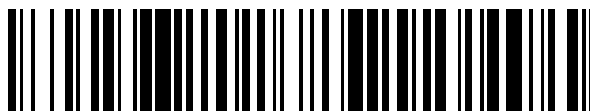


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 036**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 35/76** (2015.01)  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**A61K 39/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2010 E 10753031 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2408473**

54 Título: **Métodos de vacunación**

30 Prioridad:

**16.03.2009 US 160371 P**  
**16.03.2009 US 160372 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.07.2016**

73 Titular/es:

**MCMaster UNIVERSITY (100.0%)**  
**McMaster Industry Liaison Office McMaster**  
**Innovation Park 175 Longwood Road South MIP**  
**Suite 305**  
**Hamilton, Ontario L8P 0A1, CA**

72 Inventor/es:

**LICHTY, BRIAN;**  
**BRIDLE, BYRAM;**  
**WAN, YONGHONG y**  
**BRAMSON, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 576 036 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

Métodos de vacunación

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente a métodos de vacunación de un mamífero, y en particular, a métodos de vacunación útiles para reforzar la respuesta inmunitaria, además de métodos útiles para tratar enfermedad.

## 10 Antecedentes de la invención

Aunque muchas pautas de vacunación satisfactorias han tanto eliminado como controlado completamente las enfermedades infecciosas, tales como la viruela y la poliomielitis, se ha hecho evidente que ciertos patógenos no son fácilmente controlados por los actuales enfoques de vacunación. Por ejemplo, patógenos tales como el VIH, *Mycobacterium tuberculosis* y el parásito de la malaria resisten todos a la inmunidad humoral que se genera característicamente por las vacunas tradicionales. Se ha hecho un esfuerzo significativo por desarrollar vacunas que puedan promover la potente inmunidad celular a estos patógenos y patógenos relacionados. Similarmente, la inmunización con antígenos de tumor principalmente depende de linfocitos T, especialmente CTL CD8+, para reconocer y destruir células cancerosas debido a que muchos antígenos asociados a tumor son proteínas intracelulares. La inducción de inmunidad celular, sin embargo, es compleja y plantea numerosos problemas para los vacunólogos. Éstos incluyen dificultades en generar inmunidad celular que sea de intensidad y longevidad suficientes.

Un posible enfoque para evitar estos problemas es mediante la administración secuencial de vacunas usando vectores heterólogos. Aunque una pauta de inmunización-refuerzo típica implica vacunas basadas en ADN y variolovacuna, también se han explotado otras combinaciones usando bacteria-virus o dos virus diferentes en modelos animales. Los poxvirus más usados para la vacunación es el virus de la variolovacuna, que se usó para la vacunación contra la viruela. La variolovacuna recombinante puede administrar antígenos extraños al citoplasma de células de mamífero, permitiéndoles así el acceso directo a las vías de procesamiento de antígeno que conduce a presentación de péptidos derivados de antígeno en asociación con moléculas MHC clase I y clase II sobre la superficie celular. Esta propiedad hace que la variolovacuna sea útil como vacuna recombinante, particularmente para estimular respuestas inmunitarias de linfocitos T CD 8+ y CD4+. Cuestiones sobre la capacidad del virus de la variolovacuna para replicarse en células de mamífero han limitado su uso clínico y conducido a la búsqueda de alternativas más seguras.

Con respecto al uso de virus para tratar enfermedad tal como el cáncer, se han encontrado virus oncolíticos (OV) que curan el cáncer en modelos animales si infectan tumores y se replican ampliamente para mediar en la destrucción completa. Sin embargo, la amplia aplicación clínica requiere tratar huéspedes inmunocompetentes portadores de tumores malignos que pueden tener mecanismos antivirales parcialmente intactos. Una respuesta inmunitaria del huésped activa contra el virus que elimina rápidamente la replicación viral, conduciendo a destrucción tumoral incompleta o transitoria, representa una barrera importante al éxito. Se ha mostrado en animales sin tratamiento previo que el desarrollo de una respuesta inmunitaria adquirida normalmente dura menos de una semana, dejando una pequeña ventana de oportunidad para que funcionen los vectores oncolíticos. Para maximizar la replicación del virus administrado o virus re-administrado, se ha probado una variedad de enfoques que varían de inmunosupresión completa, al uso de células portadoras (denominadas "caballos de Troya") y encubrimiento viral.

A pesar de los intentos anteriores por tratar los problemas asociados a los actuales métodos de vacunación, se desea desarrollar métodos más eficaces de generación de una respuesta inmunitaria en un mamífero.

## 50 Sumario de la invención

Ahora se han desarrollado novedosos métodos de vacunación.

Por consiguiente, en un aspecto de la invención, se proporciona un método de tratamiento de cáncer en un mamífero que comprende administrar intravenosamente al mamífero un vector oncolítico rabdoviral replicante, en el que el vector expresa un antígeno de tumor para el que el mamífero tiene una inmunidad preexistente.

En otro aspecto se proporciona un kit para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un antígeno de tumor, o un vector que expresa un antígeno de tumor, en una cantidad adecuada para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, y un vector oncolítico rabdoviral replicante que expresa el antígeno de tumor en una cantidad adecuada para potenciar la respuesta inmunitaria.

En otro aspecto se desvela un método de refuerzo de la respuesta inmunitaria en un mamífero que tiene una inmunidad preexistente a un antígeno. El método comprende administrar al mamífero intravenosamente un vector que expresa el antígeno, en el que dicho vector es capaz de infectar linfocitos B.

En otro aspecto se desvela un método de refuerzo de respuesta inmunitaria en un mamífero que tiene una inmunidad preexistente a un antígeno que comprende administrar intravenosamente al mamífero linfocitos B cargados de antígeno.

5 En todavía otro aspecto se desvela un kit para su uso en reforzar una respuesta inmunitaria en un mamífero. El kit comprende un antígeno, o un vector que expresa el antígeno, en una forma administrable adecuada, y un vector que expresa el antígeno que está en una forma adecuada para administración intravenosa.

10 Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes en la descripción detallada que sigue y por referencia a las siguientes figuras.

Breve descripción de las figuras

15 La FIGURA 1 ilustra el efecto de VSV-GFP (A), Ad-hDCT (B y C) y VSV-hDCT sobre tumores *in vivo*;  
la FIGURA 2 muestra la línea de tiempo (A), perfil de linfocitos T CD8+ (B) y efecto sobre la supervivencia (C) para un tratamiento de combinación con Ad-hDCT y VSV-hDCT;

20 la FIGURA 3 muestra el perfil de linfocitos T CD8+ específicos de DCT (A), correlación de la supervivencia con la frecuencia de linfocitos T específicos de antígeno de tumor (B), número de linfocitos T de DCT (C) y frecuencia de linfocitos T de gp100 (D) tras un tratamiento de combinación con Ad-hDCT y VSV-hDCT;

25 la FIGURA 4 demuestra títulos virales (A) y pesos cerebrales (B) en ratones portadores de tumor tras la vacunación con Ad-hDCT y posterior tratamiento con VSV-hDCT;

la FIGURA 5 muestra el transcurso de tiempo para la expansión de linfocitos T CD8+ específicos de DCT en sangre (A), bazo (B) y ganglios linfáticos cervicales (C) tras el tratamiento con VSV-hDCT de huéspedes sensibilizados con Ad-hDCT;

30 la FIGURA 6 resume el transcurso de tiempo para pautas de tratamiento de intervalo corto y largo (A), y títulos de VSV en los pulmones y cerebros de ratones tras los protocolos de inmunización y de tratamiento del transcurso de tiempo de intervalo corto (B) e intervalo largo (B);

35 la FIGURA 7 muestra el porcentaje (A) y número (B) de linfocitos T CD8+ específicos de DCT en sangre cuando se tratan con VSV-hDCT tanto 14 como 100 días tras la inmunización con Ad-hDCT;

la FIGURA 8 ilustra los datos de inmunoanálisis (A) y de supervivencia (B) tras el tratamiento de tumores con un tratamiento de combinación de vacunación con Ad-hDCT y Maraba-hDCT oncolítico;

40 la FIGURA 9 ilustra datos de supervivencia (A) y la mediana de la supervivencia (B) de un tratamiento de combinación usando vectores de célula dendrítica para administrar el antígeno de DCT (DCh-DCT);

45 la FIGURA 10 ilustra el efecto sobre el volumen tumoral (A) y la supervivencia (B) con el uso de vector de la variolovacuna deletionado doble para administrar antígeno de DCT (ddVV-hDCT) en un tratamiento de combinación;

la FIGURA 11 demuestra una comparación de vías de administración para la pauta de sensibilización-refuerzo;

la FIGURA 12 muestra las capacidades de refuerzo a diferentes intervalos;

50 la FIGURA 13 demuestra una comparación entre la capacidad de VSV y el virus de la variolovacuna administrados i.v. en las respuestas inmunitarias de refuerzo;

la FIGURA 14 muestra la capacidad de la versión G-menor (mutante) de VSV para reforzar respuestas inmunitarias;

55 la FIGURA 15 demuestra la calidad de linfocitos T provocados por la pauta de inmunización-refuerzo;

la FIGURA 16 muestra la calidad de los linfocitos T provocados reforzando con VSV en comparación con reforzar con un vector de la variolovacuna;

60 la FIGURA 17 demuestra la respuesta de linfocitos T de la pauta de refuerzo usando diferentes antígenos y cepas huésped;

la FIGURA 18 muestra que el efecto de refuerzo mediado por VSV i.v. es independiente de linfocitos T CD4+;

65 la FIGURA 19 demuestra la durabilidad de la respuesta inmunitaria secundaria y proporción de células efectoras que se han convertido en células de memoria;

la FIGURA 20 muestra que una vacuna de VSV mutante inductora de interferón atenuada refuerza equivalentemente a VSV no mutante;

5 la FIGURA 21 compara la respuesta inmunitaria cuando los vectores basados en VSV y Maraba se utilizan para administrar un refuerzo de antígeno de DCT;

10 la FIGURA 22 ilustra las respuestas inmunitarias en sangre (A y B) y bazo (C) cuando los vectores Ad y de Maraba se usan para administrar un antígeno y los vectores de Maraba y VSV se usan para reforzar la inmunidad al antígeno;

15 la FIGURA 23 ilustra la respuesta inmunitaria con diversas dosis de antígeno (A) para establecer una inmunidad preexistente y el efecto de un refuerzo de VSV sobre cada uno (B);

la FIGURA 24 compara la respuesta inmunitaria primaria a un antígeno en ratones mutantes frente a deficientes en linfocitos B (A) y la respuesta inmunitaria en sangre y bazo tras un refuerzo con antígeno (B); y

la FIGURA 25 ilustra el efecto de la reconstitución de linfocitos B (A) sobre un refuerzo de antígeno (B).

20 Descripción detallada de la invención

Se proporciona un método de vacunación útil para tratar cáncer en un mamífero en el que un vector oncolítico rabdoviral replicante que expresa un antígeno de tumor, al que el mamífero tiene una inmunidad preexistente, se administra intravenosamente al mamífero. La invención proporciona un método en el que la respuesta inmunitaria del mamífero al antígeno de tumor sobrepasa la respuesta inmunitaria del mamífero al virus oncolítico, produciendo así tratamiento eficaz del cáncer.

El presente método de vacunación es útil para tratar cáncer en un mamífero. El término "cáncer" se usa en el presente documento para englobar cualquier cáncer, que incluye, pero no se limita a, melanoma, sarcoma, linfoma, carcinoma tal como cáncer de cerebro, mama, hígado, estómago y de colon, y leucemia.

El término "mamífero" se refiere a seres humanos, además de a mamíferos no humanos.

El método incluye la administración al mamífero de un vector oncolítico rabdoviral replicante que expresa un antígeno de tumor al que el mamífero tiene una inmunidad preexistente. Como se usa en el presente documento, se indica que el término "inmunidad preexistente" engloba una inmunidad inducida por la vacunación con un antígeno, además de una inmunidad naturalmente existente dentro del mamífero.

Así, en una realización, para establecer una inmunidad preexistente, el presente método incluye una etapa de vacunar un mamífero con un antígeno de tumor apropiado para inducir una reacción inmunitaria contra células cancerosas diana. El antígeno de tumor puede, por ejemplo, ser un antígeno asociado a tumor (TAA), por ejemplo, una sustancia producida en una célula tumoral que desencadena una respuesta inmunitaria en el mamífero. Ejemplos de tales antígenos incluyen antígenos oncofetales tales como alfa-fetoproteína (AFP) y antígeno carcinoembrionario (CEA), glucoproteínas superficiales tales como CA 125, oncogenes tales como Her2, antígenos asociados a melanoma tales como dopacromo tautomerasa (DCT), GP100 y MART1, antígenos de cáncer de testículos tales como las proteínas MAGE y NY-ESO1, oncogenes virales tales como HPV E6 y E7, proteínas ectópicamente expresadas en tumores que están normalmente limitados a tejidos embrionarios o extraembrionarios tales como PLAC1. Como apreciará un experto en la materia, un antígeno puede seleccionarse basándose en el tipo de cáncer que va a tratarse usando el presente método, ya que uno o más antígenos pueden ser particularmente aptos para uso en el tratamiento de ciertos cánceres. Por ejemplo, para el tratamiento de melanoma puede usarse un antígeno asociado a melanoma tal como DCT.

El antígeno de tumor puede administrarse por sí mismo, o, preferentemente, administrarse mediante un vector, por ejemplo, vector adenoviral (Ad), poxviral o retroviral, un plásmido o células presentadoras de antígeno cargadas tales como células dendríticas. Métodos de introducción del antígeno de tumor en el vector son conocidos para aquellos expertos en la materia. Generalmente, el vector se modificará para expresar el antígeno. A este respecto, el ácido nucleico que codifica el antígeno seleccionado se incorpora en el vector seleccionado usando tecnología recombinante bien establecida.

El antígeno de tumor se administra al mamífero en una cualquiera de varias vías que incluyen, pero no se limitan a, intravenosamente, intramuscularmente o intranasalmente. Como será apreciado por un experto en la materia, el antígeno de tumor, o vector que incorpora el antígeno de tumor, se administrará en un vehículo adecuado, tal como solución salina u otro tampón adecuado. Tras la vacunación con un antígeno de tumor seleccionado, se genera una respuesta inmunitaria por el mamífero dentro de un intervalo de respuesta inmunitaria, por ejemplo, dentro de aproximadamente 4 días, y que se extiende durante meses, años, o posiblemente toda la vida.

65

Para establecer una respuesta inmunitaria al antígeno de tumor, se realiza vacunación usando el antígeno usando técnicas bien establecidas. Por consiguiente, un antígeno de tumor seleccionado, o un vector que expresa el antígeno de tumor, puede administrarse al mamífero en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmunitaria. Como apreciará un experto en la materia, la cantidad requerida para generar una respuesta inmunitaria variará con varios factores que incluyen, por ejemplo, el antígeno seleccionado, el vector usado para administrar el antígeno y el mamífero que va a tratarse, por ejemplo, especie, edad, tamaño, etc. A este respecto, por ejemplo, la administración intramuscular de un mínimo de al menos aproximadamente  $10^7$  UFP de vector adenoviral a un ratón es suficiente para generar una respuesta inmunitaria. Una cantidad correspondiente sería suficiente para administración a un ser humano para generar una respuesta inmunitaria.

En otra realización, la respuesta inmunitaria al antígeno puede ser que exista de forma natural dentro del mamífero y no es necesaria una primera etapa de vacunación para inducir la respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria que existe de forma natural a un antígeno puede resultar de cualquier exposición anterior al antígeno.

Una vez se ha generado una respuesta inmunitaria en el mamífero, dentro de un intervalo de respuesta inmunitaria adecuado, por ejemplo, al menos aproximadamente 24 horas, preferentemente al menos aproximadamente 2-4 días o más, por ejemplo, al menos aproximadamente 1 semana, entonces se administra un virus oncolítico rabdoviral replicante que expresa el antígeno de tumor al mamífero en una cantidad adecuada para terapia viral oncolítica, que variará con el virus oncolítico seleccionado, y el mamífero que va a tratarse, como será apreciado por un experto en la materia. Por ejemplo, un mínimo de  $10^8$  UFP de VSV oncolítico administrado IV a un ratón es suficiente para terapia oncolítica. Una cantidad correspondiente sería suficiente para su uso en un ser humano.

Un virus oncolítico rabdoviral replicante que expresa un antígeno de tumor seleccionado puede prepararse incorporando un transgén que codifica el antígeno en el virus usando tecnología recombinante estándar. Por ejemplo, el transgén puede incorporarse en el genoma del virus, o alternativamente, puede incorporarse en el virus usando un plásmido que incorpora el transgén. El presente método puede incluir cualquier virus oncolítico rabdoviral replicante capaz de destruir el tumor, mientras que sea apropiado para administración a un mamífero. Ejemplos de virus oncolíticos que pueden utilizarse en el presente método incluyen rabdovirus tales como vesiculovirus, por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular (VSV) y virus de Maraba, Ephemerovirus, Cytorhabdovirus, Nucleorhabdovirus y virus Lyssavirus.

Este método de vacunación de combinación proporciona tratamiento eficaz de un cáncer en un mamífero administrando un antígeno de tumor diana al mamífero, estimulando así una respuesta inmunitaria al antígeno diana, seguido de potenciamiento de la respuesta inmunitaria administrando al mamífero un virus oncolítico rabdoviral replicante que también expresa el antígeno de tumor. También se encontró que este método reducía la respuesta antiviral del mamífero, convirtiendo el virus oncolítico rabdoviral replicante en un contribuyente útil con respecto a la degradación tumoral.

También se proporciona un kit en otro aspecto de la invención útil en el tratamiento del cáncer. El kit comprende un antígeno de tumor, o un vector que expresa un antígeno de tumor, en una cantidad adecuada para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, y un vector oncolítico rabdoviral replicante que expresa el antígeno de tumor en una cantidad adecuada para potenciar la respuesta inmunitaria. Antígenos de tumor adecuados y vectores oncolíticos para inclusión en el kit se describen anteriormente.

En otro aspecto se desvela un método de refuerzo de una respuesta inmunitaria en un mamífero que tiene una inmunidad preexistente a un antígeno. El método comprende administración intravenosa al mamífero del antígeno, preferentemente mediante un vector que es capaz de infectar los linfocitos B. El término "inmunidad preexistente" es como se ha definido anteriormente y puede lograrse como se ha descrito anteriormente.

Este método puede utilizarse para reforzar la inmunidad con respecto a cualquier antígeno, que incluye, por ejemplo, antígenos de tumor, antígenos virales y particularmente antígenos derivados de organismos patógenos virales tales como VIH, HepC, FIV, LCMV, virus del Ébola, además de patógenos bacterianos tales como *Mycobacterium tuberculosis*. Como apreciará un experto en la materia, el vector puede prepararse para expresar un antígeno seleccionado usando tecnología recombinante bien establecida.

Vectores apropiados para su uso en la administración de un antígeno al mamífero son vectores que son capaces de infectar linfocitos B, que incluyen, por ejemplo, rabdovirus como se exponen anteriormente que incluyen vesiculovirus y virus basados en Maraba. También son apropiados vectores virales mutantes para su uso en el presente método. Son particularmente ventajosos virus atenuados mutantes, que incluyen formas incompetentes para la replicación, para su uso en el presente método. El antígeno también puede administrarse al mamífero cargado en células presentadoras de antígeno, tales como linfocitos B.

Una vez el vector se prepara para expresar el antígeno seleccionado, se administra intravenosamente al mamífero para el óptimo refuerzo de la inmunidad. La cantidad de vector administrada variará de nuevo con el vector seleccionado, además del mamífero. En relación con la inmunidad preexistente, el vector que expresa antígeno puede administrarse al mamífero antes de o coincidente con la respuesta inmunitaria pico de la inmunidad

preexistente. El vector que expresa antígeno se administra óptimamente al mamífero para reforzar la inmunidad preexistente tras la fase efectora de la inmunidad preexistente por sensibilización.

5 Tal administración intravenosa del vector que expresa antígeno, por ejemplo, el vector de refuerzo, produce un refuerzo significativo en la respuesta inmunitaria al antígeno en comparación con otras vías de administración que incluyen intramuscular, intraperitoneal, subcutánea e intranasal. El método proporciona un aumento de al menos aproximadamente 4 veces en la respuesta inmunitaria en comparación con otras vías de administración.

10 También se desvela un kit para su uso en reforzar una respuesta inmunitaria en un mamífero. El kit comprende un antígeno, o un vector que expresa el antígeno, en una cantidad adecuada para inducir una respuesta inmunitaria al antígeno. El antígeno o vector se proporciona en una forma administrable adecuada, por ejemplo, en una forma adecuada para administración intravenosa, intramuscular o intranasal. El kit también incluye un vector que expresa el mismo antígeno que está en una forma adecuada para administración intravenosa, por ejemplo, en una solución salina o solución tamponada. Antígenos y vectores adecuados para inclusión en el kit se han descrito anteriormente.

15 En otro aspecto se desvela un método de refuerzo de la respuesta inmunitaria en un mamífero que tiene una inmunidad preexistente a un antígeno, que comprende administrar intravenosamente al mamífero linfocitos B cargados de antígeno. Como se indica, la administración intravenosa de linfocitos B cargados de antígeno produce un refuerzo significativo a la respuesta inmunitaria preexistente al antígeno.

20 Realizaciones de la invención describen a continuación ejemplos específicos que no deben interpretarse como limitantes.

25 Ejemplo 1

MATERIALES Y MÉTODOS

30 Ratonos. Ratonos hembra de la misma edad (8-10 semanas de edad al inicio del estudio), que incluyen ratones C57BL/6 (H-2b) y BalB/c (H-2d) (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), se alojaron en una instalación libre de patógenos específica. Los estudios en animales cumplieron con las normas del Canadian Council on Animal Care y fueron autorizados por el comité de ética de investigación animal de la Universidad de McMaster.

35 Células. Se cultivaron células de melanoma murino B16-F10 y células de carcinoma de colon CT26 en medio esencial mínimo F11 que contenía 10 % de FBS, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, disolución de vitamina, aminoácidos no esenciales 0,01 mM, 2-mercaptoetanol 50  $\mu$ M, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina (todos de Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.). Se cultivaron células HEK293T en D-MEM más 10 % de FBS, mientras que las células Vero se cultivaron en  $\alpha$ -MEM más 10 % de FBS.

40 Vectores. Ad-hDCT es un Ad tipo 5 humano deleciónado en E1/E3 que expresa el gen hDCT de longitud completa y AdBHG es un virus deleciónado en E1/E3 que no contiene transgén (Lane, C., et al. Cancer Res 64, 1509-1514 (2004); Ng et al. Mol Ther 3, 809-815 (2001)). Se manipuló VSV recombinante del serotipo Indiana para expresar la hDCT subclonando un fragmento de PCR de hDCT en los sitios XhoI y NheI entre los genes G y L del plásmido pVSV-XN (proporcionado por John Rose, Universidad de Yale, New Haven, Connecticut), además de un genoma viral que lleva una mutación  $\Delta$ M51 en el gen matriz como se describe en Stojdl, D.F., et al. Cancer Cell 4, 263-275 (2003). Se construyeron vectores de Maraba análogos usando la misma estrategia. Se rescataron genomas recombinantes usando técnicas convencionales (Lawson et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1995 Sep 12;92(19):9009) para generar VSV que expresa hDCT competente en la replicación (VSV-hDCT). El VSV parental que no contiene transgén se rescató como virus de control para algunos experimentos (VSV-MT). Un VSV que lleva la proteína verde fluorescente (GFP) se describió previamente en Stojdl, D.F., et al. Cancer Cell 4, 263-275 (2003) y se usó para monitorizar la infección en este estudio (VSV-GFP). También se usaron virus que expresan una fusión SIINFEKL-luciferasa para inducir respuestas frente a este epítipo derivado de ovoalbúmina. También se construyeron virus que expresan epítipes de LCMV para vacunar contra este virus. Las reservas de VSV se produjeron a partir de células HEK 293T y se purificaron por centrifugación por gradiente de sacarosa. El título viral se determinó por ensayo en placa en células Vero.

55 Péptidos. El péptido inmunodominante de DCT que se une a H-2Kb (DCT180-188, SVYDFVWL; compartido por DCT humana y murina) se sintetizó por sistemas PepScan (Lelystad, Los Países Bajos). El epítipo limitado por H-2Kb de la proteína N de VSV (RGYVYQGL) y un péptido gp100 murino que se une a Db (mgp10025-33; EGSRNQDWL) se compraron de Biomer Technologies (Hayward, CA).

60 Cirugía estereotáctica. Para establecer tumores cerebrales, los ratones recibieron inyecciones intracraneales de  $1 \times 10^3$  células B16-F10 en 2  $\mu$ l de PBS. Los ratones se colocaron en una estereotaxia (Xymotech Biosystems Inc, Quebec, Canadá) y se hizo una incisión en el cuero cabelludo para exponer el cráneo bajo anestesia. Se colocó una aguja montada en una jeringa de Hamilton de 10  $\mu$ l (Hamilton Company, Reno, NV) sobre el hemisferio derecho del cerebro, 2,25 mm lateral al bregma. Se perforó un pequeño agujero de trépano a través del cráneo y el bisel de la aguja se insertó en la parénquima cerebral a una profundidad de 3 mm. Las células se inyectaron durante un periodo

de 1 minuto. La aguja se dejó en el sitio durante 2 minutos antes de extraerla para minimizar el reflujo a lo largo del tramo de inyección. La incisión del cuero cabelludo se cerró con grapas de acero inoxidable que se quitaron 7-10 días después.

5 Tumores metastásicos de pulmón en ratones BalB/c. Se inocularon ratones BalB/c con  $2 \times 10^5$  células CT26 en 200  $\mu$ l de PBS mediante inyección en la vena de la cola. Todos los ratones sin tratar llegaron al punto final en el plazo de 24 días.

10 Protocolo de vacunación. Se inmunizaron ratones anestesiados por inyección intramuscular (i.m.) de  $1 \times 10^8$  ufp de vector Ad en 100  $\mu$ l de PBS (50  $\mu$ l/tendón) o inyección de  $2 \cdot 10 \times 10^8$  ufp de VSV en 200  $\mu$ l de PBS en la vena de la cola (i.v.).

15 Titulación viral en homogeneizados de tejido. Para medir la replicación de virus intratumoral, se recogieron los cerebros o pulmones 3 días después de la inoculación i.v. de vectores de VSV, se pesaron y se homogeneizaron antes de la titulación. Los títulos virales se cuantificaron por ensayo en placa en monocapas de Vero y se expresan como unidades formadoras de placa (UFP) por gramo de tejido.

20 Anticuerpos. Se usaron los siguientes Ab monoclonales en ensayos de citometría de flujo: anti-CD16/CD32 (clon 2.4G2) para bloquear receptores de Fc, anti-CD3 (clon 145-2C11), anti-CD8 (clon 53-6.7) para detectar marcadores de la superficie celular y anti-IFN- $\gamma$  (clon XMG1.2) para la tinción intracelular (todos los reactivos de BD Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.).

25 Preparación de linfocitos T y tinción intracelular. Para la recogida de CMSP (células mononucleares de sangre periférica), se recogió sangre del seno peri-orbital y se lisaron los glóbulos rojos. Para el aislamiento de TIL (linfocitos infiltrantes de tumor), se diseccionaron tumores del SNC de los cerebros, se pesaron, se trituraron y posteriormente se incubaron a 37° 1 h en solución salina tamponada de Hank que contenía 0,1 % de colagenasa tipo I (Invitrogen Life Technologies) y DNasa (0,1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Tras la digestión, las células liberadas se filtraron a través de un tamiz de 70  $\mu$ m y los TIL se purificaron usando el sistema EasySep CD90-PE (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC). Las células mononucleares de sangre y los TIL de los tumores cerebrales se estimularon con péptidos (1  $\mu$ g/ml) en presencia de brefeldina A (GolgiPlug, BD Pharmingen, 1  $\mu$ g/ml añadido después de 1 h de incubación). Después de 5 h de tiempo de incubación total, las células se trataron con anti-CD16/CD32 y se marcaron fluorescentemente marcadores superficiales mediante la adición de Ab. Entonces, las células se permeabilizaron y se fijaron con Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen) y se tiñeron para citocinas intracelulares. Los datos se adquirieron usando un citómetro de flujo FACSCanto con el software FACSDiva 5.0.2 (BD Pharmingen) y se analizaron con el software FlowJo Mac Versión 6.3.4 (Treestar).

40 Tinción de tetrámeros y ensayo de incorporación de BrdU. Los ratones inmunizados recibieron inyecciones i.p. de 1 mg de BrdU 24 h antes de la recogida. Los linfocitos de diferentes órganos se tiñeron primero con tetrámero conjugado con APC H-2Kb/SVYDFVWL y a continuación se tiñeron para BrdU usando el kit de tinción de BrdU (BD Pharmingen) según las instrucciones del fabricante.

45 Tinción de tejido. Para la tinción de secciones de cerebro en parafina, se fijó tejido durante la noche en 10 % de formalina, se transfirió a 70 % de etanol, se incorporó en parafina y se seccionó a un espesor de 5  $\mu$ m. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (Sigma).

50 Análisis estadísticos. Se usó GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.) para todas las gráficas y análisis estadísticos. Las respuestas de linfocitos T se analizaron por la prueba de la t de Student bilateral o ANOVA uni o bilateral. Las diferencias entre medias se consideraron significativas a  $p \leq 0,05$ . Se muestran barras de medias más error estándar. Los datos de supervivencia se analizaron usando el método de Kaplan-Meier y la prueba del orden logarítmico para la tendencia.

## RESULTADOS

55 Impacto de la oncólisis y la vacunación tumoral en huéspedes sin tratamiento previo

60 Ratones C57BL/6 recibieron inyecciones intracraneales de  $1 \times 10^3$  células B16-F10. Una semana después, los ratones se trataron con inyecciones intravenosas de  $1 \times 10^9$  ufp de VSV-GFP. La microscopía fluorescente reveló que los cerebros recogidos 3 días después del tratamiento con VSV tenían evidencia de expresión intratumoral de GFP. El examen macroscópico de cerebros recogidos en el día 4 después de la infección reveló una gran reducción en la carga tumoral en cerebros tratados con VSV-GFP. Las secciones tratadas con hematoxilina y eosina de estos cerebros también indicaron esta reducción. Los estudios de supervivencia, como se muestran en la Fig. 1A, dejaron de detectar supervivencia prolongada tras el tratamiento oncolítico con VSV-GFP (dos grupos de cinco ratones se trataron como antes y se repitió 3 veces con resultados similares). Alternativamente, en el día 5 después del injerto, los ratones se trataron con una única dosis intramuscular de  $1 \times 10^8$  UFP de Ad-hDCT o Ad-BHG. El análisis inmunológico de sangre periférica se realizó en el día 14 después de la vacunación. El porcentaje de linfocitos T CD8+ positivos para IFN $\gamma$  intracelular tras la estimulación con el epítipo dominante para DCT se muestra en la Fig.

1B. Se recogieron los datos de supervivencia, que indican una extensión significativa de la supervivencia en ratones vacunados con Ad-hDCT como se muestra en la Fig. 1C. El experimento se repitió 3 veces y se muestran datos representativos. En otro experimento, en el día 5 después del injerto, los ratones portadores de tumores B16 intracraneales se trataron con una dosis intravenosa única de  $1 \times 10^9$  UFP de VSV-hDCT. El análisis inmunológico de la sangre periférica se realizó en el día 14 después de la administración de VSV. El porcentaje de linfocitos T CD8+ positivos para IFN $\gamma$  intracelular tras la estimulación con los epítipes dominantes para DCT y para la nucleocápside del VSV se muestra en la Fig. 1D. Los estudios de supervivencia dejaron de detectar supervivencia prolongada tras el tratamiento oncolítico con VSV-hDCT (dos grupos de cinco ratones, se repitió 3 veces con resultados similares) como se muestra en la Fig. 1E.

Convertir la respuesta inmunitaria contra el virus oncolítico (OV) en una beneficiosa.

La línea de tiempo para un tratamiento de combinación con Ad-hDCT y VSV-hDCT en la que los ratones portadores de tumor se vacunan en el día 5 después del injerto para generar una respuesta anti-DCT antes de la administración del virus oncolítico en el día 19 se muestra en la Figura 2A. Se recogió sangre periférica 6 días después del tratamiento con VSV y se realizó ICS para IFN $\gamma$  en respuesta a los epítipes dominantes para DCT y para VSV-N. Los ratones sin tratamiento previo presentaron una respuesta frente a VSV-hDCT que estuvo dominada por la respuesta antiviral, mientras que los ratones vacunados presentaron una respuesta dominada por la respuesta anti-DCT y una respuesta anti-VSV reducida (véase la Fig. 2B). La Fig. 2C muestra los datos de supervivencia reunidos para tres experimentos independientes en los que los ratones se trataron con vector Ad vacío (Ad-BHG), Ad-hDCT solo o Ad-hDCT, seguido de VSV-hDCT (n=19, n=18 y n=15 respectivamente), y claramente establece la elevada supervivencia con la última combinación.

Características inmunológicas del refuerzo inmunitario con virus oncolítico.

La comparación de los números de linfocitos T CD8+ IFN $\gamma$ + específicos de DCT en la sangre periférica de ratones C57BL/6 portadores de tumor (TB) y libres de tumor (TF) en el pico de la respuesta después del tratamiento con VSV (TB n=7, TF n=5) se muestra en la Fig. 3A. Los datos reunidos que demuestran la correlación entre la magnitud de la respuesta anti-DCT en la sangre periférica y la supervivencia se muestran en la Fig. 3B. Los datos incluyen ratones que se vacunaron con vector vacío (Ad-BHG, x), se vacunaron con Ad-hDCT ( $\square$ ) o se trataron con la combinación de Ad-hDCT + VSV-hDCT ( $\bullet$ ). Las líneas horizontales indican la respuesta media lograda en ratones libres de tumor +/- EEM (líneas discontinuas). La mayoría de las respuestas asociadas a la supervivencia >45 días solo pueden lograrse en animales portadores de tumor que demostraron la importancia de uso de un virus oncolítico como vector de refuerzo. Los ratones C57BL/6 vacunados con Ad-hDCT portadores de tumores B16-F10 intracraneales se trataron posteriormente con PBS, VSV-MT (sin transgén) o VSV-hDCT. Siete días después se recogieron los tumores y se enumeraron los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) IFN $\gamma$ + sensibles al péptido DCT180-188 como se muestra en la Fig. 3C. Los linfocitos T CD8+ sensibles a gp100 se enumeraron por ICS para IFN $\gamma$ , demostrando que la terapia de combinación de animales portadores de tumor (TB) induce la diseminación de epítipo (Fig. 3D).

Impacto de la vacunación sobre la replicación de OV.

Se inmunizaron i.m. ratones C57BL/6 libres de tumor (TF) o portadores de tumor B16-F10 (TB) con vectores Ad. Catorce días después del tratamiento Ad, los ratones se administraron con VSV-hDCT mediante inyección i.v. y los cerebros se pesaron y se homogeneizaron 3 días después de la inoculación con VSV. Los títulos virales se cuantificaron por ensayo en placa en monocapas de Vero y se expresan como UFP por gramo de tejido cerebral (Figura 4A). Los pesos cerebrales se resumen en la Figura 4B. Los datos se reunieron de dos experimentos con 5 ratones por grupo.

Cinética de la replicación de linfocitos T tras el tratamiento con VSV-hDCT.

Se inmunizaron ratones C57BL/6 libres de tumor con Ad-hDCT durante 14 días antes de la inoculación con VSV-hDCT. Los ratones inmunizados recibieron inyecciones i.p. de 1 mg de BrdU 24 h antes de la recogida. Se recogieron los tejidos cada 24 h para monitorizar la proliferación de linfocitos T durante 7 días. La proliferación de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno en la sangre (Figura 5A), bazo (Figura 5B) y ganglios linfáticos cervicales (Figura 5C) se determinó por co-tinción con un anticuerpo para BrdU y tetrámero H-2Kb/SVYDFFVWL. Cada símbolo representa 5 ratones y el experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Impacto de la vacunación sobre la oncólisis en un modelo metastásico de pulmón.

Se inmunizaron i.m. ratones BalB/c con  $10^8$  UFP de Ad-hDCT 14 días antes (intervalo largo) o el mismo día (intervalo corto) del injerto del tumor CT26 ( $2 \times 10^5$  células, inyección i.v.) como se muestra en la línea de tiempo (Fig. 6A). Catorce días después de la inoculación del tumor, los ratones se trataron con  $2 \times 10^8$  UFP de VSV-hDCT o VSV-GFP mediante inyección en la vena de la cola. Se recogieron los pulmones completos y se homogeneizaron 4 días después del tratamiento con VSV. Los títulos virales se cuantificaron por ensayo en placa en monocapas de Vero y



se expresan como UFP por gramo de tejido (véanse las Figs. 6B y 6C, respectivamente). Se reunieron los datos de dos experimentos con 5 ratones por grupo.

El elevado intervalo entre la sensibilización y el refuerzo mejora la magnitud de la respuesta.

Se inmunizaron inicialmente ratones C57BL/6 con una dosis i.m. de  $10^8$  UFP de Ad-hDCT. Catorce o 100 días después, los ratones se administraron con  $10^9$  UFP de VSV-hDCT mediante inyección en la vena de la cola. El porcentaje (Figura 7A) o número (Figura 7B) de linfocitos T CD8+ que secretan IFN $\gamma$  específicos de DCT en la sangre se cuantificó por análisis de FACS 7 días después del tratamiento con VSV. Cada barra representa 5 ratones.

Vectores de vacuna oncolítica basados en Maraba

Se vacunaron ratones C57/B6 portadores de tumores B16F10 intracraneales con Ad-BHG (vector vacío, control negativo) o Ad-hDCT ( $1 \times 10^9$  UFP IM). Un grupo recibió posteriormente una dosis intravenosa única de hDCT de Maraba ( $2 \times 10^9$  UFP). Se realizó análisis inmunitario en linfocitos T de sangre periférica 5 días después (tres barras por tratamiento, la barra izquierda es IFN $\gamma$ +, la central es TNF $\alpha$ + y la barra derecha es doble positivo en cada caso) (Figura 8A) y se registraron los datos de supervivencia (Figura 8B).

Vacunación con células dendríticas cargadas de antígeno

Se injertaron intravenosamente ratones C57/B6 con células B16F10. Los ratones se vacunaron con células dendríticas cargadas de Ad-hDCT o hDCT (DC) solas o en combinación con VSV-hDCT administrado posteriormente IV. Se recogieron los datos de supervivencia, como muestra la Fig. 9A. Dos ratones tratados con la combinación de DC-hDCT+VSV-hDCT fueron supervivientes a largo plazo (se sacrificaron 100 días después del injerto, los pulmones estaban claros). Los grupos vacunados con Ad y el grupo vacunado con DC presentaron todos mediana de la supervivencia significativamente mayor frente al grupo tratado con PBS, mientras que el grupo tratado con DC-hDCT+VSV-hDCT de combinación presentó la mayor mediana de la supervivencia. (Figura 9B).

Vacunación con vector viral de la variolovacuna cargado con antígeno

Se trataron tumores de melanoma B16F10 subcutánea de día 10 con PBS, hDCT de la variolovacuna doblemente deletada (ddVV-hDCT,  $1 \times 10^6$  UFP IT) sola o ddVV-hDCT, seguido cuatro días después por VSV-hDCT ( $2 \times 10^9$  UFP IV). Se proporcionan los volúmenes tumorales (Fig. 10A) y los datos de supervivencia (Fig. 10B) e ilustran la elevada respuesta a la terapia de combinación.

Discusión

Se utilizó un modelo de melanoma intracraneal (i.c.) agresivo B16 en un huésped inmunocompetente usando antígenos asociados a melanoma. En este modelo, ratones C57BL/6 se injertaron con  $1 \times 10^3$  células B16-F10 mediante inyección i.c. y la mediana del tiempo de supervivencia tras la administración tumoral fue 15 días (datos acumulados para controles no tratados, n=41). Para evaluar la eficacia del tratamiento con VSV, los ratones portadores de tumores B16 de 5 días de edad se trataron con una dosis intravenosa única (i.v.) de  $1 \times 10^9$  VSV-GFP. El tumor se infectó con VSV, produciendo una clara reducción en los volúmenes tumorales como era de esperar. Sin embargo, este efecto fue transitorio y dejó de traducirse en un beneficio de supervivencia (Fig 1a).

En otro enfoque se probó el tratamiento de melanoma B16 i.c. mediante la vacunación del tumor. Se injertaron ratones C57BL/6 con una dosis i.c. de  $1 \times 10^3$  células B16 y éstos se trataron intramuscularmente (i.m.) con  $1 \times 10^8$  UFP de Ad-hDCT 5 días después del injerto. La respuesta de linfocitos T CD8+ contra un epítipo inmunodominante DCT180-188 (idéntico entre ser humano y ratón) fue evidente en sangre periférica una semana después de la vacunación y alcanzó el punto máximo en el día 12-14 (~3,5 % de linfocitos T CD8+ IFN- $\gamma$ +, Fig. 1b). En comparación con el tratamiento con VSV, la vacunación con Ad-hDCT prolongó significativamente la supervivencia (mediana del tiempo hasta la muerte 32 días frente a 19 días, P=0,0044) (Fig 1c), pero fue incapaz de curar ninguno de los ratones. No se midieron linfocitos T específicos de DCT o protección en ratones inmunizados con un vector de control Ad-BHG o PBS.

En otro enfoque, VSV se manipuló para expresar hDCT (VSV-hDCT) y se trataron ratones que tenían tumores B16-F10 i.c. con el vector VSV-hDCT. Este vector indujo una pequeña respuesta de linfocitos T CD8+ anti-DCT (0,26 %, Fig 1d) que fue 12 veces más pequeña que la provocada por Ad-hDCT (3,2 %, Fig. 1b). Sin embargo, se detectó un alto nivel de linfocitos T CD8+ contra un epítipo de la nucleoproteína del VSV tras el tratamiento con VSV-hDCT (14,0 %, Fig. 1d), sugiriendo que la respuesta antiviral dominó el desenlace inmunológico. Similar a la observación con VSV-GFP (Fig. 1a), el tratamiento con VSV-hDCT no proporcionó ningún beneficio a la supervivencia (Fig. 1e). Así, la potente respuesta inmunitaria antiviral provocada por el virus oncolítico no solo produce el impacto oncolítico del vector por ser transitorio, sino que también domina los intentos por inducir directamente respuestas inmunitarias contra el transgén del antígeno asociado a tumor (TAA).

En otro enfoque se indujo una respuesta inmunitaria contra un antígeno de tumor definido, seguido de tratamiento con un virus oncolítico que expresa el mismo antígeno. Los ratones C57BL/6 portadores de tumores B16 i.c. de 7 días de edad se trataron por inyección i.m. de  $1 \times 10^8$  UFP de tanto Ad-BHG como Ad-hDCT. Catorce días después, los ratones se administraron con una dosis i.v. única de VSV-GFP o  $1 \times 10^9$  UFP de VSV-hDCT (Fig. 2a). Como se resumen en la Figura 2b, la inmunización con Ad-hDCT seguida de VSV-hDCT en ratones portadores de tumor produjo que el 22 % de los linfocitos T CD8+ derivados de la sangre fueran específicos de DCT; 7 veces (en comparación con Fig. 1b) o 85 veces (en comparación con Fig. 1d) superiores a cualquier tratamiento de vector solo. Además, no solo esta combinación potenció significativamente la respuesta inmunitaria a TAA, en realidad redujo la magnitud de la respuesta de linfocitos T CD8+ anti-VSV en comparación con la observada tras la exposición de un ratón sin tratamiento previo a este OV (del 14 % al 4,7 % de los linfocitos T CD8+ derivados de la sangre; Fig. 2b), demostrando una inversión de la respuesta inmunitaria contra el virus oncolítico de la vacuna en el que la respuesta antitumoral dominó ahora con respecto a la inmunidad antiviral. Y, lo que es más importante, la terapia de combinación condujo a otra extensión en la mediana de la supervivencia, es decir, un efecto sinérgico (mediana de la supervivencia de 15 días con Ad-BHG solo, mediana de la supervivencia de 30,5 días con Ad-hDCT solo, mediana de la supervivencia de 54 días con tratamiento de combinación) y el 20 % de los ratones tratados de este modo presentaron cura duradera a largo plazo (Fig. 2c) tras solo una dosis de cada vector.

La magnitud de la respuesta de linfocitos T anti-DCT fue mayor en animales portadores de tumor que en animales libres de tumor, demostrando la ventaja de uso de un OV replicante para administrar el transgén en presencia de un tumor (Fig 3a). Además, la supervivencia se correlacionó directamente con el nivel de linfocitos T CD8+ específicos de DCT, donde la mayor extensión a la supervivencia solo se logró cuando la magnitud de esta respuesta inmunitaria superó la que podría generarse en huéspedes libres de tumor (Fig. 3b). Así, el máximo efecto terapéutico estuvo mediado por la replicación del vector de refuerzo oncolítico dentro del tumor. Además, la frecuencia de linfocitos T CD8+ infiltrantes de tumor específicos para DCT fue significativamente mayor en animales tratados con VSV-hDCT en comparación con aquellos tratados con el virus de control VSV-MT, que indica que el tratamiento con VSV-hDCT no solo produjo un aumento global en el número de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno en la periferia, sino que también potenció su reclutamiento en el tumor (Fig. 3c). De forma interesante, se detectó una respuesta de linfocitos T CD8+ contra GP100, otro TAA con el que los ratones no se vacunaron, proporcionando evidencia de diseminación de epítotope probablemente resultante de la potenciada destrucción tumoral por tanto CTL anti-DCT como la oncólisis viral debido a que no se midió una respuesta anti-GP100 con ningún tratamiento solo (Fig. 3d).

Aunque las observaciones descritas anteriormente sugieren que VSV-hDCT sigue siendo oncolítico en presencia de respuesta inmunitaria contra el transgén de vector, se evaluó el impacto de tal inmunidad preexistente sobre la replicación de VSV. Los ratones libres de tumor y los ratones portadores de tumores B16-F10 intracraniales se trataron con Ad-hDCT o Ad-BHG. Catorce días después, los ratones se administraron con una dosis i.v. de  $1 \times 10^9$  UFP de VSV-hDCT. Se recogieron los cerebros 42 h después de la administración de VSV y se determinaron los títulos virales. En ratones vacunados con vector vacío, tanto los cerebros libres de tumor como los portadores de tumor presentaron abundante replicación de VSV-hDCT, presentando los cerebros portadores de tumor un título viral 50 veces mayor (Fig 4a). Como la vacunación con vector vacío no impidió el crecimiento tumoral, estos ratones tuvieron una carga tumoral significativa (Fig 4b) y estuvieron muy cerca del punto final en el momento de la eutanasia. En los ratones vacunados con Ad-hDCT, los títulos de VSV fueron mucho menores, sin embargo, los cerebros portadores de tumor todavía presentaron un mayor título de VSV-hDCT (Fig 4a) aún cuando estos cerebros tuvieron carga tumoral mínima en este momento de tiempo (Fig 4b). Así, VSV fue todavía capaz de infectar y replicarse en este tumor residual, a pesar de la inmunidad preexistente al transgén de vector. Para determinar el desfase temporal para la expansión de linfocitos T CD8+ específicos de DCT por VSV-hDCT, los ratones se reforzaron con VSV-hDCT y recibieron BrdU 24 h antes de las recogidas de tejido que incluyeron bazo y ganglios linfáticos. Los datos resumidos en la Figura 5 indican que la expansión de linfocitos T CD8+ no se detectó hasta el día 3 después del tratamiento con VSV-hDCT. Estos datos sugieren que el vector oncolítico de vacuna tuvo al menos 3 días para replicarse en presencia de la respuesta inmunitaria primaria contra el transgén de TAA antes de la gran expansión en linfocitos T específicos de TAA observada después del tratamiento.

Como Ad-hDCT tuvo un gran impacto sobre la carga tumoral, fue difícil analizar cuantitativamente el impacto de una respuesta inmunitaria preexistente contra un transgén sobre la replicación viral en el modelo de B16. Por tanto, este efecto se midió en un modelo de tumor diferente en el que la DCT no era un antígeno de tumor. Esto permitió una comparación en la que los ratones tenían cargas tumorales similares independientemente de la vacunación y también permitió flexibilidad con respecto al intervalo entre la vacunación y la oncólisis viral. Para este fin, se seleccionó un modelo metastásico de pulmón de carcinoma de colon CT26 en el que DCT era irrelevante. Los ratones se inocularon i.v. con células CT26 y se vacunaron i.m. con Ad-hDCT el mismo día. Catorce días después, los ratones recibieron  $2 \times 10^8$  UFP de tanto VSV-hDCT como VSV-GFP mediante inyección i.v. Para medir la replicación viral, los ratones se sacrificaron 96 h después de la administración de VSV y se recogieron los pulmones y los cerebros para la determinación de los títulos de VSV por ensayo en placa (Fig 6a). Se observó una reducción de aproximadamente 1,5 logaritmos de los títulos virales en tanto los pulmones como los cerebros de animales tratados con VSV-hDCT, en comparación con controles de VSV-GFP (Fig. 6b). De forma interesante, sin embargo, hubo una reducción más pequeña en los títulos pulmonares de VSV-hDCT si los ratones se inmunizaron 14 días antes del injerto de CT26 (27 días antes del tratamiento con VSV-hDCT) (Fig. 6c), sugiriendo que un elevado

intervalo entre estos dos tratamientos puede minimizar posiblemente la compensación en la oncólisis. También se observó una reducción significativa en los títulos de cerebro de VSV-DCT (Fig 6c), que demuestra que la vacunación anterior contra un transgén no estructural codificado por un virus oncolítico (OV) reduce la replicación de OV en tejidos normales y así potencia el perfil de seguridad del OV.

La reducción en la oncólisis puede minimizarse adicionalmente aumentando el intervalo entre la vacunación y la administración de OV, ya que la frecuencia de efectores específicos de antígeno disminuye con el tiempo. Otro beneficio de extender el intervalo entre la vacunación y la oncólisis viral puede demostrarse en animales libres de tumor en los que la frecuencia media de linfocitos T CD8+ específicos para el epítipo inmunodominante de DCT alcanzó el 37 % (doble del nivel observado cuando se hace en el momento de tiempo de 14 días) si VSV-hDCT se administró 100 días después de Ad-hDCT (Figura 7).

En vista de lo anterior, se demuestra una estrategia de tratamiento que usa eficazmente vacunación tumoral para modificar la respuesta inmunitaria contra un vector oncolítico viral manipulado de tal manera que se permite una oncólisis viral transitoria que conduce directamente a una respuesta inmunitaria antitumoral masiva. El arreglar el sistema de forma que la respuesta inmunitaria dominante frente al virus oncolítico también sea una respuesta inmunitaria antitumoral funciona para extender el impacto del vector viral a través de esta reacción inmunitaria. Así, la manipulación de virus oncolíticos para expresar antígenos de tumor naturales puede inducir una débil respuesta de linfocitos T contra el antígeno de tumor, pero esta respuesta está completamente eclipsada por la respuesta inmunitaria contra antígenos virales. Aunque la inmunización previa contra un transgén de vector oncolítico puede parecer ser contraintuitiva ya que puede alterar la administración o replicación viral, los presentes resultados demostraron que la vacuna oncolítica fue más potente bajo estas circunstancias, ya que amplificó espectacularmente la inmunidad antitumoral preexistente, mientras que retuvo la actividad oncolítica, conduciendo a desenlaces clínicos significativamente mejorados. Sorprendentemente, la inmunidad preexistente no previno la replicación viral intratumoral y el gran beneficio inmunológico de este enfoque hace de esto una compensación razonable. Aunque esta respuesta específica de antígeno potenciada puede reducir adicionalmente la replicación del OV, los datos de ratones marcados con BrdU indicaron que hay al menos una ventana de 3 días de oportunidad para la oncólisis viral. En realidad, se desea el reclutamiento de CTL en el tumor en ese punto y potencia la eliminación de tanto el virus como el tumor.

Un beneficio adicional de este enfoque es el potenciado perfil de seguridad presentado por el vector oncolítico de vacuna. Los datos demuestran infección intracraneal por VSV tras la administración intravenosa, sin embargo, los títulos virales fueron menores en los cerebros de animales inmunizados y, lo más impresionante, no hubo parálisis de las extremidades traseras en ninguno de los ratones que habían sido vacunados contra el transgén viral aún cuando se usó VSV no mutante. Esta terapia de combinación también se probó con un mutante de VSV inductor de interferón que expresa hDCT y produjo supervivencia comparable en el modelo de B16 intracraneal (no mostrado), que indica que este enfoque puede combinarse satisfactoriamente con otros medios de direccionamiento y atenuación virales.

El presente método de terapia de combinación puede utilizar diversos métodos de generación de una respuesta inmunitaria al antígeno preexistente (viral, plásmido y celular), y también puede utilizar diversos vectores oncolíticos de vacuna que incluyen VSV y Maraba.

## Ejemplo 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

Virus - Se construyeron vectores de VSV usando un genoma de plásmido portador de un gen M no mutante (pVSV-XN) o un mutante de proteína M de serotipo Indiana (⊗M51-VSV) y se crearon subclonando fragmentos de PCR entre los sitios XhoI y NheI de los plásmidos pVSV-XN o pΔM5. VSV/SIINFEKL-Luc (VSV/SIIN) contiene una versión modificada de luciferasa que lleva el epítipo de clase I inmunodominante de OVA (SIINFEKL) marcado en el extremo N. VSV/hDCT lleva un antígeno asociado a melanoma humano, dopacromo tautomerasa (DCT). VSV/GFP aloja la proteína verde fluorescente y el virus de control, VSV/MT, no contiene transgén. Los vectores de VSV se propagaron en cultivos de células 293T y se purificaron por centrifugación en un gradiente de sacarosa. El virus de la variolovacuna deleciónado doble-hDCT (ddVV-hDCT) es una timidina cinasa recombinante y el virus de la variolovacuna doble deleciónado del factor de crecimiento de la variolovacuna se manipuló para expresar hDCT. La variolovacuna se cultivó en células CV1.

Péptidos - Se sintetizaron el péptido inmunodominante de DCT que se une a H-2K<sup>b</sup> (DCT<sub>180-188</sub>, SVYDFVWL; compartido por DCT humana y murina) (Parkhurst et al, 1998) y un péptido de unión a K<sup>b</sup> de OVA (SIINFEKL) por PepScan Systems (Lelystad, Los Países Bajos).

Protocolo de vacunación - Se inmunizaron ratones anestesiados por inyección i.m. de 1 x 10<sup>8</sup> ufp de vector Ad en 100 μl de PBS (50 μl/tendón) y seguido de inyección i.v. con 1-2 x 10<sup>9</sup> ufp de VSV en 200 μl de PBS en la vena de la cola. El intervalo oscila de 8 a 233 días.

- Anticuerpos - Se usaron los siguientes Ab monoclonales en ensayos de citometría de flujo: anti-CD16/CD32 (clon 2.4G2) para bloquear receptores de Fc, anti-CD3 (clon 145-2C11), anti-CD4 (clon RM4-5), anti-CD8 (clon 53-6.7) para detectar marcadores de la superficie celular y anti-IFN- $\gamma$  (clon XMG1.2) y anti-TNF- $\alpha$  (clon MP6-XT22) para tinción intracelular (todos los reactivos de BD Biosciences, San Diego, CA, EE.UU.). Se realizaron estudios de inmunoagotamiento con los mAb GK1.5 (anti-CD4) y/o 2.43 (anti-CD8) de ATCC. Los mAb purificados (250  $\mu$ g en 500  $\mu$ l de solución salina) se inyectaron i.p. separados dos días y a continuación dos veces a la semana a partir de aquí a una dosis de mantenimiento de 200  $\mu$ g por tratamiento. La eficiencia del agotamiento específico de subconjuntos de linfocitos fue >98 % como se mide por citometría de flujo.
- Preparación de linfocitos T y tinción intracelular - Se recogió sangre del seno peri-orbital y se lisaron los glóbulos rojos. Se incubaron los bazo y ganglios linfáticos en solución salina tamponada de Hank (HBSS) con 0,05 mg/ml de colagenasa tipo I (Invitrogen Life Technologies) a 37° durante 30 min y a continuación se presionaron entre portaobjetos de microscopio para generar suspensiones de células individuales. Para el aislamiento de TIL, se diseccionaron tumores del SNC de los cerebros de ratones perfundidos con PBS, luego se pesaron, se trituraron y posteriormente se incubaron a 37° durante 45 min en HBSS que contenía 0,5 mg/ml de colagenasa tipo I, 0,2 mg/ml de DNasa y 0,02 mg/ml de hialuronidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Tras la digestión, las células liberadas se filtraron a través de un tamiz de 70  $\mu$ m y los TIL se purificaron usando el sistema EasySep CD90-PE (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC). Las células mononucleares preparadas se estimularon con péptidos (1  $\mu$ g/ml) en presencia de brefeldina A (GolgiPlug, BD Pharmingen, 1  $\mu$ g/ml añadido después de 1 h de incubación). Después de 5 h de tiempo de incubación total, las células se trataron con anti-CD16/CD32 y se marcaron fluorescentemente marcadores superficiales mediante la adición de Ab. Entonces, las células se permeabilizaron y se fijaron con Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen) y se tiñeron para citocinas intracelulares. Los datos se adquirieron usando un citómetro de flujo FACSCanto con el software FACSDiva 5.0.2 (BD Pharmingen) y se analizaron con el software FlowJo Mac Versión 6.3.4 (Treestar).
- Aislamiento y cultivo de linfocitos B - Se aislaron linfocitos B esplénicos por selección negativa usando un kit MACS (Miltenyi) para eliminar linfocitos B no0. Los linfocitos B se cultivaron en IMDM más FCS y mull2 durante 4 días antes de la infección con vectores Ad o de VSV a una MOI de 25 durante 2 horas antes del lavado y administración mediante la vena de la cola en ratones receptores.

## 30 RESULTADOS

- Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-hDCT en el día 0, seguido de inyecciones de  $1 \times 10^9$  ufp de VSV-hDCT por diversas vías (i.m.: intramuscular, s.c.: subcutánea, i.p.: intraperitoneal, i.n.: intranasal, i.v.: intravenosa) en el día 14. Siete días después, las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre al epítipo inmunodominante del antígeno asociado a melanoma, dopacromo tautomerasa (DCT180-188), se midieron por análisis de citometría de flujo de tinción intracelular de interferón-gamma tras la re-estimulación con el péptido 9 (véase la Fig. 11).
- Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-hDCT en el día 0, seguido de inyecciones i.v. de  $1 \times 10^9$  ufp de VSV-hDCT en el pico de la respuesta inmunitaria primaria, día 14 (Figura 12a), o antes del pico, día 8 (Figura 12b) (Nota: El pico inducido por Ad es el día 12-14). Siete días después, las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre al epítipo inmunodominante del antígeno asociado a melanoma, dopacromo tautomerasa (DCT180-188), se midieron por análisis de citometría de flujo de tinción intracelular de interferón-gamma tras la re-estimulación con el péptido. Esta estrategia funcionó en tanto escenarios libres de tumor (Figura 12a) como portadores de tumor (Figura 12b; en este caso, melanomas B16-F10 intracraneales, conocidos por ser inmunosupresores).
- Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-hDCT en el día 0, seguido de inyecciones i.v. de  $1 \times 10^7$  ufp de VSV-hDCT o ddVV-hDCT en el día 232. Las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre a los epítopes inmunodominante (SVY) (Figura 13a) y segundo más dominante (VIT) (Figura 13b) del antígeno asociado a melanoma, dopacromo tautomerasa, se midieron por análisis de citometría de flujo de tinción intracelular de interferón-gamma tras la re-estimulación con el péptido.
- Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-hDCT en el día 0, seguido de inyecciones i.v. de  $1 \times 10^7$  ufp de VSV-hDCT o VSV-deltaG-hDCT (una versión del vector que conduce a una infección no productiva; considerada extremadamente segura) en el día 35. Las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre a los epítopes inmunodominante (SVY), segundo más dominante (VIT) y tercer más dominante (STF) del antígeno asociado a melanoma, dopacromo tautomerasa, se midieron por análisis de citometría de flujo de tinción intracelular de interferón-gamma tras la re-estimulación con el péptido (Fig. 14).
- Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-hDCT en el día 0, seguido de inyecciones i.v. de  $1 \times 10^9$  ufp de VSV-hDCT en el día 8. En los días 8, 15, 22 y 29 después de Ad, las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre al epítipo inmunodominante (SVY) del antígeno asociado a melanoma, dopacromo tautomerasa, se midieron por análisis de citometría de flujo de tinción intracelular de interferón-gamma tras la re-estimulación con el péptido. Más linfocitos T produjeron factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa (Figura 15a)

(expresado como una relación de células productoras de citocina doble con respecto a citocina individual) en respuesta al refuerzo por VSV-hDCT en comparación con Ad-hDCT solo, con o sin la presencia de melanomas de cerebro B16-F10, o Ad + un vector de VSV de control (VSV-GFP). Además, cada linfocito T de ratones reforzados con VSV-hDCT-produjo más interferón-gamma (Figura 15b).

Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-hDCT en el día 0, seguido de inyecciones i.v. de  $1 \times 10^7$  ufp de VSV-hDCT o ddVV-hDCT en el día 232. Las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre a los epítopes inmunodominante (SVY) (Figura 16a, c) y segundo más dominante (VIT) (Figura 16b, d) del antígeno asociado a melanoma, dopacromo tautomerasa, se midieron por análisis de citometría de flujo de tinción intracelular de interferón-gamma tras la re-estimulación con el péptido. Se evaluaron la cantidad de interferón (IFN) gamma producida en una base por célula (Figura 16a, b) y la proporción de células productoras de IFN-gamma que también secretaron factor de necrosis tumoral (TNF) alfa (Figura 16c, d).

Ratones C57BL/6 (Figura 17a, b) o BALB/c (Figura 17c) (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-hDCT en el día 0, seguido de inyecciones i.v. de  $1 \times 10^9$  ufp de VSV-SIIN (Figura 14a) o VSV-hDCT (Figura 17b, c) o VSV-DCT murina (VSV-mDCT) (Figura 17b) 17 días (Figura 17a) o 35 días después (Figura 17b, c). Cinco días después de VSV, las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre a SIINFEKL (Figura 17a) o el antígeno asociado a melanoma, dopacromo tautomerasa (Figura 17b, c), se midieron por análisis de citometría de flujo de tinción intracelular de interferón-gamma tras la re-estimulación con el péptido.

Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-SIIN en el día 0, seguido de inyecciones i.v. de  $1 \times 10^9$  ufp de VSV-SIIN en el día 17. Diez días después de Ad (1ª respuesta) y cinco días después de VSV (2ª respuesta), las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre a SIINFEKL se midieron por tinción de tetrámeros. Los resultados muestran la frecuencia (Figura 18a), número (Figura 18b) y aumento en veces en estas respuestas.

Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-SIIN en el día 0, seguido de inyecciones i.v. de  $1 \times 10^9$  ufp de VSV-SIIN en el día 14. En los días 10, 19, 51 y 233, las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre a SIINFEKL se midieron por tinción de tetrámeros. La longevidad de la respuesta se muestra en (Figura 19a). Se evaluó la proporción de células específicas de SIINFEKL de memoria efectora (definidas como CD127+CD62L-) (Figura 19b) y de memoria central (CD127+CD62L+) (Figura 19c) en el día 51.

Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) recibieron inyecciones i.m. de  $1 \times 10^8$  ufp de Ad-SIIN en el día 0, seguido de inyecciones i.v. de  $1 \times 10^9$  ufp de tanto wtVSV-hDCT como deltaM51 VSV-hDCT en el día 14. Cinco días después de VSV, se midieron las respuestas de T derivados de la sangre por análisis de citometría de flujo de tinción intracelular de interferón-gamma tras la re-estimulación con el péptido (Fig. 20).

Ratones C57/B6 se sensibilizaron con Ad-hDCT y a continuación se reforzaron con una dosis intravenosa de tanto VSV-hDCT como Maraba-hDCT 14 días después. El análisis inmunitario de las respuestas de linfocitos T CD8+ se midió en sangre periférica. A una dosis equivalente, la respuesta inducida por la vacunación con Maraba fue 3-8 veces tan grande como las respuestas inducidas por VSV frente al transgén (Fig. 21). En otro experimento, los ratones C57/B6 tanto se sensibilizaron con Maraba-hDCT ( $2 \times 10^9$  UFP IV) como se sensibilizaron con Ad-hDCT ( $1 \times 10^8$  UFP IM) y se reforzaron con Maraba-hDCT ( $2 \times 10^9$  UFP IV). Las respuestas inmunitarias se midieron en sangre y bazo 5 días después (tres barras por tratamiento, la barra izquierda es IFN $\gamma$ +, la central es TNF $\alpha$ + y la barra derecha es positivo doble en cada caso) como se muestra en la Fig. 22A. Maraba-hDCT administrado IV 9 o 12 días después de la sensibilización con Ad (en el pico de la fase efectora inducida por Ad) puede todavía reforzar respuestas inmunitarias (Fig. 22B). Maraba-hDCT y VSV-hDCT administrados intravenosamente refuerzan ambos significativamente las respuestas inmunitarias en ratones BalB-C (ratones tratados como en A, las barras representan IFN $\gamma$ +, TNF $\alpha$ + y doble+ izquierda a derecha para cada tratamiento) como se muestra en la Fig. 22C.

Ratones C57/B6 se sensibilizaron con dosis variables de VSV y variolovacuna que expresa SIINFEKL-luciferasa para sensibilizar una respuesta frente a este epítipo de OVA (Fig. 23A) y posteriormente se reforzaron con VSV-hDCT intravenosamente administrado. Se midieron las respuestas de linfocitos T específicas de SIINFEKL y se muestran en la Fig. 23, que están significativamente potenciadas por el posterior refuerzo de VSV.

Ratones C57/B6 se administraron con una dosis intravenosa única de  $2 \times 10^9$  UFP de VSV-GFP y 24 horas después los bazos se recogieron para análisis de citometría de flujo. El 61,3 % de los esplenocitos voluminosos fueron B220+CD19+, indicativo de linfocitos B. El 50,8 % de las células positivas para GFP son B220+CD19+ y se detectan en la fracción de linfocitos B.

Se vacunaron ratones C57-B6 no mutantes y +/- para linfocitos B con Ad-hDCT para sensibilizar una respuesta inmunitaria anti-DCT como se mide por linfocitos T CD8+ específicos de DCT en la sangre (Fig. 24A). La respuesta secundaria se midió tras la administración intravenosa de VSV-hDCT. Los números de linfocitos T CD8+ IFN $\gamma$ + como se mide por tinción intracelular se indican +/- EEM. (Figura 24B) indicó dependencia del refuerzo de linfocitos B.

Se transfirieron adoptivamente linfocitos B de ratones no mutantes y/o suero inmune a ratones deficientes en linfocitos B. Los linfocitos B se midieron como un porcentaje de linfocito de sangre periférica en 1) control no mutante

2) B-/- más VSV 3) B-/- más VSV más suero 4) B-/- más linfocitos B VSV y 5) B-/- más linfocitos B más suero más VSV como se muestra en la Fig. 25A. Se midieron las respuestas de linfocitos T anti-DCT en ratones deficientes en linfocitos B reconstituidos tras el refuerzo con VSV. Los números de linfocitos T CD8+ IFN $\gamma$ + se indican +/- EEM. Carriles: 1) B-/- más VSV 2) B-/- más VSV más suero 3) B-/- más linfocitos B VSV y 4) B-/- más linfocitos B más suero más VSV (Figura 25B) que muestran respuestas potenciadas en linfocitos B.

Se inyectó VSV-SIIN ( $2 \times 10^9$  ufp) intravenosamente en un ratón C57/B6, y 24 horas después, se recogieron los bazo y se purificaron células CD19 positivas de esplenocitos totales. Las células CD19+ se co-cultivaron con una línea celular de DKL. Activación de linfocitos T cocultivados con células CD19+ de ratón inmunizado con VSV-SIIN, células CD19- de ratón inmunizado con VSV-SIIN, células CD19+ de ratón inmunizado con VSV-SIIN co-cultivado con DKL en presencia del péptido SIIN (control positivo) y control negativo. Los resultados muestran que los linfocitos B infectados con el virus pueden estimular al linfocito T para producir IFN- $\gamma$ .

Se aislaron linfocitos B esplénicos de ratones C57/B6 y se cultivaron en mull2 durante 4 días y a continuación se cargaron con tanto VSV-SIINFEKL/luciferasa como Ad-SIINFEKL/luciferasa (infección de 2 horas, se lavaron y se recogieron). Estos linfocitos B cargados se administraron IV a receptores sin tratamiento previo o sensibilizados. Las respuestas de linfocitos T se midieron 5 días después. Los linfocitos T de ratones sensibilizados con variolovacuna-SIINFEKL/luciferasa mostraron respuesta al péptido SIINFEKL. Los linfocitos T de ratones sensibilizados con linfocitos B cargados con VSV-SIINFEKL/luciferasa mostraron respuesta al péptido SIINFEKL. Los linfocitos T de ratones sensibilizados con linfocitos B cargados con vAd-SIINFEKL/luciferasa mostraron una respuesta mínima al péptido SIINFEKL. Los linfocitos T de ratones sensibilizados con variolovacuna-SIINFEKL/luciferasa y luego reforzados con linfocitos B cargados con VSV-SIINFEKL/luciferasa mostraron respuesta al péptido SIINFEKL. Los linfocitos T de ratones sensibilizados con variolovacuna-SIINFEKL/luciferasa y luego reforzados con linfocitos B cargados con Ad-SIINFEKL/luciferasa mostraron respuesta al péptido SIINFEKL (TNF $\alpha$  eje Y, IFN $\gamma$  eje X en cada caso).

#### Discusión

Los ratones se inmunizaron con adenovirus mediante inyección intramuscular durante 14 días. Se administró una dosis única de VSV recombinante a ratones como la porción de refuerzo de una pauta de vacunación por sensibilización-refuerzo por cualquier de las vías intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intranasal o intravenosa. Las respuestas de linfocitos T específicas de antígeno se midieron 7 días después y se observó que hubo una respuesta de linfocitos T significativamente mayor cuando VSV se administró intravenosamente (véase la Fig. 11).

El momento exacto del refuerzo de la respuesta inmunitaria provocado por VSV se probó en este modelo de vacunación por sensibilización-refuerzo. El refuerzo se administró intravenosamente en el pico de la respuesta inmunitaria primaria (día 14) o en el día 8, precediendo al pico (durante la fase efectora). Las respuestas de linfocitos T medidas 7 días después revelaron que el refuerzo de VSV fue capaz de reforzar la respuesta inmunitaria en y antes del pico de la respuesta inmunitaria primaria. Esto se demostró en tanto ratones libres de tumor como portadores de tumor y, por tanto, entornos inmunosupresores (véase la Fig. 12). Es notable que el refuerzo fue eficaz durante la fase efectora. Generalmente, los linfocitos T efectores menguan antes de que funcione un vector de refuerzo tal.

La capacidad de refuerzo inmunitario de VSV se comparó con un virus de la variolovacuna de control. El refuerzo se realizó 232 días tras la sensibilización inicial (este intervalo prolongado permite dosis 100 veces menores de VSV para lograr el mismo nivel de refuerzo de linfocitos T como se demuestra anteriormente) y se probó la respuesta de linfocitos T a 2 péptidos específicos de antígeno diferentes. Se encontró que la capacidad de refuerzo del VSV, como se mide por las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre, era sustancialmente mejor que la del virus de la variolovacuna para ambos péptidos de antígeno probados (véase la Fig. 13).

Se probó una versión mutante de VSV que puede replicar su genoma y expresar genes dentro de células que son inicialmente infectadas, pero es incapaz de producir progenie infecciosa, para su capacidad para reforzar la respuesta inmunitaria. Las respuestas de linfocitos T derivados de la sangre a 3 epítopes dominantes del antígeno usado en el protocolo de inmunización-refuerzo indicaron que el VSV mutante reforzó la respuesta inmunitaria tan eficazmente como la versión no mutante (véase la Fig. 14). Esto indica que puede usarse una versión más segura del virus que no puede diseminarse para reforzar una respuesta inmunitaria.

Se evaluó la calidad de linfocitos T provocados reforzando con VSV, como se mide por la producción de múltiples citocinas, además de la cantidad de producción de citocinas por célula, para el refuerzo de VSV. La calidad se comparó con los linfocitos T provocados por una sensibilización-vacunación sola o un refuerzo con un vector de control de VSV (sin transgén de Ag insertado). Los linfocitos T generados por el refuerzo de VSV específico de antígeno produjeron múltiples citocinas y una mayor cantidad de interferón-gamma (véase Fig. 15). La calidad de los linfocitos T provocados por el refuerzo de VSV que contiene antígeno se comparó adicionalmente con un refuerzo de virus de la variolovacuna. De nuevo, los linfocitos T de la población de refuerzo de VSV produjeron una mayor cantidad de interferón gamma y también secretaron mayores cantidades de factor de necrosis tumoral alfa (véase la Fig. 16).

Se probaron dos cepas de ratón diferentes con la pauta de VSV de sensibilización-refuerzo, ya que fueron dos antígenos diferentes. En todos los escenarios, se observó el masivo refuerzo inmunitario tras la administración de VSV (véase la Fig. 17).

5 Se probó el requisito para linfocitos T cooperadores CD4+ en el refuerzo inmunitario mediado por VSV. Se examinaron respuestas de linfocitos T tras el refuerzo tanto con como sin agotamiento de células CD4. El agotamiento tuvo un impacto sobre la respuesta inmunitaria primaria, pero no sobre la respuesta secundaria como se mide por el porcentaje, número y aumento en veces en linfocitos T CD8+ (véase la Fig. 18). El método de sensibilización-refuerzo con VSV mantiene la promesa de tratar pacientes inmunocomprometidos tales como  
10 aquellos afectados con SIDA/infección por el VIH.

La durabilidad de la respuesta inmunitaria reforzada se probó 10, 19, 51 y 233 días tras el refuerzo. La respuesta de linfocitos T medida en estos momentos de tiempo indica que la respuesta inmunitaria se mantuvo a largo plazo. Una  
15 evaluación de la proporción de células de memoria efectora y de memoria central en el día 51 indica que hubo una conversión de una mayor proporción de células efectoras en fenotipo de memoria en comparación con una respuesta sensibilizada sola (véase la Fig. 19). Ya no se necesitan células efectoras una vez se ha eliminado el antígeno. Un mayor conjunto de células de memoria en este momento, especialmente células de memoria central, garantizará un mejor re-expansión cuando se encuentren con el antígeno de nuevo.

20 Un vector de VSV que lleva una mutación deltaM51 en la proteína de la matriz que lo incapacita para bloquear la producción de interferón, y denominado así un mutante inductor de interferón, puede usarse para generar un efecto de refuerzo similar. Se sensibilizaron ratones con Ad-hDCT con un refuerzo posterior de tanto VSV-hDCT no mutante (wtVSV-hDCT) como deltaM51 VSV-hDCT (dM51/VSV-hDCT) y se midieron linfocitos T específicos de DCT en la sangre (véase Figura 20). El vector de deltaM51/VSV se atenúa por inducción por interferón *in vivo* y así es  
25 tanto un vector más seguro como tiene asociadas propiedades oncolíticas. Esto demuestra que pueden utilizarse diversos medios para atenuar VSV, mientras que se retiene la capacidad para reforzar respuestas inmunitarias tras la administración intravenosa.

30 Las vacunas con vector de VSV son agentes de refuerzo particularmente potentes cuando se administran intravenosamente. Las características únicas y notables de este enfoque incluyen la magnitud de respuesta, durabilidad de la memoria, vía de administración preferida, independencia de linfocitos T CD4, capacidad para reforzar la respuesta inmunitaria temprana (durante la fase efectora), capacidad para provocar una calidad de linfocitos T superior, refuerzo de respuestas a epitopes subdominantes y la adaptabilidad a vectores atenuados más seguros. Se desvela que esta estrategia puede aplicarse a cualquier antígeno deseado que incluye, por ejemplo,  
35 antígenos extraños derivados de patógenos, además de autoantígenos, antígenos oncofetales y neoantígenos que se dirigen a tumores. El refuerzo puede usarse conjuntamente con cualquier estrategia de sensibilización para reforzar respuestas de linfocitos T y de anticuerpos para tanto vacunación profiláctica como terapéutica. Además, pueden usarse otros miembros de las familias de vesiculovirus o rhabdovirales en lugar de VSV como vector de refuerzo. También pueden usarse diversas versiones no replicantes o mutantes de estos virus de refuerzo como  
40 vectores de refuerzo.

La capacidad de refuerzo de vectores de VSV intravenosamente administrados es dependiente de linfocitos B. El VSV administrado IV infecta linfocitos B en el bazo. Cuando estas células se aíslan tras la administración de VSV, se muestra que presentan antígeno de transgén a linfocitos T específicos *ex vivo*. Los linfocitos B cargados con una  
45 vacuna de VSV *ex vivo* es una plataforma de vacunación superior para vacunar tanto animales sin tratamiento previo como sensibilizados. También pueden usarse otros virus con un tropismo de linfocitos B para lograr estos efectos.

El documento del estado de la técnica Rose, NF et al., J. of Virology, The American Society of Microbiology, US, vol. 74, no. 23, 2000-12-01, páginas 10903-10910, describe que los vectores de vacuna de VSV modificados con la glucoproteína G permiten el refuerzo eficaz y la generación de anticuerpos neutralizantes a una cepa aislada del VIH primaria. El documento Diaz RM et al., Cancer Reseach, 2007, 67:2840-2828, se refiere a inmunoterapia oncolítica para melanoma usando VSV.  
50

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un vector oncolítico rabdoviral replicante para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero, en el que dicho vector expresa un antígeno de tumor al que el mamífero tiene una inmunidad preexistente y dicho vector se administra intravenosamente al mamífero.
2. El vector oncolítico para su uso según la reivindicación 1, en el que el antígeno de tumor es un antígeno asociado a tumor.
- 10 3. El vector oncolítico para su uso según la reivindicación 1, en el que el antígeno de tumor está seleccionado del grupo que consiste en un antígeno oncofetal, una glucoproteína superficial, un marcador de la superficie celular, un antígeno asociado a melanoma, antígeno de cáncer de testículos, un oncogén, un oncogén viral, dopacromo tautomerasa (DCT), GP100, MART1, alfa-fetoproteína (AFP) y antígeno carcinoembrionario (CEA).
- 15 4. El vector oncolítico para su uso según la reivindicación 1, en el que el vector oncolítico es un rabdovirus seleccionado del grupo que consiste en vesiculovirus tales como virus de la estomatitis vesicular y virus de Maraba, Ephemerovirus, Cytorhabdovirus, Nucleorhabdovirus y Lyssavirus.
- 20 5. El vector oncolítico para su uso según la reivindicación 1, en el que el mamífero se ha vacunado con el antígeno de tumor para generar la inmunidad preexistente al antígeno antes de la administración del vector oncolítico.
- 25 6. Un kit para su uso como se define en la reivindicación 1, que comprende un antígeno de tumor, o un vector que expresa un antígeno de tumor, en una cantidad adecuada para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, y un vector rabdoviral oncolítico replicante que expresa el antígeno de tumor en una cantidad adecuada para potenciar la respuesta inmunitaria, en el que el vector oncolítico está en una forma adecuada para administración intravenosa.



FIGURA 1

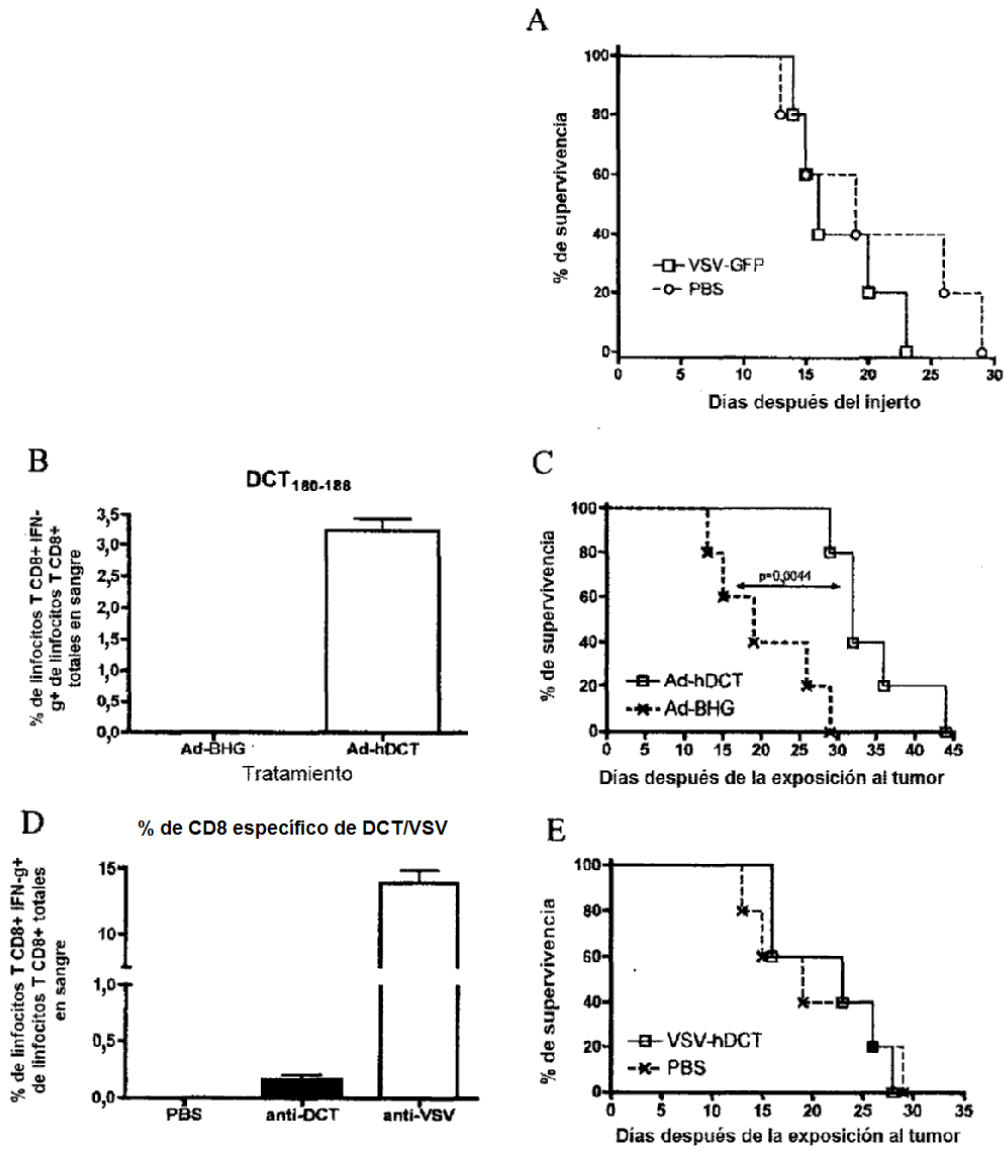


FIGURA 2

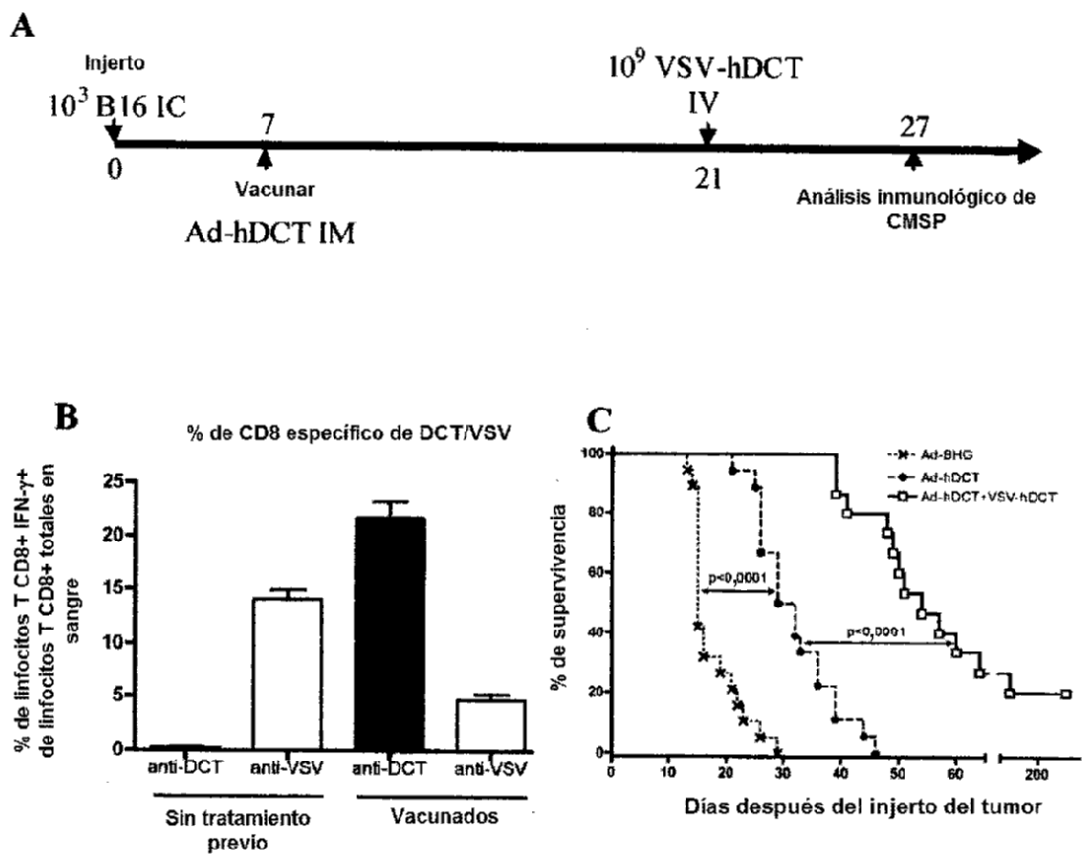


FIGURA 3

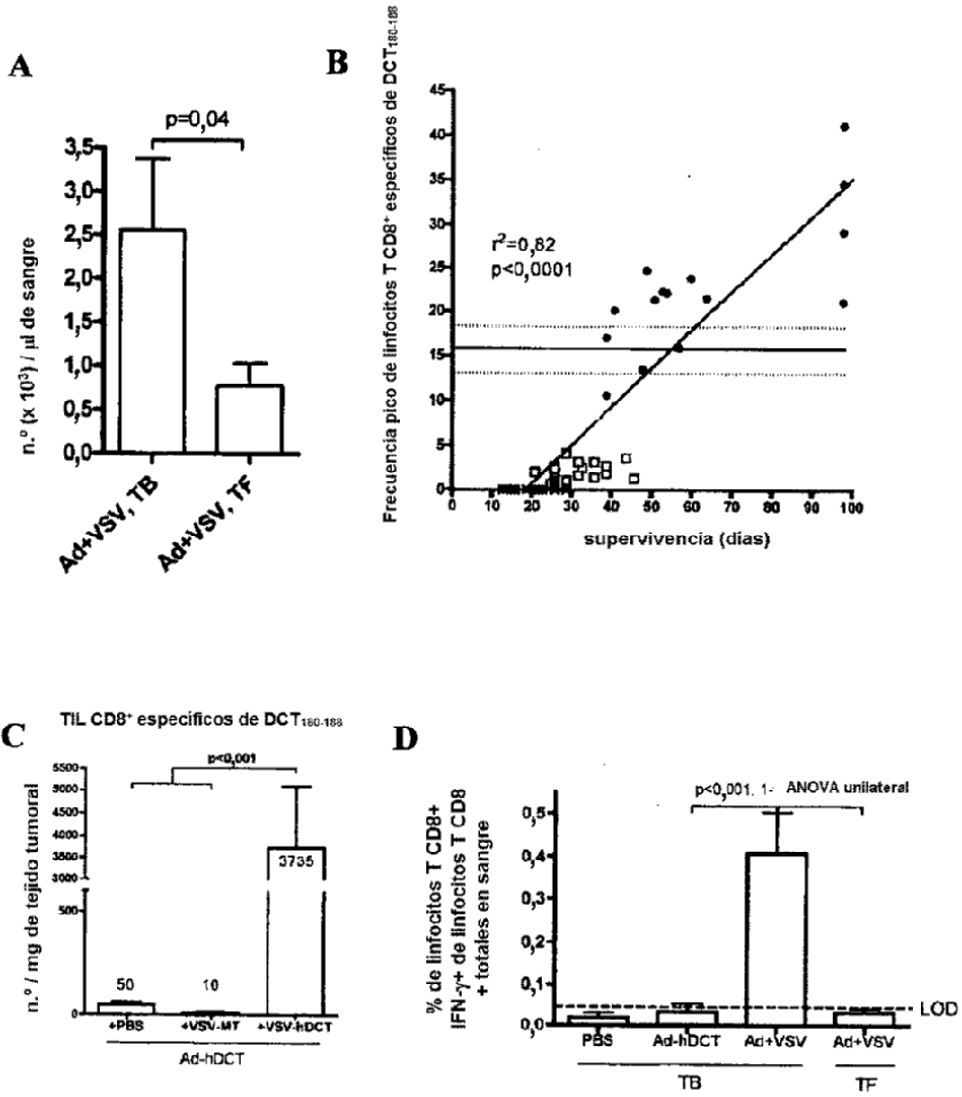


FIGURA 4

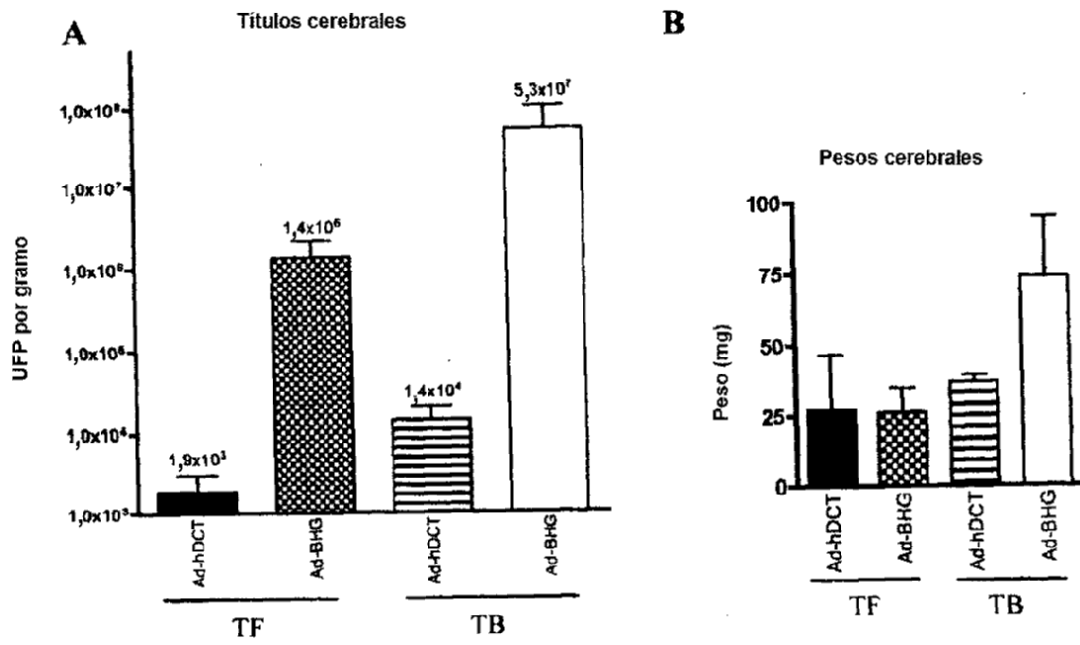


FIGURA 5

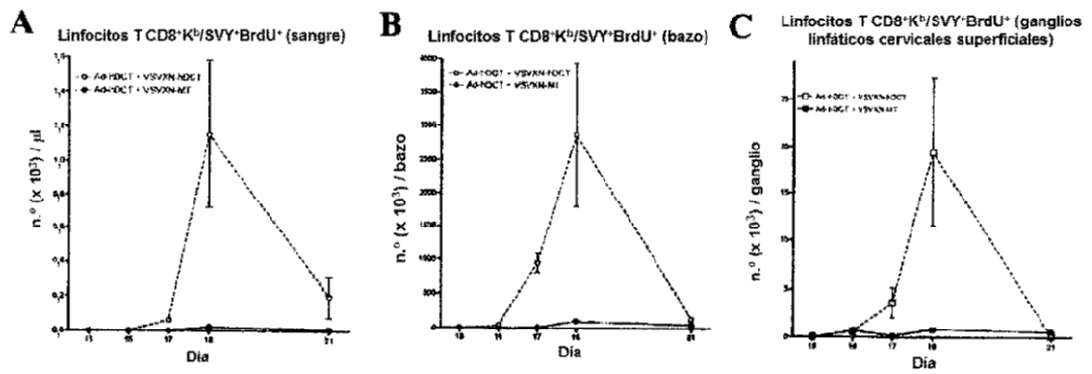


FIGURA 6

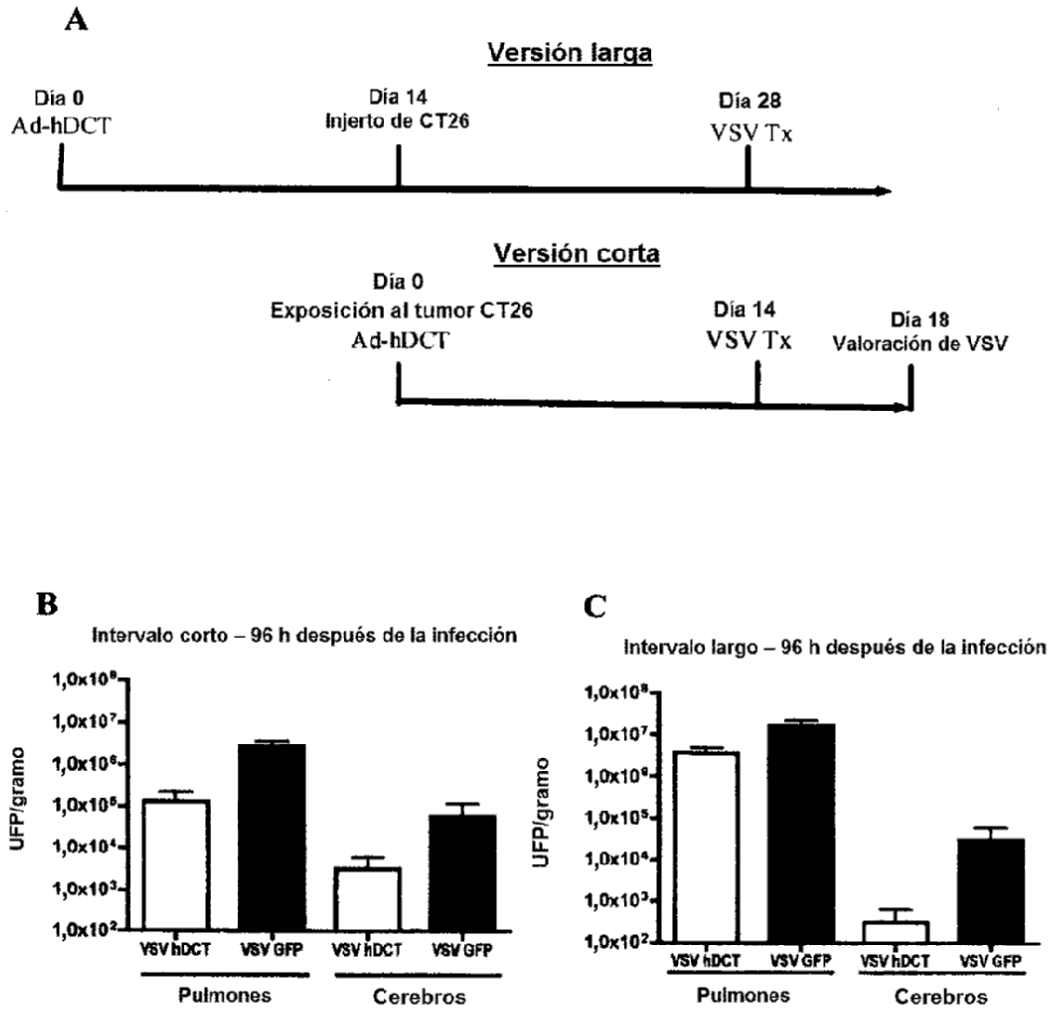


FIGURA 7

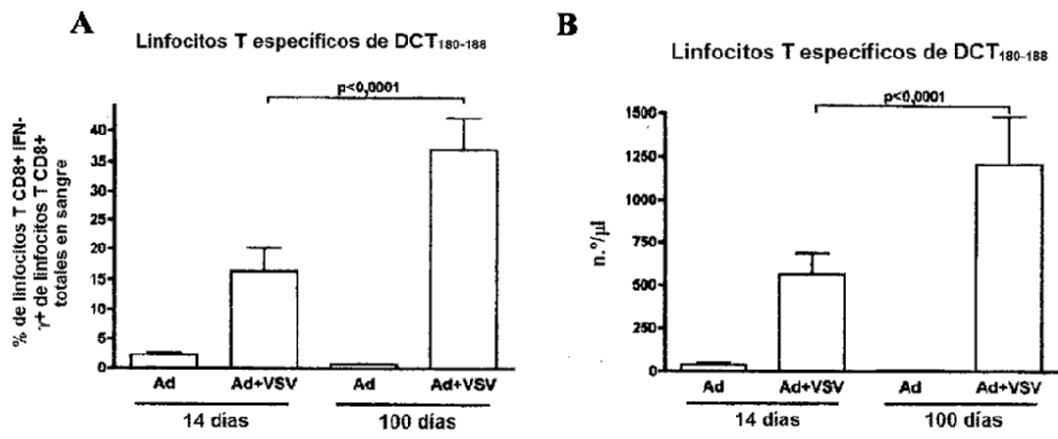


FIGURA 8

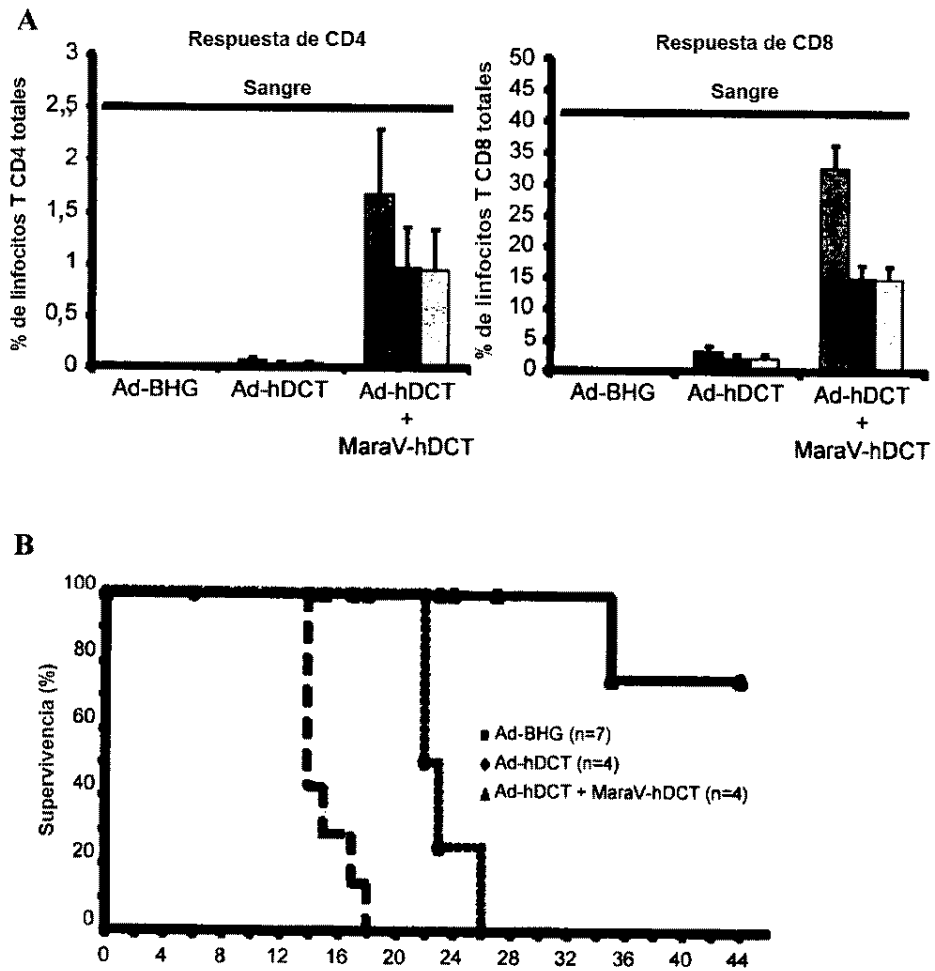




FIGURA 9

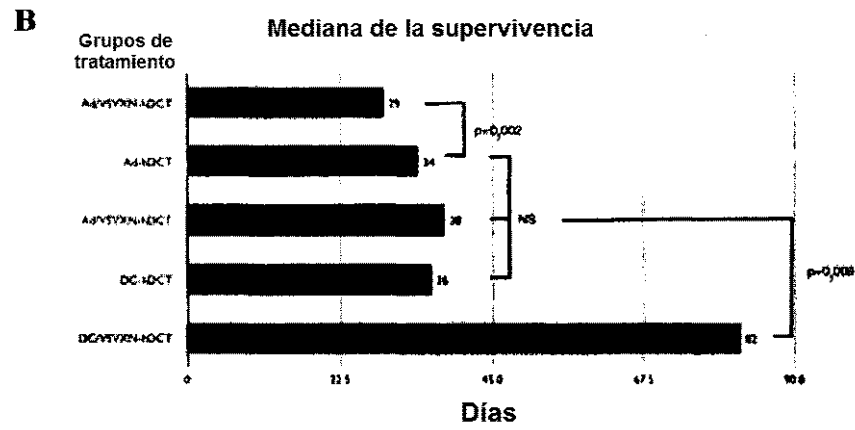
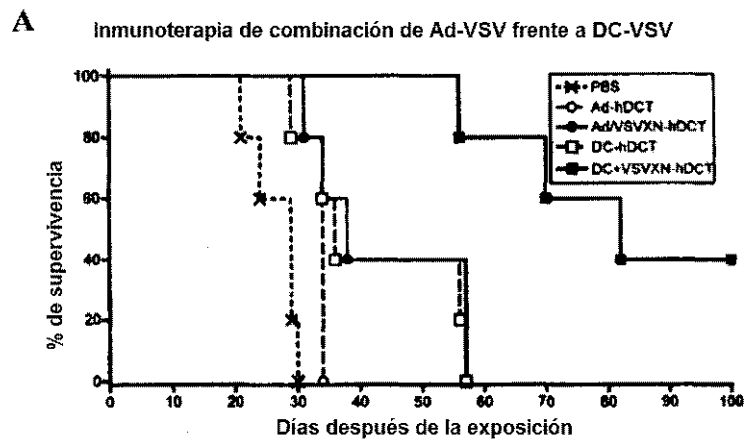
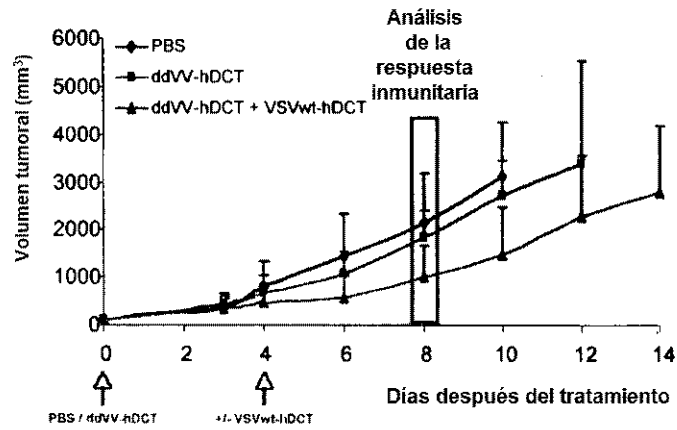


FIGURA 10

A



B

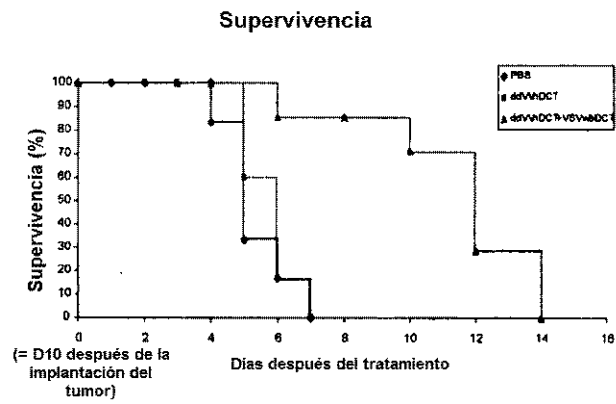


FIGURA 11

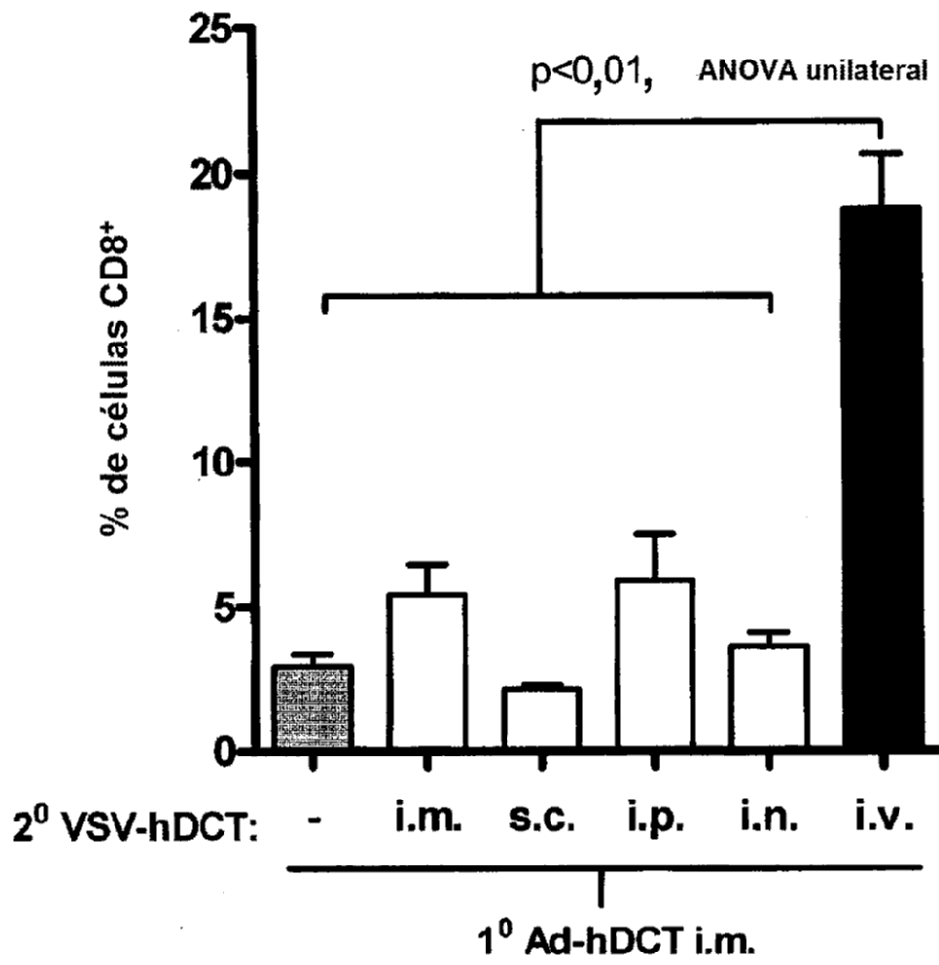


FIGURA 12

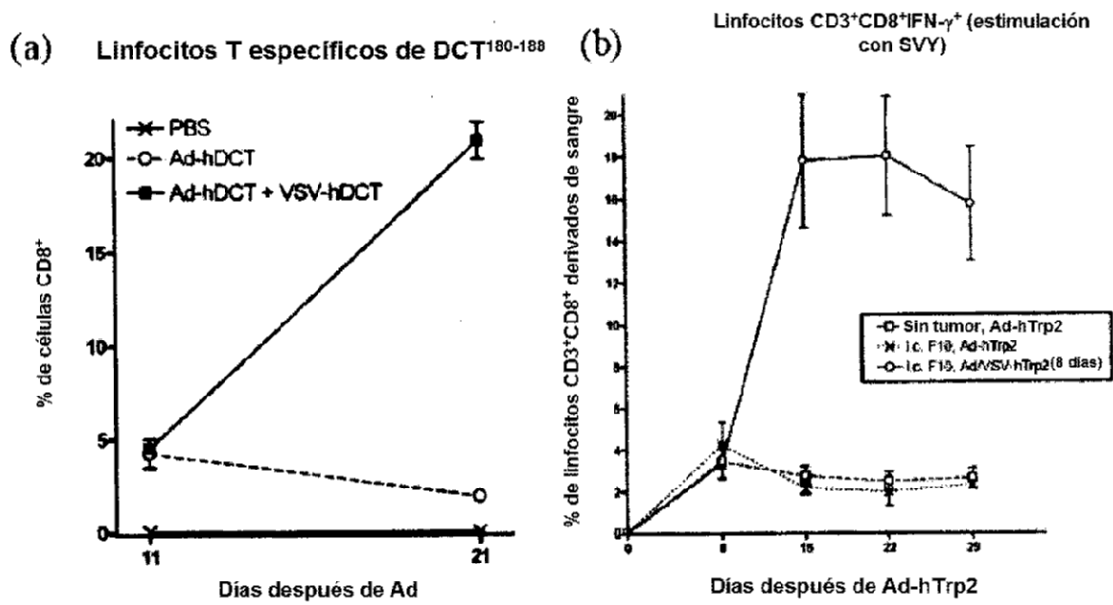


FIGURA 13

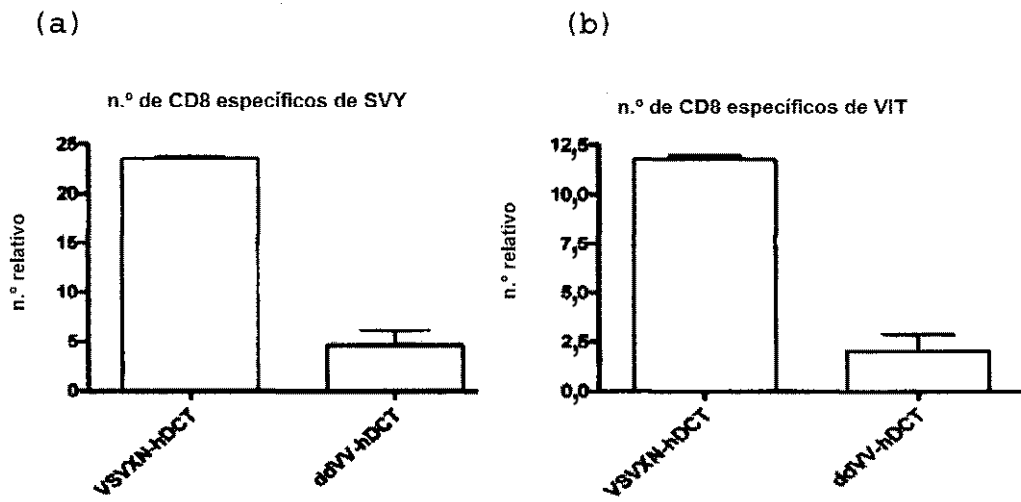


FIGURA 14

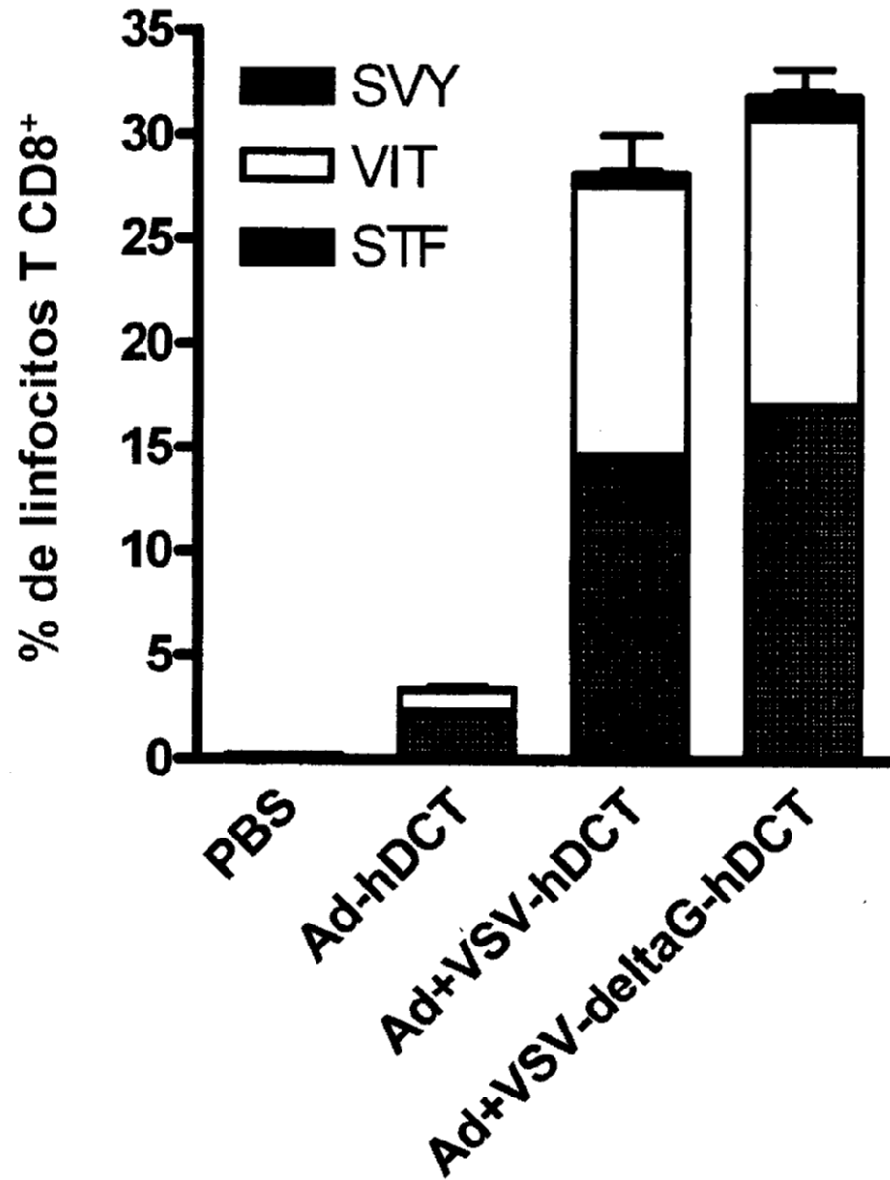


FIGURA 15

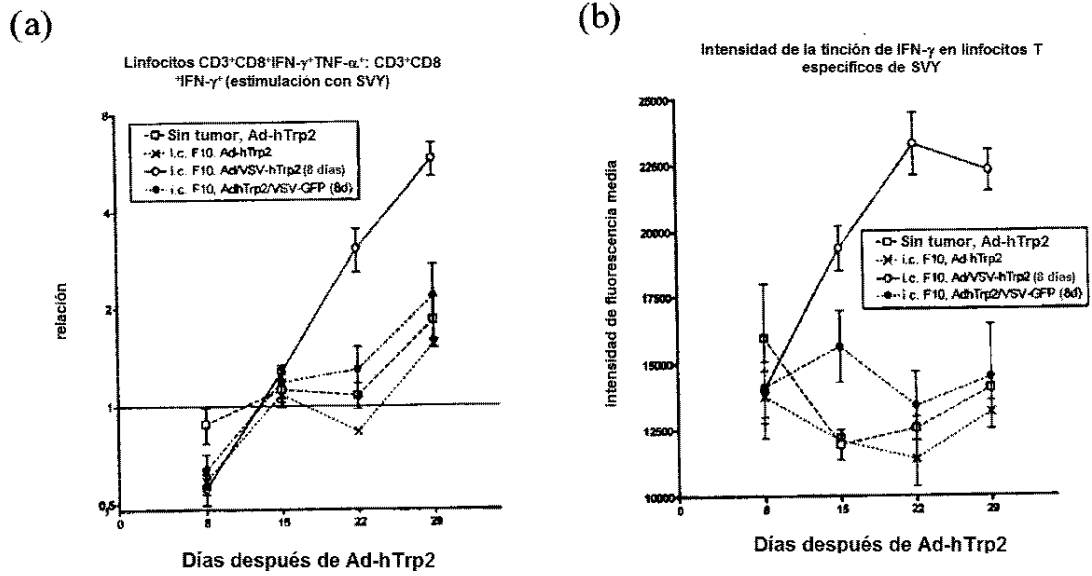


FIGURA 16

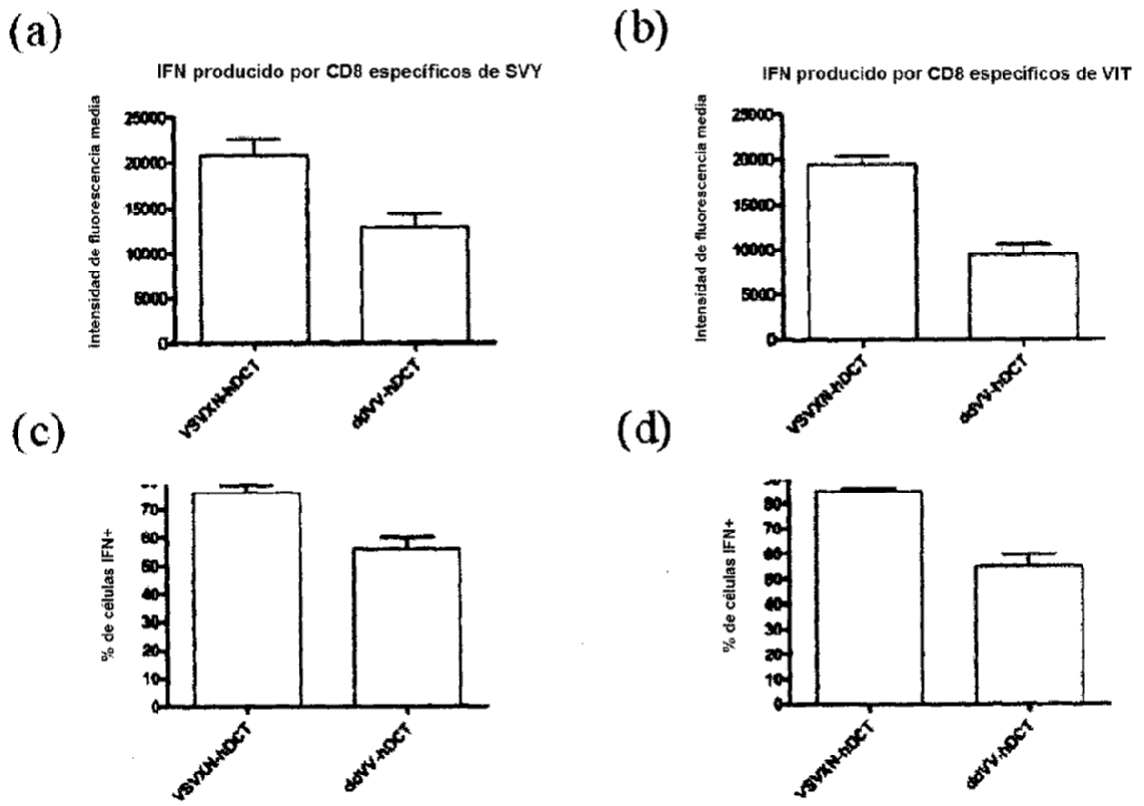




FIGURA 17

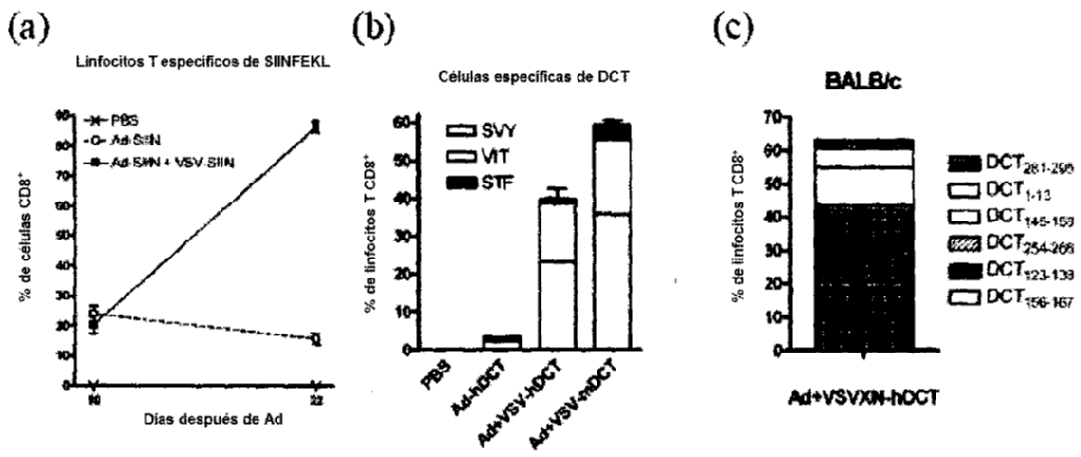


FIGURA 18

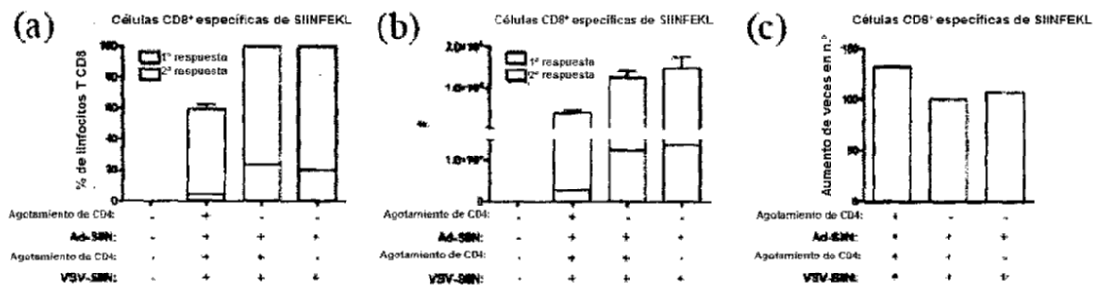


FIGURA 19

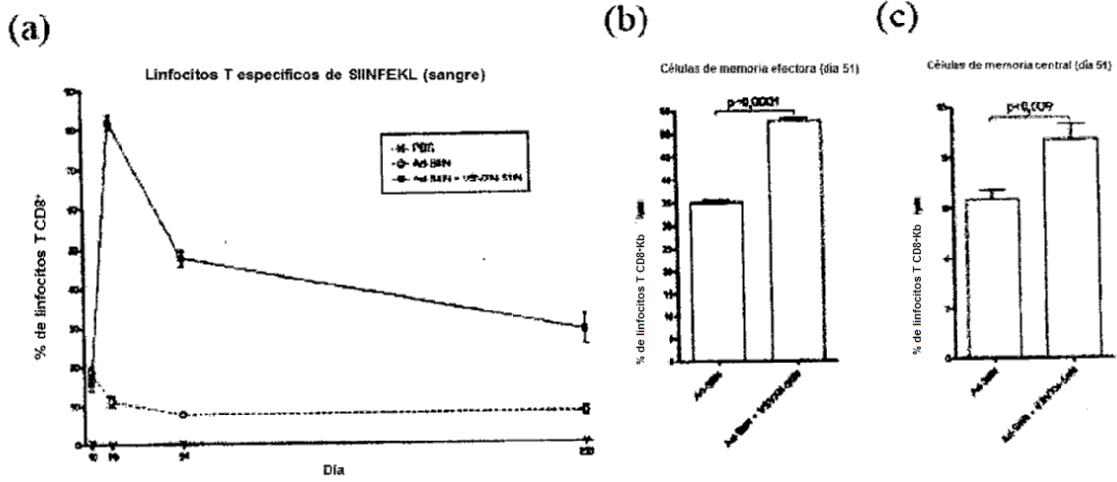


FIGURA 20

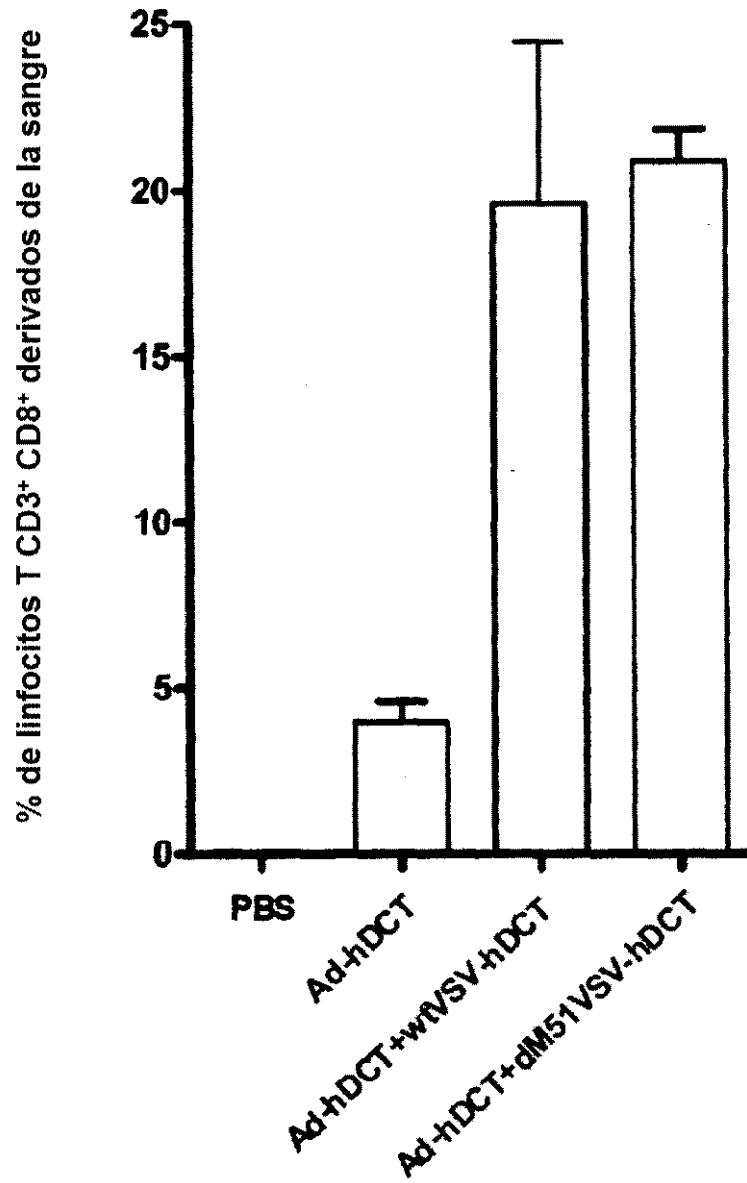


FIGURA 21

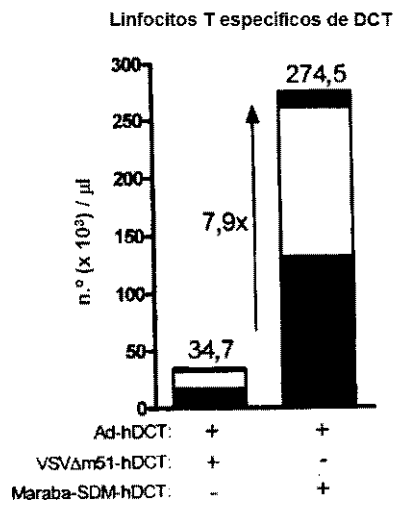
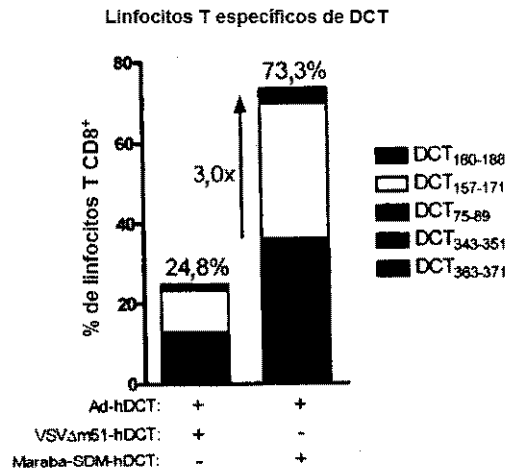


FIGURA 22

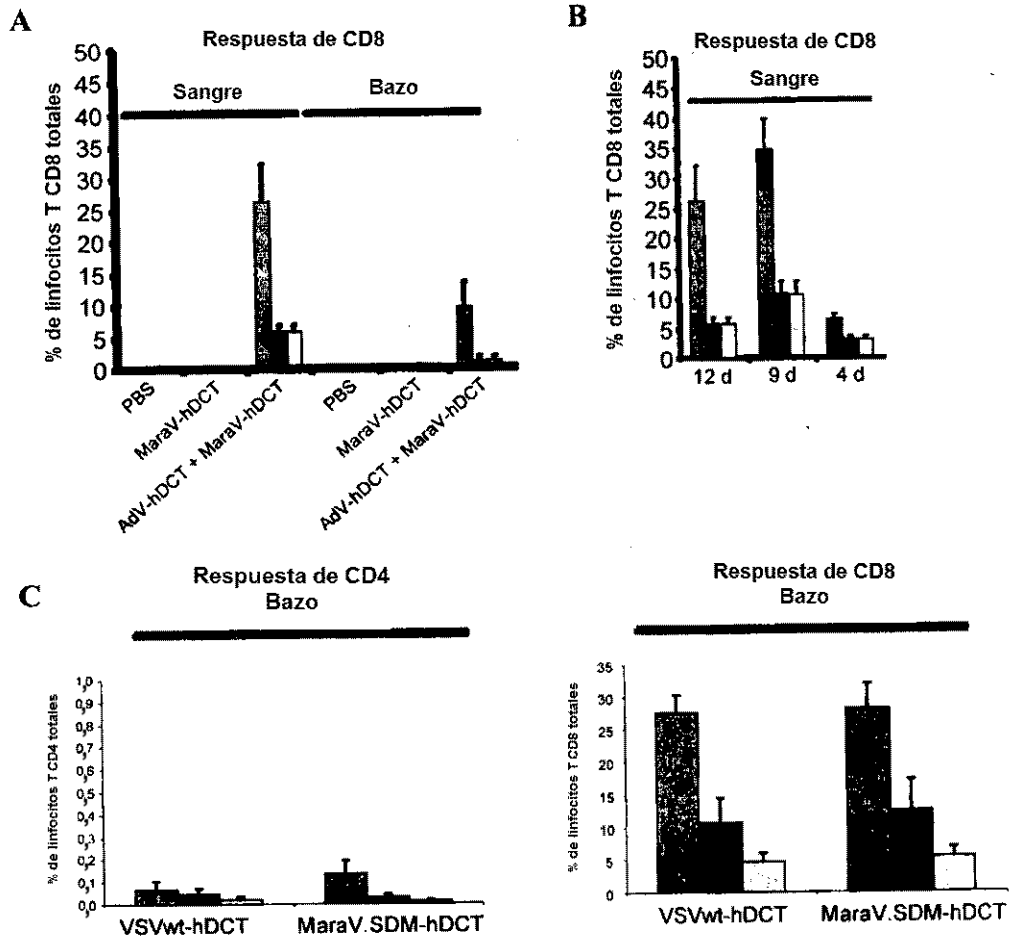


FIGURA 23

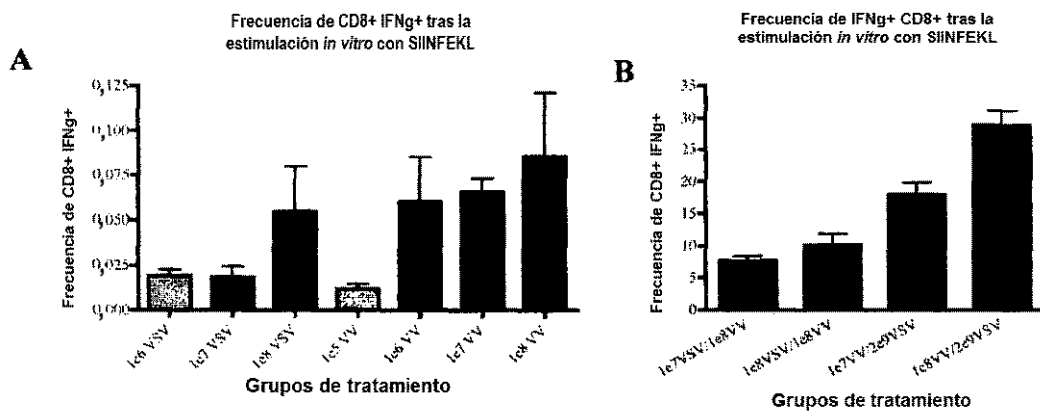


FIGURA 24

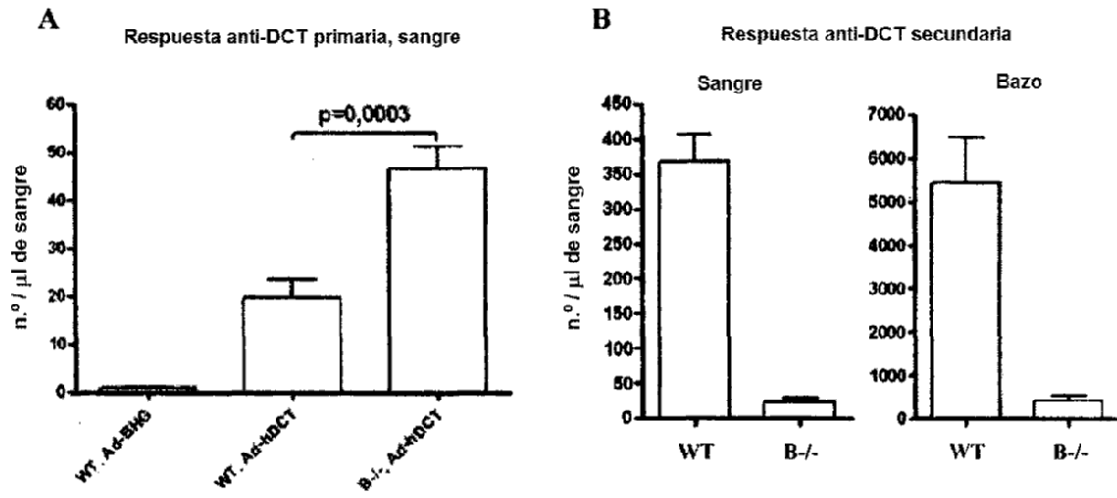


FIGURA 25

