

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 516**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/0783 (2010.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2009 PCT/US2009/059177**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10039924**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2009 E 09818495 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2334309**

54 Título: **Sensibilización para vacunación con TH1 para inmunoterapia activa**

30 Prioridad:

30.09.2009 US 570442
01.10.2008 US 101692 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2017

73 Titular/es:

IMMUNOVATIVE THERAPIES, LTD. (100.0%)
POB 974
60850 Shoham, IL

72 Inventor/es:

HAR-NOY, MICHAEL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 635 516 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).

Sensibilización para vacunación con TH1 para inmunoterapia activa**DESCRIPCIÓN****5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de las vacunas y, más particularmente, a métodos de vacuna terapéuticos. Específicamente, la invención se refiere a métodos para el uso de composiciones farmacéuticas que contienen células alogénicas para sensibilización para aumentar las Th1 de memoria que, después, se pueden activar y servir como adyuvante para inmunoterapia activa de cáncer y enfermedades infecciosas y otras enfermedades del envejecimiento.

Antecedentes de la invención

15 Aprovechar el poder del sistema inmunológico para el tratamiento de enfermedades infecciosas crónicas o cáncer es un objetivo principal de la inmunoterapia. Los métodos de vacunación (también conocidos como inmunoterapia activa) están diseñados para activar el sistema inmunológico para reconocer específicamente y proteger frente a patógenos invasores. Durante más de 200 años, se han utilizado métodos de inmunoterapia activa para prevenir numerosas enfermedades infecciosas, incluyendo la viruela, la rabia, la fiebre tifoidea, el cólera, la peste, el sarampión, la varicela, la parotiditis, la poliomieltis, la hepatitis B y las toxinas del tétanos y la difteria.

Actualmente se están aplicando los conceptos de inmunoterapia activa para desarrollar vacunas terapéuticas contra el cáncer con la intención de tratar tumores existentes o prevenir la recurrencia tumoral, así como aplicarse al tratamiento de infecciones víricas crónicas. Sin embargo, la tecnología existente de inmunoterapia activa no ha tenido éxito en la protección contra muchos de las enfermedades modernas objetivo, como el VIH/SIDA, hepatitis C y cáncer. Esto se debe, en parte, a la incapacidad de la actual tecnología de vacunación para provocar el tipo correcto de respuestas inmunitarias.

El tipo de respuesta inmunitaria generada frente a la infección u otro desafío antigénico puede distinguirse generalmente por la subpoblación de células T auxiliares (Th) implicadas en la respuesta. Las respuestas inmunológicas pueden clasificarse ampliamente en dos tipos: Th1 y Th2. La activación inmunitaria Th1 está optimizada para infecciones intracelulares, tales como virus, e implica la activación de células asesinas naturales (NK) y células T citolíticas (CTL) que pueden lisar células infectadas, mientras que las respuestas inmunológicas Th2 están optimizadas para respuestas humorales (anticuerpos). La activación inmunitaria de tipo Th1 es la más deseada para la terapia del cáncer y las respuestas inmunitarias de tipo Th2 están dirigidas más a la secreción de anticuerpos específicos y son relativamente menos importantes para la terapia tumoral. Las composiciones de vacunas de la técnica anterior están especializadas en la obtención de respuestas inmunitarias de tipo Th2 o humorales, que no son eficaces contra cánceres y la mayoría de las enfermedades víricas.

La erradicación del cáncer y el mantenimiento de la remisión requieren la activación inmunitaria de tipo Th1. Por lo tanto, uno de los objetivos de la inmunoterapia activa es desarrollar métodos que sean capaces de desviar una respuesta de tipo Th2 residente a una respuesta de tipo Th1. Sin embargo, en algunos pacientes que desarrollan una respuesta inmunitaria de tipo Th1 potencialmente eficaz contra un tumor o se inmunizan terapéuticamente para desarrollar una respuesta inmunitaria de tipo Th1, los tumores continúan creciendo sin afectarse.

Esta falta de eficacia en los pacientes inmunes de tipo Th1 y la ineficacia de las respuestas inmunitarias nativas contra tumores se ha atribuido a la capacidad de los tumores para emplear diversas estrategias para la evasión del ataque inmune. Estos mecanismos de inmunoevitación empleados por los tumores hacen que el sistema inmunitario sea tolerante y permita que los tumores crezcan sin impedimento por la vigilancia inmunitaria, incluso después de una regulación por aumento específica de los mecanismos antitumorales por inmunoterapia activa. Por lo tanto, las estrategias de inmunoterapia activa requieren, además de un mecanismo de acción inmunomodulador, una estrategia para superar los mecanismos de inmunoevitación tumoral.

Se cree que el establecimiento de autotolerancia a un tumor está relacionado con mecanismos inmunes naturales existentes que se emplean normalmente para prevenir la enfermedad autoinmune. El hecho de que este efecto normalmente beneficioso pueda ser responsable de la evasión inmunológica del tumor se apoya en la observación de que muchos de los mecanismos de tolerancia que evitan la autoinmunidad son los mismos que los empleados por los tumores para evadir la destrucción inmune. La "hipótesis del peligro" propone que el sistema inmunológico no discrimina primariamente lo que es propio de lo que no, sino que, en su lugar, está adaptado principalmente para reconocer y responder a los antígenos dependiendo del contexto en el cual los antígenos son presentados al sistema inmunológico.

El uso de adyuvantes ha sido durante mucho tiempo una estrategia para influir en la respuesta inmunitaria a antígenos en una composición de vacuna. Las sales de aluminio y la emulsión de aceite de escualeno en agua (MF59) son los adyuvantes más utilizados en las vacunas humanas. Sin embargo, estos adyuvantes estimulan

predominantemente las respuestas de Th2 a antígenos y, aunque son eficaces para elevar los títulos de anticuerpos en suero, no provocan respuestas inmunitarias celulares significativas.

Leukemia Research, 33, 525-538, (2008) se refiere a células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas y el documento divulga que proporcionan potentes efectos adyuvantes para la inmunoterapia activa de la leucemia/linfoma. Las células de memoria Th1 alogénicas se prepararon a partir de células CD4+ cultivadas en presencia de IL-2, IL-7, IL-12 e IL-4. Después de 6 días de cultivo, las células se activaron mediante incubación con nanopelotas recubiertas con anti CD3/anti CD28. Se mostró que estas células expresaban IFN-gamma. A los ratones se les inyectó BCL1 (células de linfoma de células B) solas o en combinación con las células Th1 activadas los días 1, 8, 15, 22. El día 0, se expuso a estos ratones con una dosis letal de células BCL1. Los ratones a los que se inyectó la mezcla de células BCL1 y células Th1 mostraron una mediana de la supervivencia de 46 días, que fue dos veces la de los ratones a los que se inyectaron solo células BCL1. Cuando se vacunó por primera vez a los ratones antes de la inyección del tumor, un porcentaje significativo de ratones sobrevivió a la inyección del tumor.

Blood, 102, 3439-3446, (2003) se refiere a subpoblaciones T1 y T2 coestimuladas con CD3/CD28 y a losensibilización diferencial *in vivo* que genera claros efectos de GVT (injerto contra tumor) y GVHD (enfermedad del injerto contra el huésped). De acuerdo con este documento, las células Th1 se generaron usando perlas magnéticas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2, IL-7, IL-12 e IL-4. Se irradió letalmente a los ratones y se administraron células de médula ósea. A continuación, se inyectó a los ratones células de cáncer de mama TSA. Algunos ratones también recibieron células Th1. Los ratones que recibieron células Th1 mostraron una tasa de supervivencia mucho mejor.

El documento WO 03/034820 se refiere a inmunoterapia adoptiva de células Th1. El documento divulga métodos para generar una población de células Th1 activadas y su uso en el tratamiento de pacientes con cáncer.

Blood, 107, 2562-2569, (2006) se refiere a la generación de células Th1 humanas altamente purificadas y funcionalmente activas contra *Aspergillus fumigatus*. El documento describe un método para generar una población purificada de células Th1 y sugiere el uso de estas células en el tratamiento de pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre.

Sumario de la invención

Esta divulgación describe composiciones y métodos para sensibilizar individuos con aloantígenos para desarrollar títulos elevados de células de memoria antialoantígenos del fenotipo Th1. Los individuos sensibilizados presentes con una enfermedad infecciosa o cáncer pueden someterse a inmunoterapia activa con los mismos aloantígenos como adyuvante. La introducción de aloantígeno en un individuo sensibilizado proporciona una fuerte descarga de citocinas de Th1 que tienen un potente efecto adyuvante. El método de sensibilización es particularmente beneficioso para individuos ancianos en el mantenimiento de la salud inmunitaria, ya que el número de células Th1 tiende a ser más bajo a medida que los individuos aumentan de edad.

Los métodos descritos en el presente documento proporcionan un medio para aumentar el número de células Th1 en circulación (la "huella Th1") en pacientes mediante la administración de células alogénicas vivas que producen citocinas de Th1. Las células alogénicas contienen aloantígenos que son procesados por las células inmunitarias y conducen al desarrollo de la inmunidad anti-alogénica. Cuando se hace que las células alogénicas produzcan citocinas Th1, estas citocinas sirven como adyuvante para hacer que la respuesta inmunitaria a los aloantígenos se dirija a Th1, aumentando de este modo la huella de Th1 de un paciente. Múltiples inyecciones de las células alogénicas que producen citocinas Th1 sirven para aumentar esta huella de Th1.

Las vacunas de sensibilización se administran generalmente a pacientes con alta susceptibilidad a enfermedades, tales como los pacientes de edad avanzada. Las vacunas de sensibilización también se pueden administrar a pacientes que han tenido cáncer pero que están en remisión y podrían albergar una enfermedad residual mínima, pero no un desafío de tumor completo. La huella de Th1 generada por la sensibilización permite que el sistema inmunológico del paciente se active para producir citocinas dirigidas de Th1 en cualquier momento en el futuro inyectando exposición antigénica adicional. En otras palabras, el sistema inmunológico del paciente está sensibilizado y en un modo de espera. Por lo tanto, cuando un paciente sensibilizado desarrolla una enfermedad, las composiciones de vacuna que incluyen las células alogénicas se pueden administrar a los pacientes solas o en combinación con antígeno de la enfermedad. Este sensibilización de un paciente para generar una huella de Th1 producida por inmunoterapia activa permite que el sistema inmunológico monte más eficazmente una respuesta terapéutica. Los pacientes con enfermedad existente también pueden estar sensibilizados antes de la inmunoterapia activa.

La invención proporciona el uso de una composición que comprende células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas en la fabricación de un medicamento para sensibilizar a un paciente susceptible a una enfermedad o un paciente que no presenta síntomas de la enfermedad para la profilaxis de la enfermedad aumentando el número de células Th1 en la circulación en el paciente, caracterizado por que el medicamento se administra conjuntamente con uno o más antígenos de la enfermedad, en el que la enfermedad es un cáncer o debido a un patógeno infeccioso.

La invención también proporciona un medicamento combinado y una composición como se define en las reivindicaciones adjuntas.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1A es un gráfico de barras que muestra la respuesta inmunitaria a BCL1 sin un adyuvante.

La figura 1B es un gráfico de barras que muestra la respuesta inmunitaria a BCL1 con un adyuvante.

10 La figura 2A muestra gráficas del cambio fenotípico en CD45RB, CD62L y CD44 desde el día 0 hasta al día 6.

La figura 2B muestra gráficas de los cambios fenotípicos en la expresión de la molécula efectora CD40L en células CD4+ colocadas en cultivo el día 0, el día 6 y activadas.

La figura 2C muestra gráficas de los cambios fenotípicos en la expresión de CD25 en células CD4+ colocadas en cultivo el día 0, el día 6 y activadas.

15 La figura 3A es una gráfica de barras de la producción de citocinas de células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28.

La figura 3B es una gráfica de la inmunogenicidad de las células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28.

La figura 4 es una gráfica que muestra las capacidades de vacunación protectora de las células de memoria Th1 activadas alogénicas y la respuesta al desafío del tumor.

20 La figura 5 es una gráfica que muestra las capacidades de vacunación terapéutica de las células de memoria Th1 activadas alogénicas.

La figura 6 es una gráfica que muestra los resultados de la sensibilización y un refuerzo terapéutico.

La figura 7A es una gráfica que muestra la respuesta en un modelo tumoral sistémico de crioblación.

La figura 7B es una gráfica que muestra la respuesta en un modelo tumoral sólido de crioblación.

25 La figura 7C es una gráfica que muestra la respuesta en el crecimiento tumoral de un tumor sólido contralateral (derecha).

La figura 7D es una gráfica que muestra la supervivencia en un modelo de tumor sistémico.

30 **Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas**

La invención proporciona el uso de una composición que comprende células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas en la fabricación de un medicamento para sensibilizar a un paciente susceptible a una enfermedad o un paciente que no presenta síntomas de la enfermedad para la profilaxis de la enfermedad aumentando el número de células Th1 en la circulación en el paciente, caracterizado por que el medicamento se administra conjuntamente con uno o más antígenos de la enfermedad, en el que la enfermedad es un cáncer o debido a un patógeno infeccioso.

La invención también proporciona un medicamento combinado y una composición como se define en las reivindicaciones adjuntas.

40 En el presente documento se describen composiciones de vacuna de sensibilización y métodos para usar estas composiciones de vacuna de sensibilización en inmunoterapia activa. Preferiblemente, las composiciones de vacuna de sensibilización incluyen células de memoria Th1 alogénicas que se activan en el momento de la inyección. Los métodos incluyen la administración de las composiciones de vacuna de sensibilización para proporcionar una huella de Th1 en individuos normales o pacientes susceptibles a enfermedad o que tienen una enfermedad residual mínima. La huella de Th1 en estos individuos puede mobilizarse mediante inmunoterapia activa al inicio o recurrencia de una enfermedad mediante la administración de una composición de vacuna activadora que incluye células de memoria Th1 alogénicas. La composición de vacuna activadora también puede incluir antígenos relacionados con la enfermedad. La composición de vacuna activadora puede usarse para provocar inmunidad Th1 terapéutica en los pacientes, al tiempo que proporciona los medios para superar los mecanismos de inmunoevitación de los patógenos de la enfermedad y los tumores. La sensibilización del paciente crea, ventajosamente, un potente adyuvante *in situ* para dirigir la inmunidad Th1. Por lo tanto, cuando el paciente está expuesto a un patógeno o cáncer, el sistema inmunológico es capaz de montar una respuesta más oportuna y eficaz.

55 En el presente documento se describe una composición de vacuna de sensibilización que comprende células inmunitarias vivas, en las que al menos una parte son células T. Las células T son, preferiblemente, células T de memoria (CD45RO+, CD62L^{Lo}) del fenotipo Th1 (células T CD4+ que producen IFN-γ y no IL-4) y denominadas en el presente documento "células de memoria" o "células Th1 de memoria". Las células Th1 de memoria se activan en el momento de la formulación y la introducción en un paciente. El método de activación preferido es mediante la reticulación de las moléculas de superficie CD3 y CD28 sobre las células T. Las células T de memoria activadas expresan, preferentemente, CD40L al ser activadas y producen grandes cantidades de citocinas inflamatorias (tales como IFN-γ, GM-CSF y TNF-α). Estas células de memoria Th1 activadas son, preferentemente, alogénicas para el paciente. En algunas realizaciones, la composición de sensibilización puede incluir también material antigénico relacionado con la enfermedad.

65 La composición con células de memoria Th1 activadas se puede usar con fines profilácticos o terapéuticos, o con ambos. Las composiciones de sensibilización descritas en el presente documento son particularmente preferibles

cuando se administran a individuos que no han mostrado ningún síntoma de una enfermedad. Aún más preferible es administrar las composiciones de sensibilización a pacientes que no han mostrado ningún síntoma pero son susceptibles a una enfermedad. La composición de sensibilización puede administrarse también a pacientes en etapas tempranas de una enfermedad o, en el caso de pacientes con cáncer, a un paciente en remisión o con una enfermedad residual mínima. La aplicación de las composiciones a pacientes que presentan síntomas también están dentro del alcance de la invención. La composición puede administrarse a través de todas las vías convencionalmente utilizadas o recomendadas para vacunas, incluyendo las vías parenteral, intradérmica, intramuscular, subcutánea o mucosa. Además, la composición se puede administrar por vía intraósea, intratecal, interperitoneal o intralaminar. En ciertas realizaciones, la composición también puede administrarse por vía intranodal o intratumoral.

La composición de vacunación de sensibilización farmacéutica descrita en el presente documento incluye células inmunitarias activadas vivas, de modo que al menos una parte son células T. La composición de también puede incluir antígenos relacionados con la enfermedad. Los antígenos relacionados con la enfermedad a los que se hace referencia en el presente documento incluyen antígenos relacionados con el patógeno causante de la enfermedad, células o lisados de un tumor u otros antígenos relacionados con una enfermedad. Las células de memoria Th1 activadas usadas en las composiciones farmacéuticas de vacuna de sensibilización de la presente invención derivan, preferentemente, de sangre de donante normal. Los métodos preferidos para el procesamiento y producción de células adecuadas para su uso en la presente invención los describen Har-Noy en las patentes de Estados Unidos 7,435,592 and 7,402,431 y la solicitud publicada de patente de Estados Unidos en trámite 2005/0191291.

El número de células de memoria Th1 usadas en las composiciones de vacuna puede variar y también puede depender de la vía de administración. La sensibilización y la composición activadora tienen, generalmente, entre aproximadamente 1×10^6 células y aproximadamente 11×10^{10} células. Preferentemente, las composiciones tienen entre aproximadamente 1×10^6 células y aproximadamente 1×10^8 células. Cuando la composición se administra por vía intradérmica o intratumoral, entre aproximadamente 1×10^7 células y aproximadamente 1×10^9 células cuando la composición se administra por vía interperitoneal, intraósea o intratecal y entre aproximadamente 1×10^8 células y aproximadamente 1×10^{10} células cuando la composición se administra por vía intravenosa. Las composiciones con células de memoria Th1 fuera de estos intervalos están también dentro del alcance de la presente divulgación.

Los pacientes que han sido sensibilizados con una composición que contiene células de memoria Th1 alogénicas desarrollarán, generalmente, inmunidad anti-aloantigénica. Las inyecciones posteriores de células alogénicas pueden activar el conjunto de células anti-aloantigénicas que pueden liberar las citocinas inflamatorias necesarias para desactivar los mecanismos de evitación inmunitaria.

En algunas realizaciones, la composición de vacuna de sensibilización puede administrarse a pacientes susceptibles a enfermedades. Estas enfermedades pueden ser enfermedades que son frecuentes en pacientes ancianos. La composición de vacuna de sensibilización puede ser eficaz para pacientes susceptibles al cáncer o enfermedades infecciosas, tales como VIH/SIDA, hepatitis B, hepatitis C, herpes, tuberculosis y paludismo. Cuando se administra la composición de vacuna de sensibilización a estos pacientes, desarrollan una inmunidad anti-aloantigénica. El sistema inmunológico de los pacientes puede albergar una huella de Th1 que puede activarse cuando sea necesario. En otras palabras, el sistema inmunológico del paciente está en un modo de espera y preparado para una respuesta Th1 más eficaz a una exposición antigénica. Cuando el paciente desarrolla síntomas de una enfermedad particular, se pueden administrar composiciones de vacuna de activación como se describe a continuación.

En algunas realizaciones, la vacunación de sensibilización puede administrarse a pacientes que ya han tenido una enfermedad, tal como cáncer, pero están en remisión. Los pacientes en remisión a veces pueden tener una enfermedad residual mínima (MRD). En la MRD, los pacientes todavía pueden tener células cancerosas pero en cantidades que no son clínicamente sintomáticas. Con el tiempo, las células cancerosas pueden crecer y conducir a la recurrencia de la enfermedad. Las vacunaciones de sensibilización que incluyen las células de memoria Th1 activadas y uno o más antígenos de las células cancerosas iniciales pueden administrarse a pacientes en remisión para crear una huella de Th1. Cuando el paciente muestra signos de recurrencia, se pueden administrar composiciones de vacuna activadoras que contienen las células de memoria Th1 activadas y uno o más de los antígenos relacionados con la enfermedad. Dado que el paciente había sido sensibilizado anteriormente, la memoria anti-aloantígeno residente puede montar una respuesta rápida para combatir más eficazmente la exposición antigénica completa avanzada.

La composición de vacuna de sensibilización de acuerdo con la presente invención cuando se administra a un paciente en remisión puede ser una composición destinada a la inmunización contra un único patógeno o cáncer, es decir, comprende uno o más antígenos de un solo patógeno o cáncer, o bien puede ser una composición destinada a la inmunización contra varios patógenos o cánceres diferentes (por tanto, esto se denomina combinación de vacuna).

La acción adyuvante de las células de memoria Th1 activadas se puede obtener cuando se combinan las células Th1 activadas y los antígenos relacionados con la enfermedad se combinan antes de la administración. Como alternativa, las células de memoria Th1 activadas se administran por separado del antígeno o antígenos

relacionados con la enfermedad. Preferentemente, las células de memoria Th1 activadas se combinan con los antígenos relacionados con la enfermedad antes de su administración al paciente.

Con el fin de mantener un entorno inflamatorio que es capaz de inactivar la capacidad de los tumores y organismos patógenos de evadir la destrucción inmune, se pueden administrar composiciones de refuerzo adicionales de células de memoria Th1 activadas solas o formuladas con antígeno. Preferentemente, las composiciones de refuerzo se pueden preparar con un intervalo de al menos 3-7 días, y, más preferentemente, con un intervalo de 7 a 14 días. Se pueden administrar composiciones de refuerzo adicionales al paciente según se requiera mensualmente o anualmente.

El componente antigénico de las composiciones farmacéuticas incluye uno o más antígenos relacionados con la enfermedad. En la formulación puede usarse cualquier fuente de antígeno, por ejemplo, estos antígenos pueden provenir de células u organismos vivos, el material fuente puede inactivarse mediante irradiación (u otro método de inactivación), usarse como células u organismos completos o lisados de los mismos. En particular, las células tumorales o lisados de células tumorales pueden servir como material fuente de células para los antígenos. El material fuente de la célula puede derivarse de fuentes celulares autólogas o alogénicas o de líneas celulares. Las fuentes de antígeno se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos 12/434.168 presentada el 1 de mayo de 2009.

Cuando el paciente desarrolla síntomas de una enfermedad particular, se administran al paciente las composiciones de vacuna activadora con células de memoria Th1 activadas y una o más fuentes de antígenos relacionados con la enfermedad. El sistema inmunológico del paciente puede activarse para producir una respuesta de Th1 a escala completa rápidamente y, por lo tanto, montar una respuesta más eficaz contra los antígenos debido a la inmunidad anti-aloantígeno que ya está presente en el paciente.

Las composiciones de vacuna activadora generalmente incluyen células de memoria Th1 activadas alogénicas como se describe en el presente documento para las composiciones de vacuna de sensibilización. Preferentemente, las células de memoria Th1 alogénicas administradas a un paciente en la composición activadora proceden de la misma fuente que las células de memoria Th1 alogénicas utilizadas en la composición de sensibilización. El número de células de memoria Th1 activadas alogénicas administradas a un paciente puede ser aproximadamente el mismo que el número de células alogénicas administradas en las composiciones de sensibilización. Aunque el uso de cantidades mayores o menores de células en las composiciones activadoras está dentro del alcance de la invención. Las composiciones de vacuna activadoras también pueden incluir antígenos relacionados con la enfermedad como se describe en el presente documento. Las células Th1 alogénicas y los antígenos relacionados con la enfermedad pueden administrarse conjuntamente como una composición de vacuna activadora. Alternativamente, las células Th1 alogénicas y los antígenos relacionados con la enfermedad se pueden administrar como composiciones separadas.

Ejemplo

Se adquirieron ratones hembra Balb/c (H-2^{d/d}) y macho C57BL/6 (H-2^{b/b}) de cinco a seis semanas de edad de la Universidad Hebrea, Instalaciones de animales de la Escuela de Medicina Hadassah, Jerusalén, Israel. Todos los ratones se mantuvieron en condiciones específicas sin patógenos (SPF) y se les dio agua acidificada y alimentos *ad libitum*. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Escuela de Medicina de la Universidad Hebrea. Todos los ratones tenían de 6 a 8 semanas de edad cuando se usaron en el experimento.

El modelo BCL1 de tumor BCL1 es una leucemia/linfoma espontáneo de células B de origen Balb/c. La línea tumoral BCL1 se mantiene *in vivo* mediante pases en serie en receptores Balb/c. En estos experimentos, se infundió a los animales por vía intravenosa a través de la vena de la cola 2.000 células BCL1 el día 0, que es letal en el 100 % de los ratones. En algunos experimentos, se implantaron 1×10^4 BCL1 por vía subcutánea en el flanco de ratones Balb/c. BCL1 forma un tumor sólido de rápido crecimiento en este contexto que se asemeja a linfoma/plasmacitoma.

Preparación de células de memoria Th1 alogénicas- Se prepararon células de memoria Th1 alogénicas. En resumen, se aislaron células CD4⁺ de bazo de machos C57BL/6 y se cultivaron durante 6 días con perlas paramagnéticas anti-CD3 y anti-CD28 (perlas expansoras de células T CD3/CD28, Dynal/Invitrogen) en una relación inicial perla:células CD4 de 3:1 y 200 UI/ml (rm)IL-2 recombinante de ratón, 20 ng/ml de rmIL-7, 10 ng/ml de rmIL-12 (Peptotech, New Jersey) y 10 µg/ml de mAb de IL - 4 antimurina (Becton Dickenson) en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 %, penicilina-estreptomicina-glutamina, aminoácidos no esenciales (NEAA) (Biological Industries, Israel) y N-acetilcisteína 3,3 mM (NAC; Sigma) (medios completos). Después de 6 días en cultivo, las células CD4 se cosecharon y se separaron mediante rotura física y paso sobre un imán. Estas células se usaron frescas o se almacenaron en nitrógeno líquido para uso futuro. Antes del uso, las células se activaron mediante incubación con nanopérlas recubiertas con anti-CD3/anti-CD28 durante 4 horas en medio completo.

Vacunaciones - Los ratones se vacunaron con composiciones de vacuna suspendidas en 0,1 ml de HBSS o medio completo. Las inoculaciones se realizaron en almohadillas del pie alternas o en la capa de piel del flanco afeitado.

Se usaron preparaciones de antígeno tumoral de BCL1 - lisados de BCL1 y células BCL1 irradiadas como fuentes de antígenos tumorales. Los lotes de lisado de BCL1 se obtuvieron a partir de 1×10^7 células BCL1 suspendidas en 2 ml de HBSS y se lisaron mediante 3 ciclos de congelación (a -80°C en el congelador)-descongelación (baño de agua a 37°C). La rotura celular total se validó microscópicamente usando tinción con azul tripán. El lisado se mezcló bien para asegurar una solución homogénea y se dividió en alícuotas en dosis separadas de 0,2 ml. Estas dosis se almacenaron a -80°C antes de su uso. Se irradiaron células BCL1 frescas a 20 Gy y se usaron en una hora de tratamiento.

Anticuerpos monoclonales - Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales (mAb) para el fenotipado de superficie. anti-mCD4-PerCP-Cy5 (IgG2a); at IgG2a-PerCP-Cy5.5 de rata como control de isotipo; anti-mCD62L-APC (IgG2a); IgG2a-APC de rata como control de isotipo; anti-mCD45RB-PE (IgG2a); IgG2a-PE de rata como control de isotipo; anti-mCD8a-FITC (IgG2a); IgG2a-FITC de rata como control de isotipo; anti-mCD44-FITC (IgG2b); IgG2b-FITC de rata como control de isotipo; anti-mCD154(CD40L)-PE (IgG); IgG-PE de rata como control de isotipo; anti-mCD25-APC (IgG1); IgG1-APC de rata como control de isotipo; anti-mCD3e-PerCP-Cy5.5(IgG); IgG-PERCP-Cy5.5 de hámster armenio como control de isotipo, todos ellos de eBioscience, Inc. (San Diego, EE.UU.).

ELISPOT Ensayo - Se prepararon suspensiones de células individuales de células de bazo de ratones inmunizados. Las células se dividieron en alícuotas de modo que se sembraron en placas 2×10^6 células viables en 2 ml de medio completo en pocillos de una placa de 24 pocillos. Los esplenocitos en cada pocillo se pulsaron con antígenos de prueba. Los antígenos de prueba se prepararon como lisados de congelación-descongelación suspendidos en medio completo. En cada pocillo se introdujeron pulsos de lisado de 1×10^7 células: BCL1, células Th1 alogénicas o esplenocitos de ratones singénicos no tratados. Los pocillos pulsados se cultivaron durante 24 horas a 37°C en un incubador de CO_2 humidificado. Después de 24 horas, se recogieron las células no adherentes, se lavaron y se contaron. A continuación, estas células se sembraron en placas por triplicado a 100.000 células viables por pocillo en placas previamente recubiertas con anti-IFN- γ y anti-IL-4 (eBioScience, San Diego, CA) y se incubaron durante 20 horas adicionales en medio completo suplementado con 20 UI/MI de rmlL - 2 (Peprotech). Se usaron esplenocitos frescos de ratones singénicos activados con PHA como control positivo para cada placa (datos no mostrados). Las placas se desarrollaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se leyeron en un sistema automatizado de análisis de imágenes.

Modelos tumorales de crioinmunoterapia - Se utilizaron dos modelos tumorales para los protocolos de crioinmunoterapia, un modelo de tumor sólido bilateral y un tumor sólido con modelo de enfermedad sistémica. El modelo de tumor sólido bilateral consistió en ratones que recibieron inyecciones subcutáneas de 1×10^4 de células tumorales BCL1 bilateralmente en los flancos afeitados al día 0. Para el tumor sólido con modelo de enfermedad sistémica, los ratones recibieron una sola inoculación subcutánea de 1×10^4 de BCL1 el día 0 en el flanco izquierdo y también una infusión intravenosa de 2000 BCL1.

Crioablación - Los ratones anestesiados (ketamina-HCL, 100 mg/kg, i.p.) sufrieron tratamiento de crioablación aplicando una suave presión durante 10 segundos con pinzas congeladas (que se mantuvieron en nitrógeno líquido) al tumor. Los tumores eran de 16-25 mm^2 cuando se trataron. La bola de hielo cubrió la masa tumoral completa. Para asegurar la descongelación completa del área tratada antes de la vacunación, se administraron tratamientos intratumorales después de 1 hora.

Estadística – Se usó un ANOVA de dos vías para determinar diferencias significativas en los niveles de citocinas, frecuencias de respuesta ELISPOT y los cambios de volumen tumoral. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo. Se usó análisis de rangos logarítmicos y de razón de riesgos instantáneos para comparar las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Graphpad Software; San Diego, CA). Los animales que sobrevivieron > 60 días se censuraron del análisis.

Respuesta inmunitaria a la vacunación con BCL1 con o sin adyuvante.(Figura 1A y figura 1B) Se vacunó a los ratones Balb/c ($n=3$) cuatro veces por vía intradérmica a intervalos semanales con lisado de tumor BCL1 congelado-descongelado (f/t BCL1) o BCL1 irradiado (BCL1 irrad.) sin adyuvante (figura 1A) o se mezclan con 1×10^3 células Th1 alogénicas reticuladas CD3/CD28 (Th1 alo) como adyuvante (figura 1B). A la 5ª semana después de la primera inoculación, se sacrificó a los animales y se recogieron los bazos, se añadieron pulsos a los cultivos en suspensión de células individuales de esplenocitos con f/t BCL1 o esplenocitos f/t de un ratón Balb/c nativo como control. Después de 24 horas, las células T no adherentes se retiraron y se sembraron en placas por triplicado a 1×10^5 células por pocillo de anti-IFN- γ cualquier placa de ELISPOT recubierta con anti-IL-4. Después de un cultivo de 20 horas, se desarrollaron las manchas de IFN- γ y IL-4 y se contaron mediante el análisis de imágenes de vídeo asistido por ordenador. Cada barra representa el número de manchas medias de los triplicados \pm SE de 10^5 células T. El asterisco (*) en la figura 1A y la figura 1B indica una diferencia significativa ($p < 0,05$) y n.s. indica que no es significativo ($p > 0,05$) en comparación con el control y entre los valores entre paréntesis (ANOVA de dos colas).

Caracterización de células Th1 reticuladas CD3/CD28. (Fig. 2A, Fig. 2B and Fig. 2C) Las células T CD4+ seleccionadas positivamente derivadas de C57BL/6 –e introdujeron en cultivo el día 0 en medio cRPMI suplementado con rmlL-12, rmlL-7, rmlL-2 y un mAb anti-IL-4 neutralizante y se activaron con perlas expandidas con células T conjugadas con CD3/CD28 (Dynal/Invirogen) a una relación de perlas:células de 3:1. Las células se

dividieron diariamente a partir del día 3 - 6 y se suplementaron con perlas Expandier de células T adicionales, rmlL - 7, rmlL - 2 y mAb anti - IL - 4. El día 6, las células se cosecharon y se activaron con nanopérlas conjugadas con CD3/CD28. El cambio fenotípico en CD45RB, CD62L y CD44 desde el día 0 al día 6 se muestra en la figura 2A El área de color negro representa el control de isotipo. La línea negra es el fenotipo de las células CD4+ del día 0. El área rellena de color gris es el fenotipo de las células del día 6 antes de la activación de nanopérlas de CD3/CD28 y la línea gris representa el fenotipo después de la activación de las nanopérlas de CD3/CD28. La figura 2B muestra los cambios fenotípicos en la expresión de la molécula efectora CD40L en células CD4+ en cultivo el día 0 en comparación con las células cosechadas el día 6 antes y después de la activación de las nanopérlas de CD3/CD28. Solo las células activadas expresaron cantidades significativas de esta molécula efectora. La figura 2C representa el cambio fenotípico en la expresión de CD25 en las células CD4+ el día 0 en comparación con las células el día 6 antes y después de la activación de las nanopérlas CD3/CD28. El fenotipo de las células activadas el día 6 fue CD4+, CD62Llo, CD45RBhi, CD44hi, CD40L+, CD25+.

Producción de citocinas (figura 3A) e inmunogenicidad (figura 3B) de las células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28. La producción de las citocinas de IFN- γ e IL-4 en sobrenadantes de cultivos de células de 6 horas mediante ELISA. Las células CD4 seleccionadas positivamente de C57BL/6 cultivadas durante 6 días en presencia de IL-12 (solo día 1-3), IL-7 e IL-2 se expandieron 60-100 veces y se diferenciaron a las células efectoras/de memoria. CD45RBhi, CD44hi. Estas células se cosecharon el día 6, se lavaron y se reactivaron con nanopérlas CD3/CD28, se cultivaron durante 6 horas y los sobrenadantes se recogieron para análisis mediante ELISA (Figura 3A: Th1 activadas frescas). Estos resultados se compararon con los sobrenadantes de cultivos de 6 horas de las mismas células cosechadas del día 6 que se congelaron primero en nitrógeno líquido y, después, se descongelaron y se activaron con nanopérlas CD3/CD28 (Figura 3A: Th1 activadas descongeladas). Para la comparación, los sobrenadantes de una muestra de células CD4 positivamente seleccionadas (las mismas que se colocaron en cultivo el Día 0) se activaron con perlas Expandier de células T CD3/CD28 a una relación perlas:células de 3:1 y se cultivaron durante 6 horas (figura 3A: CD4 vírgenes). Los sobrenadantes de las células cosechadas del día 6 también se cultivaron durante 6 horas sin activación de CD3/CD28 (Figura 3A: Th1 frescas no activadas).

La inmunogenicidad de estas composiciones celulares se analizó mediante ELISPOT (Figura 3B). Se inocularon 1×10^4 células Th1 activadas frescas, células Th1 no activadas frescas o células CD4 seleccionadas positivamente (control) derivadas de ratones C57BL/6 por vía intradérmica en ratones Balb/c alogénicos una vez a la semana durante 4 semanas. Durante la 5ª semana, se sacrificó a los ratones ($n = 3$), se extrajeron los bazo y

se establecieron cultivos de células esplenocitos individuales. Se aplicaron pulsos en los cultivos con lisados congelados/descongelados de esplenocitos CD57BL/6 y se cultivaron durante 24 horas. La fracción de células T no adherentes se recogió después, se lavó y se transfirieron 1×10^5 células a placas de ELISPOT recubiertas con anti-IFN- γ o anti-IL-4 por triplicado y se cultivaron otras 20 horas en presencia de 20 UI de rmlL-2. Cada barra representa el número medio de manchas de los triplicados \pm SE.

Vacunación protectora y exposición tumoral. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones Balb/c vacunados contra el tumor BCL1 ($n = 8$ para cada grupo). (Figura 4) Se infundió a todos los ratones i.v. 2.000 células de BCL1 el día 0. Antes de la exposición tumoral, se inoculó a los ratones i.d. el día -22, el día -15, el día -8 y el día -1 medio solo (control), 1×10^4 células Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas (Th1 solo), 1×10^4 células Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas mezcladas con BCL1 irradiado (BCL1 irradiad. +Th1) o 1×10^4 células Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas mezcladas con lisado tumoral BCL1 congelado/descongelado (f/t BCL1+Th1). La mediana de la supervivencia de los ratones control fue de 21 días. La vacunación con BCL1 irradiad. solo (mediana de la supervivencia = 20,5 días) de f/t BCL1 solo (mediana de la supervivencia= 20,0 días) no afectó significativamente a la supervivencia en comparación con el control. El tratamiento previo con Th1 solo prolongó significativamente la supervivencia hasta una media de 24 días (razón de riesgos instantáneos= 3,14). La vacunación con BCL1 irradiad. con Th1 como adyuvante no tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia (mediana de la supervivencia = 22 días). La mezcla de f/t BCL1 con Th1 dio como resultado la supervivencia del 50 % de los ratones a la exposición al tumor letal y dio como resultado una mediana de la supervivencia de 46 días (razón de riesgos instantáneos= 6,08).

Vacunación terapéutica. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones Balb/c

A ratones ($n = 6$ por grupo) a los que se infundieron 2000 BCL1 i.v. el día 0. (Figura 5) se les administraron inyecciones i.d. de 1×10^4 células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas solas (Th1) o lisado de f/t de 1×10^6 BCL1 mezclado con Th1 (f/t BCL1 + Th1) i.d. los días 1, 8 y 15. Los ratones de control sobrevivieron una media de 19,5 días. Los ratones vacunados con Th1 solo sobrevivieron significativamente más tiempo que el control con una media de 26 días (rango logarítmico: $p=0,001$; razón de riesgos instantáneos: 3,981). Los ratones vacunados con f/t BCL1 + Th1 también sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones de control con una supervivencia media de 34 días (rango logarítmico: $p = 0,001$, razón de riesgos instantáneos: 3,981), que no fue significativamente diferente del grupo Th1 solo.

Sensibilización con refuerzo terapéutico. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones Balb/c vacunados contra el tumor BCL1 ($n = 8$ para cada grupo). (Figura 6) Se infundió a todos los ratones i.v. 2.000 células de BCL1 el día 0. Antes de la exposición tumoral, se sensibilizó a los ratones mediante inoculación i.d. el día -22, el día -15, el día -8 y el día -1 con medio solo (control), 1×10^4 células Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas (Th1) o 1×10^4 de

células Th1 mezcladas con lisado de tumor BCL1 congelado/descongelado (sensibilización con Th1+f/t BCL1). El día 7, se administraron a algunos ratones inyecciones terapéuticas de refuerzo i.d. Con Th1 solo o Th1 mezclado con f/t BCL1. Los ratones de control sobrevivieron una mediana de 20 días. La vacunación con Th1 solo dio como resultado una extensión de la supervivencia significativa a una mediana de 23 días (rango logarítmico: $p=0,011$;

razón de riesgos instantáneos: 2,478). La vacunación con Th1 sola seguido de un refuerzo de Th1 dio como resultado una ventaja significativa de supervivencia (mediana de la supervivencia = 25 días) en comparación con el control (orden logarítmico: $p < 0,0001$; razón de riesgos instantáneos = 3,915) y una supervivencia significativa en comparación con Th1 solo (orden logarítmico: $p = 0,03$; razón de riesgos instantáneos = 2,337). Los ratones sensibilizados mediante vacunación con f/t BCL1 con Th1 como coadyuvante (sensibilización con Th1 + f/t BCL1) dieron como resultado una mediana de la supervivencia de 57,5 días, sobreviviendo el 50 % de los ratones al ataque letal. Los ratones sensibilizados con Th1 + f/t BCL1 y a los que se ha administrado un refuerzo de Th1 tuvieron una supervivencia del 75 % a la exposición letal. Los ratones sensibilizados con células Th1 solas y a los que se administró una inyección de refuerzo terapéutico con f/t BCL1+Th1 tuvieron una ventaja significativa de supervivencia en comparación con los controles, con una mediana de supervivencia de 46 días (rango logarítmico: $p < 0,0001$; cociente de riesgos instantáneos = 5,633) y un 37,5 % de ratones supervivientes a la exposición letal.

Respuesta del tumor sólido y del tumor sistémico a la crioinmunoterapia. En el modelo de tumor sólido, se administró a los ratones Balb/c inoculaciones subcutáneas de 1×10^4 células tumorales BCL1 bilateralmente en los flancos afeitados al día 0. En el modelo de tumor sistémico, se administró a los ratones Balb/c inoculaciones de 1×10^4 células tumorales BCL1 en el flanco izquierdo y 2000 BCL1 por vía intravenosa a través de la vena de la cola el día 0. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier del modelo de tumor sistémico (Figura 7A) y del modelo de tumor sólido (Figura 7B) en ratones ($n=8$ en cada grupo) tratados el día 14 con crioblación de todo el tumor observable de la masa tumoral que queda sola (crio solo) o con células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas intratumorales (crio+Th1) o con células Th1 intratumorales solas sin crioblación (Th1 solo). Los ratones control sobrevivieron una mediana de 21 días en el modelo sistémico y 28,5 días en el modelo de tumor sólido. El tratamiento de crio+Th1 dio como resultado una ventaja significativa sobre la supervivencia (rango logarítmico: $p=0,0059$; cociente de riesgos instantáneos= 3,194) en el modelo sistémico. La ventaja sobre la supervivencia en el modelo de tumor sólido no fue significativo (n.s.). Se repitió el mismo experimento con la adición de una infusión intravenosa de 1×10^5 de Th1 al día 7 para todos los ratones. La figura 7C muestra las curvas de crecimiento tumoral de las masas tumorales contralaterales no tratadas para ratones tratados con este protocolo. El 40% de los ratones tratados con crio + Th1 se curaron de la enfermedad. El crecimiento del tumor contralateral se suprimió significativamente ($p < 0,01$) en el otro 60 % de ratones que, finalmente, sucumbieron a la enfermedad. En el modelo de tumor sistémico (figura 7D), se muestran curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Los ratones tratados con células Th1 intratumorales solas sobrevivieron una media de 28 días, que fue significativamente más largo que los ratones control, que sobrevivieron una media de 19 días (rango logarítmico: $p < 0,0001$; cociente de riesgos instantáneos=4,291). El 40% de los ratones tratados con crio + Th1 sobrevivieron > 90 días.

RESULTADOS

Inmunogenicidad de BCL1 - La respuesta inmunitaria nativa a la vacunación con BCL1 en ratones Balb/c se caracterizó como basal para analizar los efectos biológicos de la adición de un adyuvante. Dado que BCL1 que se ha pasado continuamente *in vivo* durante muchos años, el clon de BCL1 actual resultaría ser no inmunogénico cuando se administra a ratones Balb/c singénicos sin un adyuvante debido a la "inmunoedición".

Se analizó la inmunogenicidad de dos preparaciones vacunales de BCL1, BCL1 entero irradiado (BCL1 irrad.) o un lisado congelado-descongelado de BCL1 (f/t BCL1) sin adyuvante (figura 1A) o mezclado con 1×10^3 células Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas (Th1 alo) como adyuvante (figura 1B). La "hipótesis de peligro" predice que la preparación de lisado de BCL1 f/t sería más inmunogénica que la preparación de BCL1 irradiado. Para analizar la inmunogenicidad de preparaciones de f/t BCL1 y BCL1 irrad., se administró a ratones Balb/c por vía intardérmica (i.d.) a en 0,2 ml de HBSS una vez por semana durante 4 semanas.

La vacunación con BCL1 irrad. y f/t BCL1 sin adyuvante pudo provocar respuestas inmunitarias significativas específicas del tumor (véase la Figura 1A). La frecuencia media de las células T específicas del tumor (manchas de IL-4 + IFN- γ) fue de 1/64 después de la vacunación con BCL1 irrad., que fue significativamente mayor (3,5 veces) que la frecuencia media de 1/227 después de la vacunación con f/t BCL1. Ambos protocolos de vacunación dieron como resultado frecuencias significativamente mayores de células T que respondieron en comparación con la frecuencia media de control de 1/3333 ($p < 0,001$).

Ambas preparaciones de vacuna produjeron respuestas de células T específicas del tumor sesgadas hacia Th2 (IL-4). La respuesta de frecuencia media de la IL-4 de células T a la vacunación con BCL1 irrad. fue de 1/93 y la respuesta de IFN- γ fue significativamente menor ($p < 0,001$) a 1/208. La frecuencia media de los respondedores de IL-4 en ratones vacunados con f/t BCL1 fue de 1/322, que fue significativamente mayor ($p < 0,01$) que la frecuencia de respuesta media de IFN- γ de 1/769. La frecuencia media de los respondedores de IFN- γ en ratones vacunados con BCL1 irrad. en comparación con los ratones vacunados con Bcl1 f/t no fue significativamente diferente.

Ninguno de los ratones vacunados con BCL1 irrad. o f/t BCL1 fue capaz de sobrevivir a una exposición letal de 2000 células BCL1 administradas por vía intravenosa a través de la vena de la cola (véase la Figura 4), lo que indica que las respuestas inmunológicas significativas a ambos protocolos de vacunación BCL1 no eran protectoras.

5 Caracterización de células de memoria - El C57BL/6 derivado CD3/CD28 reticulado Th1 células de memoria se caracterizó por primera vez para el fenotipo de superficie (Figura 2A-C), la producción de citocinas perfil (Figura 3A] y Respuesta inmunitaria después de 4 identificaciones semanales En ratones Balb/c alogénicos (Figura 3B

10 Se analizó la expresión superficial de CD62L, CD45RB, CD44, CD25 y CD40L para caracterizar la diferenciación de células durante el cultivo de 6 días mediante FACS de las células fuente CD4+ del día 0 y se compararon los patrones de tinción con las mismas células recogidas después de 6 días en cultivo antes y después de la activación mediante reticulación de CD3/CD28. Los resultados se muestran en la Figura 2A.

15 Las células CD4+ del día 0 positivamente seleccionadas de esplenocitos se tiñeron CD62L^{hi}, CD44^{hi} pero se convirtieron de un fenotipo CD62L^{hi} a un fenotipo CD62L^{lo}. Por lo tanto, las células CD3/CD28 reticuladas del día 6 expresaron un fenotipo de CD4+, CD62L^{lo}, CD45RB^{hi}, CD44^{hi}.

20 Fenotípicamente, las células de memoria de ratón son, normalmente, CD62L^{lo}, CD45RB^{lo}, CD44^{hi}. El fenotipo CD62L^{lo}, CD45RB^{lo}, CD44^{hi} de las células producidas mediante nuestro método de cultivo expresan el mismo fenotipo que las células de memoria/efectoras que se han asociado previamente con la enfermedad autoinmune y el rechazo del aloinjerto.

25 La activación mediante reticulación CD3/CD28 de las células del día 6 durante 4 horas causó un aumento significativo en el número de células que expresan CD40L de 9,27 % a 67,65 % (Figura 2B), que se correlacionó con un aumento en las células que expresan CD25 de 63,09 % a 91,52 % (Figura 2C).

30 Estas células de memoria/efectoras CD4+, CD45RB^{hi}, CD44^{hi}, CD40L+, CD40L+, CD25+ activadas con CD3/CD28 (n = 6 lotes) se analizaron para detectar la producción de citocinas después de la activación mediante reticulación de CD3/CD28 de las células frescas cosechadas al día 6 o las células cosechadas el día que se habían congelado en nitrógeno líquido, descongelado y activado. Se incluyeron las células CD4+ activadas del día 0 y las células del día 6 frescas recolectadas no activadas para comparación (véase la Figura 3).

35 Las células de memoria/efectos CD4+ frescas activadas/expresaron cantidades sustanciales de IFN- γ (4210 \pm 169,7 pg/ml/6h) e IL-4 insignificante (52,33 \pm 6,8 pg/ml/6h) y, por tanto, estas células se denominan células de memoria Th1. Cuando estas células de memoria Th1 se congelan en nitrógeno líquido antes de la activación y después se descongelan y se activan, mantienen el fenotipo Th1 pero expresan aproximadamente un 29 % menos IFN- γ e IL-4 que las células frescas (2985 \pm 173,5 pg/ml/6h de IFN- γ y 37,2 \pm 6,95 pg/ml/6h de IL-4). Las células de memoria Th1 no activadas produjeron cantidades insignificantes de citocinas (13 \pm 6,7 pg/ml/6h de IFN- γ , 8,8 \pm 3,6 pg/ml/6h de IL-4). Las células CD4+ fuente aisladas mediante selección positiva a partir de una suspensión de células individuales de esplenocitos C57BL/6 normales produjeron citocinas tras la activación con microperlas conjugadas con CD3/CD28 con un sesgo Th2 (254 \pm 50,2 pg/ml/6h de IL-4 53,5 \pm 11,4 pg/ml/6h de IFN- γ).

45 Estos datos demuestran que las condiciones de cultivo hacen que las células nativas con CD4+ con un sesgo de Th2 se diferencien en células de memoria Th1/efectoras fuertemente polarizadas que expresan CD40L tras la reticulación de CD3/CD28 y expresan un fenotipo de memoria CD62L^{lo}, CD45RB^{hi}, CD44^{hi} inusual.

50 Respuesta inmunitaria a las células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas - Para caracterizar el potencial de las células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas para proporcionar actividad adyuvante para la estimulación de la inmunidad de tipo 1, se llevó a cabo un estudio para determinar si las células de memoria TH1 derivadas el C57BL/6 eran capaces de provocar inmunidad de tipo 1 frente a sus propios aloantígenos en huéspedes Balb/c alogénicos. A los ratones se les administraron 1 x 10⁴ células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 o 1 x 10⁴ células de memoria Th1 sin reticulación CD3/CD28 i.d. en 0,1 ml de cRPMI, se utilizó como control la inoculación de cRPMI. Se inocularon ratones (n = 6) una vez a la semana durante cuatro semanas.

55 Durante la quinta semana después de la primera vacunación, se sacrificó a los ratones y se extrajeron los bazo y se prepararon suspensiones de células individuales para el análisis ELISPOT como se ha indicado anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 3B.

60 La vacunación con células CD4 alogénicas (día 0) solas dio como resultado una frecuencia media de la respuesta inmunitaria alogénica basal (IFN- γ +IL-4) de las células 1/348 T. Las células Th1 alogénicas (día 6) sin reticulación CD3/CD28 dio como resultado una frecuencia media de respuesta de las células 1/268 T que no fue significativamente diferente de la de las células CD4 solas. Sin embargo, la reticulación CD3/CD28 de las células Th1 alogénicas dio como resultado una frecuencia media de las células T 1/34 específicas aloantigénicas que fue significativamente mayor que la frecuencia de respuesta de las células CD4 alogénicas y las células Th1 alogénicas no activadas (p<0,0001).

65

La respuesta inmunitaria a las células CD4 alogénicas y las células de memoria Th1 alogénicas no activadas dio como resultado una inmunidad Th2 sesgada, mientras que las células de memoria Th1 alogénicas reticuladas CD3/CD28 provocaron una respuesta Th1 fuertemente polarizada. La vacunación con células CD4 dio como resultado una frecuencia media de las células T 1/181 productoras de IL-4, que fue significativamente mayor ($p < 0,0001$) que la frecuencia media de las células T 1/4167 productoras de IFN- γ . Las células de memoria Th1 alogénicas no activadas provocó una frecuencia media de las células T 1/147 respondedoras de IL-4, que fue significativamente mayor ($p < 0,0001$) que la frecuencia media de las células T 1/1587 productoras de IFN- γ . El control del esplenocito singénico no provocó una respuesta inmunitaria adaptativa detectable (resultados no mostrados).

Vacunación protectora y exposición. Con el fin de determinar si las células Th1 alogénicas podrían servir como coadyuvante para proteger a los ratones de una exposición letal del tumor BCL1, se prepararon mezclas de vacunas de lisado BCL2 congelado/descongelado (f/t BCL1) o BCL1 irradiado (Irrad BCL1) usadas solo (control) o mezcladas con 1×10^4 células Th1 alogénicas. Se usaron células Th1 alogénicas solas sin una fuente de antígeno tumoral como control. Los ratones ($n = 8$ en cada grupo) recibieron 4 Inoculaciones i.d. de las preparaciones de la vacuna a intervalos semanales los días -22, -15, -8 y -1. Se usaron inyecciones de medios solo como control. El día 0, todos los ratones vacunados recibieron una exposición i.v. letal de 2000 células BCL1.

Se realizó un seguimiento de los ratones para determinar la supervivencia (véase la figura 4). La mediana de la supervivencia de los ratones control solos fue de 21 días. La vacunación con cualquiera de BCL1 irradiado, f/t BCL1 o Th1 alogénicas individuales no dio como resultado protección contra la exposición tumoral. Curiosamente, la vacunación con Th1 alogénica solas, aunque no proporcionó protección, prolongó significativamente la supervivencia de los ratones expuestos a una media de 24 días (cociente de riesgos instantáneos = 3,14). La vacunación con una composición de células BCL1+TH1 irradiadas no afectó a la supervivencia (mediana de la supervivencia = 22 días) y no proporcionó protección. La vacunación con células f/t BCL1+Th1 dio como resultado una mediana de la supervivencia de 46 días (cociente de riesgos instantáneos = 6,08), sobreviviendo el 50 % de los ratones a la exposición tumoral letal.

Protocolo terapéutico de vacuna - Los datos anteriores demostraron los efectos protectores de la vacunación con f/t BCL1 y células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas utilizadas como adyuvante en animales que fueron vacunados cuando estaban libres de tumor, después, expuestos a una dosis letal del tumor. Para determinar si este efecto protector podría proporcionar también un efecto terapéutico, se investigaron protocolos de vacunación en ratones con tumores preexistentes.

El protocolo previo de vacunación protectora incluyó 4 inoculaciones i.d. semanales (28 días) seguidas de una exposición tumoral el día 35. Este programa de vacunación no se pudo traducir al contexto terapéutico en nuestro modelo, ya que los ratones sucumben a la enfermedad 19-22 días después de la infusión letal de BCL1. Por lo tanto, los ratones ($n = 6$ cada grupo) recibieron una dosis letal de 2000 células BCL1 por vía intravenosa el día 0 y vacunaciones terapéuticas de 1×10^4 células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas solas (Th1) o lisado f/t de 1×10^6 de BCL1 mezclado con Th1 alogénicas (f/t BCL1 + Th1) i.d. los días 1, 8 y 15. Las inoculaciones de medios solo con el mismo programa sirvieron como control. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Los ratones de control sobrevivieron una media de 19,5 días. Curiosamente, los ratones vacunados con Th1 solo sin ninguna fuente de antígeno tumoral sobrevivieron significativamente más tiempo que el control con una media de 26 días (rango logarítmico: $p=0,001$; razón de riesgos instantáneos: 3,981). Los ratones vacunados con f/t BCL1 + Th1 también sobrevivieron significativamente más tiempo que los ratones de control con una supervivencia media de 34 días (rango logarítmico: $p = 0,001$, razón de riesgos instantáneos: 3,981), pero no fue significativamente diferente del grupo de Th1 alogénicas solo. No se curó ningún ratón con ninguno de estos protocolos de vacuna terapéuticos.

Vacunación de sensibilización y de refuerzo terapéutico. Dado que no se curaron ratones en los protocolos de vacuna terapéutica, la vida de 19-22 días de los ratones a los que se infundieron tumores BCL1 no era suficiente tiempo para que desarrollaran una respuesta inmunitaria adoptiva que pudiera superar el tumor de rápido crecimiento. Por lo tanto, se llevaron a cabo ensayos para determinar si los ratones sensibilizados con vacunaciones que contenían Th1 alogénicas antes de la exposición al tumor responderían mejor a la vacunación terapéutica. En estos experimentos, se sensibilizó a los ratones con Inoculaciones i.d. el día -22, día -15, día -8 y día -1 con medio solo (control), 1×10^4 células Th1 (Th1) reticuladas CD3/CD28 alogénicas o 1×10^4 células Th1 mezcladas con lisado de tumor BCL1 congelado/ descongelado (sensibilización c Th1 + f/t BCL1). A todos los ratones se infundieron 2000 BCL1 el día 0. El día 7, se administró a algunos ratones i.d. inoculaciones de refuerzo terapéuticas de 1×10^4 Th1 solas o 1×10^4 de Th1 mezcladas con BCL1. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Los ratones de control sobrevivieron una mediana de 20 días. La sensibilización con Th1 solo de nuevo dio como resultado una extensión de la supervivencia significativa a una mediana de 23 días (rango logarítmico: $p=0,011$; razón de riesgos instantáneos: 2,478). La sensibilización con Th1 solas seguido de un refuerzo terapéutico de Th1 dio como resultado una ventaja significativa de supervivencia (mediana de la supervivencia = 25 días) en comparación con el control (orden logarítmico: $p < 0,0001$; razón de riesgos instantáneos = 3,915) y una supervivencia significativa en comparación con la sensibilización con Th1 solo (orden logarítmico: $p = 0,03$; razón de

riesgos instantáneos = 2,337). Los ratones sensibilizados mediante vacunación con f/t BCL1 con Th1 como coadyuvante (sensibilización con Th1 + f/t BCL1) presentaron una mediana de la supervivencia de 57,5 días, sobreviviendo el 50 % de los ratones al ataque letal, el mismo resultado obtenido en el experimento previo de los inventores (véase la figura 4). Los ratones sensibilizados con Th1 + f/t BCL1 y a los que se ha administrado un refuerzo terapéutico de Th1 tuvieron una supervivencia del 75 % tras la exposición letal. Los ratones sensibilizados con células Th1 solas y a los que se administró una inyección de refuerzo terapéutico con f/t BCL1+Th1 tuvieron una ventaja significativa de supervivencia en comparación con los controles, con una mediana de supervivencia de 46 días (rango logarítmico: $p < 0,0001$; cociente de riesgos instantáneos + 5,633) y un 37,5 % de ratones supervivientes a la exposición letal.

La forma de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier para el grupo de sensibilización con Th1/ Th1 + f/t BCL1 fue diferente cuando se comparó con otros grupos que también resultaron en ratones curados después de la inyección de BCL1 letal. El 50% de los ratones que no sobrevivieron después de la sensibilización con Th1 + f/t BCL1 y el 25 % que no sobrevivió a la exposición letal del grupo Th1 + f/sensibilización con t BCL1 /refuerzo con Th1 mostraron signos inmediatos de leucemia (esplenomegalia palpable e importante aumento de peso) y sucumbió a la enfermedad muy temprano en una media de 24 días. Por el contrario, el grupo de tratamiento Th1 sensibilización + f/t BCL1 contenía una subpoblación de ratones (62,5 %) también con leucemia evidente pero que sobrevivió significativamente más tiempo que los ratones control y una subpoblación separada (37,5 %) que aparentemente se curó y nunca mostró signos de la leucemia.

Crioimmunoterapia - Para intentar mejorar la eficacia de la vacunación terapéutica, se planteó la hipótesis de que la muerte tumoral *in situ* por necrosis proporcionaría una respuesta inmunitaria adaptativa más potente que las otras preparaciones de lisado congelado-descongelado de los inventores. Se sabe que las células muertas de forma neuronal activan señales endógenas de angustia responsables del reclutamiento y maduración de DC, estímulos que no podrían ser generados por células sanas o en muerte apoptótica y que pueden faltar en las preparaciones de lisados de los inventores. Además, la exposición de DC inmaduros a estos estímulos proporciona señales de maduración, críticas para la iniciación de la inmunidad Th1 local y sistémica.

Con el fin de causar muerte *in situ* por necrosis, se utilizó un protocolo de crioablación. La cirugía de crioablación es una técnica que se puede traducir a la clínica y ha demostrado ser un procedimiento bien dirigido y controlado capaz de inducir necrosis tisular. Se sabe que la crioablación produce un estímulo antigénico (capaz de generar una respuesta inmunológica específica contra antígenos autólogos del tejido congelado).

Se establecieron dos modelos de tumores donde se disponía de tumores subcutáneos para la crioablación. En el modelo de tumor sólido, se administró a los ratones Balb/c inoculaciones subcutáneas de 1×10^4 células tumorales BCL1 bilateralmente en los flancos afeitados al día 0. En el modelo de tumor sistémico, se administró a los ratones Balb/c de inóculos de 1×10^4 células tumorales BCL1 en el flanco izquierdo y 2000 BCL1 por vía intravenosa a través de la vena de la cola el día 0. El tumor izquierdo de estos animales ($n = 8$ por grupo) se trató después el día 14 después de que los tumores sólidos habían crecido hasta una área $> 16 \text{ mm}^2$ con solo crioablación, crioablación con 1×10^3 células de memoria Th1 reticuladas CD3/Cd28 alogénicas por vía intratumoral (Th1), células Th1 solas o medio completo intratumoral solo como control. Los resultados se muestran en las figuras 7A y 7B.

En el modelo de tumor sistémico (Figura 7A), la supervivencia media de los ratones de control fue de 21 días. La supervivencia de los ratones tratados con crioablación solo y Th1 solo no fue diferente a la del control. Sin embargo, la combinación de la crioablación con el tratamiento intratumoral con Th1 dio como resultado una supervivencia significativamente prolongada a una media de 28,5 días (rango logarítmico, $p = 0,0057$, cociente de riesgos instantáneos: 3.194). En el modelo de tumor sólido (Figura 7B), la supervivencia media de los ratones de control fue de 28 días. Ninguno de los tratamientos analizados en este modelo proporcionó una ventaja de supervivencia significativa.

Debido a que el protocolo de crioablación no dio como resultado ningún ratón curado como resultado del tratamiento, los inventores modificaron el tratamiento para incluir una infusión intravenosa de 1×10^5 Th1 alogénicas al día 7 para todos los ratones. Se demostró previamente que la infusión intravenosa de 1×10^5 células Th1 alogénicas el día 7 causó una ventaja de supervivencia significativa en ratones a los que se inyectó letalmente BCL1 el día 0. Se hipotetizó que este tratamiento proporcionaría más tiempo para que se desarrollara una respuesta inmunitaria adaptativa potencialmente curativa y, por lo tanto, afecta a la supervivencia de los ratones sometidos a crioimmunoterapia. Además, este tratamiento sensibilizaría para la inmunidad aloantigénica, mostrada anteriormente (Figura 6) para proporcionar una ventaja de supervivencia.

Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 7C (modelo de tumor sólido) y la Figura 7D (modelo de tumor sistémico). En el modelo de tumor sólido, el área del tumor se determinó midiendo la anchura y la longitud más largas del tumor con pinzas. Después de la ablación completa del tumor izquierdo por crioablación, solo se midió la masa tumoral contralateral no tratada. Las curvas de crecimiento tumoral de los contralaterales solos y ratones tratados con combinación de crioablación y Th1 alogénicas intratumorales (crio + Th1). El 40% de los ratones tratados con la terapia de combinación sobrevivieron sin evidencia de tumor. El área del tumor contralateral se muestra para demostrar por separado la respuesta del 40 % de los ratones que sobrevivieron y el 60 % que, en

última instancia, sucumbió a la enfermedad. El crecimiento de los tumores contralaterales se suprimió significativamente ($p < 0,01$) en el 60 % de los ratones que, finalmente, sucumbieron a la enfermedad. En el modelo de tumor sistémico (figura 7D), los ratones tratados con células Th1 alogénicas intratumorales solas sobrevivieron una media de 28 días, que fue significativamente más largo que los ratones control, que sobrevivieron una media de 19 días (rango logarítmico: $p < 0,0001$; cociente de riesgos instantáneos = 4,291). El 40% de los ratones tratados con crio + Th1 sobrevivieron > 90 días.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas en la fabricación de un medicamento para sensibilizar a un paciente susceptible a una enfermedad o un paciente que no presenta síntomas de la enfermedad para la profilaxis de la enfermedad aumentando el número de células Th1 en la circulación en el paciente, **caracterizado por que** el medicamento se administra conjuntamente con uno o más antígenos de la enfermedad, en el que la enfermedad es un cáncer o debido a un patógeno infeccioso.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en el que los antígenos son células u organismos enteros vivos.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que los antígenos son células u organismos enteros inactivos o lisados de los mismos.
- 15 4. El uso de la reivindicación 1, en el que los antígenos son células tumorales o lisados de células tumorales.
5. El uso de la reivindicación 1, **caracterizado por que** los antígenos se administran de forma concurrente, por separado, o después de la administración del medicamento.
- 20 6. El uso de la reivindicación 1, en el que los antígenos se combinan con las células de memoria Th1 activadas alogénicas.
- 25 7. Un medicamento de combinación para su uso en la sensibilización de un paciente susceptible a una enfermedad o un paciente que no presenta síntomas de la enfermedad para la profilaxis de la enfermedad, que comprende una composición que comprende células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 activadas alogénicas y una composición que comprende uno o más antígenos de la enfermedad, en el que el medicamento combinado, tras la administración, aumenta el número de células Th1 en circulación en el paciente, en el que la enfermedad es un cáncer o se debe a un patógeno infeccioso.
- 30 8. La combinación de la reivindicación 7, para su uso de la reivindicación 7, **caracterizada por que** los antígenos se administran de forma concurrente, por separado o después de la administración de las células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 activadas alogénicas.
- 35 9. Una composición para su uso en la sensibilización de un paciente susceptible a una enfermedad o un paciente que no presenta síntomas de la enfermedad para la profilaxis de la enfermedad, que comprende células de memoria Th1 reticuladas CD3/CD28 alogénicas y en la que la composición aumenta el número de células Th1 en la circulación en el paciente, **caracterizado por que** la composición se administra conjuntamente con uno o más antígenos de la enfermedad, en el que la enfermedad es un cáncer o debido a un patógeno infeccioso.
- 40 10. La composición de la reivindicación 9 para el uso de la reivindicación 9 o la combinación de la reivindicación 7 para el uso de la reivindicación 7, en la que los antígenos son células u organismos enteros vivos.
- 45 11. La composición de la reivindicación 9 para el uso de la reivindicación 9 o la combinación de la reivindicación 7 para el uso de la reivindicación 7, en la que los antígenos son células u organismos enteros inactivados o lisados de los mismos.
- 50 12. La composición de la reivindicación 9 para el uso de la reivindicación 9 o la combinación de la reivindicación 7 para el uso de la reivindicación 7, en la que los antígenos son células tumorales o lisados de células tumorales.

50

55

60

65

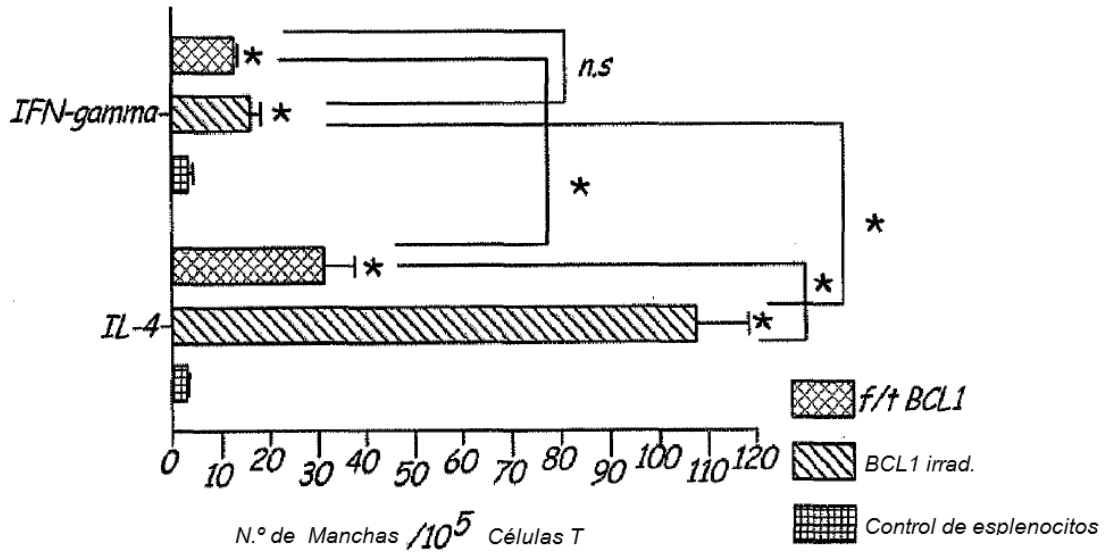


Fig. 1A

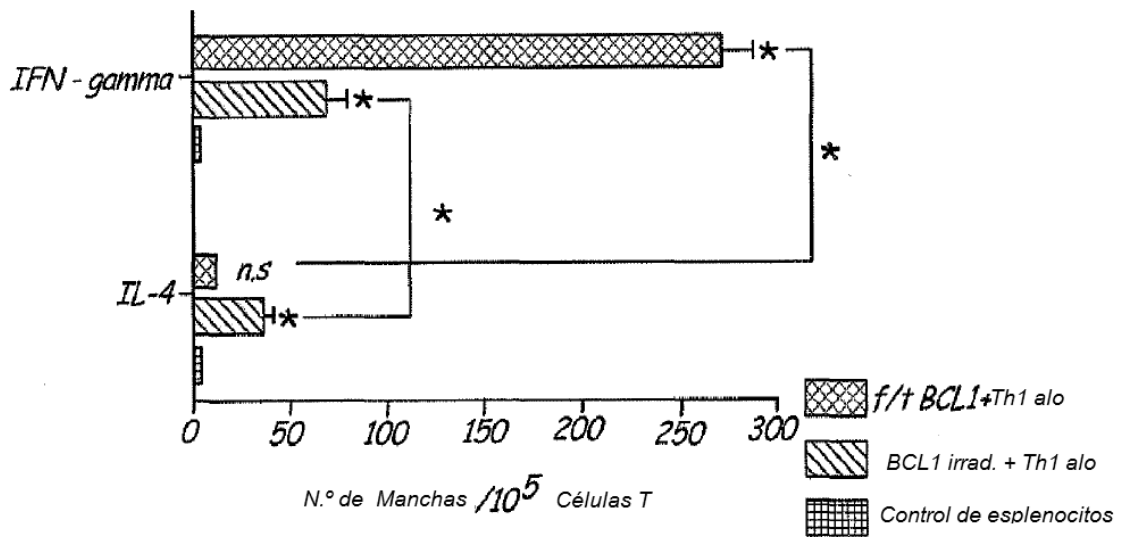


Fig. 1B

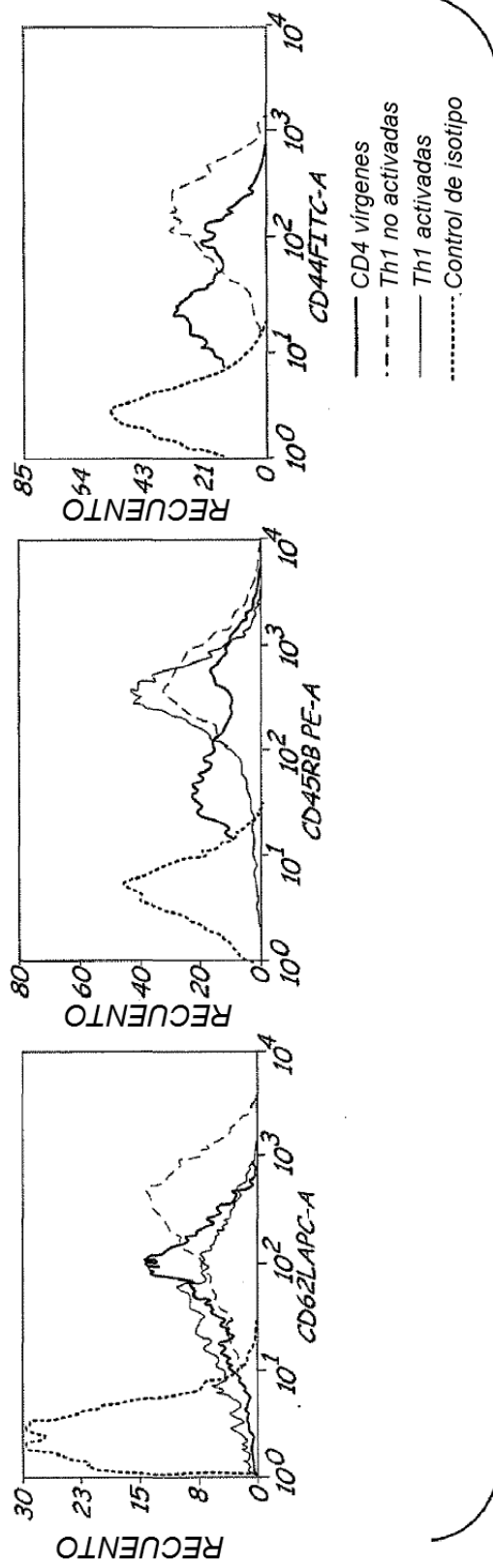


Fig. 2A

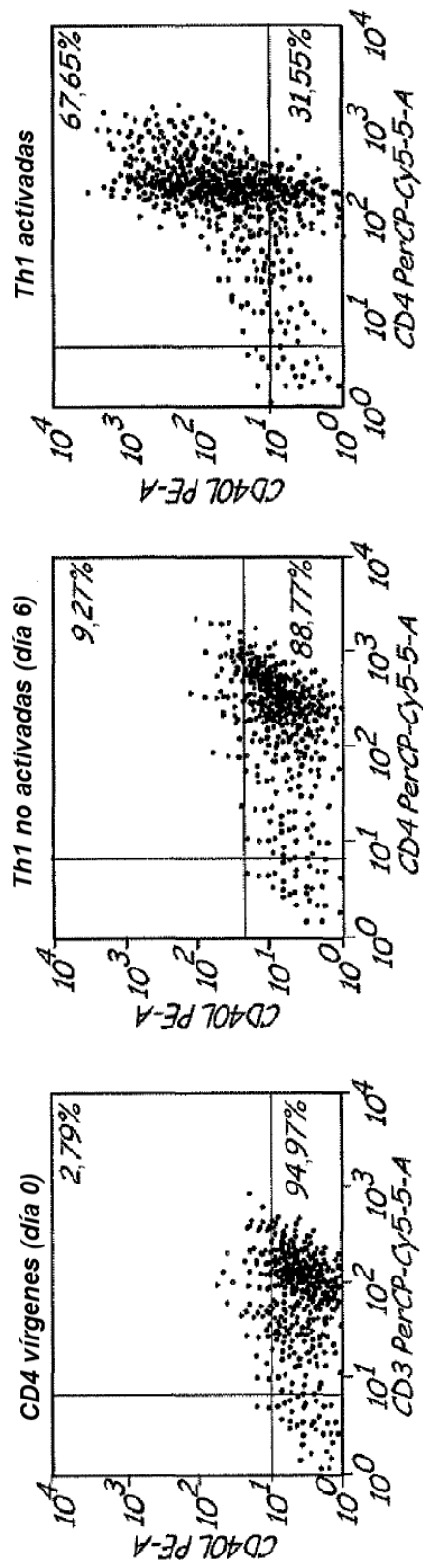


Fig. 2B

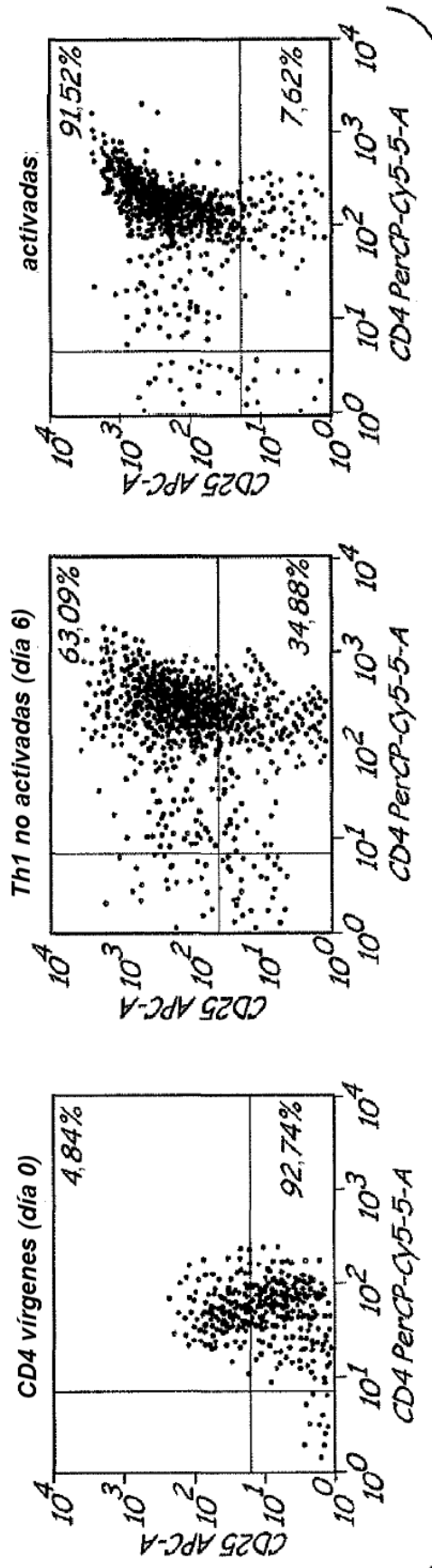


Fig. 2C

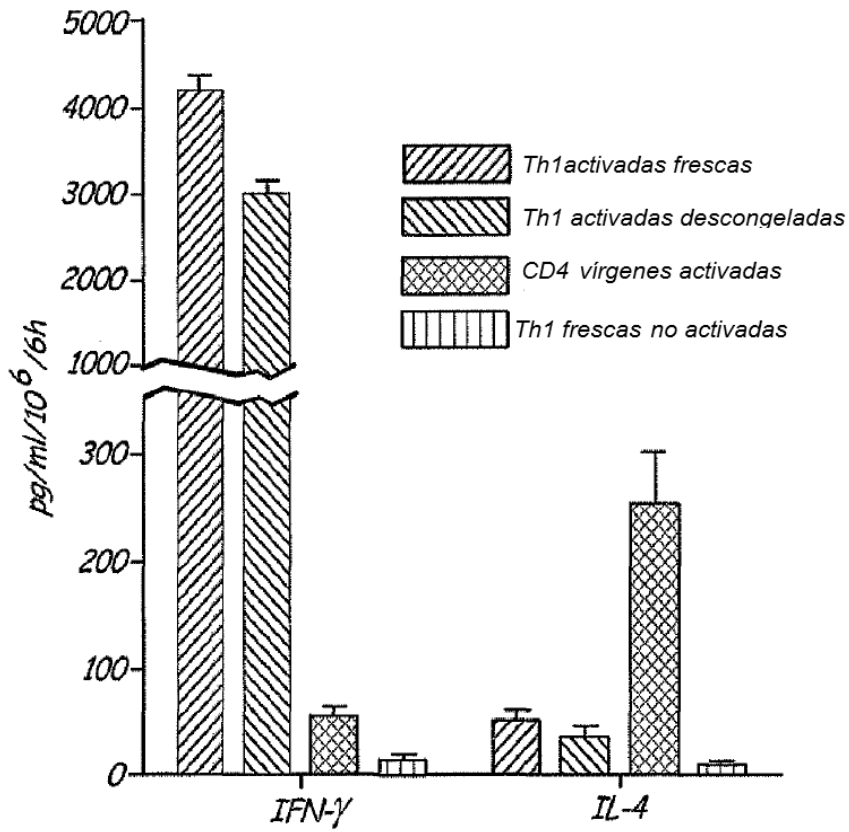


Fig. 3A

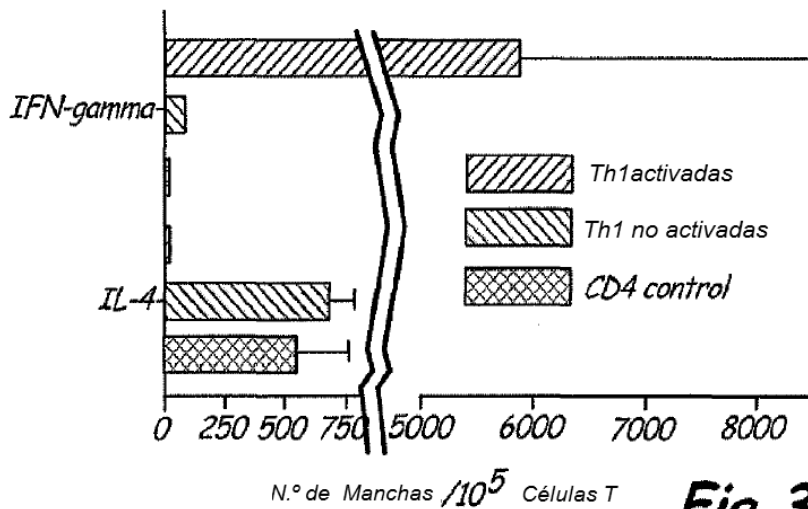


Fig. 3B

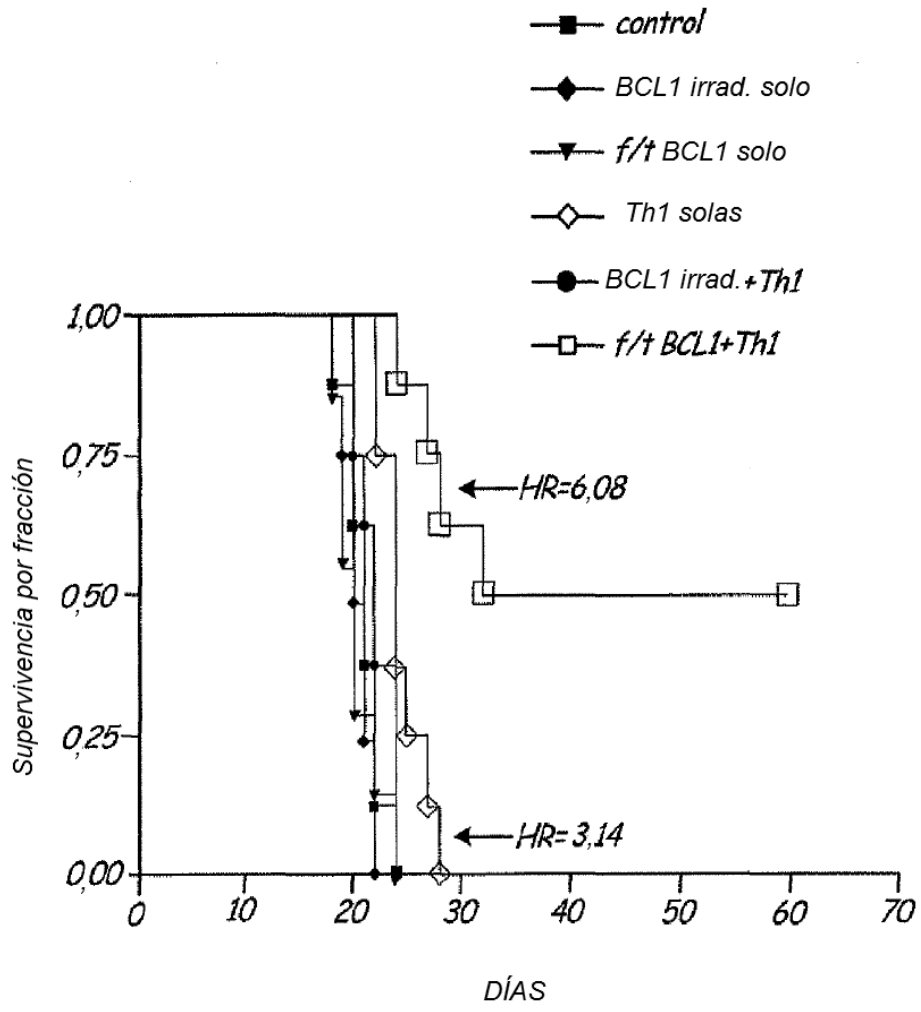


Fig. 4

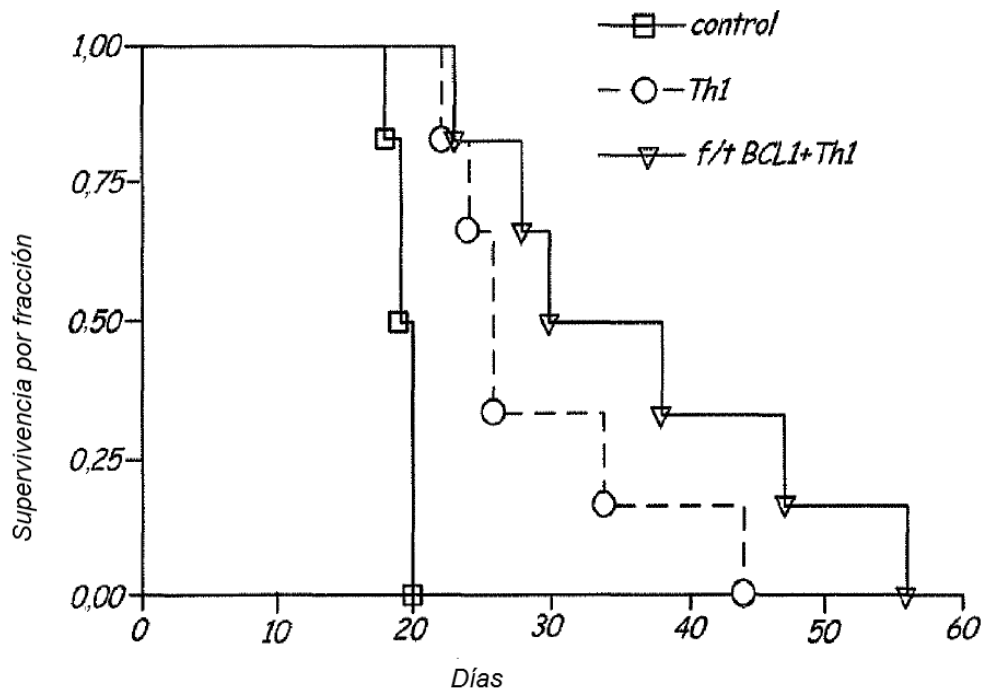


Fig.5

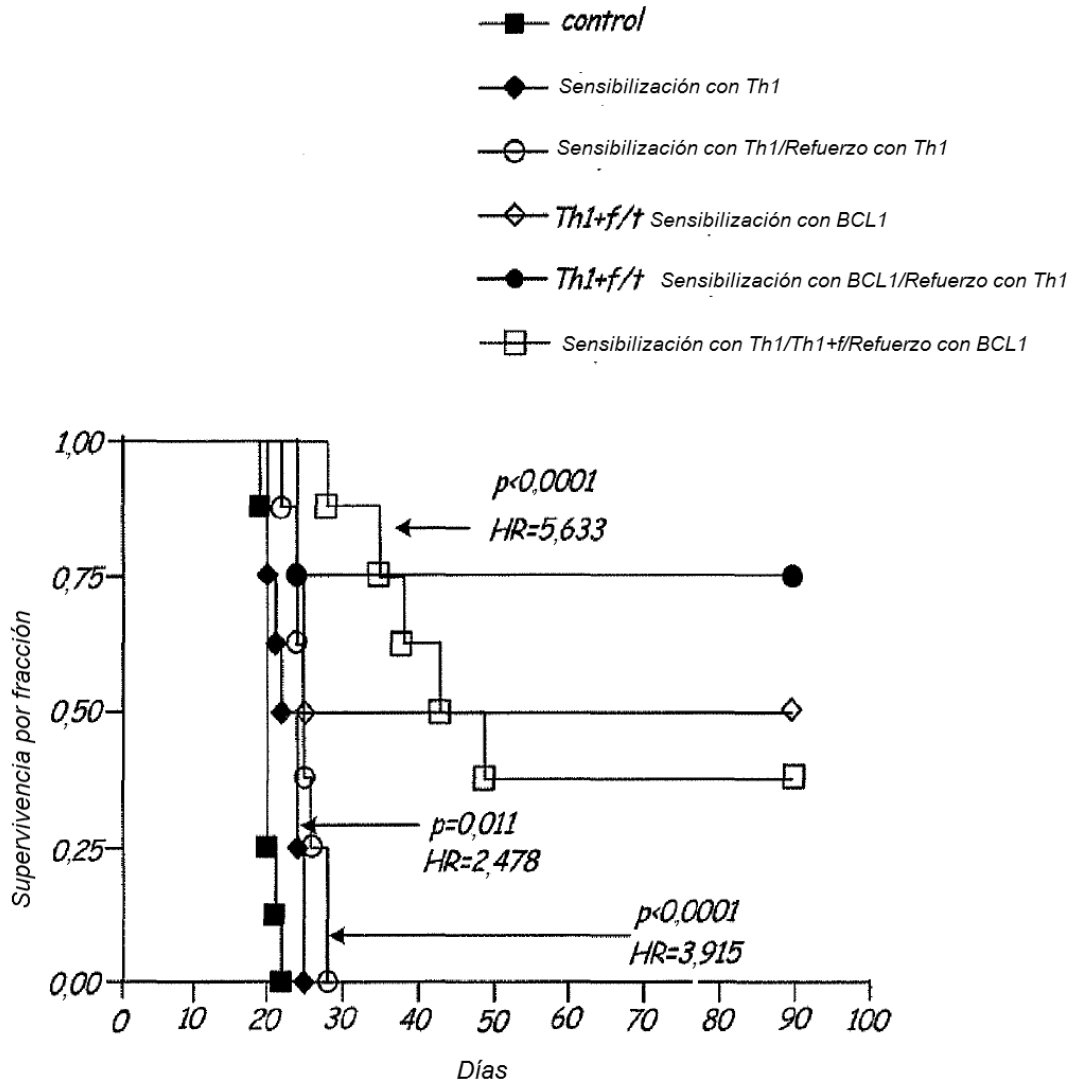


Fig. 6

