descrito previamente la clonación del plásmido pGEM4Z-NGFR que codifica una forma truncada del receptor del factor de crecimiento nervioso (fragmento extracelular y de transmembrana). El CD40L se amplificó a partir de cADN de

células activadas T CD4⁺ con los siguientes cebadores: 5'-CD40LS GATGGzA 7CCGTCATGATCGAAACATACAAC-3' (SEQ ID NO: 3) y CD40LAS 5'-GCT CGG74CCCATCAGAGTTTGAGTAAGCC-3' (SEQ ID NO: 4) y se insertó en el plásmido pGEM4ZA64 (amablemente proporcionado por el Dr. N. Schaft, Departamento de Dermatología, hospital de Universidad de Erlangen, Alemania) como un BamHI-KpnI fragmento. CD70 se amplifica del plásmido pIRESneo2-CD70 (una especie de regalo del Dr. S. Iwamoto, Departamento de Bioquímica, Universidad de Showa, Japón) con los siguientes cebadores: CD70S 5'-AA4?GC77CCACCATGCCGGAGGAGGGTTC-3' (SEQ ID NO: 5) y CD70AS 5'-GGGGG G??77CTCAGGGGCGCACCCAC-3' (SEQ ID NO: 6) y se inserta en el plásmido pGEM4Z-A64 como fragmento a/-/nc/III-EcoRI. Para la clonación del plásmido pGEM4Z-caTLR4-A64, la secuencia líder (sig) de Lamp1 se fusionó a TLR4 humano, se truncó entre el aa M620 y P621, eliminando así el dominio de unión a LPS extracelular y creando la forma constitutivamente activa de TLR4. El caTLR4 se amplificó de cADN de DC madura humana con los siguientes cebadores: caTLR4S 5'-GGGG/A7CCTGTGCTGAGTTTGAATA TCACC-3' (SEQ ID NO: 7) y caTLR4AS 5'-GGG??77CTCAGATAGATGTTCTTCTG-3' (SEQ ID NO: 8). El cADN de caTLR4 se insertó en el pGEM4Z-sig-Lamp1-A64 como un fragmento SamHI-EcoRI, eliminando de este modo la secuencia de dirección Lamp1 a desde el vector. En paralelo el cADN caTLR4 también se insertó como un fragmento SamHI-EcoRI en el vector pcADN3 que contiene sig.

15 Transcripción in vitro de electroporación de mARN y mARN de extremos terminales de DC.

El mARN de extremo terminal que codifica las diferentes moléculas inmunoestimuladoras se transcribió de ADN de plásmido linealizado con polimerasa T7. En el día 6, 4x10⁶ DC obtenidas como en el ejemplo 1 se sometieron a electroporación con 10 µg de cada mARN. La electroporación se realizó en 200 µl de solución B Optimix (Equibio) en una cubeta de electroporación de 4 mm, utilizando el aparato Equibio Easyject Plus^(R). Las siguientes condiciones se utilizaron para la electroporación: voltaje de 300 V, capacitancia 150 µF y resistencia 99 Ω, resultando en un tiempo de impulso de aproximadamente 5 ms. Inmediatamente después de electroporación, las células se transfirieron en IMDM que contiene 1 por ciento de suero AB inactivado por calor (PAA Laboratories, Linz, Austria), PSG, L-asparagina 0.24 mM y L-arginina 0.55 mM (ambos de Cambrex) (denominados como medio de estimulación) a una concentración de 1 x 10⁶ células/ml para su uso posterior. No se agregó GM-CSF, IL-4 o citoquinas de maduración a las DC después de electroporación.

Péptidos sintéticos y pulsación de péptidos.

El péptido derivado de MelanA/MART-1 restringido a HLA-A*0201 correspondiente al epítipo inmunodominante optimizado (aa 26-35; ELAGIGILTV) se adquirió de Thermo Electron (Thermo Electron Corporation, Ulm, Alemania). El péptido gag restringido a HLA-A2 (péptido gag-A2, conjunto completo de péptido HXB2 gag, NIH, Investigación del SIDA y Programa de Reactivos de Referencia, McKesson BioServicios Corporation, Rockville, MD) se utilizó como control negativo. Para impulsar el péptido, las DC se diluyeron a una densidad final de 2 x 10⁶ células/ml en IMDM que contenía 10 µg/ml de péptido y se incubaron durante 2 horas a 37°C.

Citometría de flujo.

Las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales (mAb) contra CD40L-PE o CD70-PE (Beckton Dickinson, BD, San José, CA). Para tinción de CD40L, las DC se incubaron con tapón de Golgi (brefeldina A, BD, San José, CA) durante 4 h, después de lo cual una tinción intracelular de CD40L se realizó utilizando el equipo BD Cytofix/Cytoperm plus.

Resultados:

Expresión del transgen después de electroporación de mARN.

40 Cuando las células K562 se sometieron a electroporación con mARN de CD40L, más del 80 por ciento de las células muestran expresión de superficie fuerte de CD40L después de 4 h. Después de 24 h, más de 40 por ciento de las células todavía expresan CD40L (datos no presentados). Por el contrario, cuando las DC se sometieron a electroporación con mARN de CD40L, no se pudo detectar expresión en la membrana. El CD40L se pudo detectar intracelular, pero sólo cuando se agrega conexión de Golgi inmediatamente después de la electroporación para prevenir el tráfico a la membrana celular. Bajo estas condiciones, aproximadamente el 60 por ciento de las DC sometidas a electroporación expresan CD40L durante las cebadoras 4 h después de electroporación (Figura 1A). El porcentaje de células positivas se redujo ligeramente cuando el mARN de CD40L se sometió a electroporación en combinación con uno o dos de otros mARNs. Las DC inmaduras o maduras en cóctel de citoquinas no mostraron expresión de CD70 como se detectó por FACS, ni las DC sometidas a electroporación con mARN de CD40L y/o caTLR4. Cuando estas células se sembraron en CD40L que expresan fibroblastos 3T6 durante 48 h, se observó una ligera regulación ascendente de la expresión de CD70 en aproximadamente 3 ± 1.8 por ciento (n = 2) de las DC inmaduras y 4.9 ± 2.1 por ciento (n = 2) de las DC maduras en cóctel de citoquinnass (datos no mostrados). Cuando las células se maduraron con LPS o por pulsación pasiva o electroporación con el análogo dsARN de Ampligen, la expresión de CD70 se podría detectar en aproximadamente 5.8 ± 0.3 por ciento, 9 ± 3.3 por ciento y 11.2 ± 3 por ciento de las DC, respectivamente. Por otro lado, las DC sometidas a electroporación con mARN de CD70 mostraron una expresión fuerte y de larga duración de CD70 sobre su membrana (Figura 1B). Veinticuatro horas después de electroporación 78 por ciento de las

DC sometidas a electroporación expresan CD70, mientras que 96 horas después de electroporación, 67 por ciento todavía expresan CD70. Una vez más, las DC de expresión CD70 disminuyeron ligeramente cuando una combinación de dos o tres mARN diferentes se sometieron a electroporación en comparación con solo mARN de CD70.

5 Las DC ya expresan anticuerpos TLR4 y disponibles comercialmente, contra el TLR4 reconocen el dominio extracelular, que se suprimió en la construcción caTLR4. Por lo tanto, no hemos podido evaluar la expresión de caTLR4 después de electroporación de mARN.

Ejemplo 3: Prueba del efecto inmunoestimulador de la vacuna antitumor obtenida in vitro.

Materiales y métodos:

10 La activación de la ruta de NF-kappaB. Las construcciones genéticas utilizadas fueron como sigue: el plásmido pNFconluc que codifica el gen de luciferasa de luciérnaga dirigido por un promotor sensible a NF-kappaB mínimo fue proporcionado amablemente por el Dr. R. Beyaert (VIB, Universidad de Gante, Bélgica). El plásmido CSCW-GLuc-YFP, que codifica la luciferasa Gaussia secretada humanizada fusionada a la proteína fluorescente amarilla es una especie de regalo del Dr. B. A. Tanus (Massachusetts General Hospital, Boston, MA). El gluc-YFP se subclonó a partir de este plásmido en el vector PHR. El CD27 se amplificó de cADN de células EBV-B con los siguientes cebadores: CD27S 5'-AAA4?GCTTCCACCATGGCACGGCCACATCCCTG-3' (SEQ ID NO: 1) y CD27AS 5'- CCCCTCGAG TCAGGGGGAGCAGGCAGG-S' (SEQ ID NO: 2) y se insertó en el vector pCADN3 como un fragmento HindIII- XhoI.

20 Para el ensayo de luciferasa de NF-kappaB, las células 293T (1 x 10⁵ células por pozo) se sembraron en placas de 24 pozos. Después de 24 h, las células se transfectaron con 10 ng del plásmido de gen informador pNFconluc, 10 ng de PHR-gluc-YFP y con 100 ng del plásmido de expresión pcADN3-caTLR4 o pcADN3-CD27 cuando se indica. Las transfecciones se realizaron por triplicado con el reactivo de transfección Fugene 6 (Roche) y las cantidades totales de plásmido se mantuvieron constantes al agregar el plásmido pcADN3 vacío. Después de transfección, se agregaron 1 x 10⁵ DC sometidas a electroporación a los pozos cuando se indica. Se prepararon extractos celulares 24 horas más tarde, y la actividad del gen informador se determinó por el sistema de ensayo de luciferasa (Promega, Leiden, Países Bajos). Los resultados se normalizaron para actividad de luciferasa Gaussia secretada.

25 Citometría de flujo.

30 Las DC se tiñeron utilizando anticuerpos monoclonales (mAb) contra CD40-PE, CD80-PE, CD83-FITC, CD86-FITC y HLA-ABC-FITC (todos de Pharmingen, San Jose, CA). Las células T se sometieron a fenotipo con mAbs contra CD4-FITC, CD8-FITC, CD8-APC-Cy7, CD27- APC, CD28-APC, CD45RA-biotina, CD45RO-APC, CD62L-FITC (todos de Pharmingen)) y CCR7-APC (R and D Systems, Oxford, Reino Unido). El CD45RA biotinilado se detectó con estreptavidina conjugada con PerCP.

Se utilizaron mAbs emparejados con isotipo no reactivos (Pharmingen) como controles. Los datos se recolectaron a través de un citómetro de flujo FACSCanto y analizados utilizando el software CellQuest o FACSDiva. Las células se cerraron electrónicamente de acuerdo a las propiedades de dispersión de luz con el fin de excluir las células muertas y contaminantes.

35 Ensayo de secreción de citoquinas.

La secreción de 27 diferentes citoquinas y quimiocinas por DC durante las cebadoras 24 horas después de electroporación se evaluó con el panel A 27-Plex de citoquina humana Bio-Plex de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, Nazareth, Bélgica).

Inducción de una respuesta de células T CD4⁺ no tratadas por DC sometidas a electroporación.

40 Se aislaron células T CD4⁺ no tratadas de la fracción no adherente de las células mononucleares de sangre periférica mediante selección inmunomagnética utilizando el equipo de Aislamiento de células T CD4⁺ II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), después de lo cual las células T CD45RA⁺ se seleccionaron positivamente utilizando microesferas de CD45RA (Miltenyi Biotec). Las células T CD4⁺ fueron consistentemente mayores del 85 por ciento de pureza y mayores del 90 por ciento de CD45RA positivos (datos no mostrados). Luego, 5 x 10⁴ células T CD4⁺ no tratadas se cocultivaron con 1 x 10⁴ DCs alogénicas sometidas a electroporación con el mARN indicado. Cada cocultivo se realizó en 12 veces en 200 µl de medio de estimulación por fondo redondo de 96 pozos. Después de 6 días, se recogieron células T estimuladas, se resuspendieron a una densidad de 1 x 10⁵ células T/ml de medio de estimulación en presencia de 4.7 x 10⁴ perlas expansoras de células T CD3/CD28 (Dyna, Invitrogen) y se volvieron a sembrar en ml por 96 pozos con fondo redondo. Después de 24 h de incubación a 37°C, el sobrenadante se recogió y se ensayó para IFN-gamma (BioSource International, Camarillo, CA), IL-4 (Pierce Biotechnology, Aalst, Bélgica) y-10 IL (R and D Systems) contenido utilizando equipos ELISA disponibles comercialmente. Cada cocultivo se ensayó por duplicado en ELISA.

Inducción de células T CD8⁺ específicas a MelanA.

Las células T y DC se obtuvieron de donantes sanos HLA-A2⁺. Las DC se sometieron a electroporación con el mRNA indicado e inmediatamente se impulsaron con péptido MelanA-A2 durante 2 h. Después del lavado, las DC sometidas a electroporación del mRNA impulsado por péptido se cocultivaron con 10 x 10⁶ células T CD8⁺ autólogas purificadas por selección inmunomagnética al utilizar microperlas CD8 (Miltenyi). Las células T CD8⁺ fueron consistentemente mayores del 90 por ciento de pureza (datos no mostrados). Las estimulaciones se llevaron a cabo a una relación de DC: células T de 1:10 en 5 ml de medio de estimulación por 6 pozos. Las células T CD8⁺ se volvieron a estimular semanalmente con las mismas DC estimuladoras como se utiliza en la estimulación primaria. Después de 3 rondas de estimulación, se recogieron células T CD8⁺ y se determinó su especificidad de antígeno y su función.

10 Tinción de tetrámero.

Las células T se tiñeron con tetrámeros de HLA-A2 marcados con PE 10 nM que contenían péptidos MelanA (ELAGIGILTV) o MAGE-A3 (FLWGPRALV). Los tetrámeros se prepararon de forma interna. Posteriormente, las células se tiñeron con un anti-CD8 Ab marcado con FITCy 1 x 10⁵ células se analizaron por citometría de flujo.

Tinción intracelular de citoquinas.

15 La capacidad de las células T CD8⁺ cebadas con MelanA para producir citoquinas luego de reestimulación específica se investigó utilizando tinción intracelular para IFN-gamma y TNF-alfa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células T2 impulsadas con péptido MelanA-A2 o gag-A2 se cocultivaron con células T CD8⁺ cebadas a una relación de respuesta:estimulador de 10:1 durante 2-3 h a 37°C luego se agregó conexión de Golgi para bloquear la secreción de citoquinas y las células se incubaron durante 12 h adicionales a 37°C, las células T CD8⁺ luego se tiñeron con anti-CD8
20 conjugado con APC-Cy7, se lavaron, se permeabilizaron y tiñeron intracelularmente con IFN-gamma-PE/TNF-alfa-FITC utilizando el equipo BD Cytotfix/cytoperm plus. Se analizaron cien mil células mediante citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células T CD8⁺ que producen citoquinas.

Ensayo de movilización de CD107a.

25 1 x 10⁵ células T CD8⁺ cebadas se volvieron a estimular con 4 x 10⁴ células T2 cargadas con péptido MelanA-A2 o gag-A2 en presencia de detención de Golgi (monensina, BD) y, o bien anti-CD107a mAb marcado con PE-Cy5 o un control de isotipo irrelevante. Después de 12 h de incubación a 37°C, se recogieron las células, se tiñeron con anti-CD8 mAb marcado con FITC y 1 x 10⁵ células se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células T CD8⁺ CD107a⁺.

Resultados:

30 Activación de la ruta de NF-kappaB.

Como se muestra en la Figura 2, cuando se compara las DC sometidas a electroporación con mRNA de NGFR, ambas DC sometidas a electroporación con mRNA de CD40L y CD70 llevaron a activación de NF-kappaB en células 293T que expresan CD40 o CD27, respectivamente. Aunque este tipo de experimento no era factible con mRNA caTLR, podríamos mostrar que las células 293T cotransfectadas con ADN caTLR4 (que codifica la misma proteína que el
35 mRNA de caTLR4) y plásmido informador de NF-kappaB también llevaron a una activación de la ruta de NF-kappaB en comparación con las células 293T cotransfectadas con plásmido informador de NF-kappaB y plásmido pcADN3 vacío (Figura 2). Estos datos indican que los mRNA de CD40L, CD70 y caTLR4 codifican proteínas funcionalmente activas.

Fenotipo de DC sometidas a electroporación de manera diferente.

40 Se evaluó el fenotipo de las DC sometidas a electroporación con las diferentes combinaciones de mRNA de CD40L, CD70 y caTLR4 y al compararlas con DC inmaduras (Imm) y maduras en cóctel de (Mat) sometidas a electroporación con mRNA de NGFR irrelevante como controles positivos y negativos, respectivamente. Como se muestra en la Figura 3A, la electroporación de las DC inmaduras con mRNA de CD40L y/o caTLR4 indujo una regulación ascendente marcada de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83 y CD86 y de HLA clase I. En general, las DC sometidas a electroporación de mRNA de caTLR4 mostraron una maduración fenotípica ligeramente menos pronunciada que las
45 DC sometidas a electroporación de mRNA de CD40L mientras que la combinación de mRNA de CD40L y caTLR4 indujo maduración fenotípica ligeramente más pronunciada, que era comparable con la maduración inducida por el cóctel de citoquinas. Por el contrario, la electroporación o co-electroporación de CD70 no tuvo efecto sobre el fenotipo de las DC.

Secreción de citoquinas/quimioquinas por DC sometidas a electroporación de manera diferente.

50 Adicionalmente a una maduración fenotípica, la electroporación con mRNA de CD40L o caTLR4 induce una secreción aumentada de IL-12p70 bioactivo. La combinación de CD40L y caTLR4 refuerza aún más la producción de IL-12p70.

Una vez más, electroporación o coelectroporación de CD70 no tuvo ningún efecto (Figura 3B). También investigamos la secreción de varias otras citoquinas y quimiocinas. La secreción por las DC sometidas a coelectroporación con mARN de CD40L, CD70 y caTLR4, en comparación con las DC inmaduras y maduras en cóctel de citoquinas sometidas a electroporación con mARN de NGFR irrelevante se muestra en la Tabla 1. Para cada citoquina/quimioquina enumerada en la Tabla 1, encontramos que la que CD70 (co-)electroporación con CD70 no tuvo ningún efecto, mientras que la electroporación con CD40L y caTLR4 aumentó la secreción de citoquinas/quimioquinas, y la combinación de ambas produjo la secreción más alta. Adicionalmente, no se observó ninguna secreción de IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, FGF básico o PDGF por cualquiera de nuestras preparaciones de DC.

Tabla 1 Producción de citoquina y quimioquina (pg/ml) mediante DC sometidas a electroporación. Las DC sometidas a electroporación con mARN irrelevante o la combinación de mARN de CD40L, CD70 y caTLR4. Después de electroporación, las DC se cultivaron durante 24 h a una densidad celular de 1×10^6 células/ml en medio de estimulación sin adición de citoquinas suplementarias. La secreción de citoquinas y quimioquinas se mide con el panel A27-Plex de citoquina humana Bio-Plex. Se muestra uno de 3 experimentos.

		Imm NGFR	CD40L + CD70 + caTLR4	Mat NGFR
Citoquinas	IL-1beta	7.2	146	3.5
	IL-6	754	>20000	1093
	IL-10	43.4	902	54.1
	G-CSF	140	8553	68
	GM-CSF	9	101	10.3
	IFN-gamma	51.5	508	71.6
	TNF-alpha	87.2	>20000	20
	Quimioquinas	IL-8	10521	>30000
MIP-1alpha		175	917	120
IP-10		1076	>20000	50.5
RANTES		1071	>20000	598

15 Estimulación de células T CD4⁺ no tratadas mediante DC sometidas a electroporación de manera diferente.

Luego, se investigó si las DC sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de mARN de CD40L, CD70 y caTLR4 podrían inducir una respuesta de células T CD4⁺ no tratadas y si se observó sesgo hacia una respuesta Th1 o Th2. Por lo tanto, las DC sometidas a electroporación se utilizaron para estimular células T CD4⁺ CD45RA⁺ alogénicas y después se evaluó la reestimulación con perlas de expansión de células T CD3/CD28 del sobrenadante para contenido de IL-4, IL-10 y IFN-gamma. En general, las células T estimuladas secretan cantidades muy bajas de IL-4 (menos de 50 pg/ml) e IL-10 (menos de 200 pg/ml) y no se encontraron diferencias entre las células T estimuladas de forma diferente (datos no mostrado). Por otro lado, las DC sometidas a electroporación con mARN de CD40L y caTLR4 estimularon las células T CD4⁺ que secretan altas cantidades de IFN-gamma. Aquí también, la combinación de CD40L con caTLR4 impulsa la secreción de IFN-gamma aún más y la (co-) electroporación de CD70 no tuvo ningún efecto (Figura 3C), aunque el análisis de FACS confirmó que las células T CD4⁺ CD45RA⁺ expresan CD27.

Inducción de células T CD8* específicas a MelanA mediante DC sometidas a electroporación de forma diferente.

En un siguiente conjunto de experimentos, se investigó si las DC sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de mARN de CD40L, CD70 y caTLR4 podía cebar células T CD8* específicas a MelanA no tratadas. Por lo tanto, las DC de donantes sanos HLA-A2* se sometieron a electroporación con diferentes combinaciones de mARN

de CD40L, CD70 y caTLR4, impulsadas con el péptido MelanA inmunodominante y co-cultivadas con células T CD8⁺ autólogas. Las DC inmaduras y maduras en cóctel de citoquinas, sometidas a electroporación con mARN de NGFR irrelevante e impulsadas con péptido MelanA, se utilizaron como controles. Después de 3 de estimulaciones semanales, se determinaron el número de células restantes y el porcentaje de tetrámero positivo, las células T CD8⁺ específicas a MelanA (Tabla 2). A partir de estos datos se calcularon el número absoluto de tetrámero positivo, células T CD8⁺ específicas a MelanA (Tabla 2) y el aumento de veces sobre DC inmaduras sometidas a electroporación con mARN irrelevante (Figura 4A). Nuestros datos muestran que las DC que se someten a electroporación con solo mARN de CD40L o caTLR4 proporcionan un mayor número de células T CD8⁺ específicas a MelanA, que se incrementó aún más mediante la combinación de CD40L con electroporación CD70 o caTLR4. La combinación de todas las tres moléculas resultó consistentemente en el mayor aumento de números de células T específicas a antígeno, con un incremento de veces promedio de 573 y 203 sobre las Dc inmaduras o maduras en cóctel de citoquinas sometidas a electroporación con mARN de NGFR, respectivamente.

Tabla 2. Inducción de células T CD8⁺ específicas a MelanA restringidas a HLA-A2 mediante DC sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de mARN de CD40L, CD70 y caTLR4 e impulsadas con el péptido MelanA. Los resultados se muestran para 4 experimentos individuales de diferentes donantes sanos

	% de células T tetrámero+ MelanA CD8 ⁺ /número de células T CD8 ⁺ (10 ⁸) [†]				Número absoluto de células T tetrámero+ MelanA CD8 ⁺ (10 ³) [‡]			
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4
Imm NGFR	0.4 / 3.4	0.5 / 2.1	0,1 / 2.8	0.1 / 1.35	13.7	10.7	2.8	1.35
CD40L	60.2/ 5.4	6.7 / 2.1	5.6 / 2.8	1.1/1.5	3271	141	157	16.5
CD70	3.3 / 3.6	0.9 / 1.7	0.2 / 2.2	0.2 / 1.65	120	15.4	4.4	3.3
caTLR4	20.8/ 4.3	40.3 / 4.0	1.3 / 2.2	9.3/1.8	892	1596	29.1	167
CD40L+ CD70	65/ 8.9	17.3/ 2.0	17.1 / 4.0	1.8/ 1.75	5792	348	677	31.5
CD40L +								
caTLR4	64 / 6.7	49.5 / 4.7	39.9/ 4.0	16.8 / 2.2	4301	2317	1612	370
CD40L+ CD70								
+ caTLR4	ND / ND	60.5 / 5.5	40.2 / 6.2	63.2 / 1.1	ND	3303	2508	695
Mat NGFR	0.7 / 3.1	1.2 / 3.4	0.4 / 3.2	0.1/1.7	21.7	41.0	12.9	1.7

† La población de células T generada después de 3 estimulaciones semanales con DC sometidas a electroporación, impulsadas con péptido se tiñeron con tetrámeros de HLA-A2 cargados con MelanA y anti-CD8 Ab. Se identificaron células T CD8⁺ específicas a MelanA mediante citometría de flujo. Se sustrajo la tinción de fondo con tetrámeros de HLA-A2 específicos a MAGE-A3, que nunca alcanzaron más de 0.5 por ciento. El número de células vivas se determinó mediante exclusión con azul de tripano.

‡ Se calculó el número absoluto de células T CD8⁺ específicas a MelanA con la siguiente fórmula: (número de células T CD8⁺ /100) x por ciento de células T tetrámero+ MelanA CD8⁺.

Propiedades funcionales y fenotípicas de las células T CD8⁺ estimuladas.

Por último, se evaluaron las propiedades funcionales y fenotípicas de las células T CD8⁺ estimuladas 3 veces con DC impulsadas con péptido MelanA-A2, cometidas a electroporación de forma diferente. Se investigaron principales mecanismos efectores de células T CD8⁺ estimuladas, es decir, citólisis y producción de citoquinas. En cebador lugar se realizó un ensayo de movilización de CD107a (Figura 4B), que mide la exposición de CD107a, presente sobre la membrana de los gránulos citotóxicos, sobre la superficie de las células T como resultado de la desgranulación luego de estimulación antigénica. Se ha demostrado que la movilización CD107a se puede utilizar como un marcador para la

actividad lítica. En segundo lugar se realizaron tinciones de citoquinas intracelulares para enumerar el número de células que secretan IFN-gamma y/o TNF-alfa, los dos principales mediadores de la respuesta inmunitaria, después de estimulación antigénica (Figura 4C). Para todos los donantes probados se observó que el porcentaje de células T específicas a MelanA, en correlación con el porcentaje de células T líticas y con el porcentaje de células T que producen IFN-gamma/TNF-alfa. Por otro lado, también se analizó el fenotipo de las células T CD8⁺ específicas a MelanA inducidas. Las células T CD8⁺ específicas a MelanA cebadas fueron todas CD45RA⁺CD45RO⁺CD27⁺CD28⁺, junto con una expresión variable de CD62L y CCR7 (Figura 4D). En general, no hubo diferencias significativas en el fenotipo de las células T CD8⁺ específicas a MelanA de los diferentes donantes, independientemente de que se utilizaron del tipo DC para estimulación.

5 Ejemplo 4: Las DC TriMix se pueden someter a co-electroporación con mARN de TAA sin afectar su eficiencia de electroporación, fenotipo maduro y secreción de citoquinas

Materiales y métodos

Construcciones genéticas.

15 Los plásmidos pGEM-CD40L, pGEM-CD70, pGEM-caTLR4 que codifican CD40L, CD70 y la forma constitutivamente activa de TLR4 (que contiene los fragmentos intracelulares y de transmembrana de TLR4), respectivamente; el plásmido pGEM-NGFR que codifica una forma truncada del receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR, que contiene fragmentos extracelulares y de transmembrana); y se han descrito el plásmido pGEM-sig-MelanA-DCLamp que codifica el antígeno MelanA de longitud completa, que contiene el epítipo MelanA-A2 inmunodominante optimizado y ligado a la señal de dirección de DC-Lamp.

20 Generación in vitro de las DC derivadas de monocitos humanos, transcripción in vitro electroporación de mARN y mARN de terminal protegido de DC.

25 Se han descrito anteriormente la generación, maduración y crioconservación de DC inmaduras y maduras en cóctel de citoquinas, producción de mARN de terminal protegido y electroporación de mARN de DC TriMix impulsadas con péptido MelanA. Para la coelectroporación con mARN de antígeno de tumor, las DC se sometieron a electroporación en la misma forma que la descrita en el ejemplo 2, pero se incluyeron µg de mARN de antígeno de tumor en la mezcla de mARN.

Citometría de flujo.

30 Se tiñeron las DC utilizando los siguientes mAbs: CD40-APC, CD70-PE, CD80-PE, CD83-PE, CD86-PE, HLA-ABC-FITC (todos de BD Pharmingen, Erembodegem, Bélgica) y HLA-DR (purificado a partir del clon L243). El anticuerpo anti-HLA-DR se marcó con biotina y se detectó a través de estreptavidina-APC (BD Pharmingen). Se utilizaron mAbs emparejados con isotipo no reactivos (BD Pharmingen) como controles. Los datos se recolectaron a través de un citómetro de flujo FACSCanto y se analizaron utilizando el software FACSDiva. Las células fueron encerradas electrónicamente de acuerdo a las propiedades de dispersión de luz con el fin de excluir las células muertas y contaminantes.

35 Ensayo de secreción de citoquinas.

Se evaluó la secreción de IL-12p70 por DC durante las cebadoras 24 h después de electroporación mediante ELISA utilizando un equipo disponible comercialmente (eBioscience, Zoersel, Bélgica).

Resultados:

40 Las DC sometidas a electroporación con un trímix de mARN de CD40L, CD70 y caTLR4 son normalmente sometidas a electroporación de manera muy eficiente: en promedio, aproximadamente el 80 por ciento de las DC expresan la molécula CD70 en su superficie 24 h después de electroporación. Debido a que se observó que la eficiencia de la electroporación se redujo ligeramente cuando una combinación de tres mARNs diferentes se sometió a electroporación en comparación con un mARN sencillo, se investigó si la adición de un cuarto mARN afectaría a la eficiencia de electroporación. Hemos encontrado que, cuando las DC TriMix se someten a coelectroporación con mARN de TAA, la eficiencia de electroporación no se altera notablemente, como lo demuestra la expresión de CD70 24 horas después de electroporación (Figura 5A).

50 Después de electroporación con mARN de TriMix, las DC inmaduras adquieren un fenotipo maduro y aumentan su secreción de citoquinas como se demuestra por la regulación ascendente de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD83, CD86) y moléculas HLA, y la secreción de IL-12p70, respectivamente. Aquí también, cuando las DC TriMix se someten a coelectroporación con mARN de TAA, no se alteran notablemente el fenotipo maduro (Figura 5B) y la secreción de citoquinas (Figura 5C).

Ejemplo 5: Inducción de células T CD8⁺ específicas a MelanA por DC TriMix impulsadas con el péptido o sometidas a coelectroporación con el mARN de antígeno de tumor completo.

Materiales y métodos:

5 Las DC TriMix impulsadas con péptido o sometidas a coelectroporación con mARN de antígeno de tumor completo se prepararon como se describió anteriormente, así como la inducción in vitro de células T CD8⁺ específicas a MelanA y tinción de tetrámero.

Citometría de flujo.

10 Las células T se sometieron a fenotipo con los siguientes mAbs: CD8-FITC, CD8-APC-Cy7, CD27-APC, CD28-APC, CD45RAbiotin, CD45RO-APC, CD62L-FITC (todos de BD Pharmingen) y CCR7-APC. Se detectó el CD45RA biotinilado con estreptavidina conjugada con PerCP (BD Pharmingen). Se utilizaron mAbs emparejados con isotipo no reactivos (BD Pharmingen) como controles. Los datos se recolectaron a través de un citómetro de flujo FACSCanto y se analizaron mediante el software FACSDiva. Las células se encerraron electrónicamente de acuerdo con las propiedades de dispersión de luz con el fin de excluir las células muertas y contaminantes.

Tinción intracelular de citoquinas y ensayo CD107a/CD137.

15 Para la tinción intracelular de citoquinas, 2 x 10⁵ células T CD8⁺ cebadas se volvieron a estimular con 2 x 10⁴ células estimuladoras en presencia de conexión de Golgi (brefeldinA, Becton Dickinson, BD, Erembodegem, Bélgica). Después de 12 h de incubación a 37°C, las células T CD8⁺ se tiñeron con FITC o anti-CD8 mAb conjugado con APC-Cy7, se lavaron, se permeabilizaron y tiñeron intracelularmente utilizando el equipo BD Cytotfix/Cytoperm plus con IFN-gamma-PE/TNF-alfa-APC o IFN-gamma-PE/TN-Falfa- FITC, respectivamente. Para el ensayo de CD107a/CD137, 1 x 10⁵
20 células T CD8⁺ cebadas se volvieron a estimular con 2 x 10⁴ células estimuladoras en presencia de detención de Golgi (monensina, BD) y anti CD107a-mAb marcado con PE-Cy5 (BD Pharmingen). Después de 12 h de incubación a 37°C, se recogieron las células y se tiñeron con mAb anti-CD8 marcado con FITC y mAb CD137 marcado con PE (ambos de BD Pharmingen). Como células estimuladoras, se utilizaron células T2 HLA-A2⁺, deficientes en TAP, impulsadas con péptido o DC maduras en cóctel de citoquinas sometidas a electroporación con TAA-mARN se utilizaron. Las células se
25 analizaron por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACSCanto y software FACSDiva. Las células se encerraron electrónicamente de acuerdo a las propiedades de dispersión de luz con el fin de excluir las células muertas y contaminantes.

Resultados:

30 Investigamos si las DC TriMix sometidas a coelectroporación con mARN que codifica MelanA de longitud completa pueden cebar las células T CD8⁺ específicas a MelanA no tratadas. Por lo tanto, las DC de donantes sanos HLA-A2⁺ se sometieron a electroporación con mARN de TriMix y, se impulsaron con el péptido MelanA inmunodominante o se sometieron a co-electroporación con mARN de MelanA-DCLamp. Las DC luego se cocultivaron con células T CD8⁺ autólogas sin la adición de citoquinas exógenas. Las DC inmaduras y maduras en cóctel de citoquinas, sometidas a electroporación con mARN de NGFR irrelevante e impulsadas con péptido MelanA, se utilizaron como controles. Las
35 células se estimularon 3 veces con un intervalo semanal. Después de cada ronda de estimulación, se determinaron el número de células restantes y el porcentaje de tetrámeros positivos, las células T CD8⁺ específicas a MelanA y se calculó el número absoluto de tetrámero positivo, células T CD8⁺ específicas a MelanA (Tabla 3). Adicionalmente, el porcentaje relativo de células T específicas a MelanA obtenido después de cada estimulación se comparó con el número absoluto de células T CD8⁺ específicas a MelanA obtenidas después de 3 estimulaciones semanales con DC TriMix impulsadas con péptido (conjunto a 100 por ciento) (Figura 6A). Hemos observado que, después de 1 ó 2 estimulaciones, las DC TriMix sometidas a coelectroporación con mARN de TAA fueron ligeramente menos potentes que las DC TriMix impulsadas por péptido, mientras que después de 3 estimulaciones, eran igualmente potentes en 2 de 4 experimentos.

45 Luego, se evaluaron las propiedades funcionales y fenotípicas de las células T CD8⁺ estimuladas 3 veces con DC TriMix impulsadas con péptido o sometidas a co-electroporación con mARN de TAA. Se investigaron los principales mecanismos efectores de células T CD8⁺ estimuladas, es decir, activación, citolisis y producción de citoquinas. Las células T se estimularon de nuevo durante la noche con células T2 impulsadas con péptido MelanA-A2 o péptido gag como control negativo. En cebador lugar se realizó un ensayo de movilización de CD107a combinado con un ensayo de activación de CD137 (Figura 6B), que midieron respectivamente la actividad lítica (14) y la activación de células T (15)
50 luego de estimulación antigénica. En segundo lugar se realizó la tinción intracelular de citoquinas para enumerar el número de células que secretan IFN-gamma y/o TNF-alfa luego de estimulación antigénica; ambos mediadores principales de la respuesta inmunitaria (Figura 6C). Para todos los donantes probados se observó que el porcentaje de células T específicas a MelanA, se correlaciona con el porcentaje de células T líticas/ activadas y con el porcentaje de células T producen IFN-gamma/TNF-alfa. En general, no se observaron diferencias importantes entre las células T estimuladas con péptido impulsado o DC sometidas a coelectroporación de TAA, excepto un aumento leve pero
55

reproducibile en la intensidad de fluorescencia media de la tinción de IFN-gamma y también en porcentaje de células IFN-gamma/TN-Falfa dobles positivas, lo que sugiere que las células T cebadas con DC TriMix sometidas a electroporación ejercen más funciones a la vez (16). También se analizó el fenotipo de las células T CD8+ específicas a MelanA inducidas. Las células T específicas a MelanA CD8+ cebadas son todas CD45RA⁺CD45RO⁺CD27⁺CD28⁺, junto con una expresión variable de CD62L y CCR7 (datos no presentados), lo que sugiere que se han inducido las células T de memoria centrales (CD62L⁺ y CCR7⁺) y células T de memoria efectoras tempranas (CD62L⁻ y CCR7⁻) (17). En general, no hubo diferencias significativas en el fenotipo de las células T CD8+ específicas a MelanA de los diferentes donantes, independientemente de que se utilizaron DC impulsadas por péptido o sometidas a coelectroporación de TAA para estimulación.

Tabla 3. Inducción de células T CD8+ específicas a MelanA restringidas a HLA-A2 por DC TriMix impulsadas con el péptido MelanA-A2 o sometidas a co-electroporación con mARN de MelanA DC-Lamp[†].

	% de células T tetrámero+ MelanA CD8+ /número de células T CD8+ (10 ⁶) [†]				Número absoluto de células T tetrámero+ MelanA CD8+ (10 ³) [‡]			
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4
Imm + péptido MelanA	0.3 / 1.2	0.1 / 1.35	1.2 / 4.2	0.5 / 3.5	3.5	1.3	50	19
TriMix + Péptido MelanA	72.4/ 6.8	63.2/ 1.1	52.4 / 9.3	49.6 / 13	4922	695	4884	6478
TriMix + mARN de MelanA	72.5/ 6.3	25.9 / 1.6	43.3 / 5.7	44.8 / 14.7	4572	401	2455	6594
Mat + Péptido MelanA	ND	0.1 / 1.5	ND	2.1 / 2.4	ND	1.5	ND	52

[†] La población de células T generada después de 3 estimulaciones semanales con las DC diferentes se tiñeron con tetrámeros de HLA-A2 cargados con péptido MelanA y anti-CD8 Ab. Luego se identificaron células T CD8+ específicas a MelanA mediante citometría de flujo. Se sustrajo la tinción de fondo con tetrámeros de HLA-A2 específicos a MAGE-A3. El número de células vivas se determinó mediante exclusión con azul de tripano.

[‡] Se calculó el número absoluto de células T CD8+ específicas a MelanA con la siguiente fórmula: (número de células T CD8+ /100) x por ciento de células T tetrámero+ MelanA CD8+.

* Se muestran resultados para 4 experimentos individuales de diferentes donantes sanos

Abreviaturas: Imm, DC inmaduras sometidas a electroporación con el mARN de NGFR irrelevante; Mat, DC maduras en cóctel de citoquinas sometidas a electroporación con mARN de NGFR; ND, no realizado.

Ejemplo 6: Estimulación de células T CD4+ específicas a Mage-A3 por DC TriMix impulsadas con péptido o sometidas a coelectroporación con mARN de TAA completo.

Debido a que todos las TAA-construcciones utilizadas contienen una señal de dirección de HLA clase II, hemos querido investigar si las DC TriMix sometidas a co-electroporación con mARN de TAA podrían estimular las células T CD4+ establecidas. Por lo tanto, las DC TriMix se impulsaron con el péptido Mage-A3-DP4 o se sometieron a coelectroporación con mARN de MageA3-DCI_{amp}. Cuatro horas más tarde, las células se cocultivaron con células T específicas a Mage-A3, restringidas a HLA-DP4 durante 20 h. Estas células T se restringen a HLA-DP4 (HLA-DPB1*0401) y son específicas para el epítipo aa Mage-A3 243 a 258 con la secuencia KKLLTQHFVQENYLEY. Las DC inmaduras sometidas a electroporación con mARN de NGFR irrelevantes se utilizaron como un control negativo. El IFN-gamma liberado en el sobrenadante durante el cocultivo se midió por ELISA (Figura 7). Hemos observado que las DC TriMix son de hecho capaces de presentar epítipo de antígenos en el contexto de moléculas HLA clase II, sin diferencias notables entre células impulsadas por péptido y sometidas a coelectroporación de TAA.

Ejemplo 7: Inducción in vitro de células T CD8⁺ específicas a otros antígenos diferentes de MelanA en la sangre de pacientes con melanoma no vacunados.

Materiales y Métodos:

Construcciones genéticas.

5 Se ha descrito plásmido pGEM-sig-MageA3-DCLamp que codifica el antígeno Mage-A3 de longitud completa ligado a la secuencia de dirección HLA clase II de DC-Lamp (transmembrana/región citoplasmática). El plásmido pGEM-sig-MageC2- DCLamp contiene el gen MageC2 de longitud completa, flanqueado por la secuencia señal y la secuencia de dirección de HLA clase II de DC Lamp. Los plásmidos pGEM-sig-gp100-Lamp y pGEM-sig-tirosinasa-Lamp contienen el gen gp100 y Tirosinasa, respectivamente, con su propia secuencia señal y con sus regiones de transmembrana y citosólicas reemplazadas por la secuencia de dirección de HLA clase II de Lamp-1.

Electroporación de las DC.

15 Para coelectroporación con MageA3-DCLamp, MageC2-DCLamp, Tirosinasa-Lamp o mRNA de gp100-Lamp, 50×10^6 DC se sometieron a electroporación con 20 µg de mRNA de CD40L, CD70 y caTLR4 junto con 60 µg de mRNA que codifica TAA en una cubeta de electroporación de 4 mm y se utilizaron las siguientes condiciones para electroporación: voltaje 300 V, capacitancia 450 µF y resistencia 99 Ω en un volumen final de 600 µl.

Péptidos sintéticos y pulsación de péptidos.

20 El Mage-A3 restringido a HLA-A*0201 (aa 112-120; KVAELVHFL), Mage-C2 (aa 336-344; ALKDVEERV), Tirosinasa (aa 369-377; andMDGTMSQV), gp100 (aa 209-217; ITDQVPFSV) y péptidos derivados se adquirieron de Thermo Electron (Ulm, Alemania). El péptido gag restringido a HLA-A2 (péptido gag-A2, conjunto completo de péptido HXB2 gag, NIH, Investigación sobre el SIDA y Programa de Reactivos de Referencia, McKesson BioServices Corporation, Rockville, MD) se utilizó como un control negativo. Para la pulsación de péptido, se diluyeron células DC o T2 a una densidad final de 2×10^6 células/ml en IMDM que contiene 10 µg/ml de péptido y se incubaron durante 2 horas a 37°C.

Inducción de células T CD8⁺ específicas a TAA.

25 Se aislaron células T CD8⁺ de la sangre de pacientes con melanoma HLA-A2⁺. Las células T CD8⁺ se purificaron mediante selección inmunomagnética al utilizar microperlas CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y tuvieron consistentemente más del 90 por ciento de pureza (datos no mostrados). Se cocultivaron veinte millones de células T CD8⁺ con DC autólogas en una relación de DC: células T de 1:10 por 6 pozos en 7.5 ml de medio de estimulación que consiste de medio IMDM que contiene 1 por ciento de suero AB inactivado por calor (PAA Laboratories, Linz, Austria), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM, L-asparagina 0.24 mM y L-arginina 0.55 mM (todo de Cambrex) sin ninguna otra adición de citoquinas exógenas tales como IL-2 o IL-7. Como DC estimuladoras, se utilizaron DC maduras en cóctel de citoquinas que contiene IL-1 alfa, IL-6, TNF-alfa y PGE₂ e impulsadas con un péptido derivado de Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp100 restringido a HLA-A2 (secuencias KVAELVHFL, ALKDVEERV, andMDGTMSQV y ITDQVPFSV, respectivamente; se mezclaron a una relación 1:1:1:1); o DC TriMix según se prepararon para vacunación. Las células T CD8⁺ se volvieron a estimular semanalmente con las mismas DC estimuladoras como se utilizó en la estimulación primaria. Después de 2 rondas de estimulación, se recogieron las células T CD8⁺ y se determinaron su especificidad de antígeno y función.

Tinción de tetrámero.

40 Las células T se tiñeron con un anti-CD8 marcado con FITC (BD Pharmingen) y con tetrámeros de HLA-A2 marcados con PE 10 nM (preparados en casa). Los tetrámeros contenían uno de los siguientes péptidos derivados de TAA, restringidos a HLA-A2: FLWGPRALV - SEQ ID NO: 9 - o KVAELVHFL - SEQ ID NO: 10 - (derivado de Mage-A3); ALKDVEERV - SEQ ID NO: 11 - (derivado de Mage-C2); YMDGTMSQV - SEQ ID NO: 12 - (derivado de Tirosinasa); ITDQVPFSV - SEQ ID NO: 13 - , YLEPGPVTA - SEQ ID NO: 14 - o KTWGQYWQV - SEQ ID NO: 15 - (derivado de gp100); o SLLMWITQC - SEQ ID NO: 16 - (derivado de NY-ESO-1, control negativo). Las células se analizaron por citometría de flujo.

45 Se realizaron tinción intracelular de citoquinas y ensayo de CD107a/CD137 como se describe en el ejemplo 5.

Resultados:

50 Debido a que este trabajo es parte de la evaluación preclínica de un estudio de vacunación, donde las DC TriMix sometidas a coelectroporación con mRNA de Mage-A3, Mage-C2, tirosinasa o gp100 se inyectarán en los pacientes con melanoma, quisimos investigar si estas DC son capaces de inducir células T CD8⁺ específicas para estos antígenos in vitro en PBMC de pacientes con melanoma no vacunados. Por lo tanto, las células T CD8⁺ de pacientes con melanoma

HLA-A2⁺ se cocultivaron con DC autólogas según se prepara para vacunación, es decir, se someten a electroporación con mARN de TriMix junto con uno de los cuatro mARN de antígenos de tumor, y se mezclaron después en cantidades iguales. Las DC maduras en cóctel de citoquinas impulsadas con un péptido derivado de Mage A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp100 restringido a HLA-A2 (también mezclado en cantidades iguales) se utilizaron como controles. Durante todo el período de estimulación, no se agregaron citoquinas exógenas como IL-2 o IL-7 para apoyar la proliferación y supervivencia de células T. Después de 3 estimulaciones semanales, las células T se tiñeron con un panel de tetrámeros que reconocen 7 diferentes epítomos derivados de Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp100 restringidos a HLA-A2. Para los 3 pacientes probados, se observó que las DC TriMix sometidas a coelectroporación con mARN de TAA fueron capaces de inducir células T específicas a Tirosinasa restringidas a HLA-A2, mientras que las DC maduras en cóctel de citoquinas impulsados con el péptido Tirosinasa-A2 fallaron en hacerlo (Figura 8A). No se observaron células T que reconocen los otros tetrámeros específicos a Mage-A3, Mage-C2 o gp100, ni cuando se utilizaron DC TriMix ni DC maduras en cóctel de citoquinas para estimulación in vitro (datos no mostrados). Aunque las DC TriMix se sometieron a co-electroporación con mARN de TAA de longitud completa que codifica todos los posibles epítomos derivados de TAA, no se observó inducción de otras células T específicas a Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp100, según se evaluó mediante ensayos CD137/CD107a y de tinción de citoquinas intracelular (Figura 8B y C y los datos no mostrados), aunque las bajas frecuencias de células T específicas podrían haber sido ocultadas por la activación de células T no específica inducida por DC TriMix.

Ejemplo 8: Inducción de células T CD8⁺ específicas a otros antígenos diferentes de MelanA en la sangre de pacientes con melanoma después de vacunación con DC TriMix sometidas a coelectroporación con mARN de TAA.

El objetivo final de la invención es, por supuesto, la provisión de una vacuna contra el cáncer que comprende las DC manipuladas de acuerdo con la invención, que presentan epítomo derivado de antígeno específico a tumor en el contexto de moléculas de HLA clase I o II sobre su superficie, que se pueden volver a reintroducir en el paciente, posteriormente provocar una respuesta inmunitaria contra el marcador tumoral específico. Este procedimiento de inmunovacunación comprende las etapas de (1) obtención y manipulación de las DC como se describe en los ejemplos 1 y 7 y (2) inyección de las DC en el sujeto. El sujeto es un modelo de ratón para análisis adicional del efecto inmunoestimulador de la vacuna in vivo, o el sujeto puede ser un paciente con cáncer, con el fin de ayudar a establecer una respuesta inmunitaria mediada por anfitrión hacia el antígeno específico a tumor. En resumen, una preparación de DC que comprende preferiblemente 10-100 10⁶ DC, más preferiblemente 10-50 10⁶ DC, resuspendida en 250 µl de solución salina regulada con fosfato (PBS), suplementada con albúmina de suero humano se inyecta en el sujeto, preferiblemente por vía intradérmica.

En el sujeto, las DC son capaces de estimular las células T y provocar una respuesta inmunitaria mediada por anfitrión debido a sus características inmunoestimuladoras específicas. La reacción inmunitaria en el anfitrión luego se puede analizar a través de técnicas estándar. Analizando el aumento de marcadores inflamatorios apuntará al establecimiento de una reacción inmunitaria en el anfitrión, probablemente dirigida hacia el antígeno de tumor. Con el fin de comprobar si la respuesta inmunitaria se dirige específicamente hacia el antígeno de tumor presentado por las DC en la preparación de vacunas, se pueden utilizar varias técnicas conocidas, tales como tinción intracelular a través de citometría de flujo, ELISPOT o Ensayos Inmuno-absorbentes ligados a Enzima (ELISA) utilizando fragmentos de péptidos del antígeno de tumor o el antígeno de tumor completo con el fin de capturar y detectar células T de anfitrión específicas a antígeno de tumor. La respuesta inmunitaria se puede monitorizar en la sangre periférica del paciente o en la piel, después de inducción de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) y posterior biopsia de la región DTH.

Pacientes, preparación de la vacuna y esquema de vacunación.

Tres pacientes HLA-A2⁺ (2 M/1 F) con melanoma en estadio III o IV recurrente fueron reclutados en un ensayo piloto institucional permanente (UZ Brussel) con la vacuna TriMix-DC autóloga para pacientes con melanoma avanzado. Para propósitos de vacunación, las DC se sometieron a electroporación con mARN que codifica uno de los cuatro antígenos de tumor (Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa y gp100) y el mARN de TriMix. Después de un período de descanso de una hora, las células se mezclan en proporciones iguales. La cebadora vacuna se administró antes de críoconservación de la DC-caccine, las vacunas posteriores se realizaron con células que se descongelaron en el día de la vacunación. Las vacunas constan de más menos 12.5 10⁶ DC TriMix por antígeno y se administran por 4 inyecciones intradérmicas quincenales en 4 sitios de inyección diferentes (región axilar y/o inguinal).

Investigamos si las DC TriMix sometidas a coelectroporación con mARN de Mage-A3, Mage-C2, tirosinasa o gp100 serían capaces de inducir una respuesta de célula T CD8⁺ específica a antígeno in vivo. Por lo tanto, los pacientes con melanoma 2 HLA-A2⁺ (pacientes 2 y 3) se vacunaron 4 veces a intervalos quincenales con DC TriMix. Dos semanas después de la última vacunación, las células T CD8⁺ aisladas de la sangre de estos pacientes se volvieron a estimular in vitro con DC autólogas, ya sea con DC TriMix como se preparó para vacunación o con DC maduras en cóctel de citoquinas sometidas a co-electroporación con mARN de antígeno de tumor. De nuevo, durante todo el periodo de estimulación, no se agregaron citoquinas exógenas. Después de 2 estimulaciones semanales, las especificadas y funcionalidad a antígeno de las células T fue investigado por tinción con el panel de tetrámero HLA-A2 y por ensayos CD137/CD107a y de tinción intracelular de citoquinas; y esto se comparó con la respuesta inducida en las células T

5 CD8⁺ de los mismos pacientes, pero antes de vacunación. Para ambos pacientes, no se observaron células T específicas para los epítomos derivados de Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp100 restringidos a HLA-A2 conocidos en la tinción de tetrámero (datos no mostrados), aunque habíamos sido capaces de inducir la células T específicas a Tirosinasa-A2 en las células T CD8⁺ de estos mismos pacientes antes de vacunación (Figura 8A). Esto era todavía el caso después de que las células T habían recibido una ronda de estimulación adicional in vitro (datos no mostrados). Debido a que los pacientes se vacunaron con DC sometidas a co-electroporación con mRNA de antígeno de tumor de longitud completa que codifica todos los posibles epítomos derivados de antígeno de tumor, se investigó si se había inducido una respuesta de células T específica para otros epítomos diferentes de los epítomos restringidos a HLA-A2 conocidos. Por lo tanto, una semana después de la segunda reestimulación in vitro, las células T se volvieron a estimular durante la noche con DC maduras sometidas a electroporación con mRNA de antígeno de tumor o NGFR como control irrelevante después de que lo cual se realizaron ensayos de CD137/CD107a (Figura 8B) y tinción de citoquinas intracelular (Figura 8C). De hecho, hemos observado respuestas fuertes, inducidas por la vacuna contra otros epítomos de Mage-A3 (paciente 2), Mage-C2 (paciente 2 y 3) y Tirosinasa (paciente 2), que no estaban presentes antes de la vacunación. En general, se obtuvieron resultados similares cuando se utilizaron DC TriMix o DC maduras en cóctel de citoquinas para reestimulación in vitro, excepto por el hecho de que se indujeron a lo último menos células T no específicas (datos no mostrados).

Ejemplo 9: Combinación de diferentes mARNs que codifican factores inmunoestimuladores en una molécula de mRNA sencilla para electroporación

20 Para la transfección de 2 o más moléculas de mRNA o ADN que codifican factores inmunoestimuladores funcionales y/o factores que inhiben moléculas inhibitoras, se pueden utilizar preparaciones de mRNA o de ADN separadas como se mostró en los ejemplos anteriores. En este caso, cada factor individual se codifica por una molécula de mRNA o ADN sencilla. En este ejemplo alternativo, varios factores se ligan entre sí por medio de una secuencia de IRES (sitio interno de entrada de ribosoma) o una secuencia que codifica el péptido 2a dividible. De esta manera, dos o más factores se pueden codificar por una molécula de mRNA o ADN sencilla. Los datos preliminares, donde las células se sometieron a electroporación con mRNA que codifica CD40L y CD70 ligadas por una secuencia IRES o un péptido 2a dividible muestran que este método es de hecho factible. Por supuesto también se anticipa la extrapolación de este sistema a más de dos factores inmunoestimuladores mediante este ejemplo.

Listado de Secuencias

- <110> Vrije Universiteit Brussel
- 30 <120> Mejora de la capacidad estimuladora de células T de células dendríticas humanas y su uso en vacuna contra el cáncer
- <130> VUB-038-PCT
- <140> PCT/EP2007/059732
- <141> 2007-09-14
- 35 <160> 16
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 34
- <212> ADN
- 40 <213> Artificial
- <220>
- <223> cebador
- <400> 1

aaaaagcttc caccatggca cggccacatc cctg 34

<210> 2
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial
5 <220>
<223> cebador
<400> 2
cccctcgagt cagggggagc aggcagg 27
<210> 3
10 <211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
15 <400> 3
gatggatccg tcatgatcga aacatacaac 30
<210> 4
<211> 27
<212> ADN
20 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 4
cggtagccat cagagttga gtaagcc 27
25 <210> 5
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
30 <223> cebador
<400> 5

ES 2 573 458 T3

aaaagcttcc accatgccgg aggagggttc 30
<210> 6
<211> 27
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 6
ggggggaatt ctcaggggcg cacccac 27
10 <210> 7
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> cebador
<400> 7
ggggatcctg tgctgagttt gaatcacc 30
<210> 8
<211> 28
20 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 8
25 ggggaattctc agatagatgt tcttctg 28
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial
30 <220>
<223> sintético

<400> 9

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
1 5

<210> 10

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 10

10 **Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu**
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> sintético

<400> 11

Ala Leu Lys Asp Val Glu Glu Arg Val
1 5

<210> 12

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

25 <400> 12

Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> sintético

<400> 13

Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
1 **5**

<210> 14

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> sintético

<400> 14

Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
1 **5**

15 <210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> sintético

<400> 15

Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
1 **5**

<210> 16

25 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 16

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
1 5

5

Reivindicaciones

- 5 1. Un método in vitro para mejorar las características inmunoestimuladoras de células que presentan antígeno humanas que comprenden la introducción simultánea de por lo menos dos moléculas de mRNA o ADN diferentes que codifican proteínas inmunoestimuladoras funcionales en dichas células que presentan antígeno, caracterizadas porque entre dichas proteínas funcionales por lo menos se introducen CD40L y caTLR4, y en donde opcionalmente adicionalmente se introduce CD70.
- 10 2. Un método in vitro para preparar un agente de inmunoterapia que comprende las etapas de:
- a) modificar in vitro un grupo de células que presentan antígeno al introducir moléculas de mRNA o ADN en dichas células que presentan antígeno que codifican el antígeno inmunoestimulador CD40L y caTLR4 y opcionalmente adicionalmente CD70,
- b) modificar in vitro el grupo de células que presentan antígeno de la etapa a) al introducir un antígeno específico a objetivo en dichas células que presentan antígeno de tal manera que presentan antígeno específico a objetivo derivado de epítomos.
- 15 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde las células que presentan antígeno se seleccionan de el grupo que consiste de Células Dendríticas (DC), células B aisladas de o generadas de la sangre de un sujeto, estirpes celulares dendríticas, o estirpes de célula B.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el antígeno específico a objetivo es un antígeno de tumor, bacteriano, vírico o fúngico.
- 20 5. Una vacuna que comprende un agente de inmunoterapia que comprende células que presentan antígeno que se modifican in vitro al:
- a) introducir moléculas de mRNA o ADN en dichas células que presentan antígeno que codifican por lo menos el antígeno inmunoestimulador CD40L y caTLR4, y opcionalmente adicionalmente CD70, dichas células que presentan antígeno de esta manera expresan los antígenos inmunoestimuladores, y
- 25 b) introducir en dichas células que presentan antígeno un antígeno específico a objetivo, dichas células que presentan antígeno presentan de esta manera el antígeno específico a objetivo, dicha vacuna comprende adicionalmente adyuvantes farmacéuticamente aceptables.
- 30 6. Una preparación de células que presentan antígeno para uso en provocar una respuesta inmunitaria en un paciente en necesidad del mismo, caracterizada porque por lo menos dos moléculas de mRNA o ADN diferentes que codifican proteínas inmunoestimuladoras funcionales entre las cuales están por lo menos CD40L y caTLR4, y opcionalmente adicionalmente CD70 se introducen en dichas células que presentan antígeno.
7. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 5, para uso en provocar una respuesta inmunitaria en un paciente en necesidad del mismo.
- 35 8. Un método in vitro para cribar epítomos específicos a objetivo que se pueden utilizar para vacunación de pacientes, que comprende las etapas de:
- a) estimular in vitro células T de donantes saludables o pacientes, vacunados o no previamente con una vacuna anti-objetivo, con células que presentan antígeno en las que se introducen por lo menos dos moléculas de mRNA o ADN diferentes que codifican proteínas inmunoestimuladoras funcionales, entre las cuales está por lo menos CD40L y caTLR4, y opcionalmente adicionalmente CD70, dichas células que presentan antígeno de esta manera expresan las proteínas inmunoestimuladoras;
- 40 b) identificar células T específicas para el antígeno objetivo utilizado; y
- c) identificar el antígeno objetivo derivado de epítomo para el que la célula T es específica.
9. Una composición que comprende una combinación de por lo menos dos moléculas de mRNA o ADN diferentes que codifican:
- a) una proteína inmunoestimuladora funcional CD40L y caTLR4, y opcionalmente adicionalmente
- 45 b) una proteína inmunoestimuladora funcional CD70.

- 5 10. La composición de la reivindicación 9, en donde dichas dos o más moléculas de mRNA o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras son parte de una molécula de mRNA o ADN sencilla, en donde la molécula de mRNA o ADN sencilla es capaz de expresar las dos o más proteínas de forma simultánea, o en donde las dos o más moléculas de mRNA o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras se separan en la molécula de mRNA o ADN sencilla mediante un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o una secuencia de codificación de péptido 2a de auto-división.
11. Un método in vitro de los siguientes de los efectos del tratamiento con una vacuna anti-objetivo en un paciente, que comprende la detección y análisis de la respuesta inmunitaria hacia el antígeno específico a objetivo provocada en una biopsia de piel de hipersensibilidad de tipo retardado o una muestra de sangre periférica del sujeto inyectado previamente con la vacuna de la reivindicación 5 o la composición de acuerdo con cualquiera de reivindicaciones 9-10.
- 10 12. La preparación de células que presentan antígeno de la reivindicación 6, o el método de las reivindicaciones 8 o 11, en donde dicho paciente se sufre de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo de: presencia de tumor, cáncer, presencia melanoma, infección bacteriana, vírica o fúngica, infección por VIH o infección por hepatitis.
- 15 13. Un método para la amplificación ex-vivo de un grupo de células T de un paciente que comprende; a) llevar las células T obtenidas de un paciente que es vacunado antes de aislamiento, o que no es vacunado, en contacto con un agente de inmunoterapia que comprende células que presentan antígeno en las que por lo menos se introducen dos moléculas de mRNA o ADN diferentes que codifican proteínas inmunoestimuladoras funcionales, entre las cuales están por lo menos CD40L y caTLR4, y opcionalmente adicionalmente CD70, dichas células que presentan antígeno de esta manera expresan las proteínas inmunoestimuladoras; y en las que se introduce un antígeno específico a objetivo, dichas células que presentan antígeno de esta manera presentan antígeno específico a objetivo derivado de epítomos, y
- 20 b) identificar, aislar y expandir células T ex vivo que son específicas para el antígeno presentado por dichas células que presentan antígeno con las que se contactan.
- 25 14. Un grupo de células T para uso en una configuración de transferencia de célula T adaptativa en un paciente, caracterizada porque dicho grupo de células T consiste de células T obtenidas de dicho paciente que se estimula ex vivo con el agente de inmunoterapia que comprende células que presentan antígeno en las que por lo menos dos moléculas de mRNA o ADN diferentes que codifican proteínas inmunoestimuladoras funcionales entre las cuales se introduce por lo menos CD40L y caTLR4, y opcionalmente adicionalmente CD70, en dichas células que presentan antígeno; en las que se introduce un antígeno específico a objetivo en dichas células que presentan antígeno, presentando de esta manera antígeno específico a objetivo derivado de epítomos; que se han expandido ex vivo; y que son específicos para el antígeno presentado por las células que presentan antígeno con las que se ponen en contacto.

30

Figura 1A

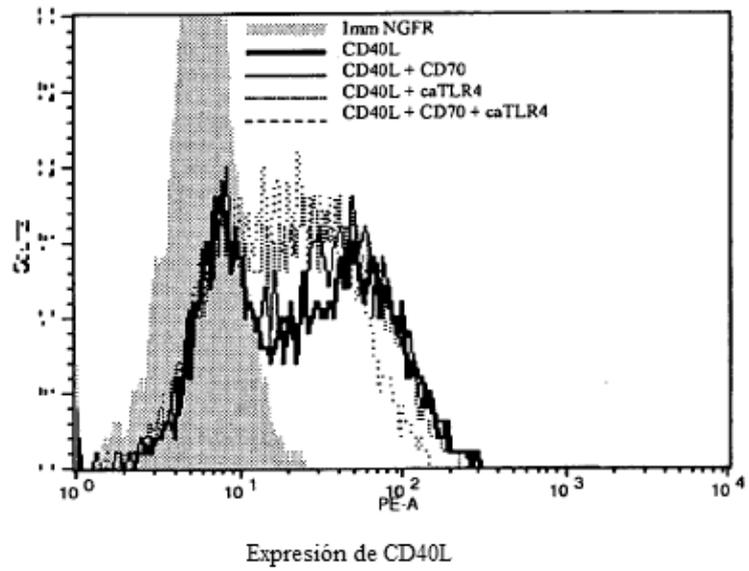


Figura 1B

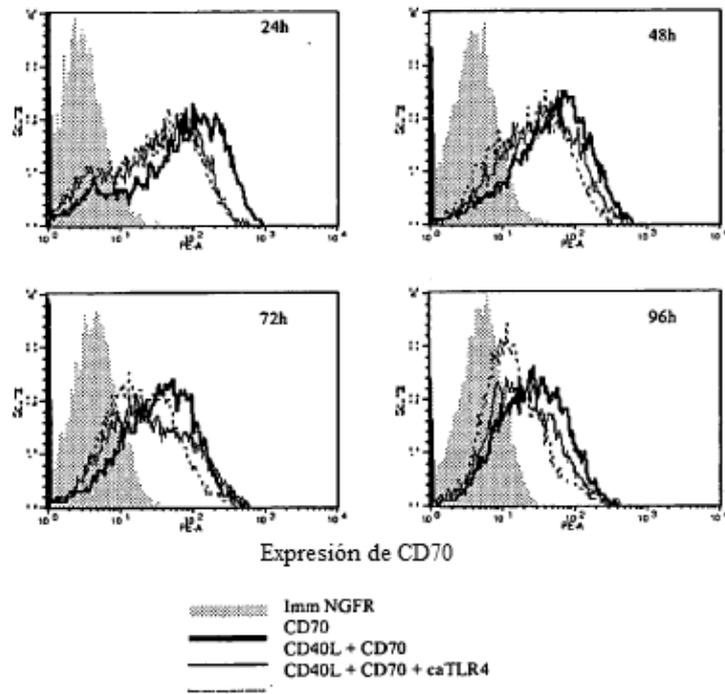


Figura 2

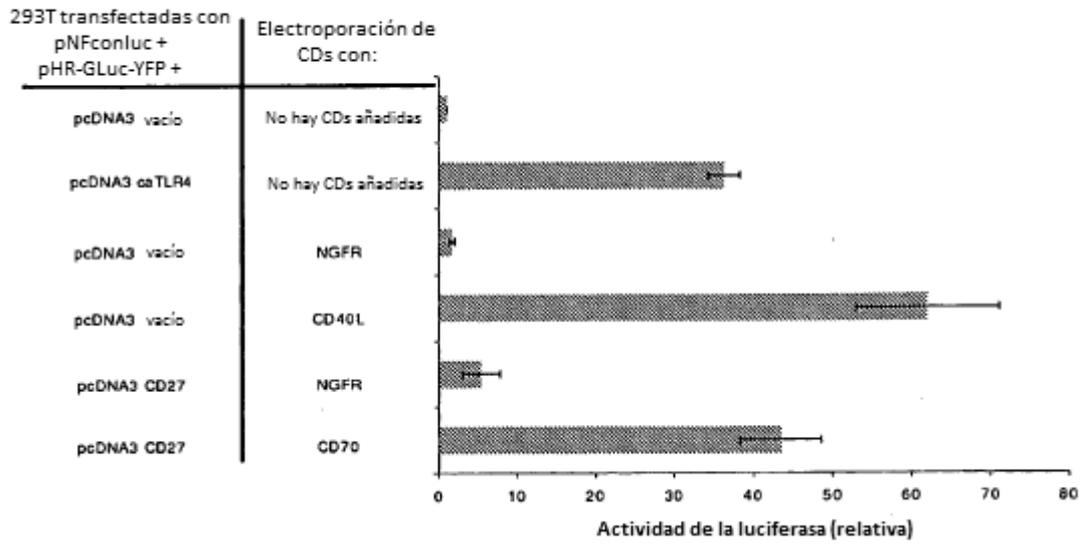


Figura 3A

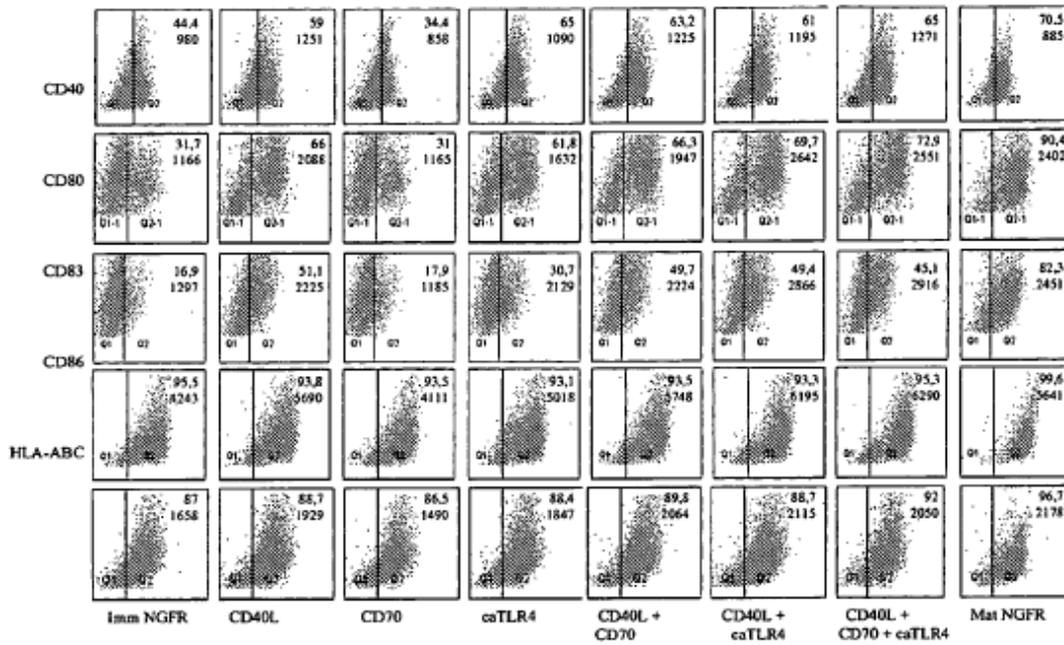


Figura 3B

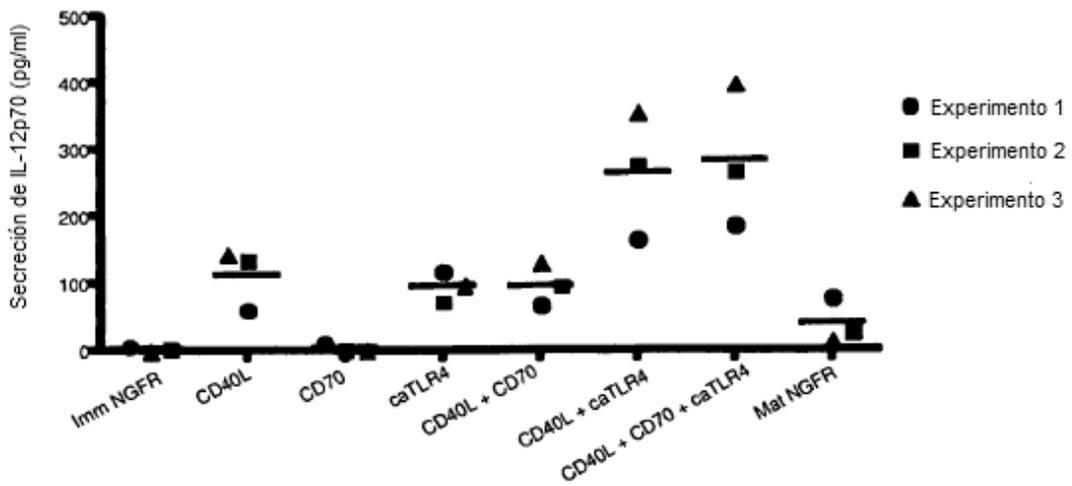


Figura 3C

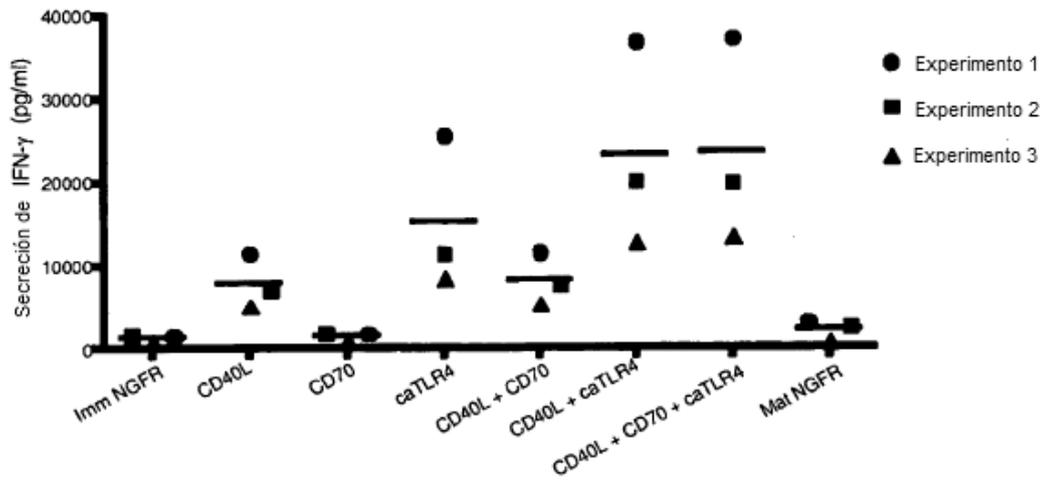


Figura 4A

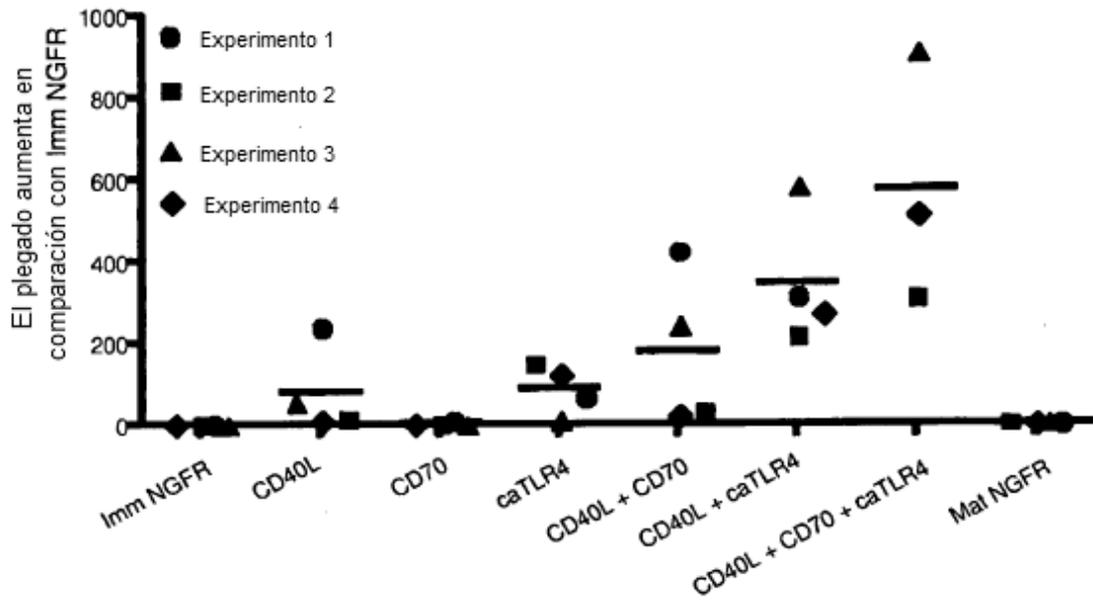


Figura 4B y C

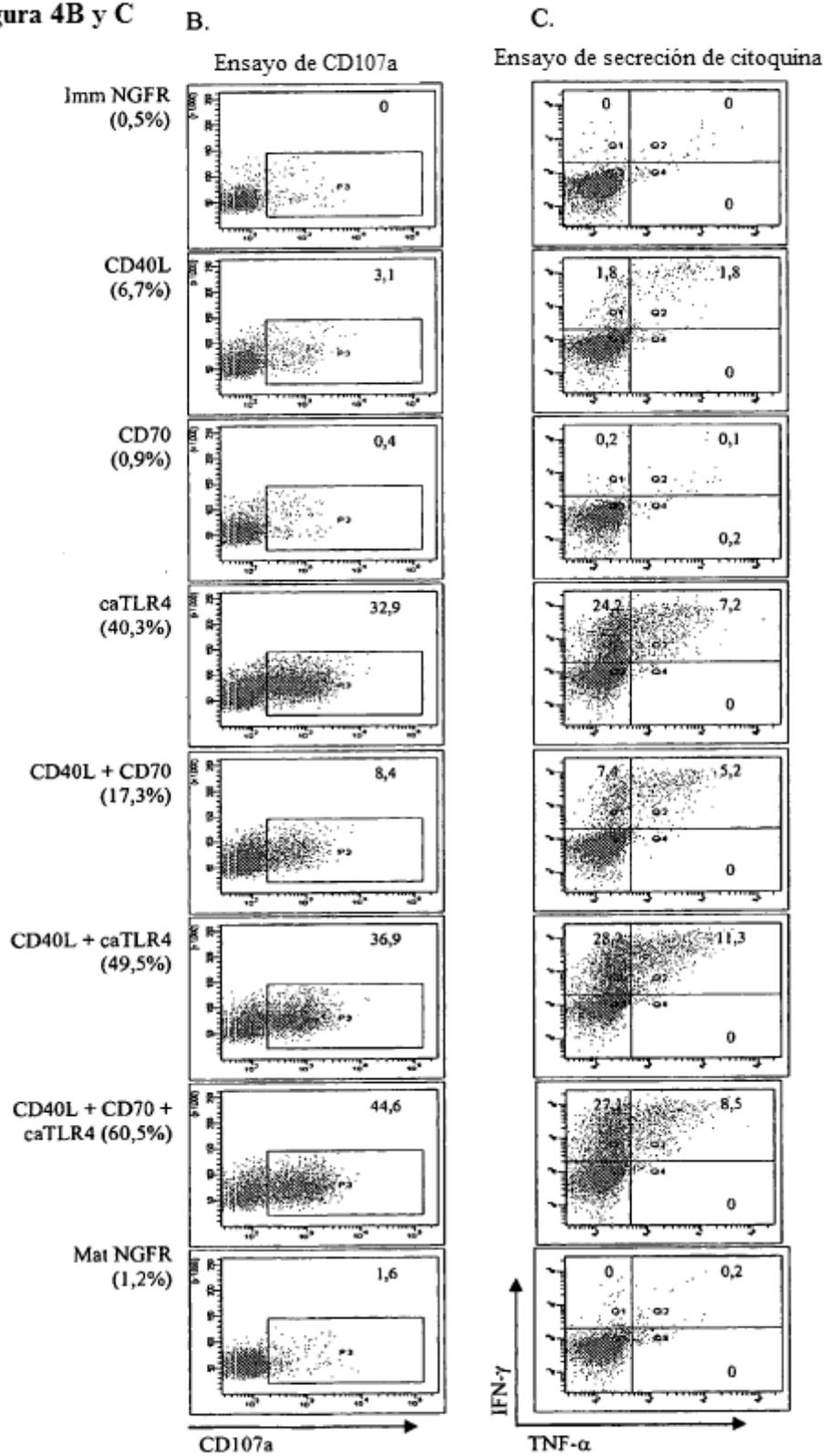


Figura 4D

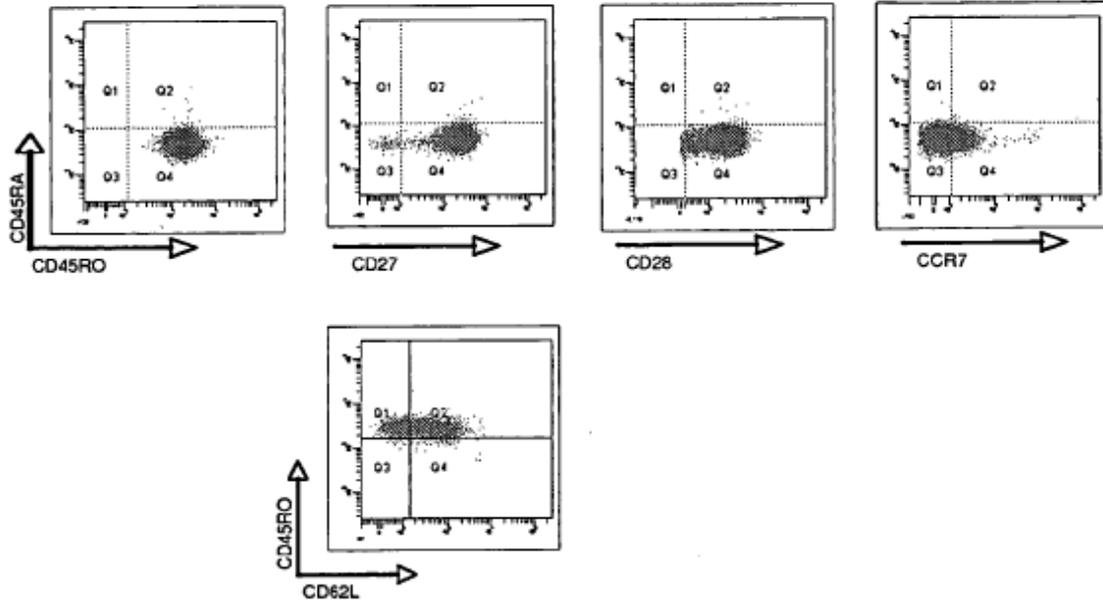


Figura 5A

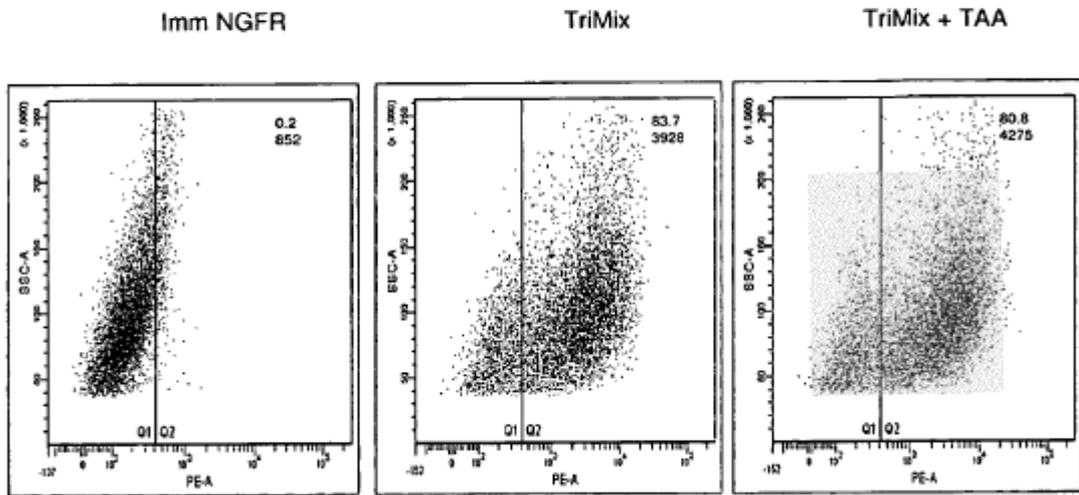


Figura 5B

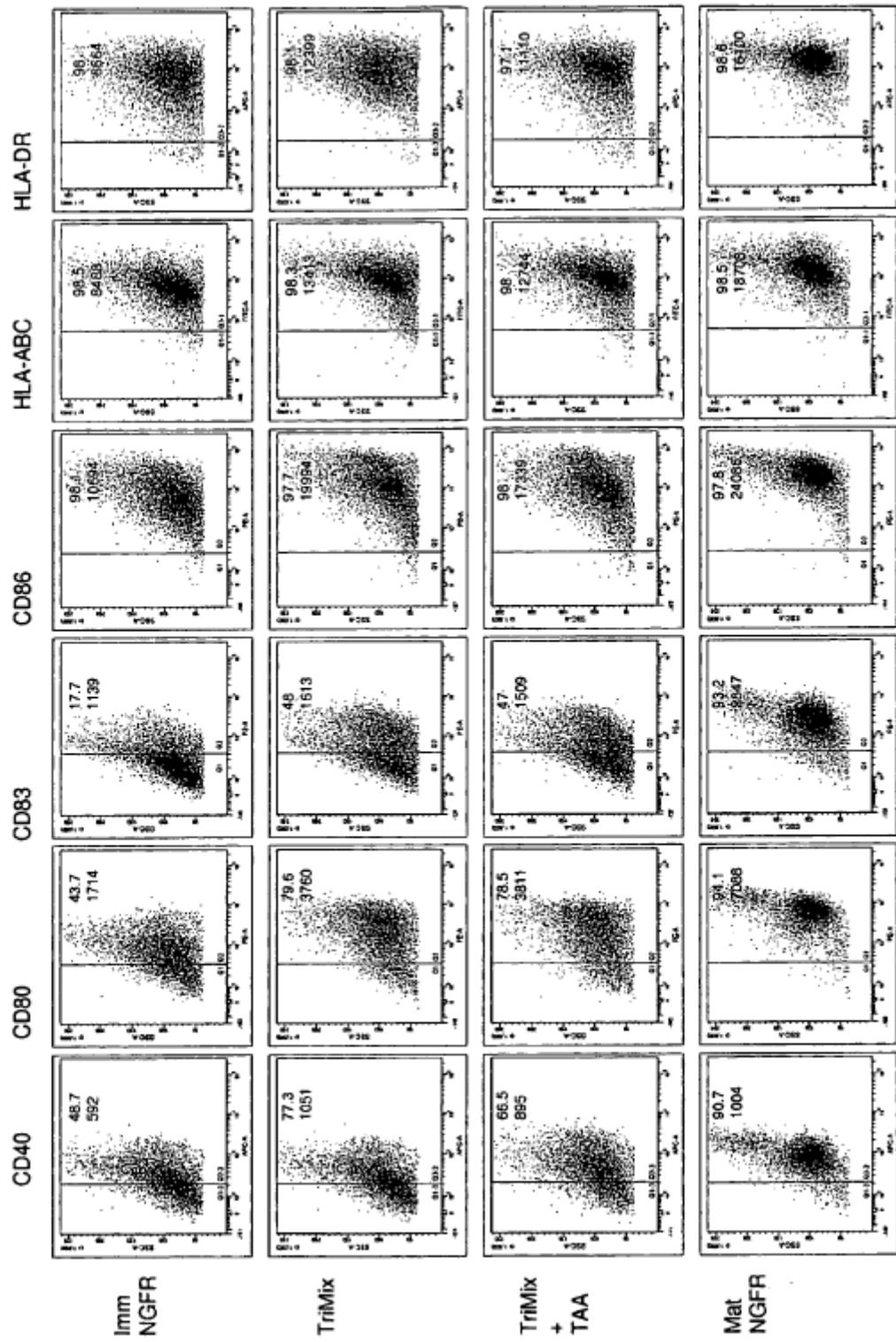


Figura 5C

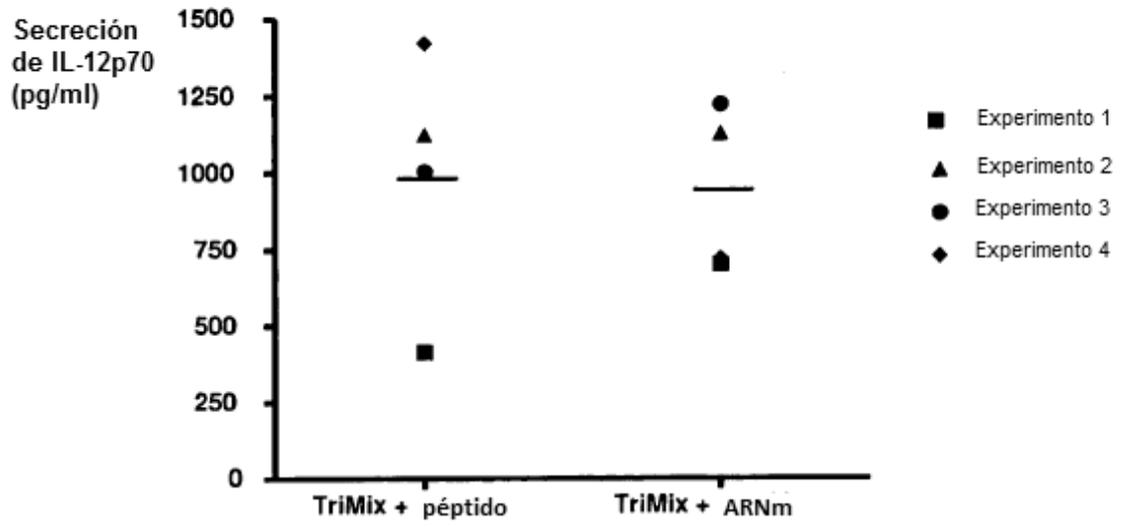


Figura 6A

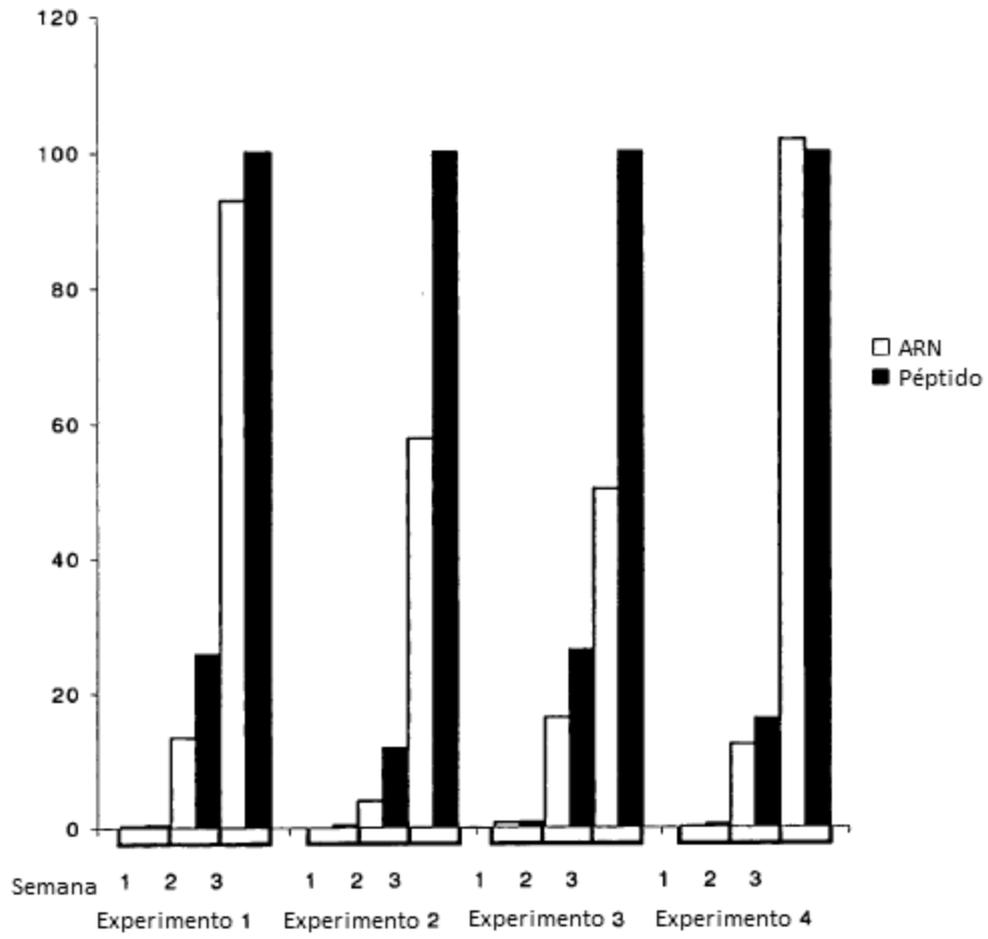


Figura 6B y C

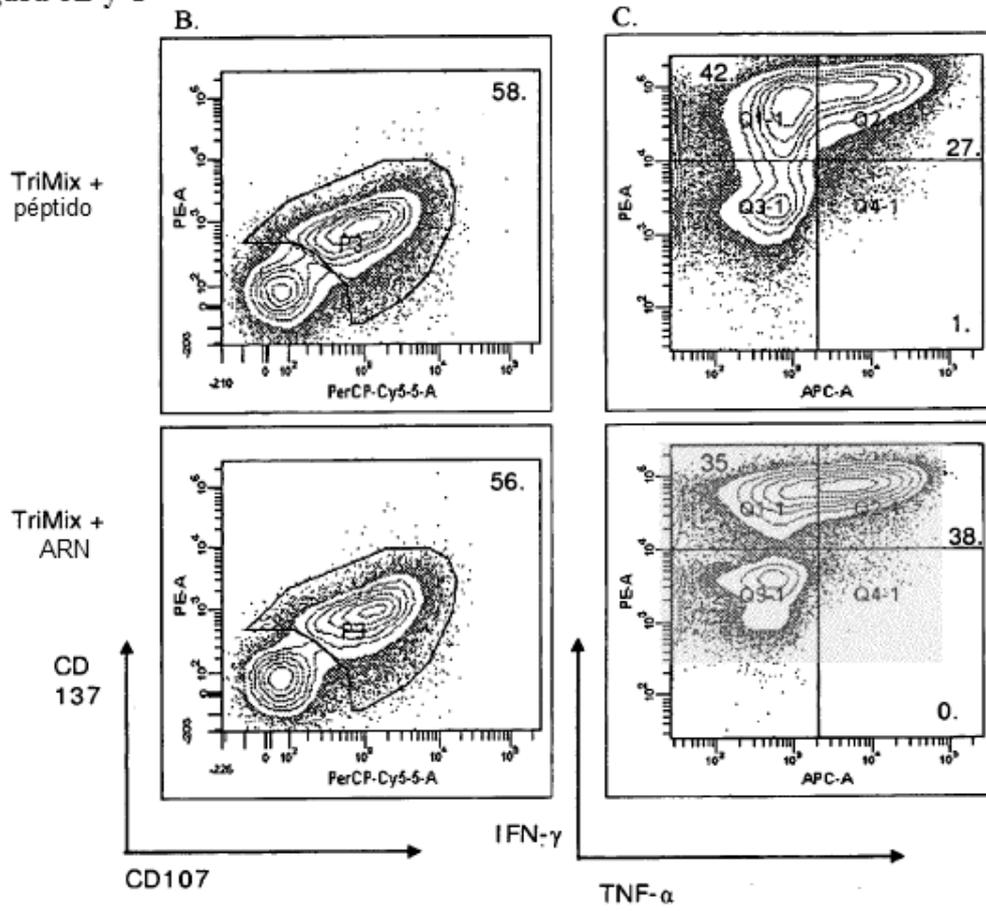


Figura 7

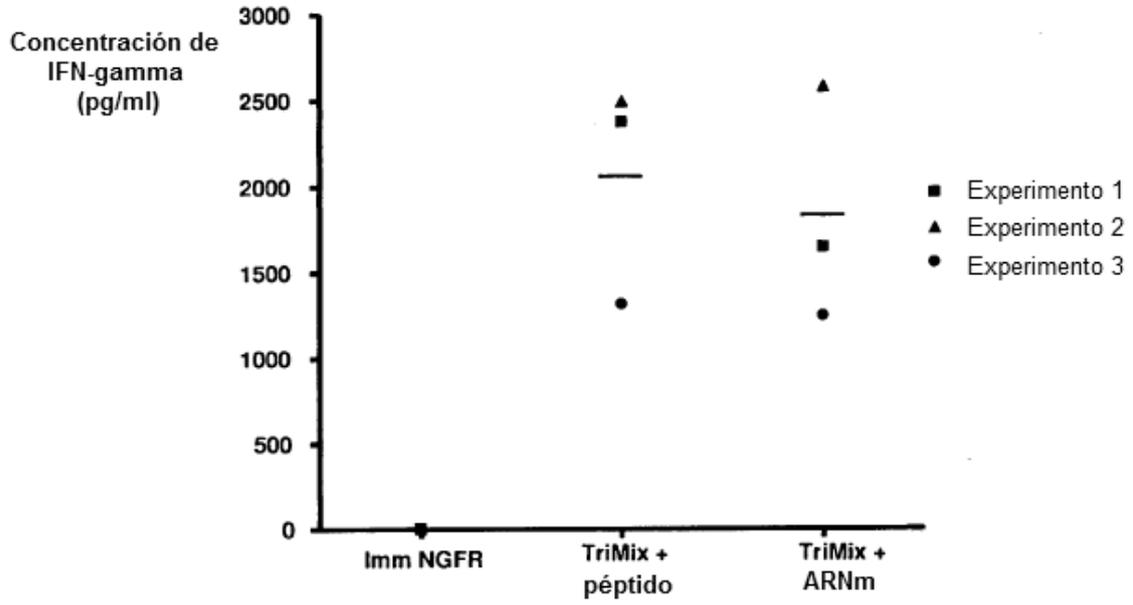


Figura 8A

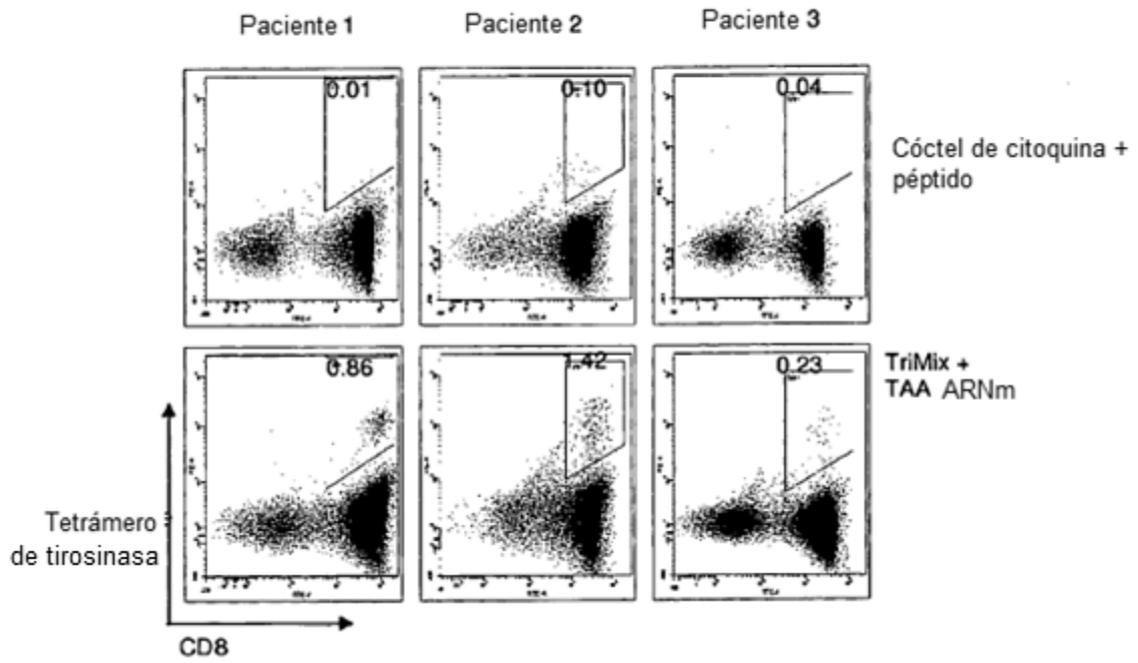


Figura 8B

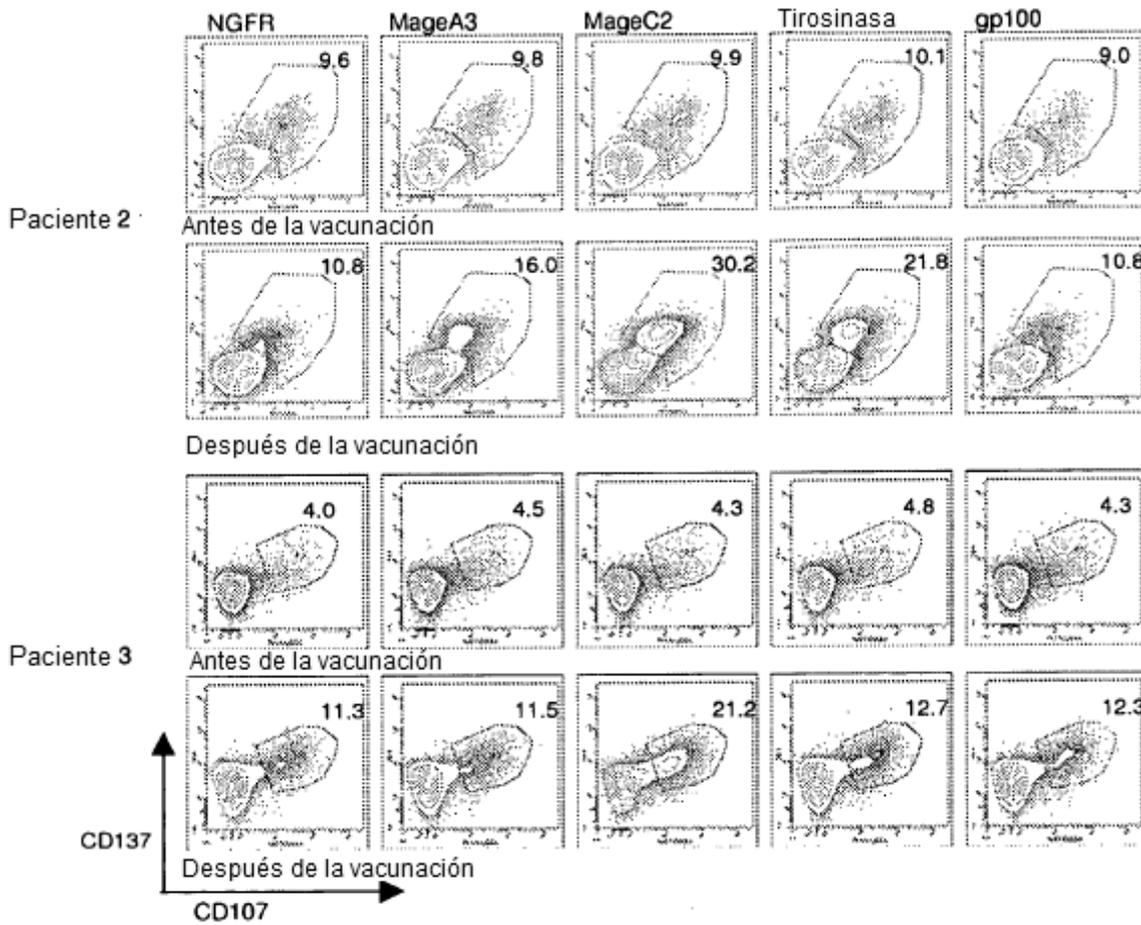


Figura 8C

