

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 833**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0784** (2010.01)

**A61K 35/12** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2009 PCT/EP2009/055909**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2009 WO2009138489**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2009 E 09745821 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2276832**

54 Título: **Linaje de células dendríticas plasmacitoides usado en terapia celular activa o adoptiva.**

30 Prioridad:

**16.05.2008 FR 0802659**

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

**27.06.2017**

73 Titular/es:

**ETABLISSEMENT FRANCAIS DU SANG (100.0%)  
20 Avenue du Stade de France  
93210 La Plaine Saint Denis , FR**

72 Inventor/es:

**PLUMAS, JOEL;  
ASPORD, CAROLINE y  
CHAPEROT-DUBONNET, LAURENCE**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 619 833 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

Linaje de células dendríticas plasmacitoides usado en terapia celular activa o adoptiva

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento de inducción y de amplificación de efectores citotóxicos que implementan un linaje de células dendríticas plasmacitoides (pDC) en situación semialogénica. La invención se refiere igualmente al uso de un linaje de pDC para la obtención de un medicamento destinado al tratamiento y o a la prevención de enfermedades infecciosas o de cánceres. La invención se refiere igualmente a una vacuna que comprende pDC y a un procedimiento de tratamiento de cánceres o de enfermedades infecciosas.

10

*Las células dendríticas*

**[0002]** Las células dendríticas son actores clave de la respuesta inmunitaria: son responsables de la captura de los antígenos y de su preparación con vistas a su presentación ante los linfocitos T. Existen diferentes tipos de células dendríticas que se distinguen por su ontogenia y sus capacidades funcionales: las células dendríticas mieloides (mDC) obtenidas de precursores que expresan las moléculas CD11c, CD13 y CD33, y las células dendríticas plasmacitoides (pDC), caracterizadas por una expresión muy intensa del receptor en IL3 (CD123) y capaces de madurar bajo el efecto de IL3 y de CD40L, o en presencia de un virus.

20 **[0003]** Las pDC, han sido identificadas con precisión a partir de amígdalas en 1997 por G. Grouard y col. (Grouard G y col., J Exp Med., 1997; 185:1101-1111), también han sido descritas en la sangre (O'Doherty U. y col., Immunology, 1994; 82:487-493; Robinson SP. y col., Eur J Immunol., 1999; 29:2769-2778), en los ganglios (Cella M. y col., Nat Med., 1999; 5:919-923) y el timo (Res PC. y col., Blood, 1999; 94:2647-2657; Bendriss-Vermare N. y col., J Clin Invest., 2001; 107:835-844). Estas células se caracterizan por su morfología de tipo plasmacitoide y su fenotipo.

**[0004]** Las pDC expresan las moléculas CD4, HLA-DR y CD45RA, y están desprovistas de marcadores de tipo mieloides CD11c y CD13 (Cella M. y col., Nat Med., 1999; 5:919-923), o de marcadores específicos de linajes tales como CD3, CD14 y CD19, por más que se haya observado a veces una expresión de CD2, CD5 o CD7 (Cella M. y col., Nat Med., 1999; 5:919-923; Res PC y col., Blood., 1999; 94:2647-2657). Más recientemente ha podido identificarse la lectina BDCA2 expresada específicamente por las pDC; BDCA4 se encuentra en las pDC pero está presente también en las DC derivadas de monocito (Dzionek A. y col., J Immunol., 2000; 165:6037-6046). Un argumento en favor de la pertenencia de estas células al linaje linfoides es su expresión de los ARNm que codifican las cadenas preT alfa (Res PC. y col., Blood., 1999; 94:2647-2657), lambda like 14.1 y SpiB (Bendriss-Vermare N. y col., J Clin Invest., 2001; 107:835-844). Estas células expresan de forma muy intensa el receptor de IL-3 y de forma débil el receptor en GM-CSF (Cella M. y col., Nat Med., 1999; 5:919-923; Rissoan MC. y col., Science., 1999; 283:1183-1186), y estas dos citocinas favorecen la supervivencia de las pDC (Grouard G. y col., J Exp Med., 1997; 185:1101-1111; Kohrgruber N. y col., J Immunol., 1999; 163:3250-3259; Robinson SP. y col., Eur J Immunol., 1999; 29:2769-2778) que en caso contrario mueren muy rápidamente *in vitro*. Las moléculas de coestimulación CD80 y CD86 están ausentes y tienen una expresión baja (Grouard G. y col., J Exp Med., 1997; 185:1101-1111), y en estado inmaduro, estas células no son capaces de activar los linfocitos T (Kohrgruber N. y col., J Immunol., 1999; 163:3250-3259). Por el contrario, en presencia de IL-3, de CD40L o de un virus, las pDC maduran, expresan con intensidad las moléculas accesorias de la presentación de los antígenos (CD40, CD80, CD86 y HLA-DR) y se vuelven capaces de activar la proliferación de linfocitos T alogénicos (Kohrgruber N. y col., J Immunol., 1999; 163:3250-3259; Grabbe S. y col., Immunol Today., 2000; 21:431-433; Kadowaki N. y col., J Exp Med., 2000; 192:219-226). Según el estímulo responsable de su maduración (IL3 o virus), las pDC polarizarán la respuesta de los linfocitos T nuevos que activan, de forma más o menos estricta, hacia un perfil Th1 o Th2 (Rissoan MC. y col., Science., 1999; 283:1183-1186; Cella M. y col., Nat. Immunol., 2000; 1:305-310; Kadowaki N. y col., J Exp Med., 2000; 192:219-226). Las pDC se describen también para inducir respuestas de tipo TCD4 y CD8 reguladoras (Gilliet & Liu, Hum. Immunol. 63, 2002; Wei y col., Cancer Res. 65(12), 2005; Gilliet & Liu, J. Exp. Med., 195(6), 2002).

*Las células dendríticas en contexto tumoral o infeccioso*

**[0005]** En un contexto tumoral, las pDC presentan a menudo un estado inmaduro y funciones tolerógenas (Perrot y col., The J. of Imm., 2007; Hartmann y col., Cancer Res., 63, 2003; Treilleux y col., Clinical Cancer Res., 10, 2004). Debe observarse que la infiltración de cáncer de mama por pDC está correlacionada con un pronóstico de supervivencia desfavorable de los pacientes, lo que indica una contribución en la progresión de dicho cáncer (Treilleux y col., 2004), o una inhibición de sus funciones en el contexto del microentorno tumoral.

**[0006]** En el contexto de las infecciones víricas, las pDC tienen un papel central en el inicio de la respuesta antivírica, por su secreción de interferón alfa, y debido a su capacidad de presentar los antígenos víricos, para activar los linfocitos T CD8+ citotóxicos (Hoefel y col., 2008, *Immunity* 27: 481-492; Di Pucchio, 2008, *Nature Immunol.* adv publicación en línea).

5

*Inmunoterapia activa e inmunoterapia alogénica*

**[0007]** Numerosos ensayos clínicos ponen de relieve la capacidad de las células dendríticas mieloides (mDC) autólogas de estimular respuestas inmunitarias antitumorales (Thurner y col., 1999, *J. Exp. Med.* 190(11): 1669-78; Palucka y col., 2005, *J. Immunother.* 28(2): 158-68). En la mayor parte de estos ensayos, la generación de las mDC se realiza a partir de monocitos tomados en el paciente, cultivados en presencia de citocinas durante varios días, y hace intervenir a veces una etapa suplementaria de maduración de las células. La producción de estas mDC debe realizarse así para cada paciente individualmente, y los ensayos clínicos realizados hasta ahora con las mDC autólogas no permiten una eficacia clínica suficiente para mejorar la supervivencia global de los pacientes (Banchereau y col., 2005, *Nat. Rev. Immunol.* 5(4): 296-306).

**[0008]** La inmunogenicidad de las vacunas celulares podría mejorarse en un contexto alogénico, y el uso de mDC semialogénicas o de linajes tumorales semialogénicos en protocolos de inmunoterapia ya ha sido documentada (Hus y col., 2005, *Leukemia* 19: 1621-1627; Holtl y col., 2005, *Cancer Immunol Immunother.* 54: 663-670). Las mDC pueden obtenerse a partir del linaje MUTZ3, un linaje de células mieloides CD34+ obtenido de una leucemia. La obtención de mDC a partir de este linaje es compleja (estimulación por GM-CSF, IL-4 y TNF- $\alpha$ , y después maduración por adición de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  y PGE2). Estas mDC derivadas de MUTZ-3 se describen como capaces de inducir linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos tumorales *in vitro* (Santegoets y col., 2006 *Cancer Immunol. Immunother.* 55: 1480-1490, documento US-2004/0.265.998). Sin embargo el nivel de inducción de la respuesta sigue siendo muy bajo, con obtención de sólo el 0,4% de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno entre los linfocitos T.

**[0009]** Además, el linaje del cáncer de mama KS transfectado con la molécula de coestimulación CD80 puede inducir también linfocitos T específicos de antígenos tumorales (Guckel, 2005, *Cancer Immunol. Immunother.*, 54: 129-140) y ya se usa en ensayos clínicos de fase I/II. Sin embargo, la respuesta inducida es limitada con respecto a los antígenos expresados por este linaje (Her-2/Neu) y no permite inducir respuestas contra otros antígenos tumorales o víricos.

**[0010]** La presente invención aporta soluciones a los problemas de las estrategias de las inmunoterapias actuales, relacionadas con la dificultad de la implementación de los protocolos y de su industrialización, a falta de eficacia terapéutica y debido a que las estrategias se han desarrollado para un estado patológico muy concreto con un campo de aplicación muy restringido.

**[0011]** De hecho, la presente invención tiene como objeto un procedimiento de inducción y de amplificación de efectores específicos que implementan un linaje de pDC en un contexto semialogénico, el uso de dicho linaje para la fabricación de un medicamento, en especial una vacuna así como un procedimiento de prevención y/o de tratamiento de cánceres y/o de enfermedades infecciosas.

**Descripción de la invención**

45

**[0012]** La presente invención se refiere a un procedimiento de inducción y de amplificación *in vitro* de efectores específicos (es decir de células inmunitarias capaces de reconocer al menos un antígeno específico) que comprende: (a) la obtención de un linaje de células dendríticas plasmacitoides (pDC) pulsadas por incubación de un linaje de pDC con dicho al menos un antígeno específico, (b) la irradiación de las células obtenidas en la etapa (a), (c) la puesta en contacto de las pDC pulsadas e irradiadas obtenidas en la etapa (b) con células mononucleadas de sangre periférica (PBMC), y el cultivo de las pDC pulsadas e irradiadas y de las PBMC que comparten al menos un alelo del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

**[0013]** Puede obtenerse una amplificación mayor del número de efectores específicos mediante al menos una nueva puesta en contacto de las células obtenidas del cultivo mencionado anteriormente con pDC pulsadas e irradiadas seguido de una etapa de cultivo.

**[0014]** El término «organismo» en el marco de la presente invención define muy en particular al ser humano o a un ratón humanizado.

- [0015]** El término «linaje celular» se aplica a las células de mamífero cultivadas *in vitro*. Las células primarias de mamíferos no se multiplican en cultivo o dejan de multiplicarse en cultivo después de un número limitado de divisiones. Los linajes celulares según la presente invención son capaces de multiplicarse indefinidamente, de lo cual los cultivos primarios o secundarios de células de mamífero son incapaces. Estas propiedades de los linajes de células dendríticas plasmacitoides humanas (pDC) según la invención permiten obtener ventajosamente cantidades importantes de células por multiplicación o proliferación de estas células *in vitro*.
- [0016]** En una realización de la invención, el linaje de pDC se obtiene a partir de células de leucemia a pDC. La patente europea EP-1.572.989-B1 describe un procedimiento de obtención y de cultivo de células de linajes de pDC a partir de células de estas leucemias. Esta patente describe muy en particular el linaje de pDC humanas, denominado GEN2.2, depositado en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75015 Paris) el 24 de septiembre de 2002 con el número CNCMI-2938 según la regla 6.1 del Tratado de Budapest, y el linaje de células dendríticas plasmacitoides humanas, denominado GEN3, depositado en la CNCM el 16 de octubre de 2003 con el número CNCMI-3110 según la regla 6.1 del Tratado de Budapest. Estos linajes pueden usarse en una implementación totalmente preferida de la invención.
- [0017]** El término «pulsado» significa que las células (linaje) de pDC se incuban con un antígeno.
- [0018]** En el marco de la presente invención el término «antígeno» define una molécula reconocida por las células del sistema inmunitario y capaz de desencadenar una reacción inmunitaria por mediación celular.
- [0019]** Los antígenos según la presente invención pueden ser antígenos nativos o modificados, tumorales o microbianos (en particular, bacterianos o víricos), tales como péptidos, proteínas, glucopéptidos, glucoproteínas, proteínas fosforiladas.
- [0020]** Los antígenos pueden aportarse al medio de cultivo del linaje de pDC o expresarse mediante el linaje de pDC transfectada por un vector que permite la expresión de dicho antígeno.
- [0021]** En una implementación preferida de la invención los antígenos son péptidos susceptibles de obtenerse a partir de proteínas antigénicas de origen tumoral o vírico.
- [0022]** En una implementación particular de la invención los péptidos susceptibles de obtenerse a partir de antígenos tumorales pueden elegirse entre los péptidos comprendidos en la secuencia de antígenos CEA, NY-BR1, Her-2/Neu, PSA, RAGE-1, PRAME, TRP-2, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A4, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-C2, MUC-1, p53, hTERT, survivina, melan-A/MART-1 (SEQ ID NO. 1), GP100 (SEQ ID No. 2), tirosinasa (SEQ ID NO. 3), MAGE-A3 (SEQ ID NO. 4) o NY-ESO1 (SEQ ID NO. 5), modificados o no.
- [0023]** En otra implementación de la invención, los péptidos susceptibles de obtenerse a partir de antígenos víricos pueden elegirse entre los péptidos comprendidos en la secuencia de antígenos env, nef, gp41, gp120, gag (SEQ ID NO. 6) o pol (SEQ ID NO. 7) del virus HIV, HBc o HBs del virus HBV, core, NS3 o NS5 del virus HCV, Flu M1 (SEQ ID NO. 8) del virus influenza, CMVpp65 (SEQ ID NO. 9) del virus CMV, BMLF1 (SEQ ID NO. 10), LMP2 (SEQ ID NO. 11), EBNA-2 (SEQ ID NO. 12) o EBNA-3a (SEQ ID NO. 13) del virus EBV, modificados o no.
- [0024]** En el marco de la presente invención el término «efector específico» se aplica a las células inmunitarias capaces de reconocer un antígeno específico o un producto obtenido de este antígeno.
- [0025]** En una implementación de la invención en particular, los efectores específicos son efectores citotóxicos y de forma muy en particular estos efectores citotóxicos son linfocitos T específicos del antígeno usado, y en particular CD8+.
- [0026]** La presente invención tiene igualmente por objeto el uso de un linaje de pDC incubadas con al menos un antígeno de origen tumoral, microbiano, bacteriano o vírico e irradiadas para la fabricación de un medicamento destinado a la prevención y/o el tratamiento de enfermedades infecciosas o de cánceres. Así, la presente invención tiene igualmente por objeto: una composición farmacéutica o no que comprende un linaje de pDC pulsado por incubación con un antígeno tumoral o un antígeno vírico, eligiéndose dicho antígeno vírico entre los péptidos comprendidos en la secuencia de antígenos env, nef, gp41, gp120, gag o pol del virus HIV, HBc o HBs del virus HBV, core, NS3 o NS5 del virus HCV, flu M1 del virus influenza, pp65 del virus CMV, BMLF1, LMP2, EBNA-2 o EBNA-3a del virus EBV e irradiadas; una composición que comprende un cultivo de células, comprendiendo dicho

cultivo un linaje de pDC incubadas con al menos un antígeno e irradiadas así como PBMC, compartiendo dichas pDC y PBMC al menos un alelo del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

5 **[0027]** Dicho linaje puede presentarse en la forma de un kit que comprende igualmente PBMC, compartiendo las pDC y las PBMC al menos un alelo del CMH. El kit, en una forma determinada puede comprender igualmente al menos un antígeno.

10 **[0028]** La invención tiene también por objeto un linaje de pDC incubadas con al menos un antígeno e irradiadas para su uso en vacunas como agente de activación del sistema inmunitario. Dicha vacuna puede administrarse en el marco de un procedimiento de vacunación.

15 **[0029]** La solicitud describe igualmente un procedimiento de prevención y/o de tratamiento de cánceres y/o enfermedades infecciosas caracterizado porque se inyecta un linaje de pDC irradiado y pulsado en un organismo, compartiendo las PBMC de dicho organismo y las pDC al menos un alelo del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

20 **[0030]** La solicitud describe igualmente un procedimiento de prevención y/o de tratamiento de cánceres y/o enfermedades infecciosas caracterizado porque se inyectan los efectores específicos obtenidos por incubación de un linaje de pDC con al menos un antígeno, siendo a continuación las pDC pulsadas irradiadas y puestas en contacto con PBMC, y cultivadas, compartiendo las pDC y las PBMC al menos un alelo del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

25 **[0031]** Entre las enfermedades infecciosas se pueden citar las enfermedades cuyo agente es un microorganismo tal como una bacteria, un hongo, una levadura o incluso un virus y más en particular las infecciones debidas a los virus de influenza (ej.: gripe), VIH (ej.: SIDA), CMV (citomegalovirus), EBV (virus de Epstein-Barr; ej.: mononucleosis), HBV y HCV (ej.: hepatitis) y las enfermedades debidas a los virus emergentes.

30 **[0032]** Entre los cánceres susceptibles de ser tratados de manera profiláctica o terapéutica se pueden citar el melanoma, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón o incluso el cáncer de próstata y los cánceres inducidos por virus.

**[0033]** En los ejemplos siguientes, la invención se describirá en algunos de estos aspectos de forma detallada.

### 35 Descripción de las figuras

**[0034]**

#### **Figura 1: inducción de respuestas T CD8 específicas primarias y memorias *in vitro***

40 **Análisis por citometría de flujo del porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos a Día (D) 0 y a D7 del cultivo de PBMC obtenidas de donantes sanos con el linaje de pDC GEN2.2 pulsado con un péptido (respectivamente viral CMV pp65 y tumoral MelA) usando tetrámeros. Los porcentajes indicados corresponden a los porcentajes de linfocitos Tetrámero+ entre los linfocitos T CD8+.**

#### 45 **Figura 2: Eficacia de las estimulaciones repetidas para amplificar de los linfocitos T CD8 específicos**

**2a)** Análisis por citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ a D0 y a D40 del cultivo de PBMC obtenidas de donantes sanos con el linaje de pDC GEN2.2 pulsado con los péptidos CMVpp65 o MelA después de estimulaciones semanales en presencia de IL-2. Los porcentajes indicados corresponden a los porcentajes de linfocitos Tetrámero+ entre los linfocitos T CD8+.

50 **2b)** Evolución del porcentaje de linfocitos T CD8+ tetrámero+ y

**2c)** Amplificación ( $\times 10^6$ ) del número absoluto de linfocitos T CD8 específicos de MelA después de estimulación semanal de PBMC con las pDC pulsadas con MelA en presencia de IL-2 (el tetrámero FluM1 se muestra como control). Las flechas indican las reestimulaciones efectuadas (reestim).

#### 55 **Figura 3: inducción simultánea de respuestas T CD8 multispecíficas**

Análisis por citometría de flujo de la especificidad de los linfocitos T CD8+ a D7 (3a) o a D21 (3b) del cultivo de PBMC obtenidas de donantes sanos con el linaje de pDC GEN2.2 pulsado con una mezcla de diferentes péptidos derivados de antígenos víricos (obtenidos del virus EBV: BMLF1 y LMP2, fig 3a) o tumorales (melanoma: MelA, GP100, TYR, MAGE-3, fig 3b). Los porcentajes indicados corresponden a los porcentajes de linfocitos Tetrámero+

entre los linfocitos T CD8+.

**Figura 4: Los linfocitos T CD8 específicos generados son funcionales *in vitro* de forma limitada a HLA y antígeno**

- 5 **4a)** Restricción antigénica y por HLA-A2 de la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 específicos de MeIA generadas por cultivo de PBMC (donante HLA-A2) con el linaje de pDC GEN2.2 pulsado e irradiado con respecto a los linajes de melanoma: los linajes Me275 y A375 son HLA-A2, los linajes Me275 y COLO expresan el antígeno MeIA.
- 10 **4b)** Secreción de IFN $\gamma$  y expresión de superficie de CD107 de los linfocitos T CD8 específicos de FluM1 generados por el linaje de pDC GEN2.2 pulsado e irradiado después de la reestimulación (paneles de la izquierda y el centro) o no (panel de la derecha; -) en linfocitos T2 pulsados con el péptido FluM1 o un péptido de control (LMP2); relación efector/diana (E/T) = 10/1

**Figura 5: Comparación del linaje de pDC pulsado e irradiado según la invención con DC mieloides alogénicas o autólogas para inducir linfocitos T CD8 específicos de alta afinidad y alta avidéz**

- 15 **5a)** Análisis por citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ a D20 del cultivo de PBMC obtenidas de donantes sanos con respectivamente el linaje de pDC GEN2.2 (GEN), mDC alogénicas o autólogas pulsadas con el péptido MeIA después de estimulaciones semanales en ausencia de citocinas. Los porcentajes indicados corresponden a los porcentajes de linfocitos Tetrámero+ entre los linfocitos T CD8+.
- 20 **5b)** Amplificación del número absoluto de linfocitos T CD8+ específicos de MeIA a D20 del cultivo de PBMC obtenidas de donantes sanos con respectivamente el linaje de pDC GEN2.2 (GEN), mDC alogénicas o autólogas pulsadas con el péptido MeIA después de estimulaciones semanales en ausencia (-) o en presencia de citocinas IL-2 o IL-15.
- 25 **5c)** Comparación de la afinidad de los linfocitos T CD8 específicos generados respectivamente con el linaje de pDC (GEN2.2), mDC alogénicas (mDC alo) o autólogas (mDC auto) medida por la disociación del tetrámero en función del tiempo después del marcado.
- 30 **5d)** Comparación de la avidéz de los linfocitos T CD8 específicos generados respectivamente con el linaje de pDC GEN2.2 (GEN) o mDC alogénicas (mDC alo) medido por su actividad citotóxica con respecto a los linfocitos T2 pulsados con concentraciones de péptido decrecientes. Los resultados de c y d se expresan en porcentaje de la señal máxima obtenida (marcado máximo con el tetrámero y citotoxicidad máxima respectivamente).

**Figura 6: Los linfocitos T CD8 específicos generados por el linaje de pDC pulsado según la invención son funcionales *in vivo***

- 35 **6a)** Evolución del crecimiento tumoral de linajes humanos HLA-A2+ y CMVpp65+ implantados en ratones inmunodeficientes NOD-SCID b2m $^{-/-}$  después de transferencia adoptiva intratumoral de linfocitos T CD8 específicos de CMVpp65 o de FluM1 amplificadas por el linaje de pDC GEN2.2 pulsado e irradiado a partir de PBMC de un donante HLA-A2+. Se presenta una experiencia representativa. Las flechas indican las inyecciones de linfocitos T específicos.
- 40 **6b)** Comparación del tamaño de los tumores 20 días después de su implantación. Cada punto representa un ratón humanizado.
- 45 **6c)** Restricción antigénica y por el HLA de la eficacia terapéutica de los linfocitos T CD8 específicos generados por el linaje de pDC pulsado irradiado según la invención después de su transferencia adoptiva. Evolución del crecimiento tumoral de linajes humanos HLA-A2+ o HLA-A2- que expresan o no el antígeno CMVpp65+ implantados en ratones inmunodeficientes NOD-SCID b2m $^{-/-}$  después de la transferencia adoptiva por vía intratumoral de linfocitos T CD8 específicos de CMVpp65 o de FluM1 amplificadas por el linaje de pDC pulsado e irradiado según la invención a partir de PBMC de un donante HLA-A2.

**Figura 7: Respuesta a la vacunación por el linaje de pDC pulsado e irradiado según la invención en un modelo de ratones humanizados**

- 50 **7a)** Los ratones inmunodeficientes NOD-SCID b2m $^{-/-}$  se han reconstituido por vía intraperitoneal con PBMC HLA-A2 humanas y se les ha vacunado una vez por semana con el linaje de pDC pulsado e irradiado según la invención por la misma vía. Los gráficos presentan los linfocitos T CD8+ tetrámero+ en el sitio de vacunación (sitio de inmunización (lavado)), en la circulación (sangre) y en los órganos linfoides de los animales vacunados (tasa) con el linaje de pDC pulsado con los péptidos CMVpp65 o MeIA respectivamente 9 (D9) y 30 días (D30) después de la primera vacuna. Los porcentajes indicados corresponden a los porcentajes de linfocitos Tetrámero+ entre los linfocitos T CD8+.
- 55 **7b)** Porcentajes de linfocitos T CD8+ específicos antes (D0) y después de la vacunación con el linaje de pDC pulsado con los péptidos CMVpp65 o MeIA e irradiado (después de 1 vacuna y 3 refuerzos) en diferentes órganos de los ratones humanizados. Cada punto representa un ratón humanizado.

**Figura 8: Eficacia terapéutica de los linfocitos T CD8 generados después de vacunación por el linaje de pDC pulsado e irradiado según la invención en un modelo de ratones humanizados**

5 **8a)** Actividad citotóxica *ex vivo* de linfocitos T CD8 purificados a partir del lavado peritoneal (paneles de la izquierda) y de la tasa (paneles de la derecha) de ratones humanizados, vacunados con el linaje GEN2.2 pulsado con el péptido CMVpp65 (GEN-pp65) y después irradiado, con respecto a los linfocitos T2 pulsados con el péptido CMVpp65 o un péptido irrelevante (paneles superiores) y con respecto a los linajes HLA-A2+ o HLA-A2- que expresan o no el antígeno CMVpp65 (paneles inferiores). GRE es HLA-A2+, COL es negativo en HLA-A2.

10 **8b)** Evolución del crecimiento tumoral de un linaje de melanoma HLA-A2+ MelA+ implantado en ratones inmunodeficientes NOD-SCID b2m<sup>-/-</sup> humanizados y vacunados con el linaje de pDC GEN2.2 (GEN) pulsado con los péptidos MelA o FluM1, e irradiado.

15 **8c)** Análisis por citometría de flujo de suspensiones tumorales que muestran la presencia de linfocitos T CD8 específicos de MelA en el sitio tumoral de un ratón humanizado vacunado. El porcentaje indicado corresponde al porcentaje de linfocitos Tetrámero+ entre los linfocitos T CD8+.

**Figura 9: El linaje de pDC pulsado e irradiado según la invención permite inducir y amplificar linfocitos T CD8 específicos y funcionales en pacientes afectados de melanoma**

20 **9a)** Análisis por citometría de flujo de los linfocitos T CD8+ a D0 y a D15-20 del cultivo de PBMC, obtenidos de pacientes HLA-A2+ afectados de melanoma, con el linaje de pDC pulsado con péptidos derivados de los antígenos MelA, GP100, MAGE3 y tirosinasa (TYR), e irradiado. Los porcentajes indicados corresponden a los porcentajes de linfocitos Tetrámero+ entre los linfocitos T CD8+.

25 **9b)** Actividad citotóxica de los linfocitos T CD8+ específicos de MelA generados por el linaje de pDC pulsado según la invención, a partir de PBMC obtenidas de pacientes HLA-A2+ afectados de melanoma, con respecto a los linfocitos T2 pulsados con el péptido MelA o un péptido de control.

**Figura 10: inducción de respuestas T CD8 específicas primarias y memorias *in vitro***

30 Porcentajes de linfocitos T CD8+ específicos a Día (D) 0 y en diferentes momentos del cultivo de PBMC obtenidos de donantes sanos con el linaje de pDC GEN2.2 pulsado con un péptido (respectivamente Flu M1 vírico y MelA tumoral), analizados por citometría de flujo usando tetrámeros. Los porcentajes indicados corresponden a los porcentajes de linfocitos Tetrámero+ entre los linfocitos T CD8+. Cada punto representa los resultados obtenidos con un donante (n=20 para Flu y n=18 para MelA). La media se representa por una barra horizontal, los porcentajes indicados son los máximos afectados.

**Figura 11: Efecto de la irradiación en la activación del linaje de pDC y en su capacidad de inducir una respuesta T específica**

35 **11a)** Análisis por citometría de flujo del grado de expresión de las moléculas HLA-A2 y de las moléculas de estimulación en la superficie del linaje de pDC irradiado o no, y después cultivadas durante 24 h, en comparación con DC mieloides tratadas en las mismas condiciones.

40 **11b)** Análisis por citometría de flujo del grado de expresión de las moléculas HLA-A2 y CD40 en la superficie del linaje de pDC irradiado o no, en presencia de ligandos de TLR7 (virus de influenza inactivado: Flu) o de TLR9 (CpGA), y después cultivadas durante 24 h.

45 **11c)** Análisis comparativo por citometría de flujo del porcentaje de linfocitos T CD8+ específicos después de 7 días de cultivo de PBMC obtenidas de donantes sanos con el linaje de pDC GEN2.2 irradiado o no y pulsado con el péptido Flu. Los porcentajes indicados corresponden a los porcentajes de linfocitos Tetrámero+ entre los linfocitos T CD8+.

**Figura 12: Eficacia del linaje de pDC para amplificar *ex vivo* linfocitos T CD8+ antitumorales específicos a partir de PBMC y TIL de pacientes portadores de un melanoma en estadio I-IV.**

50 Las PBMC (n=12) y TIL (n=6) que provienen de pacientes portadores de melanoma (estadios I a IV) se han cultivado con el linaje de pDC pulsado con un péptido (a-b) o una mezcla de cuatro péptidos tumorales (MelA, GP100, TYR o/y MAGE-3) (c-d), e irradiado. Los cultivos se han reestimulado cada semana, en presencia de IL2.

55 a-d) Análisis por citometría de flujo del porcentaje de linfocitos T CD8+ tetrámero+ en el curso de los cultivos (20 días) de las PBMC (a, b) o de los TIL (c, d) con el linaje de pDC pulsado e irradiado. Se muestra una experiencia representativa realizada con PBMC (a) o TIL (c) (análisis a D20). Se muestran los resultados del conjunto de experiencias realizadas para las PBMC (b) y para los TIL (d), con una medida de los porcentajes de CD8+ tetrámeros+ inicial (D0) y después de 7, 14 y 20 días de cultivo. Cada punto representa un paciente, las barras horizontales representan la media, los porcentajes indicados son los máximos afectados.

e-h) Análisis de la funcionalidad y de la especificidad de los linfocitos T antitumorales inducidos por el linaje de pDC pulsado e irradiado, a partir de las PBMC y los TIL. e) Medida de la secreción de IFN $\gamma$  por los linfocitos T generados

a partir de PBMC activados por el linaje de pDC pulsado por los péptidos MelA o GP100 por citometría de flujo, después de la reestimulación por linfocitos T2 pulsados con el péptido relevante o un péptido de control (experiencia representativa de 8 realizadas con PBMC (n=6) y TIL (n=2). Los porcentajes indicados corresponden a los porcentajes de linfocitos T CD8+ tetrámeros+ que producen IFN $\gamma$ .

- 5 f-h) Medida de la citotoxicidad (precipitación de  $^{51}\text{Cr}$ ) de los linfocitos T generados. Los linfocitos T purificados después de 15 a 20 días de cultivo a partir de PBMC o de TIL se han usado como efectores en una prueba de citotoxicidad contra el linaje T2 pulsado, de las células de melanoma alogénicas y autólogas, así como de las células no tumorales CD45+ autólogas. f) Las PBMC (paciente #9) se han activado mediante el linaje de pDC pulsado con el péptido MelA, y los TIL (paciente #11) se han activado mediante el linaje de pDC pulsado con una mezcla de los  
10 cuatro péptidos MelA, GP100, TYR y MAGE-3. Estas experiencias son representativas de 12 realizadas con PBMC y 6 realizadas con TIL. g) Porcentaje de lisis de las células tumorales autólogas en comparación con las células no tumorales CD45+ autólogas inicialmente y después de la estimulación de TIL. Estas dos experiencias son representativas de seis muestras de TIL analizadas. h) Comparación de la eficacia de la lisis de las dianas indicadas por los TIL antes y después de la estimulación por el linaje de pDC pulsado con una mezcla de cuatro péptidos  
15 tumorales. Se muestra la media +/- EC de los porcentajes de lisis medidas en la relación 60:1 (n=6).

## EJEMPLOS

### 20 **Ejemplo 1 - el linaje de pDC GEN 2.2 permite la inducción de respuestas T CD8 primarias y memorias específicas de un antígeno de interés *in vitro* a partir de células de sujetos sanos**

[0035] Se ha probado la capacidad de las células GEN2.2 de inducir una respuesta T CD8 específica de antígeno en situación semialogénica cultivando células del linaje GEN2.2 (en lo sucesivo: células GEN2.2), pulsadas con un péptido de interés e irradiadas, con células mononucleadas de sangre periféricas (PBMC) de donantes  
25 voluntarios sanos HLA2+.

[0036] Para pulsar las células GEN2.2 con un péptido de interés, se lavan 3 veces en medio RPMI completo (RPMI 1640 Glutamax suplementado con 1 mM de piruvato de sodio, 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de gentamicina, 100  $\mu\text{M}$  de aminoácidos no esenciales) sin SVF y se resuspenden a  $1.10^6/\text{ml}$ . A las células se les añaden 100 ng/ml de  $\beta 2$ -  
30 microglobulina y se incuban 10 min a  $37^\circ\text{C}$  (horno). A continuación se añade el péptido de interés a razón de 10  $\mu\text{M}$ . A continuación se incuban la suspensión celular 3 h a  $37^\circ\text{C}$  (horno) con agitación regular. A continuación se lavan las células, se irradian a 30 Gy y se resuspenden a  $2 \cdot 10^5/\text{ml}$  en medio RPMI completo con adición del 10% de suero de ternera fetal. Las PBMC se purifican por Ficoll a partir de una bolsa de sangre de un donante sano. Se vuelven a suspender a  $2 \cdot 10^6/\text{ml}$  en medio RPMI completo con adición del 10% de suero de ternera fetal. Las células GEN2.2  
35 pulsadas e irradiadas se someten a cocultivo con las PBMC semialogénicas HLA-A2+ en una placa de 24 pocillos ( $2 \cdot 10^5$  GEN2.2 +  $2 \cdot 10^6$  PBMC/2 ml) durante 7 días a  $37^\circ\text{C}$ . El fenotipo de los linfocitos T CD8 se realiza al principio de la experimentación (D0) y después de 7 días de cultivo (D7). La especificidad de los linfocitos T CD8 se analiza gracias a un marcado mediante tetrámeros (Figura 1).

40 [0037] El cocultivo de PBMC con el linaje de pDC GEN2.2 pulsado con un péptido derivado de antígenos víricos o tumorales e irradiado permite inducir y amplificar los linfocitos T CD8 específicos del péptido de interés con una gran eficacia en sólo 7 días de cultivo. Los autores de la invención han demostrado la inducción de respuestas primarias dirigidas contra los antígenos tumorales MelA, GP100, MAGE-3, tirosinasa y NY-ESO1, y de respuestas memorias dirigidas contra los antígenos víricos FluM1, CMVpp65, EBV BMLF1, EBV LMP2 usando esta estrategia.  
45

### 45 **Ejemplo 2 - el linaje de pDC pulsado e irradiado permite la amplificación masiva de linfocitos T CD8 específicos de un antígeno de interés**

[0038] Para optimizar la inducción de linfocitos T específicos, las células se han reestimulado regularmente con las células GEN2.2 pulsadas e irradiadas, en presencia de IL2. Para ello, las células se han puesto en cultivo tal como describe anteriormente. Después de 7 días de cultivo, las células se recuperan, se lavan, se cuentan y se ponen en suspensión a  $2 \cdot 10^6/\text{ml}$  en medio RPMI completo con adición del 10% de suero de ternera fetal. Se vuelven a poner en cultivo en una placa de 24 pocillos con células GEN2.2 pulsadas e irradiadas a razón de  $2 \cdot 10^5/\text{ml}$  en presencia de IL2 a 200 U/ml. Este proceso se renueva cada 7 días. El porcentaje y el número absoluto de  
55 linfocitos T CD8 específicos del péptido usado se evalúan antes de cada reestimulación.

[0039] Tal como muestra la Figura 2, las estimulaciones repetidas por el linaje GEN2.2 pulsado irradiado en presencia de citocinas (IL-2) permiten la amplificación masiva de linfocitos T CD8 específicos del péptido usado con una eficacia muy grande. Esto puede conducir a la amplificación exclusiva de los linfocitos T CD8 específicos del

péptido de interés (obtención de más del 97% de linfocitos T CD8 tetrámero+) y a su amplificación concomitante (multiplicación por un factor 20.000.000 del número absoluto de linfocitos T CD8 específicos) a la vez para los antígenos víricos y tumorales.

**5 Ejemplo 3 - el linaje de pDC GEN2.2 permite la inducción simultánea de respuestas T CD8 primarias o memorias multiespecíficas**

**[0040]** Para evaluar la posibilidad de inducir respuestas T multiespecíficas, las células del linaje GEN2.2 se han pulsado simultáneamente con varios péptidos derivados de antígenos víricos (BMLF1, LMP2) o de antígenos tumorales (MelanA, GP100, tirosinasa, MAGE-3), y después se han irradiado. A continuación se han cultivado con PBMC semialogénicas HLA-A2+, según los protocolos descritos anteriormente. En las PBMC, los porcentajes iniciales de linfocitos Tetrámero+ (BMLF1, LMP2, MelA, GP100, TYR, o MAGE-3) entre los linfocitos T CD8+ eran estrictamente inferiores al 0,05%. La amplificación de los linfocitos T CD8 específicos de cada uno de los péptidos usados se analiza gracias a un marcado del tetrámero a 7 días (para EBV, los péptidos BMLF y LMP2, Figura 3a) o a 21 días de cultivo con dos reestimulaciones (para MelA, GP100, TYR y MAGE-3, Figura 3b).

**[0041]** El uso del linaje de pDC pulsado con una mezcla de diferentes péptidos permite así inducir simultáneamente los linfocitos T CD8 específicos de cada uno de los péptidos usados, a la vez en modelos víricos y tumorales.

**20 Ejemplo 4 - los linfocitos T específicos generados por el linaje de pDC GEN2.2 presentan muy buena funcionalidad *in vitro***

**[0042]** Se han usado tres procedimientos para evaluar la funcionalidad de los linfocitos T CD8 generados por el linaje de pDC pulsado GEN2.2: prueba de citotoxicidad, secreción de IFN $\gamma$  y expresión de membrana de CD107 después de la reestimulación específica.

**[0043]** Se evalúa la actividad citotóxica de los linfocitos T específicos generados por el linaje GEN2.2 mediante una prueba de precipitación de <sup>51</sup>Cr. Para ello, después de la estimulación de PBMC semialogénicas con células GEN2.2 pulsadas con el péptido MelA e irradiadas, se recuperan las células y se purifican los linfocitos T CD8+ (tri T CD8 EasySep por selección negativa) y se ponen en presencia de células diana marcadas con <sup>51</sup>Cr en diferentes relaciones (relación E:T comprendida entre 60:1 y 7,5:1) durante 4 h. A continuación se efectúa una dosificación del <sup>51</sup>Cr en el sobrenadante. Los linfocitos T anti-MelA son capaces por ejemplo de lisar eficazmente las células tumorales HLA-A2+ que expresan Melan-A (Me275) pero no tienen actividad citotóxica frente a las células tumorales que no expresan MelA (A375) o que no son HLA-A2 (COLO829) (Figura 4a).

**[0044]** Se ha evaluado también la capacidad efectora de los linfocitos T específicos por su capacidad de secretar IFN $\gamma$  y de expresar CD107 en superficie después de la reestimulación específica. Para ello después de la estimulación de PBMC semialogénicas con células GEN2.2 pulsadas con el péptido fluM1 e irradiadas, las células se recuperan y se cuentan y se realiza un marcado tetrámero (30 min a temperatura ambiente). Después del lavado, las células se ponen en suspensión a 1-10<sup>6</sup>/200 ml en medio RPMI con SVF al 10%. Los linfocitos T2 pulsados con el péptido de interés (fluM1) o un péptido de control (LMP2) se añaden o no (relación células efectoras:células reestimulantes = 10:1). Para la secreción de IFN $\gamma$ , las células se reestiman durante 5 h 30 a 37°C en presencia de brefeldina A (GolgiPlug a 1  $\mu$ l/ml) durante las 3 últimas horas. Después del marcado antígenos de superficie (CD3, CD8) se realiza a continuación un marcado intracelular de IFN $\gamma$  (Figura 4b). Para medir la expresión de CD107, se añaden los anticuerpos anti-CD107a y anti-CD107b (20 ml/10<sup>6</sup> células) durante toda la reestimulación y se incuban las células durante 5 h a 37°C en presencia de monensina (GolgiSTOP a 0,67  $\mu$ l/ml) durante las 4 últimas horas. A continuación se realiza un marcado de los antígenos de superficie (CD3, CD8) (Figura 4b). El análisis del marcado de IFN $\gamma$  y de CD107 se efectúa en los linfocitos T CD8+ tetrámero+. Así los linfocitos T CD8+ anti-FluM1 generados gracias al linaje GEN son capaces de secretar IFN $\gamma$  y de expresar CD107 específicamente después de la reestimulación por linfocitos T2 pulsados con FluM1 y no después de la reestimulación por linfocitos T2 pulsados con otro péptido (T2 LMP2) o en ausencia de reestimulación (Figura 4b).

**[0045]** Los linfocitos T CD8 específicos de un antígeno generados por el linaje de pDC GEN2.2 son así capaces de destruir las células diana que expresan este antígeno de forma restringida por el HLA. Secretan específicamente IFN $\gamma$  y expresan CD107 después de la reestimulación por células que presentan el péptido del que son específicas en el contexto HLA adecuado.

**Ejemplo 5 - el linaje de pDC GEN2.2 permite inducir y amplificar linfocitos T CD8 específicos de un antígeno**

**de interés con una mayor eficacia que las células dendríticas mieloides (mDC) y les confiere un mayor poder funcional**

**[0046]** Los autores de la invención han comparado las capacidades del linaje de pDC GEN2.2 con las de las células dendríticas mieloides (mDC) alogénicas o autólogas para la inducción de linfocitos T CD8 específicos y han evaluado sus propiedades funcionales.

**[0047]** Para generar las mDC, se han purificado monocitos por clasificación negativa (uso del kit EasySep®, según las recomendaciones del fabricante) a partir de PBMC y se han cultivado a  $0,5 \cdot 10^6$  células/ml en medio RPMI con SVF al 10% en presencia de GM-CSF (500 U/ml) y de IL4 (10 ng/ml) durante 6 días. A continuación se pulsan las mDC y las células GEN2.2 con un péptido de interés tal como describe en el ejemplo 1, irradiadas y cultivadas con PBMC HLA-A2+ semialogénicas o autólogas (para las mDC). Se efectúan reestimulaciones cada 7 días en presencia de IL2 200 U/ml o de IL 15 (5 ng/ml). Se evalúa el porcentaje (Figura 5a) y el número absoluto (Figura 5b) de linfocitos T CD8 tetramero+ respectivamente a 7 y 20 días de cultivo después de la estimulación de las PBMC con GEN2.2, de las mDC alogénicas o las mDC autólogas pulsadas con MeIA. El linaje GEN2.2 permite una inducción mucho más eficaz de linfocitos T anti-MeIA en comparación con las mDC alogénicas o autólogas en condiciones basales o en presencia de citocinas. La afinidad de los linfocitos T CD8 generados en las diferentes condiciones se mide mediante la disociación del tetramero a 37°C. Para ello un marcado tetramero de los linfocitos T CD8 específicos se realiza (30 min a 4°C). Después del lavado, las células se incuban a 37°C. Después de diferentes tiempos de incubación (de 0 a 16 h), las células se recuperan y se fijan para su análisis por citometría en flujo. Se evalúa la disociación del tetramero en porcentaje del marcado tetramero inicial (Figura 5c). Se mide la avidez de los linfocitos T CD8 generados en las diferentes condiciones por su actividad citotóxica en los linfocitos T2 pulsados con concentraciones peptídicas decrecientes (de 1 a 0,0001  $\mu$ M). La citotoxicidad se expresa en porcentaje de la citotoxicidad máxima observada (Figura 5d). Los linfocitos T anti-MeIA generados por el linaje GEN2.2 presentan una afinidad más intensa y una mayor avidez con respecto a los linfocitos T anti-MeIA generados por las mDC alogénicas o autólogas.

**[0048]** El linaje de pDC GEN2.2 es mucho más eficaz que las mDC para inducir linfocitos T específicos (obtención de un mayor porcentaje de linfocitos Tetramero+ en las mismas condiciones) y sobre todo para amplificar los linfocitos T específicos (amplificación diez veces más intensa con las pDC con respecto a las mDC). Además, el linaje GEN2.2 confiere a los linfocitos T específicos un mayor poder funcional ya que adquieren una mayor afinidad y una avidez más intensa las células generadas con las mDC.

**Ejemplo 6 - los linfocitos T específicos generados por el linaje de pDC presentan una muy buena actividad antitumoral *in vivo* por transferencia adoptiva**

**[0049]** Se ha evaluado la eficacia funcional de los linfocitos T específicos generados *in vitro* por el linaje de pDC GEN2.2 *in vivo* por su capacidad de inhibir el desarrollo de un tumor humano implantado en un ratón inmunodeficiente.

**[0050]** Se establece un tumor en ratones NOD-SCID b2m<sup>-/-</sup> por inyección de 1 a  $2,5 \cdot 10^6$  células tumorales por vía subcutánea en el flanco. En paralelo, se generan linfocitos T CD8 específicos de un antígeno de interés *in vitro* por el linaje GEN2.2 como describe anteriormente. Después de la selección de los linfocitos T CD8+ por clasificación negativa (uso del kit EasySep® según las recomendaciones del fabricante), a continuación se transfieren de 1 a  $5 \cdot 10^6$  linfocitos T CD8+ por vía intratumoral a razón de 4 inyecciones espaciadas 4-5 días. A continuación se mide la evolución del crecimiento tumoral. La Figura 6a muestra la evolución del crecimiento del tumor GRE pp65 (HLA-A2+CMVpp65+) después de la transferencia adoptiva de linfocitos T CD8+ anti-CMVpp65 o anti-FluM1. La Figura 6b muestra la comparación de los tamaños tumorales 20 días después de su implantación después del tratamiento con linfocitos T CD8+ anti-CMVpp65 o anti-FluM1 (cada punto representa un ratón).

**[0051]** Los linfocitos T anti-CMVpp65 generados *in vitro* por el linaje GEN permiten así inhibir el desarrollo de un tumor HLA-A2+CMVpp65+. La eficacia terapéutica de las células inyectadas observada está limitada por el HLA y el antígeno ya que este tratamiento no permite la inhibición del desarrollo de tumores que no son HLA-A2 (COL pp65) o que no expresan el antígeno contra el cual se dirigen (GRE IE) (Figura 6c).

**Ejemplo 7 - el linaje de pDC permite inducir una respuesta T específica primaria o memoria *in vivo* por vacunación**

**[0052]** Para evaluar la capacidad del linaje de pDC GEN2.2 de inducir una respuesta T específica *in vivo*, se

ha desarrollado un modelo de ratones humanizados (ratones inmunodeficientes reconstituidos con un sistema inmunitario humano).

**[0053]** Para ello, se inyectan  $50 \cdot 10^6$  de PBMC por vía intraperitoneal en ratones NOD-SCID b2m<sup>-/-</sup>. Al día siguiente se inyectan  $5 \cdot 10^6$  células GEN2.2 pulsadas con un péptido de interés e irradiadas por vía intraperitoneal. La vacunación se renueva o no 1 vez/semana. En momentos diferentes después de la vacunación (9 días para vacuna CMV, 30 días para vacuna MeIA), se evalúa la inducción de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos en el sitio de inmunización (lavado), de la circulación y en órganos linfoides secundarios (tasa, ganglios). Para ello se someten los ratones a una extracción de sangre y después se sacrifican. Un lavado del peritoneo con 15 ml de medio RPMI permite recuperar las células del sitio de inmunización. A continuación se extraen los órganos linfoides y se lleva a cabo una suspensión celular después de la digestión con ayuda de colagenasa 2,5 mg/ml. Se realiza un marcado de los linfocitos T CD8 específicos por tetrámero. La Figura 7a presenta un ejemplo obtenido con un ratón en cada caso, la Figura 7b presenta el nivel inicial de los linfocitos T CD8 tetrámero<sup>+</sup> entre las PBMC y el conjunto de las respuestas a la vacunación CMV o MeIA obtenidas. Así una vacunación por linaje de pDC pulsado según la invención permite inducir de manera muy eficaz respuestas T CD8 específicas *in vivo*, a la vez en el sitio de inmunización pero también en circulación y en los órganos linfoides secundarios. Los autores de la invención han demostrado una respuesta a la vacunación *in vivo* con los antígenos víricos FluM1, EBV BMLF1, EBV LMP2, CMVpp65 y con los antígenos tumorales MeIA, GP100, MAGE-3, tirosinasa.

**[0054]** La inyección del producto (linaje de pDC GEN2.2 pulsado irradiado) *in vivo* permite inducir las respuestas T específicas directamente en el receptor, a la vez para los antígenos víricos y tumorales. Los niveles de respuesta obtenidos son elevados con respecto a los niveles de referencia conocidos. Esto muestra la viabilidad del uso del producto como vacuna celular. Esta eficacia aporta la prueba de concepto preclínica de la eficacia terapéutica de este producto como vacuna celular.

**Ejemplo 8 - los linfocitos T específicos generados *in vivo* después de vacunación por el linaje de pDC presentan una muy buena funcionalidad**

**[0055]** Los autores de la invención han evaluado la eficacia terapéutica de la respuesta inducida *in vivo* después de la vacunación por una parte por la actividad citotóxica *ex vivo* de los linfocitos T CD8 específicos, y por otra parte por el efecto en el desarrollo de un tumor *in vivo*.

**[0056]** Los ratones NOD-SCID b2m<sup>-/-</sup> se han reconstituido con  $50 \cdot 10^6$  de PBMC por vía intraperitoneal y después se han vacunado con  $5 \cdot 10^6$  células GEN2.2 pulsadas con un péptido derivado de CMV (CMVpp65) e irradiado. Nueve días después de la vacunación, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se purifican a partir de toma de muestras del sitio de inmunización y de los órganos linfoides (clasificación negativa con el kit EasySep, usado según las consignas del fabricante) y se evalúa su actividad citotóxica contra los linfocitos T2 pulsados con el péptido CMVpp65 o un péptido de control (fluM1) (Figura 8a), y en las células tumorales HLA-A2<sup>+</sup> (GRE pp65) o HLA-A2<sup>-</sup> (COL pp65) que expresan el antígeno correspondiente o no (GRE IE) (Figura 8a). Tal como muestra la Figura 8a, los linfocitos T CD8 específicos generados *in vivo* después de la vacunación presentan una actividad citotóxica en los linfocitos T2 y en las células tumorales HLA-A2<sup>+</sup> que expresan el antígeno del que son específicos.

**[0057]** Para evaluar la eficacia terapéutica de la vacunación por linaje de pDC pulsado según la invención en el desarrollo de un tumor, se han reconstituido los ratones NOD-SCID b2m<sup>-/-</sup> con  $50 \cdot 10^6$  células de PBMC por vía intraperitoneal y después se han vacunado con  $5 \cdot 10^6$  células del linaje GEN2.2 pulsados con un péptido derivado de MeIA o de Flu (FluM1) 1 vez por semana. De cinco a diez días después de la primera vacunación se han implantado  $10 \cdot 10^6$  células tumorales HLA-A2<sup>+</sup> MeIA<sup>+</sup> (Me275) en el flanco por vía subcutánea. A continuación se observa la evolución del crecimiento tumoral (Figura 8b). A continuación se busca la presencia de linfocitos T CD8 específicos de MeIA en el sitio tumoral mediante el análisis por citometría de flujo de una suspensión del tumor 1 mes después de su implantación (Figura 8c). Así, la vacunación por linaje de pDC pulsado según la invención permite inhibir el desarrollo de un tumor HLA-A2<sup>+</sup> que expresa el antígeno de interés usado para pulsar las células GEN. Los linfocitos T CD8 específicos del péptido de interés generados por la vacunación son capaces de migrar en el sitio de expresión del antígeno y de lisar las células tumorales.

**[0058]** Los ejemplos muestran que los linfocitos T CD8 específicos inducidos *in vivo* por vacunación presentan una eficacia citotóxica *ex vivo* limitada por el HLA y el antígeno, y son capaces de migrar en el sitio de expresión del antígeno del que son específicos y de inhibir el desarrollo de un tumor.

**Ejemplo 9 - el linaje de pDC GEN2.2 permite la inducción y amplificación de linfocitos T CD8 específicos de**

**antígenos de interés y funcionales a partir de células de pacientes afectados de cáncer**

**[0059]** Para analizar si el linaje de pDC pulsado según la invención permite amplificar una respuesta T específica en pacientes afectados de cáncer, los autores de la invención han cultivado PBMC obtenidas de 5 pacientes HLA-A2 afectados por melanoma en estadio IV con las células GEN2.2 pulsadas con los péptidos derivados de MelA, GP100, MAGE-3 o tirosinasa según el mismo protocolo que en el ejemplo 2. Los linfocitos T CD8+ específicos son analizados por citometría de flujo antes de la estimulación y después de 3 estimulaciones por las células GEN pulsadas (Figura 9a). A continuación se ha evaluado la funcionalidad de los linfocitos T CD8 generados midiendo su actividad citotóxica en los linfocitos T2 pulsados con el péptido de interés o un péptido de control (FluM1) (Figura 9b) según el mismo protocolo que en el ejemplo 4.

**[0060]** El linaje de pDC GEN2.2 permite así inducir una amplificación masiva de linfocitos T CD8 específicos de diferentes antígenos tumorales a partir de las células de pacientes afectados de cáncer. La actividad citotóxica de los linfocitos T generadas confirma su funcionalidad antitumoral.

**Ejemplo 10: El linaje de pDC GEN2.2 permite la inducción de respuestas T CD8 primarias y memorias específicas de un antígeno de interés en todos los donantes sometidos a prueba.**

**[0061]** Se ha probado la capacidad de las células GEN2.2 de inducir una respuesta T CD8+ específica de antígeno en situación semialogénica cultivando las células del linaje de pDC pulsado e irradiado en presencia de PBMC de donantes voluntarios sanos HLA-A\*0201+. La inducción de una respuesta memoria se evalúa usando el péptido MelanA, la inducción de una respuesta memoria se evalúa con ayuda del péptido flu M1 de la matriz de influenza.

**[0062]** Para pulsar las células GEN2.2 con un péptido de interés, éstas se lavan 3 veces en medio RPMI completo (RPMI 1640 Glutamax suplementado por 1 mM de piruvato de sodio, 20 µg/ml de gentamicina, 100 µM de aminoácidos no esenciales) sin SVF y se vuelven a suspender a  $1 \cdot 10^6$ /ml. A las células se les añaden 100 ng/ml de  $\beta$ 2-microglobulina y se incuban 10 min a 37°C (horno). A continuación se añade el péptido de interés a razón de 10 µM (Flu M1) o 1 µM (MelA). A continuación se incuba la suspensión celular 3 h a 37°C (horno) con agitación regular. 30 A continuación se lavan las células, irradiadas a 30 Gy y se vuelven a suspender a  $2 \cdot 10^5$ /ml en medio RPMI completo con adición del 10% de suero de ternera fetal. Las PBMC se purifican por Ficoll a partir de bolsas de sangre de donantes sanos. Se vuelven a suspender a  $2 \cdot 10^6$ /ml en medio RPMI completo con adición del 10% de suero de ternera fetal. Las células GEN2.2 pulsadas e irradiadas se someten a cocultivo con las PBMC semialogénicas HLA-A2+ en una placa de 24 pocillos ( $2 \cdot 10^5$  GEN2.2 +  $2 \cdot 10^6$  PBMC/2 ml) durante 7 a 20 días a 37°C. Se llevan a cabo reestimulaciones semanales de los cultivos en el modelo Mel A, en las mismas condiciones que inicialmente, con adición de IL-2 (200 U/ml). Se evalúa el fenotipo de los linfocitos T CD8 al principio de la experimentación (D0) y después de 7 días de cultivo (D7) para la medida de la respuesta anti-FluM1 y después de 7, 14 y 20 días para la medida de la respuesta anti-MelA. La especificidad de los linfocitos T CD8 se analiza gracias a un marcado mediante tetrameros (Figura 10).

**[0063]** Después de 7 días de cultivo, los porcentajes de linfocitos T tetrameros+ específicos del antígeno vírico Flu son en promedio del 11% (del 0,1 al 49%) (20 cultivos realizados a partir de las PBMC de donantes diferentes). Los porcentajes de linfocitos T antitumorales dirigidos contra MelA alcanzan en promedio el 22% (del 2 al 60%) después de 20 días de cultivo (18 cultivos realizados a partir de las PBMC de donantes diferentes). Los 45 porcentajes respectivos iniciales de linfocitos T tetrameros+ anti Flu y anti MelA eran en promedio del 0,23 y el 0,02%.

**[0064]** Los autores de la invención demuestran en este ejemplo que con esta estrategia es posible que el 100% de los donantes (HLAA\* 0201) amplifiquen los linfocitos T específicos de antígenos, en el contexto de una 50 respuesta primaria o memoria.

**Ejemplo 11: La irradiación del linaje de pDC induce su maduración.**

**[0065]** Las células del linaje de pDC pulsado e irradiado inducen la amplificación de los linfocitos T específicos HLA-A\*0201. Los autores de la invención han evaluado el efecto de la irradiación en la maduración de las pDC, en comparación con las células dendríticas mieloides.

**[0066]** Se han generado células dendríticas mieloides (MoDC) a partir de monocitos purificados por clasificación negativa (uso del kit EasySep®, según las recomendaciones del fabricante) a partir de PBMC y se han

cultivado a  $0,5 \cdot 10^6$  células/ml en medio RPMI con SVF al 10% en presencia de GM-CSF (500 U/ml) y de IL4 (10 ng/ml) durante 6 días.

**[0067]** Se han irradiado las células del linaje GEN2.2 y las células dendríticas mieloides (dos donantes diferentes) (30 Gray) y se han puesto en cultivo en medio RPMI con SVF al 10% durante 24 h, y después se han fenotipado. Se ha llevado un seguimiento de los niveles de expresión de las moléculas CD40, CD80, CD86 y HLA-A2 por citometría de flujo (Fig 11a). La irradiación induce el aumento de la expresión de estas cuatro moléculas específicamente en las pDC y no en las MoDC.

**[0068]** Se ha comparado el efecto de la irradiación de las pDC con el efecto de inductores fuertes de maduración de las pDC que son el virus de la influenza (Flu, ligando de TLR7) y el CpG 2336 (ligando de TLR9). Se han irradiado las células del linaje GEN2.2 (30 Gray) o no y se han puesto en cultivo en presencia o no de virus de la influenza inactivado o de CpG 2336, durante 24 h. A continuación se han fenotipado las células, y se ha medido la expresión de HLA-A2 y CD40 por citometría de flujo. La irradiación induce una maduración de las células del linaje GEN2.2 tan importante como la observada en presencia de los ligandos de TLR7 o 9 (Fig 11 b).

**[0069]** Para evaluar la influencia de la maduración inducida por la irradiación de las células GEN2.2 en la inducción de las respuestas T, se han pulsado las células del linaje GEN2.2 con el péptido Flu, y después se han irradiado o no. A continuación se han cultivado con PBMC semialogénicas HLA-A2+, según los protocolos descritos anteriormente. La amplificación de linfocitos T CD8 específicos del péptido Flu se analiza gracias a un marcado tetrámero a 7 días (Figura 11c). Las pDC no irradiadas son incapaces de inducir la proliferación de los linfocitos T específicos. La irradiación es así un elemento indispensable del procedimiento descrito.

**Ejemplo 12: el linaje de pDC pulsado e irradiado permite la amplificación masiva de linfocitos T CD8 específicos de antígenos tumorales a partir de PBMC y de TIL de pacientes portadores de un melanoma.**

**[0070]** Se ha comprobado la capacidad de las células GEN2.2 de inducir una respuesta T CD8 específica de antígenos tumorales a partir de los linfocitos T de pacientes portadores de un melanoma en situación semialogénica cultivando células del linaje GEN2.2 (en lo sucesivo: células GEN2.2), pulsadas con un péptido de interés, o una mezcla de cuatro péptidos de interés e irradiadas, con células mononucleadas de sangre periféricas (PBMC) o los linfocitos T que infiltran el tumor (TIL) de pacientes HLA-A2+ portadores de un melanoma.

**[0071]** Las PBMC se purifican por Ficoll a partir de un tubo de sangre de sujetos portadores de un melanoma (n=12). Se han medido inicialmente los porcentajes de linfocitos T CD8+ tetrámeros + específicos de los antígenos MelanA, GP100, Tirosinasa y MAGE3, estaban comprendidos en promedio entre el 0,02 y el 0,03%.

**[0072]** Se han purificado las células tumorales y los TIL a partir de biopsias tumorales, dilaceradas mecánicamente y después digeridas enzimáticamente (Colagenasa + ADNasa). Las células tumorales contenidas en estas suspensiones celulares se han separado de los TIL por su propiedad de adherencia al plástico. Estas células tumorales se han cultivado en RPMI con SVF al 10% y se han amplificado antes de ser congelados y usados como fuente de células tumorales autólogas en ciertas experiencias. Se han medido inicialmente los porcentajes de linfocitos T CD8+ tetrámeros + específicos de los antígenos MelanA, GP100, Tirosinasa y MAGE3 en los TIL, que en promedio eran del 0,17; 0,2; 0,05 y 0,3%, respectivamente.

**[0073]** Se ha evaluado la capacidad de las células del linaje GEN2.2 de amplificar los linfocitos T específicos de antígenos tumorales a partir de las PBMC y los TIL de los pacientes.

**[0074]** Las células GEN2.2 se han pulsado tal como se describe anteriormente con un péptido de interés (concentración de cada péptido: 10  $\mu$ M), o una mezcla de los cuatro péptidos obtenidos de antígenos tumorales estudiados (concentración de cada péptido: 2,5  $\mu$ M). Brevemente, la suspensión celular se incubó 3 h a 37°C con el o los péptidos, y después se lavan las células, se irradian a 30 Gy y se vuelven a suspender a  $2 \cdot 10^5$ /ml en medio RPMI completo con adición del 10% de suero de ternera fetal.

**[0075]** Las PBMC o los TIL se vuelven a suspender a  $2 \cdot 10^6$ /ml en medio RPMI completo con adición del 10% de suero de ternera fetal. Las células GEN2.2 pulsadas e irradiadas se someten a cocultivo con estos linfocitos semialogénicos HLA-A2+ en una placa de 24 pocillos ( $2 \cdot 10^5$  GEN2.2 +  $2 \cdot 10^6$  PBMC o TIL/2 ml) durante 7 días a 37°C. Se vuelven a estimular los cultivos en las mismas condiciones cada 7 días, con adición de IL2 (200 U/ml). El fenotipo de los linfocitos T CD8 después de 7, 14 y 20 días de cultivo (D7, D14, D21). La especificidad de los linfocitos T CD8 se analiza gracias a un marcado mediante tetrámeros, a partir de las PBMC (Figura 12a y b), y a

partir de los TIL (Figura 12c y d).

**[0076]** El cocultivo de PBMC con el linaje de pDC GEN2.2 pulsado con un péptido derivado de antígenos tumorales e irradiado permite inducir y amplificar los linfocitos T CD8 específicos del péptido de interés con una gran eficacia en sólo 7 días de cultivo. Los autores de la invención han demostrado que la inducción de dichas respuestas dirigidas contra los antígenos tumorales MelA, GP100, MAGE-3 o tirosinasa era posible usando esta estrategia, a partir de las tomas de muestras de pacientes portadores de un melanoma, con independencia de cuál sea el estadio de su enfermedad. Las PBMC de los pacientes responden contra al menos dos de los antígenos en los cuatro estudiados, y los TIL contra al menos tres de estos antígenos.

10

**[0077]** Se han usado dos procedimientos para evaluar la funcionalidad de los linfocitos T CD8 generados por el linaje de pDC pulsado GEN2.2: prueba de citotoxicidad y secreción de IFN $\gamma$  después de la reestimulación específica.

15 **[0078]** Para evaluar la secreción de IFN $\gamma$  tras la reestimulación las células amplificadas después del cultivo se recuperan y se cuentan y se realiza un marcado tetrámero (30 min a temperatura ambiente). Después de lavado, las células se vuelven a suspender a  $1 \cdot 10^6/200 \mu\text{l}$  en medio RPMI con SVF al 10%. Se añaden los linfocitos T2 pulsados con el péptido de interés (MelA o GP100) o un péptido de control (Flu) (relación células efectoras:células reestimulantes = 10:1). Las células se reestiman durante 5 h 30 a 37°C en presencia de brefeldina A (GolgiPlug a 1  $\mu\text{l/ml}$ ) durante las 3 últimas horas. Después del marcado de los antígenos de superficie (CD3, CD8) se realiza a continuación un marcado intracelular de IFN $\gamma$  (Figura 12e). El análisis del marcado de IFN $\gamma$  se efectúa en los linfocitos T CD8+ tetrámero+. Así los linfocitos T CD8+ anti-MelA generados gracias al linaje GEN son capaces de secretar el IFN $\gamma$  específicamente después de la reestimulación por los linfocitos T2 pulsados con MelA y no después de la reestimulación por los linfocitos T2 pulsados con otro péptido (T2 Flu), mientras que los linfocitos T específicos de GP100 secretarán IFN $\gamma$  con respecto a T2 pulsados por GP100 pero no por Flu (Figura 12b).

**[0079]** Se evalúa la actividad citotóxica de los linfocitos T específicos generados por el linaje GEN2.2 por una prueba de precipitación de  $^{51}\text{Cr}$ . Para ello, después de la estimulación de PBMC de pacientes portadores de un melanoma semialogénico con células GEN2.2 pulsadas con el péptido MelA e irradiadas, se recuperan las células y se purifican los linfocitos T CD8+ (clasificación T CD8 EasySep por selección negativa) y se ponen en presencia de células diana marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  en diferentes relaciones (relación E:T comprendidas entre 60:1 y 7,5:1) durante 4 h. A continuación se efectúa una dosificación del  $^{51}\text{Cr}$  en el sobrenadante. Los linfocitos T anti-MelA son capaces por ejemplo de lisar eficazmente las células tumorales HLA-A2+ que expresan Melan-A (Me275 y Mel89) pero no tienen actividad citotóxica frente a las células tumorales que no expresan MelA (A375) o que no son HLA-A2 (COLO829) (Figura 12f). Se han realizado experiencias similares con linfocitos T CD8+ obtenidos de cultivos de TIL estimulados por el linaje GEN2.2 pulsado con una mezcla de los cuatro péptidos tumorales estudiados. El ejemplo de la figura 12f (TIL paciente #11) muestra que los linfocitos generados que contienen linfocitos Tetrámeros+ específicos de MelA, GP100 y MAGE3 (Figura 12c) lisan las células diana que expresan al menos uno de estos antígenos en el contexto HLA-A2.

40

**[0080]** Se ha medido también la citotoxicidad de los linfocitos T específicos generados por el linaje GEN2.2 pulsado por una mezcla de los cuatro péptidos tumorales estudiados contra las células tumorales autólogas del paciente, y de las células no tumorales autólogas (leucocitos CD45+ purificados). Los dos ejemplos presentados en la Figura 12g muestran para dos pacientes que los TIL que no eran citotóxicos contra las células tumorales autólogas inicialmente, adquieren la capacidad de destruir las células tumorales autólogas después de la estimulación con las células GEN pulsadas con la mezcla de los cuatro péptidos. Las células no tumorales autólogas de por sí no son lisadas. Estos resultados se han reproducido a partir de las tomas de muestra de cinco pacientes (Figura 12h).

50 **[0081]** Los linfocitos T CD8 específicos de antígenos tumorales generados por el linaje de pDC GEN2.2 a partir de PBMC y de TIL de pacientes son así capaces de destruir las células diana que expresan este antígeno de forma limitada por el HLA, así como las células tumorales autólogas, pero no las células no tumorales autólogas. Secretan específicamente IFN $\gamma$  después de la reestimulación por las células que presentan el péptido del que son específicas en el contexto HLA adecuado.

55

Listado de secuencias

**[0082]**

# ES 2 619 833 T3

<110> Établissement Français du Sang

<120> Linaje de células dendríticas plasmacitoides usadas en terapia celular activa o adoptiva

5 <130> BR057107

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val  
1 5 10

20 <210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 2

Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val  
1 5

<210> 3

30 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

35

Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val  
1 5

<210> 4

<211> 9

40 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val  
1 5

45

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

ES 2 619 833 T3

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys  
1 5

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Virus de inmunodeficiencia humana (HIV)

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(9)

15 <223> Parte de péptido de la proteína gag

<400> 6

Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu  
1 5

20

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humana (HIV)

25

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(9)

<223> Parte de péptido de la proteína pol

30

<400> 7

Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val  
1 5

35 <210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Virus de influenza

40 <400> 8

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu  
1 5

<210> 9

45 <211> 9

<212> PRT

<213> Citomegalovirus (CMV)

<220>

# ES 2 619 833 T3

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(9)

<223> Parte de péptido del antígeno vírico pp65

5 <400> 9

Asn Leu Val Pro Met Val Ala Thr Val  
1 5

<210> 10

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Virus de Epstein-Barr

<220>

15 <221> PÉPTIDO

<222> (1)..(9)

<223> Parte de péptido del antígeno vírico BMLF1

<400> 10

20

Gly Leu Cys Thr Leu Val Ala Met Leu  
1 5

<210> 11

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Virus de Epstein-Barr

<220>

<221> PÉPTIDO

30 <222> (1)..(9)

<223> Parte de péptido del antígeno vírico LMP2

<400> 11

Cys Leu Gly Gly Leu Leu Thr Met Val  
1 5

35

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

40 <213> Virus de Epstein-Barr

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(10)

45 <223> Parte de péptido del antígeno vírico EBNA-2

<400> 12

Asp Thr Pro Leu Ile Pro Leu Thr Ile Phe  
1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Virus de Epstein-Barr

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(9)

10 <223> Parte de péptido del antígeno vírico EBNA-3a

<400> 13

Ser Val Arg Asp Arg Leu Ala Arg Leu  
1 5

15

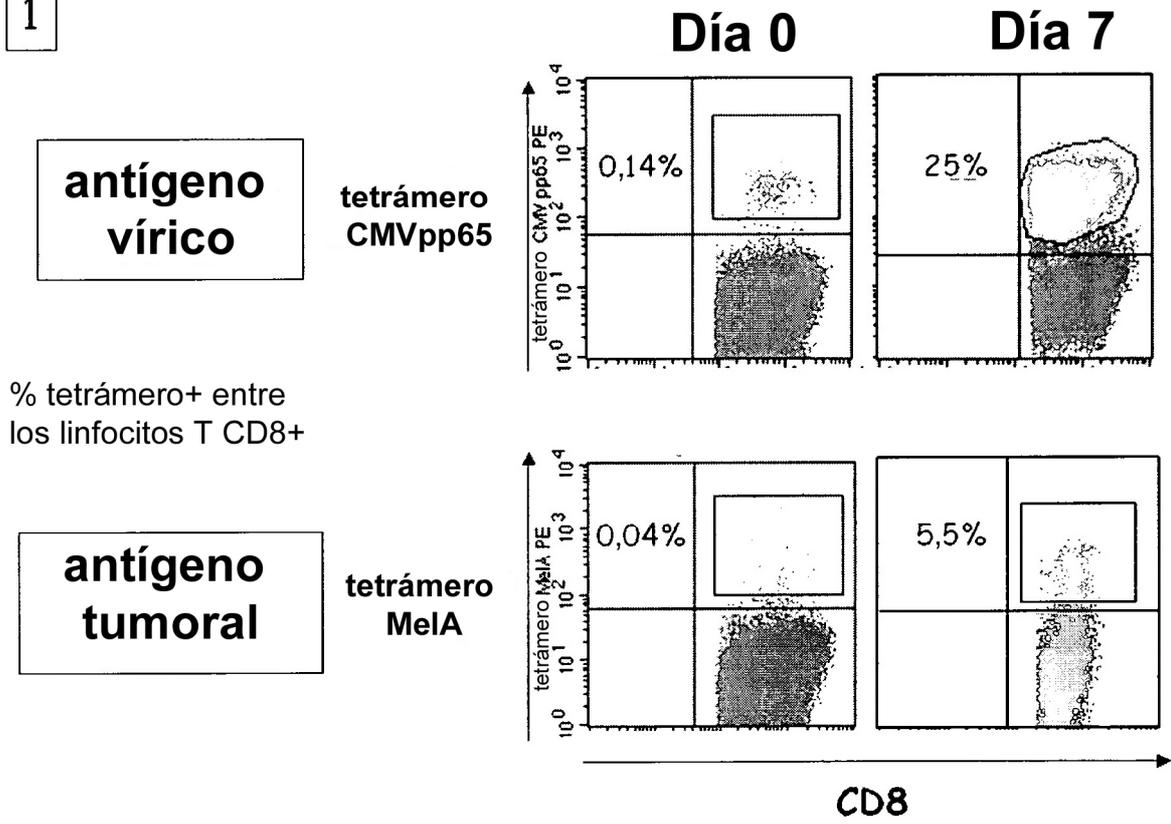
**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de inducción y de amplificación *in vitro* de células inmunitarias capaces de reconocer al menos un antígeno específico, que comprende las etapas siguientes:
- 5 (a) obtención de un linaje de células dendríticas plasmacitoides (pDC) pulsadas por incubación de un linaje de pDC con dicho al menos un antígeno específico,  
 (b) irradiación de las células obtenidas en la etapa (a),  
 (c) puesta en contacto de pDC pulsadas e irradiadas obtenidas en la etapa (b) con células mononucleadas de sangre periférica (PBMC), y cultivo de las pDC pulsadas e irradiadas y de las PBMC que comparten al menos un alelo del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).
- 10 2. Procedimiento de inducción y de amplificación según la reivindicación 1 que comprende al menos una etapa de reestimulación que consiste en una
- 15 (d) puesta en contacto de las células obtenidas en la etapa (c) de nuevo con el linaje de pDC pulsado e irradiado obtenido en la etapa (b), y cultivo.
3. Procedimiento de inducción y de amplificación según una de las reivindicaciones precedentes
- 20 **caracterizado porque** las células inmunitarias capaces de reconocer al menos un antígeno específico son linfocitos T específicos del o de los antígenos usados.
4. Procedimiento de inducción y de amplificación según la reivindicación 3 **caracterizado porque** los linfocitos T son CD8+.
- 25 5. Procedimiento de inducción y de amplificación según una de las reivindicaciones precedentes **caracterizado porque** el o los antígenos son de origen tumoral, microbiano, bacteriano o vírico.
6. Procedimiento de inducción y de amplificación según la reivindicación 5 **caracterizado porque** el al
- 30 menos un antígeno es un péptido.
7. Procedimiento de inducción y de amplificación según la reivindicación 6 **caracterizado porque** el péptido, susceptible de obtenerse a partir de un antígeno de origen tumoral, se elige entre los péptidos comprendidos en la secuencia de antígenos CEA, NY-BR1, Her-2/Neu, PSA, RAGE-1, PRAME, TRP-2, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A4, MAGE-A9, MAGEA10, MAGE-C2, MUC-1, p53, hTERT, survivina, melan-A/MART-1, GP100, tirosinasa, MAGE-A3 o NY-ESO1.
- 35 8. Procedimiento de inducción y de amplificación según la reivindicación 5 **caracterizado porque** el péptido, susceptible de obtenerse a partir de un antígeno de origen vírico, se elige entre los péptidos comprendidos en la secuencia de antígenos env, nef, gp41, gp120, gag o pol del virus HIV, HBc o HBs del virus HBV, core, NS3 o NS5 del virus HCV, Flu M 1 del virus influenza, pp65 del virus CMV, BMLF1, LMP2, EBNA-2 o EBNA-3a del virus EBV.
- 40 9. Procedimiento de inducción y de amplificación según una de las reivindicaciones precedentes **caracterizado porque** el linaje de pDC se obtiene a partir de células de leucemia de pDC.
- 45 10. Procedimiento de inducción y de amplificación según la reivindicación 9 **caracterizado porque** el linaje de pDC es el linaje GEN 2.2 o el linaje GEN3.
- 50 11. Uso de un linaje de pDC incubadas con al menos un antígeno de origen tumoral, microbiano, bacteriano o vírico e irradiado para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades infecciosas o de cánceres.
12. Composición que comprende un linaje de pDC pulsado por incubación con un antígeno tumoral o un antígeno vírico, eligiéndose dicho antígeno vírico entre los péptidos comprendidos en la secuencia de antígenos env, nef, gp41, gp120, gag o pol del virus HIV, HBc o HBs del virus HBV, core, NS3 o NS5 del virus HCV, flu M1 del virus influenza, pp65 del virus CMV, BMLF1, LMP2, EBNA-2 o EBNA-3a del virus EBV, e irradiadas.
- 55 13. Composición que comprende un cultivo de células, comprendiendo dicho cultivo un linaje de pDC

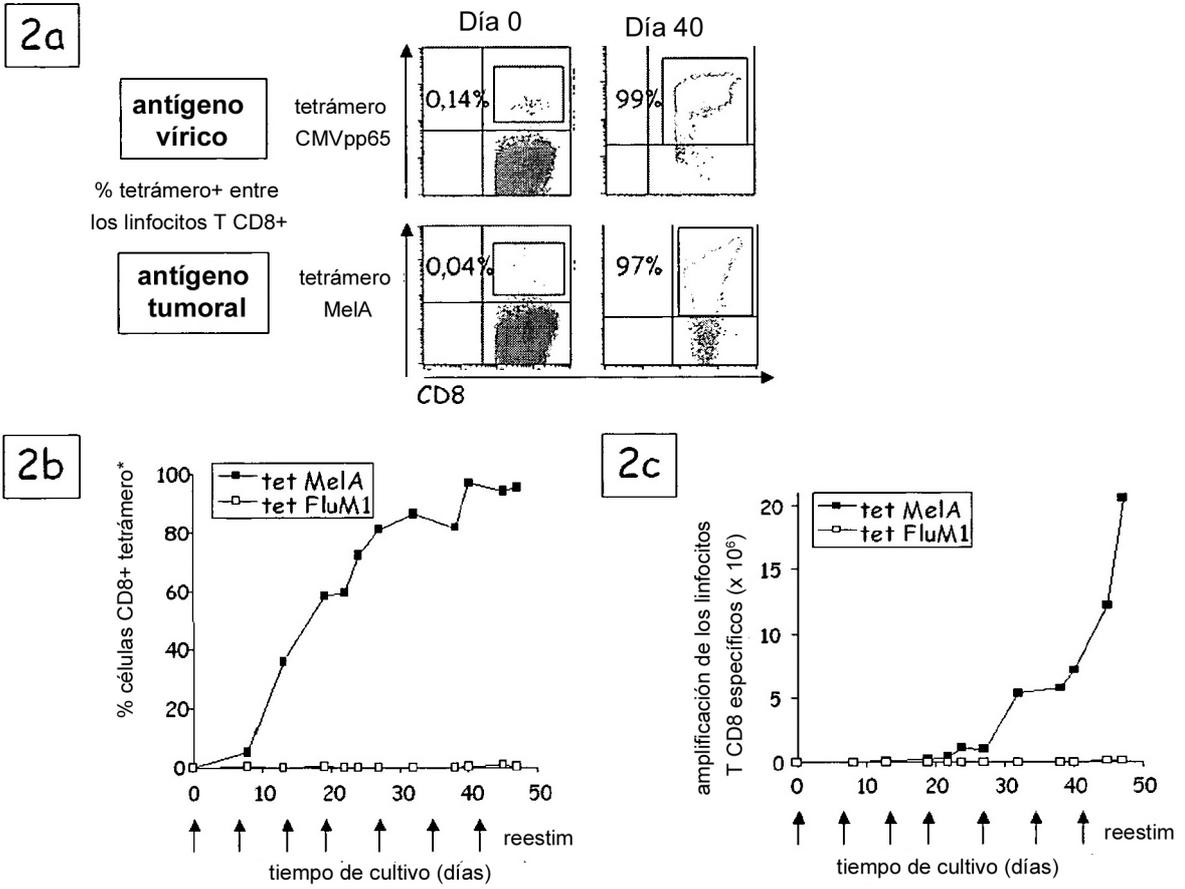
incubadas con al menos un antígeno e irradiadas y células mononucleadas de sangre periférica (PBMC), con las pDC incubadas con al menos un antígeno e irradiadas y compartiendo las PBMC al menos un alelo del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

- 5 14. Composición farmacéutica que comprende un linaje de pDC incubadas con al menos un antígeno e irradiadas para su uso como medicamento.
15. Linaje de pDC incubadas con al menos un antígeno e irradiadas para su uso en vacunas como agente de activación del sistema inmunitario.
- 10 16. Kit que comprende un linaje de pDC incubado con al menos un antígeno e irradiado y células mononucleadas de sangre periférica (PBMC), compartiendo el linaje de pDC y las PBMC al menos un alelo del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).

1

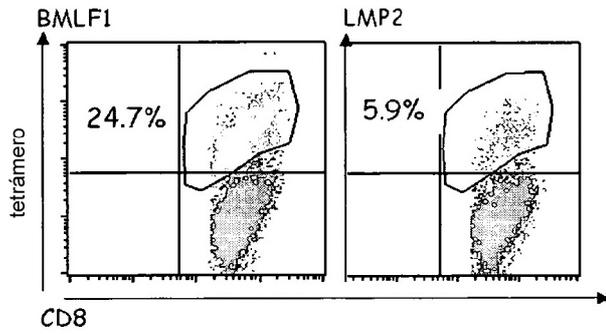


**FIGURA 1**

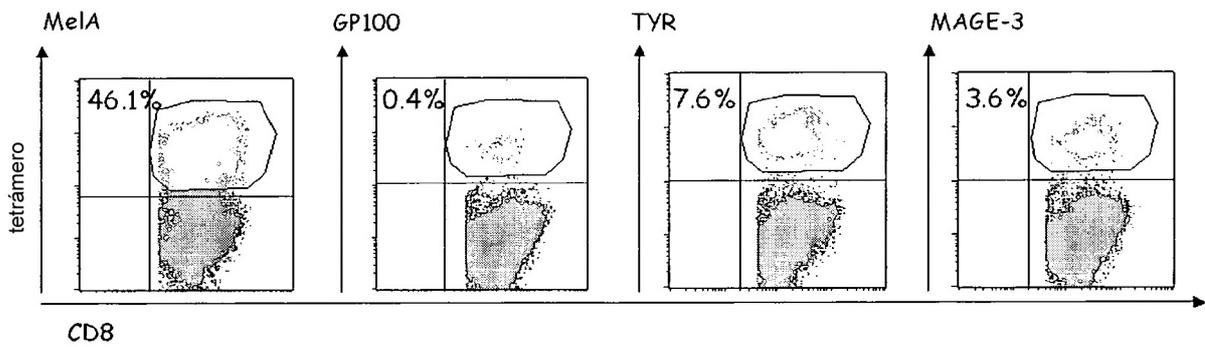


**FIGURA 2**

**3a** EBV, mezcla péptidos BMLF1 + LMP2, Día 7



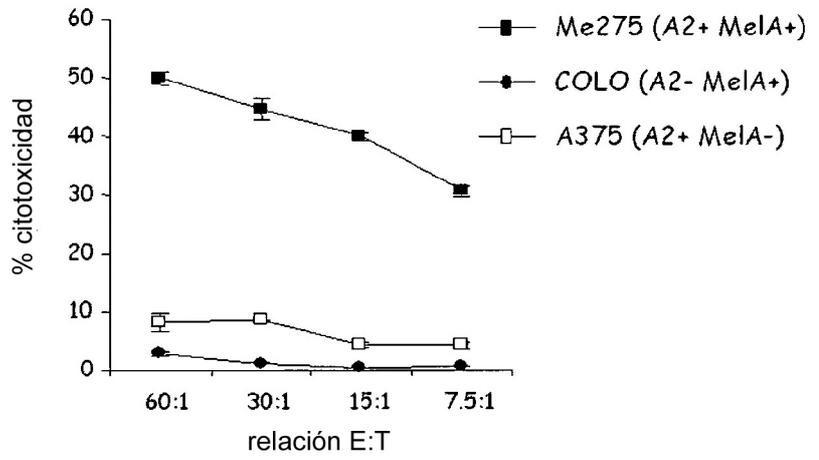
**3b** Melanoma, mezcla péptidos MelA, Tyr, GP100, MAGE-3. Día 21



**FIGURA 3**

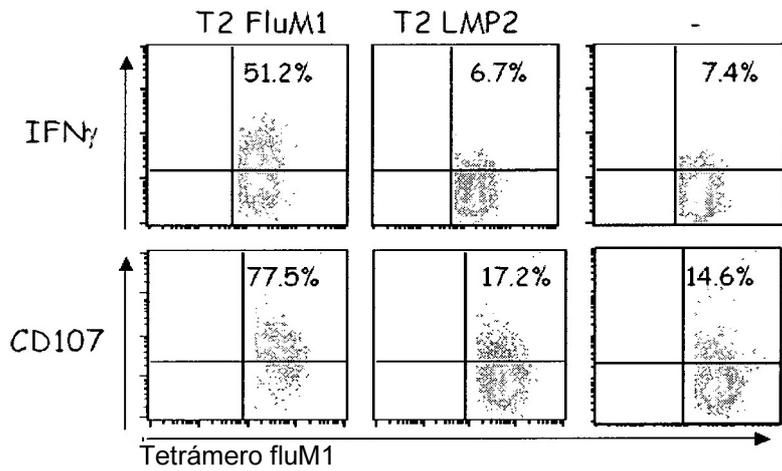
4a

linfocitos T  
específicos  
de MeIA

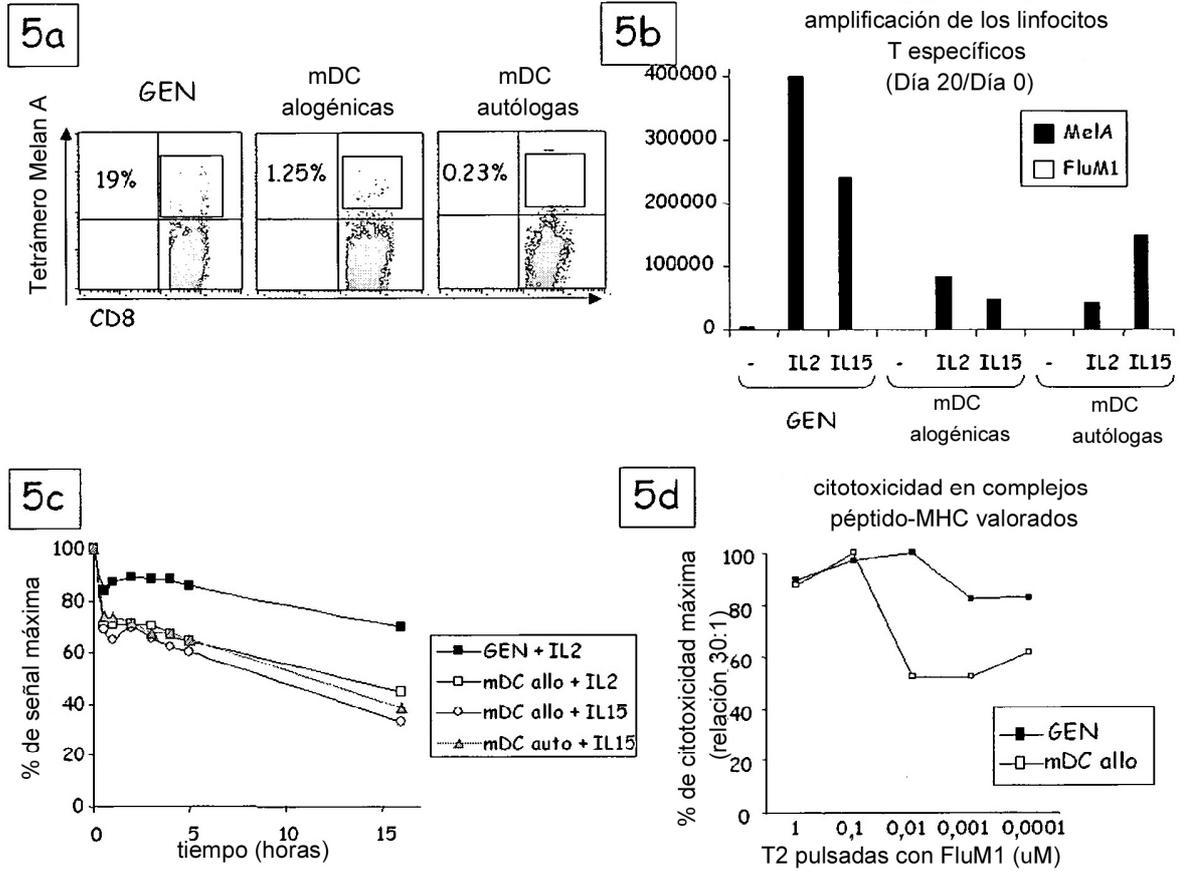


4b

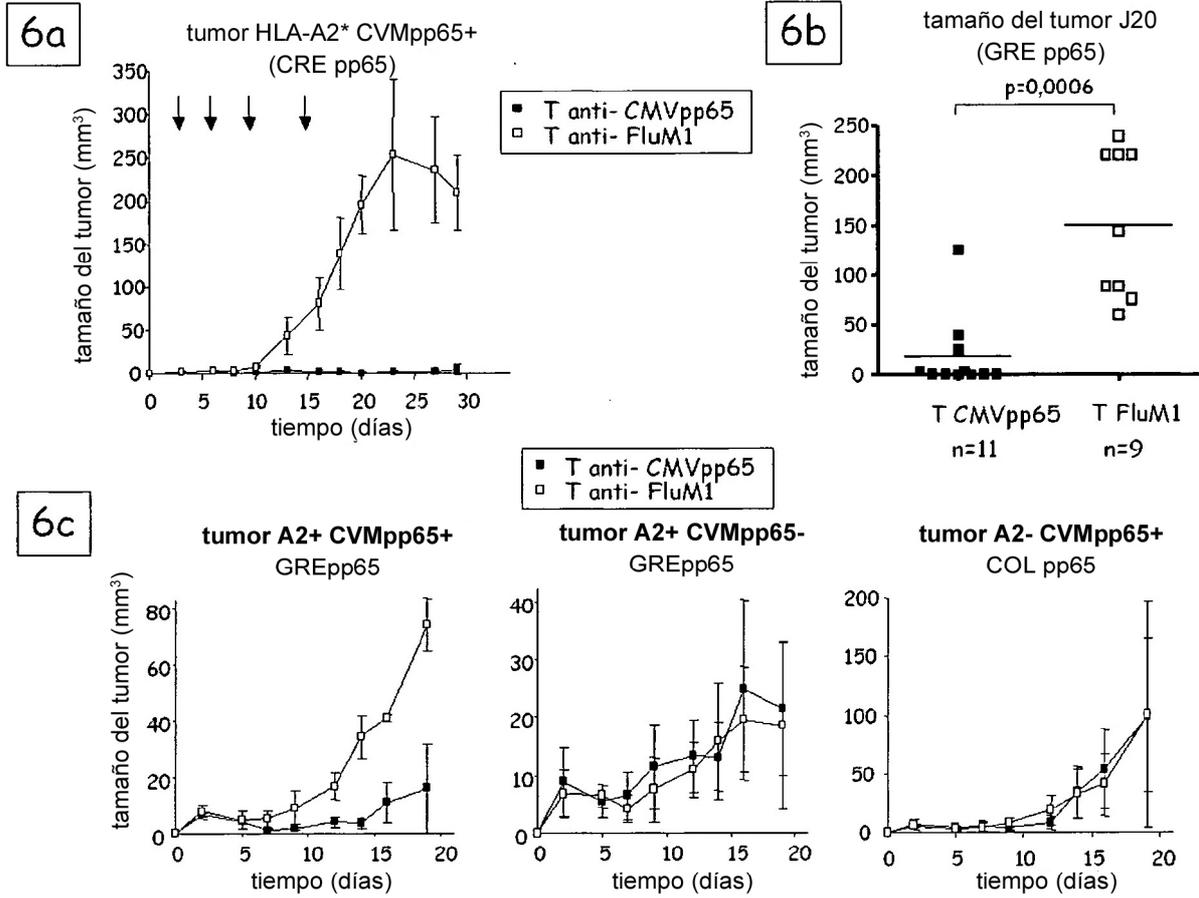
linfocitos T  
específicos  
de FluM1



**FIGURA 4**

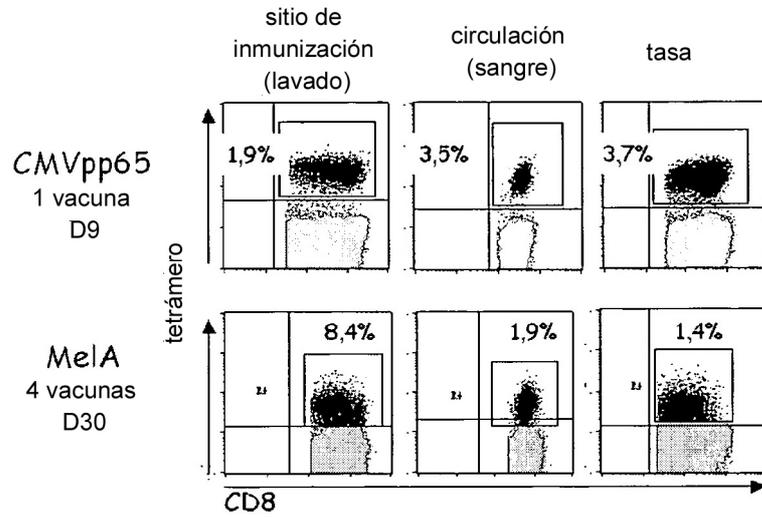


**FIGURA 5**

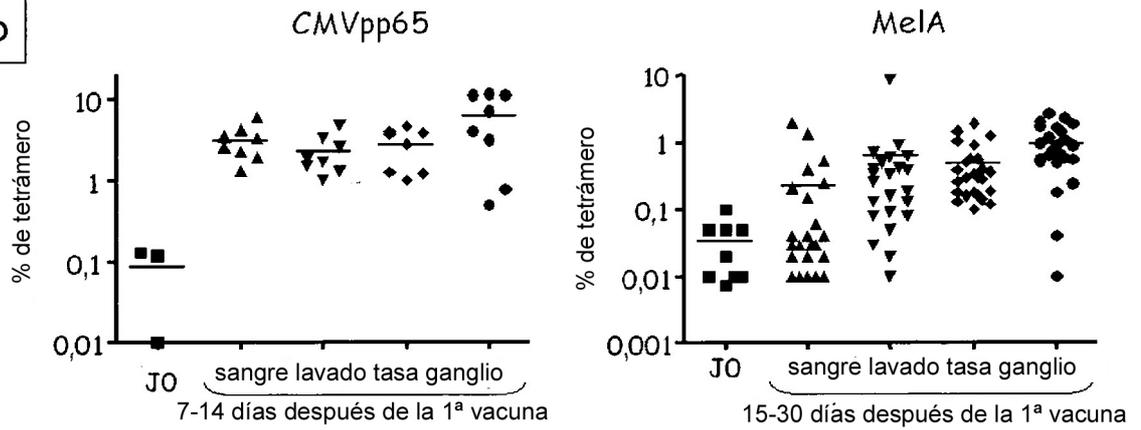


**FIGURA 6**

7a



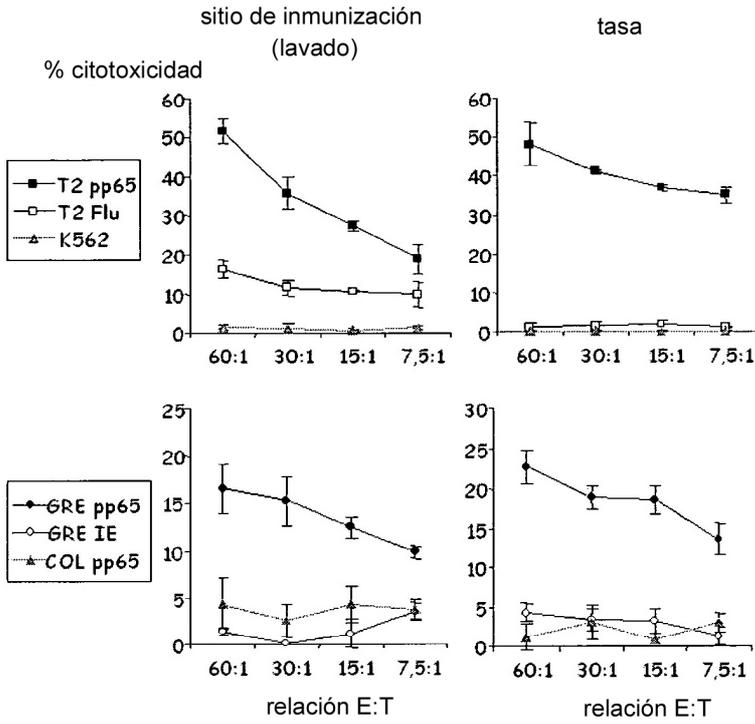
7b



**FIGURA 7**

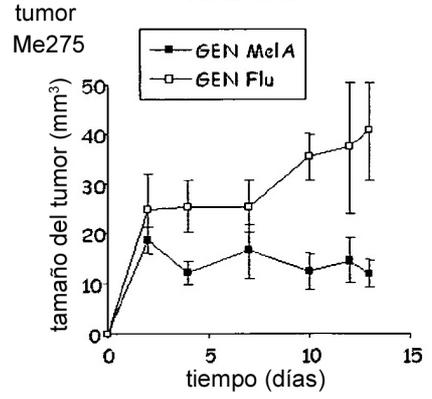
8a

prueba de citotoxicidad a partir de linfocitos T purificados de animales vacunados con GEN-pp65



8b

regresión tumoral in vivo, después de vacunación



8c

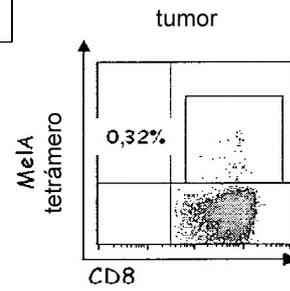
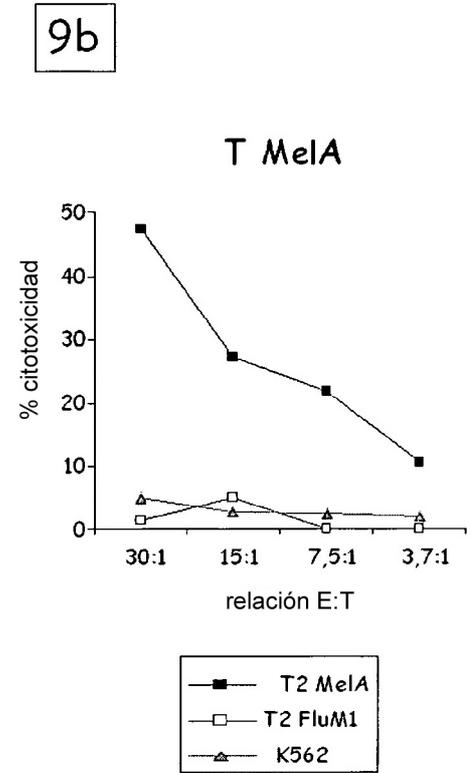
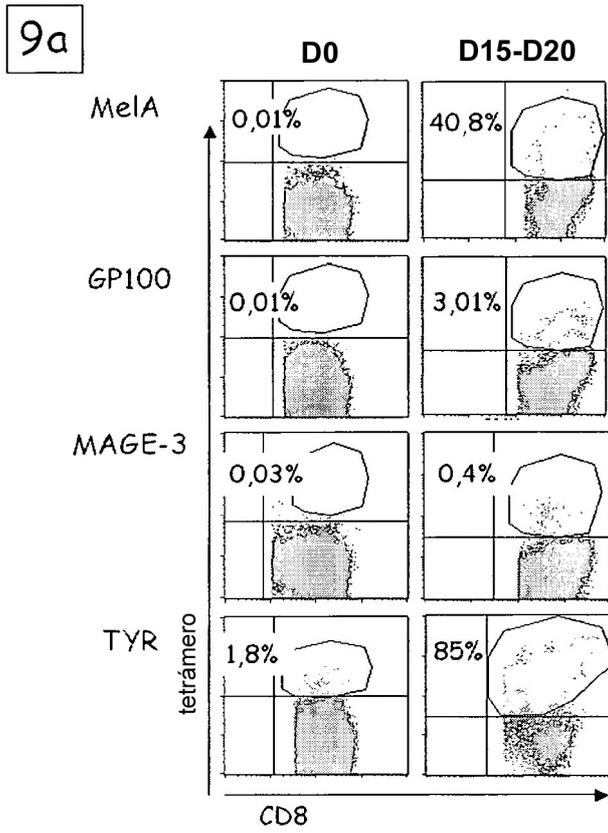
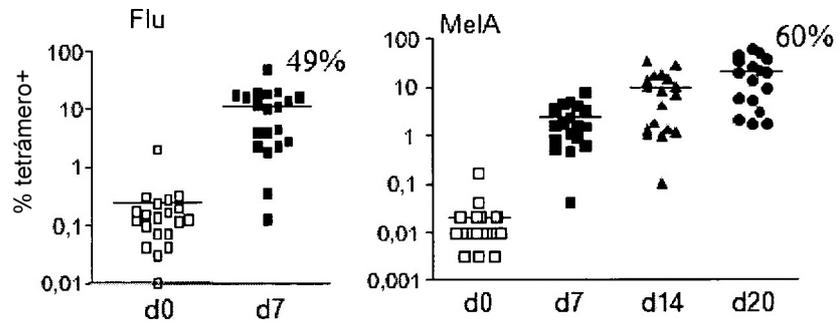


FIGURA 8



**FIGURA 9**



**FIGURA 10**

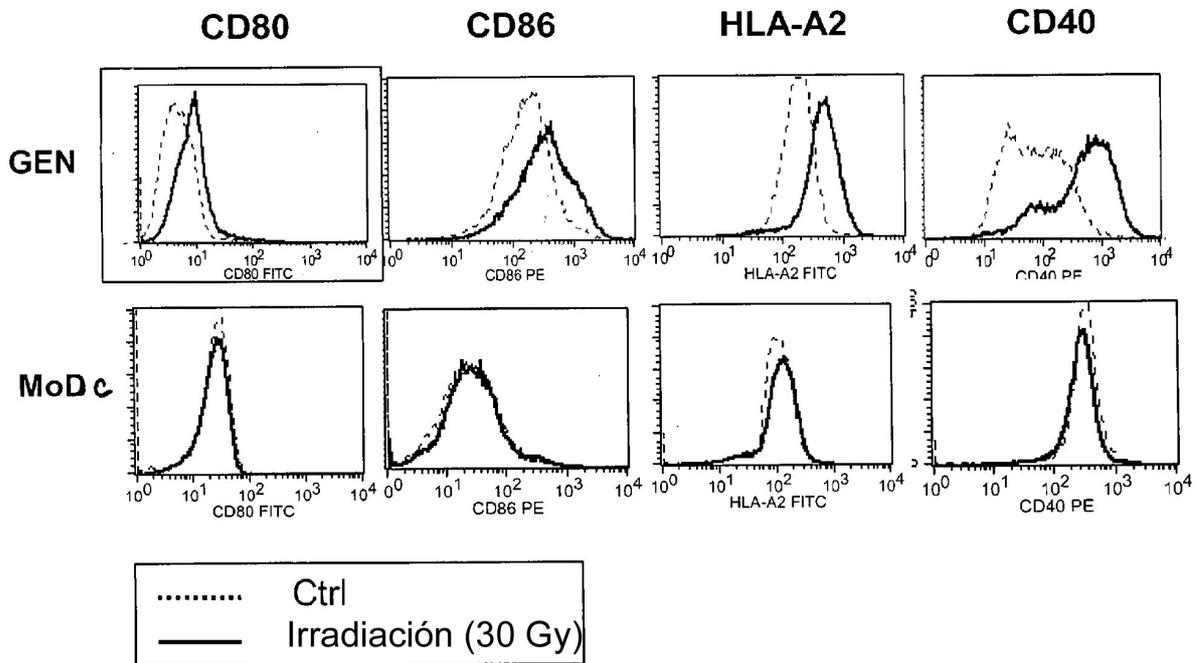
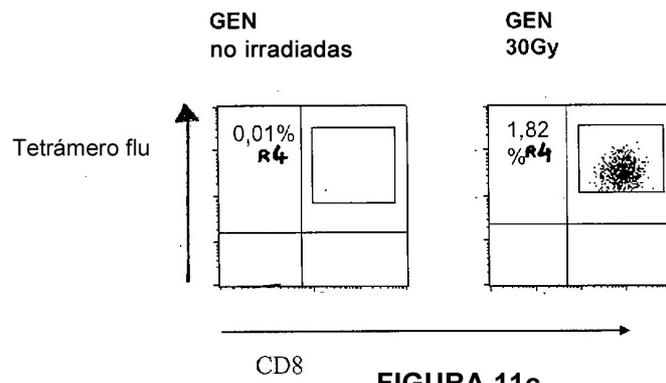
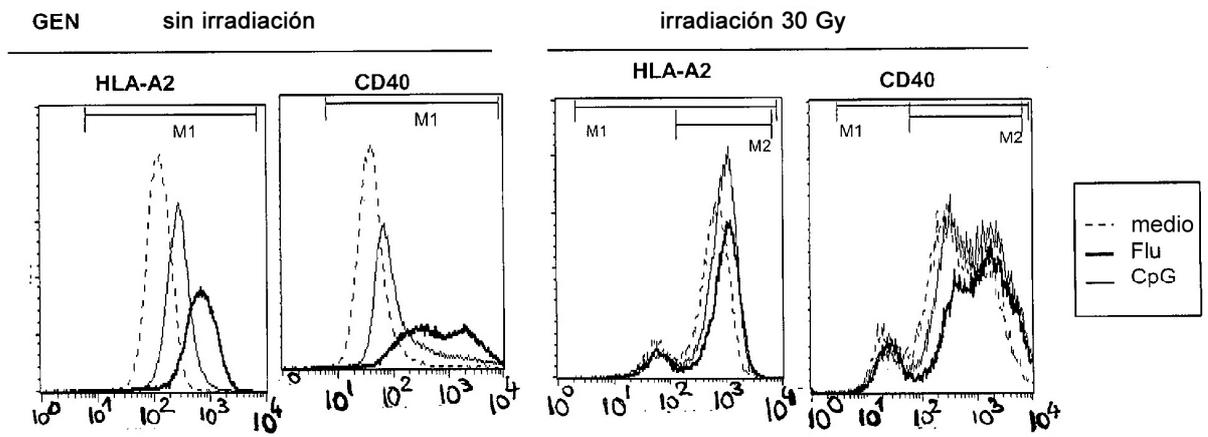


FIGURA 11a



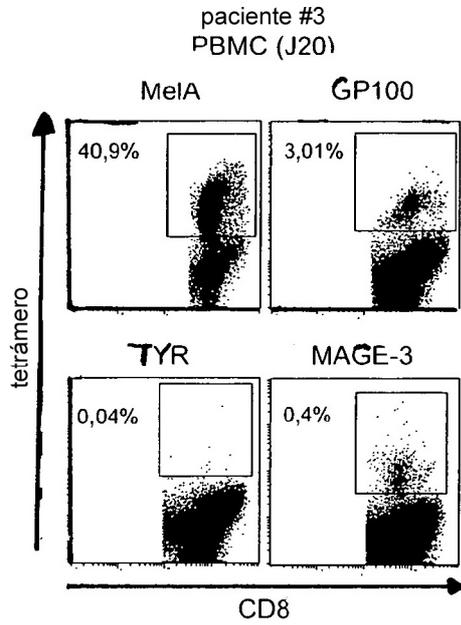


FIGURA 12a

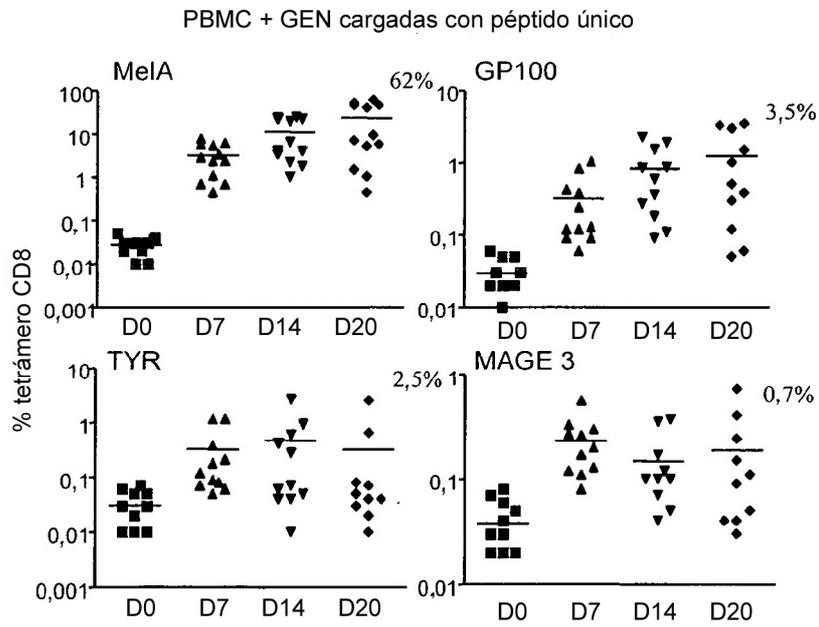
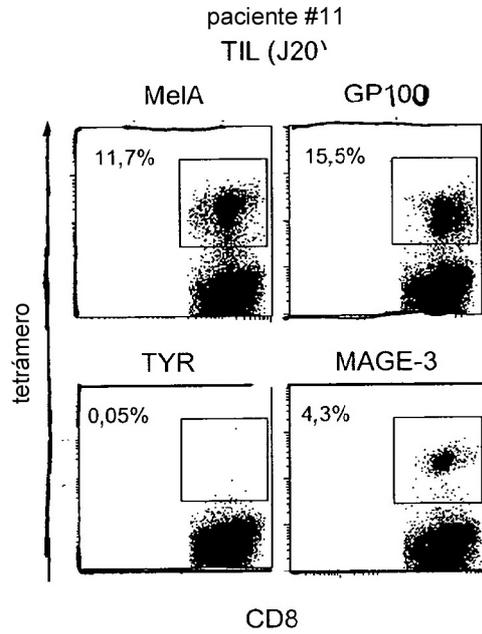
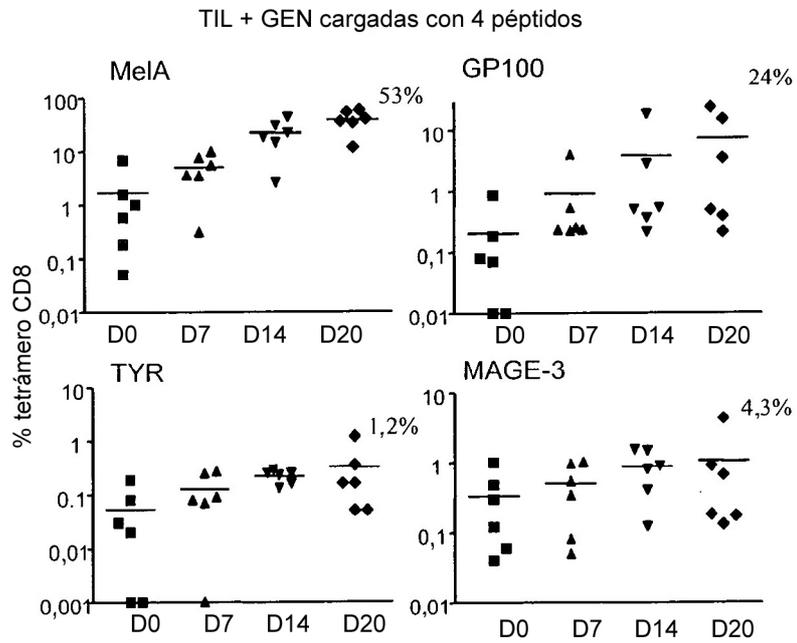


FIGURA 12b



**FIGURA 12c**



**FIGURA 12d**

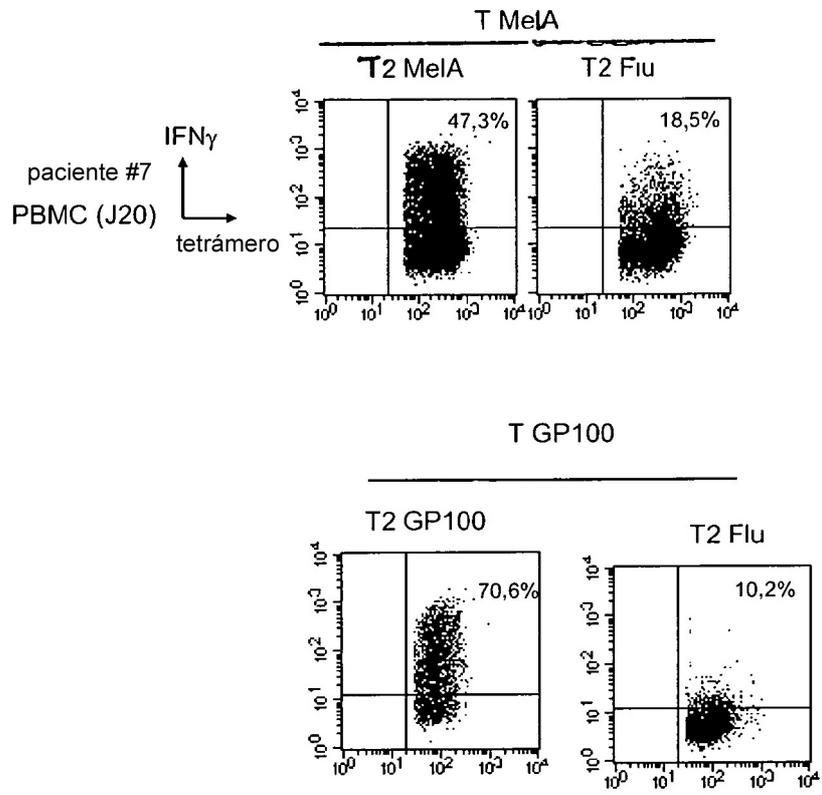


FIGURA 12e

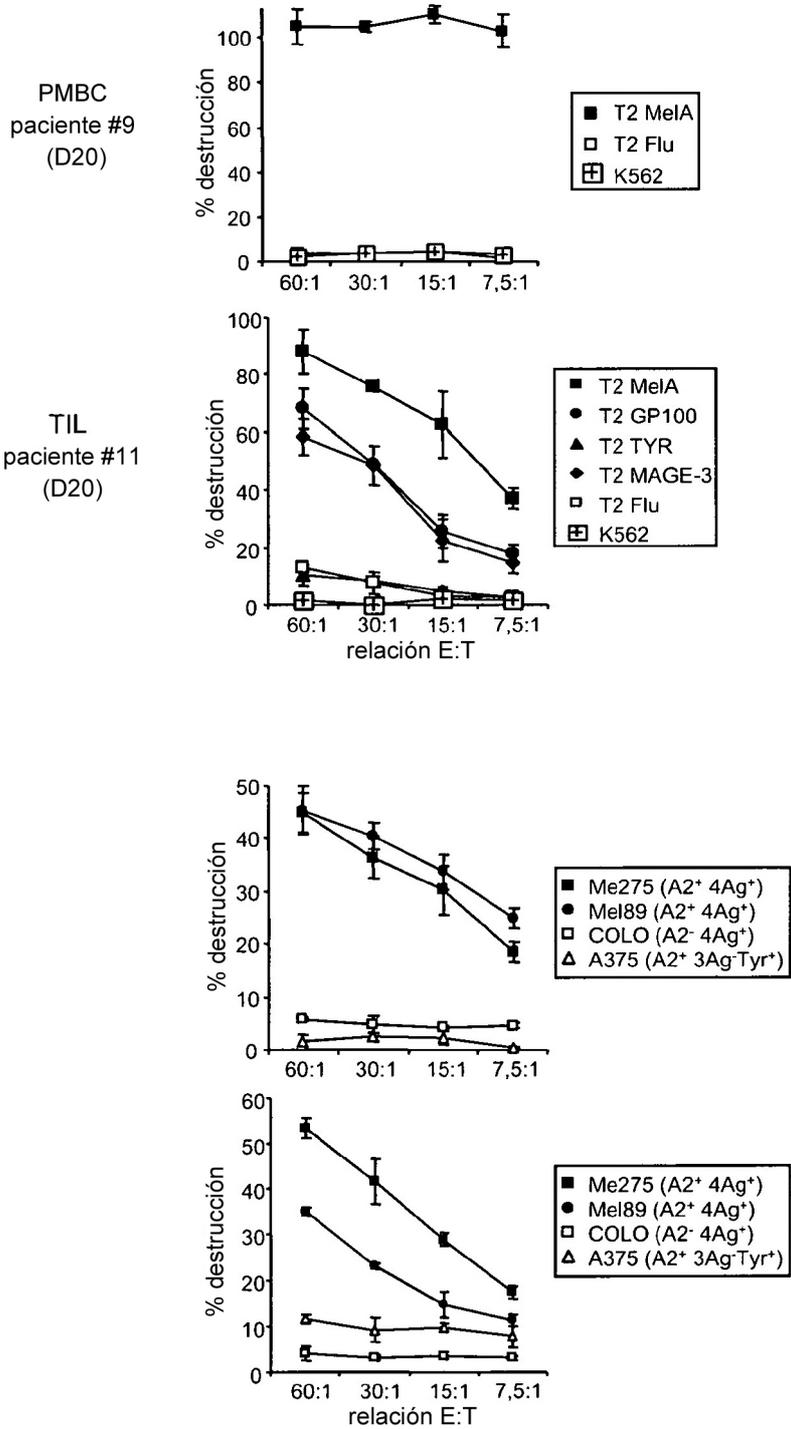
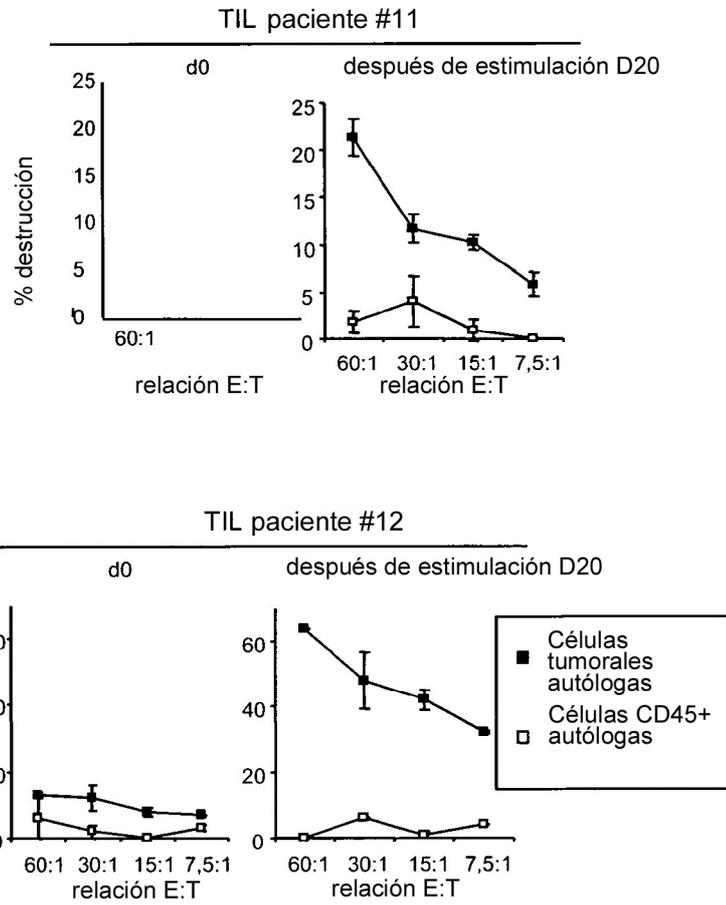


FIGURA 12f



**FIGURA 12g**

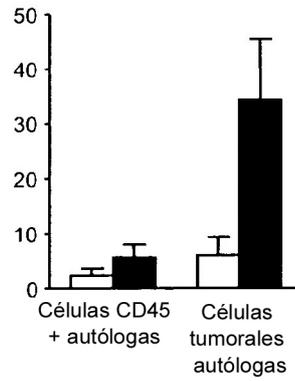
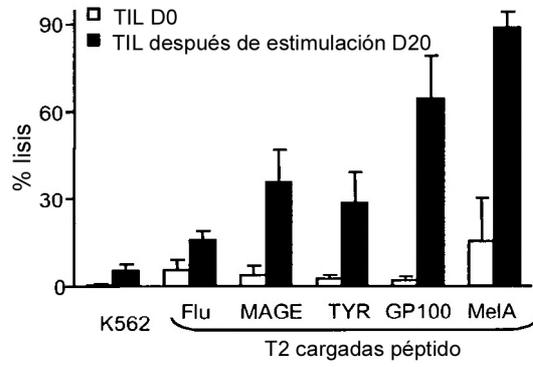
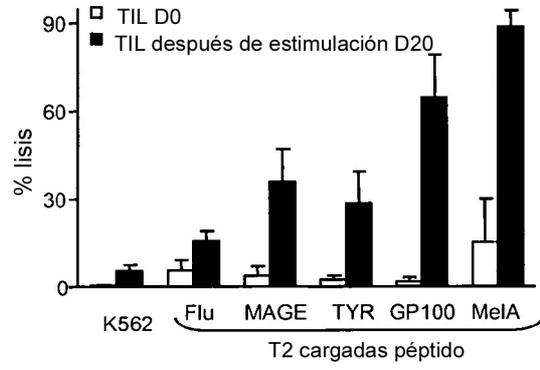


FIGURA 12h