

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 943**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2013** **E 13181345 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2700708**

54 Título: **Potenciación de la capacidad de las células presentadoras de antígeno humanas para estimular células T tanto in vitro como in vivo y su uso en la vacunación**

30 Prioridad:

23.08.2012 US 201213593393

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

27.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 643 943 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

Potenciación de la capacidad de las células presentadoras de antígeno humanas para estimular células T tanto *in vitro* como *in vivo* y su uso en la vacunación

5

Campo de la invención

La invención se ubica en el campo de la inmunoterapia que utiliza células presentadoras de antígenos (APC) de un paciente, las cuales se modifican *in vitro* o *in vivo* (*in situ*) de manera que sean capaces de presentar un antígeno específico de una diana en el paciente, lo que da lugar a una respuesta inmunitaria mediada por el huésped contra las células que expresan la diana. La invención se relaciona especialmente con el aumento del efecto inmunoestimulante de las APC *in vitro* o *in vivo* (*in situ*) con vistas a la vacunación de pacientes que padecen de cáncer o trastornos infecciosos.

10

15

Antecedentes de la invención

A lo largo de los años, las APC tales como las células dendríticas (CD) han surgido como actores clave en la orquestación de las respuestas inmunitarias y particularmente en la inducción de las respuestas primarias en los pacientes en general. Hoy en día, las CD pueden generarse a gran escala en sistemas cerrados, donde se producen cantidades suficientes de células para su uso en ensayos clínicos. Simultáneamente, se han identificado antígenos derivados de microorganismos infecciosos y muchos antígenos diferentes asociados a tumores, que se expresan selectiva o preferentemente en células tumorales. Además, se han diseñado una gran variedad de estrategias para cargar las CD con tales antígenos. En conjunto, estos hallazgos permitieron el inicio de estudios clínicos con CD cargadas de antígeno en pacientes con cáncer y en pacientes que padecían infecciones. Sin embargo, las respuestas inmunitarias y los resultados clínicos satisfactorios son difíciles de lograr.

20

25

Un problema importante de la utilización de CD cargadas con un antígeno específico de una diana, como las APC, es que son insuficientes para provocar una respuesta inmunitaria fuerte tanto *in vitro* como *in vivo*. Una causa de esta inmunestimulación insuficiente es la complicada manipulación *in vitro* de las CD antes de su uso, lo que da lugar a la pérdida de sus propiedades características, tales como la secreción de citocinas y otros factores que desencadenan respuestas inmunitarias. Otro problema es que las CD obtenidas de manera artificial frecuentemente no expresan los marcadores celulares necesarios en su superficie celular, los cuales se necesitan para activar una respuesta de células T contra el antígeno específico de la diana presentado por las CD, superando así la tolerancia de las células T hacia los antígenos específicos de la diana, lo cual ocurre con frecuencia.

30

35

Pueden usarse diferentes enfoques para transfectar CD, entre los que está un enfoque *ex vivo* ampliamente estudiado donde las CD se modifican *ex vivo* con la posterior transferencia adoptiva de CD transfectadas al paciente. La administración directa de ARNm y la captación *in vivo* es un enfoque más reciente que tiene ventajas sobre el enfoque *ex vivo*. La ventaja más importante es que permite una disminución en la cantidad de etapas de manipulación y el tiempo. Cuando se administran antígenos *in vivo*, por ejemplo en los ganglios linfáticos a través de inyección intranodal, éstos no son presentados fácilmente por las APC tales como las CD de una manera inmunoestimulante. Van Lint et al., 2012 (Cancer Res. 2012; 72; 1661-1671) por ejemplo, describe el uso *in vivo* de ARNm que codifica CD40L, CD70 y caTLR4 en una terapia antitumoral mediante inyección intranodal. Al combinar el enfoque *in vivo* con un estímulo de maduración, por ejemplo a través de la estimulación de las CD con, por ejemplo, LPS para madurarlas, esto además bloquea en general la captación y presentación de los antígenos reales, lo que da como resultado una pobre presentación antigénica de los antígenos de la diana.

40

45

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar una solución a los problemas anteriormente mencionados.

50

Resumen de la solicitud

Los inventores han establecido que la capacidad estimuladora de células T por parte de las APC sometidas a pulsos con péptido antigénico o APC puede potenciarse grandemente al proporcionarles adyuvantes moleculares específicos en forma de una mezcla de moléculas de ARNm o ADN que codifican el factor inmunoestimulante CD40L y uno o más de CD70 y caTLR4, tanto *in vivo* como *in vitro*.

55

Dicha estimulación con factores inmunoestimulantes puede realizarse *in vitro*, por ejemplo a través de co-electroporación u otros medios para introducir las moléculas de ARNm o ADN en las APC, tales como CD. Dicha estimulación con factores inmunoestimulantes además puede realizarse *in vivo* (*in situ*) mediante inyección intranodal, intradérmica, subcutánea, intratumoral o administración intravenosa de moléculas de ARNm o ADN que codifican dichos factores inmunoestimulantes y opcionalmente el ARNm, ADN o proteína del antígeno tumoral. Dicho ARNm o ADN puede estar desnudo o puede protegerse como se describe a continuación. Dicho ARNm o ADN puede protegerse cuando se administra por ejemplo por vía intravenosa.

60

65

Se sabe que la eficacia de la inmunización mediante ARNm administrado en los ganglios linfáticos de los sujetos, por ejemplo a través de inyección intranodal, depende de su captación y su capacidad para crear un ambiente inductor de CTL. Los inventores han demostrado que estos requisitos previos se cumplen mediante la administración simultánea de la o las moléculas de ARNm que codifican el factor inmunoestimulante CD40L y uno o más de CD70 y caTLR4, ya que permite la captación del ARNm del antígeno, confiere a las CD una alta capacidad estimuladora de células T, y como tal potencia su capacidad para estimular la inmunidad específica para el antígeno.

Con los métodos de la técnica anterior, la carga del antígeno y la maduración de las CD ocurren de una manera consecutiva, lo que conduce a una reducción de la eficacia de la carga del antígeno o a CD con una capacidad de secreción de citocinas muy reducida (CD agotadas). Con el uso de los métodos y estuches de acuerdo con la presente solicitud, los ARNm que codifican marcadores de activación (por ejemplo, TriMix) y el antígeno (administrados o que residen en el lugar de administración del ARNm que codifica los marcadores de activación) son captados simultáneamente por las CD inmaduras residentes, lo que da como resultado la maduración y el procesamiento del antígeno contemporáneos, y asegura así que ambos procesos ocurran en circunstancias óptimas. La maduración de las CD y la presentación de los antígenos van de la mano en lugar de excluirse entre sí.

Los inventores encontraron que la administración intranodal de ARNm del antígeno de la diana junto con TriMix, (una mezcla de ARNm que codifica el ligando de CD40, el receptor 4 de tipo toll constitutivamente activo y CD70) da como resultado la modificación y la maduración *in situ* de las CD, y por lo tanto la estimulación de las células T específicas para TAA. Se demostró la captación selectiva y la traducción del ARNm *in vivo* por las células CD11 c+ residentes en los ganglios linfáticos. Este proceso se vio obstaculizado por la administración simultánea de estímulos clásicos de maduración pero no por el ARNm TriMix. Es importante destacar que el ARNm TriMix indujo un ambiente de atracción y estimulación de células T, que incluyó el reclutamiento de células T CD4+ y CD8+ específicas para el antígeno y linfocitos T citotóxicos (CTL) contra diversos TAA. En varios modelos de tumores en ratón, la vacunación con ARNm fue tan eficaz en la inducción de CTL y en la respuesta terapéutica como la vacunación con CD sometidas a electroporación con ARNm.

La solicitud proporciona la prueba de concepto de que dichas APC modificadas sometidas a un pulso con un péptido específico de una diana o sometidas a co-electroporación con ARNm que codifica un antígeno específico de una diana pueden estimular células T con especificidad antigénica tanto *in vitro* como después de la vacunación y por lo tanto forman un nuevo enfoque prometedor para la inmunoterapia antitumoral, antiviral, antibacteriana o antifúngica.

Además, la solicitud proporciona una prueba de concepto de que la administración directa de los ARNm que codifican los factores inmunoestimulantes CD40L y CD70, caTLR4, o ambas, induce la maduración de las APC o CD *in situ*, lo que les permite presentar antígenos específicos de la diana e inducir una respuesta inmunitaria genuina contra la diana. Esto se ensayó mediante el uso de una coadministración de antígenos específicos de la diana o sin ellos y se encontró que los antígenos presentes en el ambiente tumoral eran suficientes para provocar una respuesta inmunitaria específica hacia dicho tumor. Los inventores encontraron que la inyección directa de los ARNm que codifican los factores inmunoestimulantes CD40L y CD70, caTLR4 o ambos en el tumor no sólo indujo una respuesta inmunitaria hacia dicho tumor, sino además hacia otros tumores periféricos.

Por lo tanto, la solicitud proporciona un método para mejorar las características inmunoestimulantes de las APC que comprende la introducción de al menos dos moléculas diferentes de ARNm o ADN que codifican proteínas que modifican la funcionalidad de las APC. Por consiguiente, la solicitud proporciona además un método para cargar las APC, preferentemente CD con al menos dos moléculas diferentes de ARNm o ADN que codifican proteínas que modifican la funcionalidad de las APC. Dicha carga puede llevarse a cabo *in vitro* mediante, por ejemplo, transfección o electroporación, o *in vivo*, mediante la administración directa de dicho ARNm o ADN, ya sea en una forma desnuda o protegida, en el sujeto o paciente.

Preferentemente, dichas proteínas son los factores inmunoestimulantes CD40L y uno o más de CD70 y caTLR4. Con mayor preferencia, dichas proteínas son los factores inmunoestimulantes CD40L, CD70 y caTLR4.

Opcionalmente, se introducen uno o más factores adicionales, seleccionados del grupo que comprende o consiste en: moléculas secretadas tales como IL-12p70, moléculas mediadoras de la migración de las CD tales como EL-selectina y CCR7, y/u otras moléculas coestimuladoras tales como 4-1 BBL.

Opcionalmente, las moléculas que influyen en las vías de señalización tales como SOCS, STAT3 o A20, y/o moléculas que influyen en las vías inhibitorias tales como PD-L1/PD-1/CTLA4 pueden añadirse a las APC, preferentemente CD.

En una modalidad específica, las estimulaciones específicas del antígeno se realizan sin la adición de ninguna IL-2 y/o IL-7 exógena para apoyar la proliferación y supervivencia de las células T.

En ciertas modalidades, las APC se estimulan adicionalmente con factores solubles seleccionados del grupo que comprende ligandos de TLR, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-1beta y/o PGE2.

Preferentemente, el método usado para la introducción *in vitro* de dichas moléculas de ARNm o ADN en las APC o CD se selecciona del grupo que consiste en, o que comprende: (co)electroporación, transducción vírica, lipofección y transfección de ARNm o ADN que codifican los antígenos inmunoestimulantes.

5 Preferentemente, el método usado para la introducción *in vivo (in situ)* de dichas moléculas de ARNm o ADN diferentes en las APC o CD se realiza mediante inyección intranodal, inyección intradérmica, inyección subcutánea, inyección intratumoral o mediante administración intravenosa. Para la inyección intradérmica, o inyección subcutánea (y posiblemente además para la inyección intratumoral), el pretratamiento puede realizarse, por ejemplo, con GM-CSF, Flt3L o imiquimod para potenciar el efecto. Para la administración intravenosa, se prefiere el uso de moléculas de ARNm o ADN protegidas.

15 La solicitud proporciona un método para vacunar o inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto mediante inyección intranodal, intradérmica, subcutánea, intratumoral o administración intravenosa de ARNm o ADN que codifiquen el factor inmunoestimulante CD40L y uno o más de CD70 y caTLR4, opcionalmente en combinación con antígenos o moléculas de ARNm o ADN que codifican antígenos específicos de una diana, por ejemplo derivados de una célula tumoral, o de cualquier agente infeccioso, tal como una bacteria, un virus, un hongo, una toxina o veneno, etcétera.

20 La solicitud proporciona, además, un método para tratar una infección en un paciente, que comprende la etapa de inyección intranodal, intradérmica, subcutánea o intratumoral, administración intravenosa de ARNm o ADN que codifica el factor inmunoestimulante CD40L y uno o más de CD70 y caTLR4, opcionalmente en combinación con antígenos o moléculas de ARNm o ADN que codifican antígenos derivados de cualquier agente infeccioso, tal como una bacteria, un virus, un hongo, una toxina o veneno, etcétera. Alternativamente, la administración puede realizarse en el sitio de la infección. La adición de los antígenos o moléculas de ARN o ADN que los codifican es opcional porque dichos antígenos están presentes en la circulación o en el sitio de la infección.

25 La solicitud proporciona, además, un método de tratamiento contra el cáncer para un paciente, que comprende la etapa de inyección intranodal, intratumoral, intradérmica, subcutánea o intratumoral, administración intravenosa de ARNm o ADN que codifica el factor inmunoestimulante CD40L y uno o más de CD70 y caTLR4, opcionalmente en combinación con antígenos o moléculas de ARNm o ADN que codifican antígenos tumorales. La adición de los antígenos tumorales o moléculas de ARN o ADN que los codifican es opcional porque dichos antígenos están presentes en el ambiente tumoral. Opcionalmente, dicha administración está precedida de una ablación tumoral, tal como ablación por radiofrecuencia o crio-ablación, lo que libera así los antígenos tumorales.

35 La solicitud proporciona además un método para mejorar la inmunización basada en ARNm de un antígeno en un sujeto, que comprende las etapas de administrar ARNm o ADN que codifica el factor inmunoestimulante CD40L y uno o más de CD70 y caTLR4 a dicho sujeto. Preferentemente, dicha administración se realiza en los ganglios linfáticos, por ejemplo mediante inyección intranodal. Alternativamente, dicha administración se realiza por vía intradérmica, subcutánea o intratumoral, mediante inyección o se realiza mediante administración intravenosa. Los antígenos presentes en el sitio de administración serán engullidos eficazmente por las APC activadas y posteriormente presentados al sistema inmunitario, lo que desencadena una respuesta inmunitaria específica. Preferentemente, dicha respuesta inmunitaria da lugar al tratamiento de un trastorno proliferativo.

Alternativamente, dicha respuesta inmunitaria da lugar al tratamiento de una infección o un trastorno inflamatorio.

45 La solicitud proporciona además una vacuna o composición que comprende una o más moléculas de ARNm o ADN que codifican el factor inmunoestimulante CD40L y uno o más de CD70 y caTLR4, opcionalmente en combinación con antígenos o moléculas de ARNm o ADN que codifican antígenos tumorales.

50 Por lo tanto, la solicitud proporciona una vacuna que comprende una o más moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras funcionales CD40L, CD70 y caTLR4 para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria hacia un tumor o agente causante de infección en un sujeto, en donde dicha vacuna se administra directamente al ambiente tumoral, respectivamente al área infectada, o en donde dicha vacuna se administra a los ganglios linfáticos, o a través de una administración subcutánea, intradérmica o intravenosa.

55 Preferentemente, dicha administración se realiza mediante inyección directa en la zona del tumor o área infectada, o mediante inyección intranodal o intradérmica.

60 En algunas modalidades, dicha vacuna para usar comprende además un antígeno específico de una diana. Preferentemente, dicho antígeno específico de la diana se selecciona del grupo que consiste en: ARNm total aislado a partir de una o más células diana, una o más moléculas de ARNm específico de la diana, lisados proteicos de una o más células diana, proteínas específicas de una o más células diana, un péptido o proteína sintéticos específicos de una diana y un ARNm o ADN sintético que codifica un antígeno específico de la diana o su(s) péptido(s) derivado(s).

En una modalidad preferida, dicho antígeno específico de la diana es un antígeno tumoral. En una modalidad de mayor preferencia, dicha administración está precedida de una ablación tumoral, tal como ablación por radiofrecuencia o crioblación, lo que libera así los antígenos tumorales.

5 Alternativamente, dicho antígeno específico de la diana es un antígeno bacteriano, viral o fúngico.

En modalidades preferidas, dichas moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras forman parte de una única molécula de ARNm o ADN. A veces, esa única molécula de ARNm o ADN es capaz de expresar las dos o más proteínas simultáneamente. A veces, las moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras están separadas en la única molécula de ARNm o ADN mediante un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o una secuencia que codifica un péptido 2a de autoescisión.

En algunas modalidades, la vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las modalidades definidas en la presente descripción, comprende adicionalmente moléculas de ARNm o ADN que codifican una o más de las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: IL-12p70, EL-selectina, CCR7 y 4-1 BBL. En otras modalidades, una o más moléculas que inhiben la expresión o función de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3 pueden incluirse en la vacuna. En algunas modalidades, dicho ARNm está protegido.

La solicitud proporciona además un método para preparar un agente inmunoterapéutico que comprende las etapas de:

- a) obtener o proporcionar las APC,
- b) modificar *in vitro* dicho conjunto de APC de la etapa a) con al menos 2 moléculas inmunoestimuladoras seleccionadas del grupo que comprende CD40L, CD70, caTLR4, IL-12p70, EL-selectina, CCR7 y/o 4-1 BBL; y/o inhibición de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3, y
- c) modificar *in vitro* el conjunto de APC de la etapa b) de manera que presenten epítomos derivados de antígenos específicos de la diana.

En modalidades preferidas, el método de modificación usado en la etapa b) y/o c) se selecciona del grupo de electroporación, transducción vírica, lipofección o transfección de ARNm o ADN que codifica los antígenos inmunoestimulantes.

Preferentemente, las proteínas inmunoestimuladoras específicas y los antígenos diana se introducen a través de un mecanismo de una sola etapa. En una modalidad preferida, se utiliza la co-electroporación del ARNm o ADN que codifica un antígeno específico de la diana con el ARNm o ADN que codifica los factores inmunoestimulantes.

En otra modalidad, la aplicación de pulsos de proteínas o péptidos se usa para cargar el antígeno específico de la diana o sus péptidos antigénicos derivados en las APC.

Una combinación preferida de factores inmunoestimulantes utilizados en los métodos de la solicitud es CD40L y CD70. En otras modalidades preferidas, se utiliza la combinación de moléculas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLR4, que se denomina de aquí en adelante "TriMix".

Las APC usadas en los métodos de la solicitud se seleccionan del grupo que consiste en CD o células B específicas del paciente; o líneas de células dendríticas establecidas o líneas de células B.

La solicitud proporciona además una vacuna que comprende el agente inmunoterapéutico obtenido por cualquiera de los métodos de la solicitud mencionados anteriormente, que comprende además adyuvante(s) farmacéuticamente aceptable(s).

En una modalidad específica, el agente inmunoterapéutico se dirige a un antígeno específico de una diana que puede ser un antígeno tumoral, o un antígeno bacteriano, viral o fúngico. Dicho antígeno específico de la diana puede derivarse de cualquiera de: ARNm total aislado de una o más células diana, una o más moléculas de ARNm específico de la diana, lisados proteicos de una o más células diana, proteínas específicas de una o más células diana, o un péptido o proteína sintéticos específicos de una diana y un ARNm o ADN sintético que codifican un antígeno específico de una diana o sus péptidos derivados.

La solicitud abarca además el uso de una preparación de APC obtenida por el método de la solicitud o el agente inmunoterapéutico obtenido por el método de la solicitud en la fabricación de una vacuna capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un paciente que la necesite.

La solicitud proporciona además un método para analizar nuevos epítomos específicos de la diana que pueden usarse para la vacunación de pacientes, mediante el uso de APC obtenidas por el método de inmunoestimulación de la solicitud que comprende:

- a) estimular células T de donantes sanos o pacientes (previamente vacunados o no con una vacuna contra la diana) con APC obtenidas por el método de inmunoestimulación de la solicitud;
- b) identificar células T específicas para el antígeno diana usado; y
- c) identificar el epítomo derivado del antígeno diana para el que la célula T es específica.

Además, la solicitud proporciona un método para seguir los efectos del tratamiento con una vacuna contra la diana en un paciente; que comprende la detección y el análisis de la respuesta inmunitaria hacia el antígeno específico de la diana, inducida en el sujeto previamente inyectado con la vacuna contra la diana obtenida por cualquiera de los métodos de la solicitud. En modalidades preferidas, el paciente padece de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo de: cáncer, infección bacteriana, viral o fúngica, por ejemplo, infección por VIH o hepatitis.

La solicitud proporciona, además, un estuche para mejorar las características inmunoestimulantes de las APC, que comprende una combinación de al menos dos moléculas diferentes de ARNm o ADN que codifican proteínas inmunoestimuladoras funcionales seleccionadas del grupo que consiste en CD40L, CD70, caTLR4, IL12p70, EL-selectina, CCR7, y/o 4-1 BBL, y que comprende opcionalmente moléculas que inhiben la expresión o función de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3. En una modalidad preferida, el estuche comprende moléculas de ARNm o ADN que codifican CD40L y CD70. En una modalidad de mayor preferencia, el estuche de la solicitud puede comprender adicionalmente el ARNm o ADN que codifica para caTLR4, lo que da como resultado el denominado "TriMix". En ciertas modalidades, el estuche de la solicitud comprende una única molécula de ARNm o ADN, en donde se combinan dichas dos o más moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras. Preferentemente, la única molécula de ARNm o ADN es capaz de expresar simultáneamente las dos o más proteínas inmunoestimuladoras, por ejemplo, las dos o más moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras están unidas en la única molécula de ARNm o ADN por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o una secuencia que codifica un péptido 2a de autoescisión.

Además, la solicitud proporciona un método *ex vivo* para amplificar células T con especificidad antigénica, de un paciente. El paciente puede estar vacunado previamente o no. El conjunto amplificado de células T puede utilizarse después para una vacunación nueva o adicional (refuerzo) del paciente. Por lo tanto, la solicitud proporciona un método para la amplificación *ex vivo* de un conjunto de células T de un paciente, que comprende:

- a) obtener células T de un paciente que fue vacunado antes del aislamiento o no
- b) poner las células T en contacto con el agente inmunoterapéutico de la solicitud, que comprende las APC de la solicitud, y
- c) identificar, aislar y expandir las células T *ex vivo* que son específicas para el antígeno presentado por las APC con las que se pusieron en contacto. Opcionalmente, el método comprende la siguiente etapa adicional:
- d) administración de estas células T con especificidad antigénica estimuladas y expandidas *in vitro* al paciente en un contexto de transferencia adoptiva de células T.

La solicitud proporciona además métodos para usar las APC modificadas de la solicitud para el tratamiento de neoplasias, cáncer, enfermedades infecciosas tales como infecciones virales, bacterianas o fúngicas, por ejemplo con VIH y hepatitis, o trastornos inmunológicos tales como inmunodeficiencia, SCIPD o SIDA. En el caso de la inmunoterapia activa para el cáncer o enfermedades infecciosas o inmunitarias, el tratamiento con la vacuna, el agente inmunoterapéutico o las APC de la solicitud pueden combinarse o seguirse con un tratamiento no específico de inmunomodulación para reforzar el sistema inmunitario del paciente. En el caso del tratamiento contra el cáncer, este puede consistir en anticuerpos anti-CTLA4 o IFN-alfa u otros métodos de inmunomodulación para reforzar el sistema inmunitario del paciente.

Proporcionar las APC tales como CD, células B, líneas de células dendríticas o líneas de células B con una señal de maduración a través de la electroporación de ARNm ofrece varias ventajas:

En primer lugar no hay necesidad de preincubar las APC hasta 48 horas con señales de maduración solubles como citocinas proinflamatorias o ligandos de TLR para lograr la activación de la célula presentadora de antígenos, lo que puede hacer que las células se "agoten" y sean inferiores para los propósitos de vacunación. Como resultado, las APC sometidas a electroporación con ARNm o ADN que codifican dos o más factores inmunoestimulantes (por ejemplo, el TriMix de CD40L, CD70 y caTRLA4), que se pueden inyectar en el paciente unas pocas horas después de la electroporación, madurarán y secretarán la mayor parte de sus citocinas y quimiocinas inmunoestimulantes *in situ*.

En segundo lugar, se ha postulado que la maduración de las APC *in situ* se asemeja más estrechamente al proceso fisiológico implicado en la respuesta a la infección por patógenos, y por lo tanto esa maduración *in situ* puede conducir a una mayor inmunidad por las células T. La pulsación de dichas APC con un péptido específico de la diana da como resultado la presentación de dicho péptido al sistema inmunitario del paciente.

Además, los inventores muestran que las APC sometidas a electroporación con ARNm o ADN que codifican dos o más factores inmunoestimulantes (por ejemplo, el TriMix de CD40L, CD70 y caTRLA4), pueden someterse a co-electroporación con ARNm que codifica antígenos en lugar de someterse a pulsos con péptidos antigénicos. Este enfoque ofrece varias ventajas adicionales:

En primer lugar, la maduración y la carga con antígenos de las APC se pueden combinar en una sola etapa. Evitar la etapa de pulsos con péptidos en la producción de vacunas da como resultado menos manipulación de las células y menos pérdida de células y riesgo de contaminación.

En segundo lugar, mediante el uso de un ARNm que codifica un antígeno de longitud completa todos los epítomos antigénicos posibles del TAA se presentarán en lugar de algunos epítomos seleccionados. En consecuencia, esta estrategia puede inducir una respuesta más amplia de células T específicas para el antígeno y no depende de (el conocimiento de) el tipo de HLA de cada paciente o de la identificación previa de los epítomos derivados del antígeno.

En tercer lugar, el plásmido que codifica el antígeno puede modificarse genéticamente mediante la adición de una secuencia dirigida a HLA clase II. Esto no sólo encamina el antígeno a los compartimentos de HLA clase II para su procesamiento y presentación de péptidos derivados de antígenos restringidos al HLA clase II, sino que además mejora el procesamiento y la presentación en el contexto de moléculas de HLA clase I.

También se estableció que las APC con TriMix (es decir, sometidas a electroporación con ARNm que codifica CD40L, CD70 y caTLR4) pueden estimular casi igualmente las células T específicas para MelanA cuando se someten a co-electroporación con ARNm completo que codifica MelanA en lugar de someterse a pulsos con un péptido derivado de MelanA. Además, las APC con TriMix pueden estimular células T específicas para otros antígenos con una frecuencia de precursores más baja tanto *in vitro* como *in vivo*.

La solicitud proporciona además métodos de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer, que está infectado con un agente infeccioso, o que padece de un trastorno inmunológico, que comprende la administración de una vacuna que comprende CD que se han modificado *in vitro* con los factores inmunoestimulantes tales como CD40L, CD70 y/o caTLR4.

La solicitud proporciona, además, un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto o un método para vacunar un sujeto contra un antígeno, que comprende la administración de una vacuna que comprende CD que se han modificado *in vitro* con los factores inmunoestimulantes tales como CD40L, CD70 y/o caTLR4.

Dicha administración se puede realizar por vía intravenosa o intradérmica, o mediante una combinación de estas en cualquiera de los métodos que usan CD modificadas *in vitro* de acuerdo con la solicitud (por ejemplo, TriMix-CD).

Dichos métodos de tratamiento o vacunación que usan CD modificadas *in vitro* de acuerdo con la solicitud (por ejemplo, TriMix-CD) se pueden combinar con cualquier otro tratamiento quimioterapéutico o beneficioso de cualquier otra manera para dicho sujeto.

La modificación *in vivo* de APC o CD, también es parte de la solicitud y abarca la administración directa de una o más moléculas de ARNm o ADN que codifican el factor inmunoestimulante CD40L y uno o más de CD70 y caTLR4.

Opcionalmente, se pueden administrar además moléculas de ARNm o ADN que codifican antígenos específicos de la diana.

El ARNm o ADN mencionados en cualquiera de las modalidades definidas en la presente pueden ser ARNm o ADN desnudos, o ARNm o ADN protegidos. La protección del ADN o del ARNm aumenta su estabilidad, preservando al mismo tiempo la capacidad de utilizar el ARNm o el ADN con fines de vacunación, dado que todavía pueden presentarse por las APC o CD. Ejemplos no limitantes de la protección de ARNm o ADN pueden ser: encapsulación en liposomas, protección por protaminas, formación de lipocomplejos lipídicos (catiónicos), composiciones lipídicas, catiónicas o policationicas, formación de lipocomplejos manosilados, formación de liposomas en burbujas, protección con polietilimina (PEI), protección con microburbujas cargadas de liposomas, etcétera.

La administración de los componentes de la vacuna, el agente inmunoterapéutico o la composición puede realizarse simultánea o secuencialmente, es decir, se puede administrar un componente al sujeto a la vez. Por ejemplo, las moléculas de ARNm o ADN que codifican CD40L, y caTLR4 o CD70 pueden administrarse simultáneamente junto con el antígeno diana. Alternativamente, el antígeno puede añadirse después de un pequeño intervalo de tiempo. En otra modalidad, cada molécula de ARNm o ADN que codifica un factor inmunoestimulante (es decir, CD40L, caTLR4 y CD70) se puede añadir secuencialmente, con un pequeño intervalo de tiempo entre las administraciones subsiguientes, seguido o precedido opcionalmente por la adición del antígeno diana.

De manera similar, las CD o APC pueden modificarse *in vitro* mediante la adición de los componentes del estuche o la composición de manera simultánea o secuencial, es decir, se puede añadir un componente a la vez. Por ejemplo, las moléculas de ARNm o ADN que codifican CD40L y caTLR4 o CD70 se pueden añadir a las APC o CD simultáneamente junto con el antígeno diana. Alternativamente, el antígeno puede añadirse después de un pequeño intervalo de tiempo. En otra modalidad, cada molécula de ARNm o ADN que codifica un factor inmunoestimulante (es decir, CD40L, caTLR4 y CD70) se puede añadir secuencialmente a las APC o CD, con un pequeño intervalo de tiempo entre las administraciones subsiguientes seguidas o procedidas opcionalmente por la adición del antígeno diana.

Además, los inventores han observado que la modificación de las APC o CD con los agentes inmunoestimulantes reduce además la actividad de las células T reguladoras *in vitro*. Las células T reguladoras son mediadores importantes de la tolerancia periférica, evitando así la ocurrencia de respuestas autoinmunitarias. Durante las infecciones crónicas y el cáncer, estas células T reguladoras se acumulan y disminuyen la respuesta inmunitaria específica contra la infección

o el cáncer. Por lo tanto, la reducción de la actividad de las células T reguladoras en el sitio de infección o dentro del ambiente tumoral es altamente beneficiosa, ya que aumentará la respuesta inmunitaria hacia los antígenos presentes en el sitio de infección o dentro del tumor. Hemos demostrado que las CD humanas modificadas con ARNm TriMix no inducen Treg a partir de células T CD4⁺ CD25⁻. Más importante aún, la estimulación de las células T CD8⁺ por las TriMix-CD sólo fue influenciada ligeramente por la presencia de las Tregs. Además, se observó que las células T CD8⁺ que se habían precultivado con TriMix-CD estaban parcialmente protegidas contra la posterior supresión de Treg. Además de la desensibilización de las células T CD8⁺ a las Tregs, demostramos además que las Tregs co-cultivadas en presencia de TriMix-CD perdieron parcialmente su capacidad supresora, un fenómeno que se acompañó por una disminución de la expresión de CD27 y CD25 en estas Tregs, así como un aumento en la expresión del factor de transcripción T-bet y la secreción de citocinas relacionadas con un fenotipo TH1.

Por lo tanto, la solicitud proporciona moléculas de ARNm o ADN que codifican CD40L y caTLR4, CD70, o ambas, que pueden usarse para reducir localmente la actividad de las células T reguladoras, lo que comprende la etapa de administrar dichas moléculas de ARNm o ADN al sujeto, preferentemente al sitio de la infección o al tumor, o por vía intranodal o intradérmica.

Alternativamente, la solicitud proporciona además un método para reducir localmente la actividad de las células T reguladoras, que comprende la etapa de administrar células presentadoras de antígenos o CD modificadas mediante la introducción de moléculas de ARNm o ADN que codifican CD40L, y caTLR4, CD70, o ambos, en el sitio de la infección o el tumor.

La solicitud proporciona además células presentadoras de antígenos o CD modificadas mediante la introducción de moléculas de ARNm o ADN que codifican CD40L, y caTLR4, CD70, o ambas, para usar en la reducción local de la actividad de las células T reguladoras, que comprende la etapa de administrar dichas células presentadoras de antígenos o CD al sitio de infección o al tumor.

La siguiente sección describirá la solicitud en más detalle.

Descripción de las figuras

Figura 1. Expresión transgénica después de la electroporación con ARNm. (A) Las CD se sometieron a electroporación con CD40L solo o en combinación con CD70 y/o caTLR4. Inmediatamente después de la electroporación, el transporte de proteínas se bloqueó con Golgi-plug y después de 4 h, las células se tiñeron intracelularmente para CD40L. Se utilizaron CD inmaduras sometidas a electroporación con ARNm irrelevante como control negativo. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. (B) Las CD se sometieron a electroporación con CD70 solo o en combinación con CD40L y CD40L junto con caTLR4. En varios puntos de tiempo después de la electroporación, las CD se tiñeron para la expresión de CD70. Se utilizaron CD inmaduras sometidas a electroporación con ARNm irrelevante como control negativo. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 2. Ensayo de activación de NF-kappaB. Se transfectaron células 293T con el plásmido del gen reportero pNFconluc (que codifica el gen de luciferasa de luciérnaga dirigido por un promotor mínimo sensible a NF-kappaB) y el plásmido pHR-GLuc-YFP (que codifica la luciferasa de *Gaussia* secretada, humanizada y fusionada a la proteína fluorescente amarilla). Donde se indica, las células fueron cotransfectadas con el plásmido de expresión pcDNA3-caTLR4 o pcDNA3-CD27. Debe señalarse que las células 293T expresan CD40 de manera endógena. Las transfecciones se realizaron por triplicado y las cantidades totales de plásmido se mantuvieron constantes mediante la adición de plásmido pcDNA3 vacío. Después de la transfección, 1×10^5 CD sometidas a electroporación con ARNm de CD40L o CD70 se añadieron donde se indica. Después de 24 h, se determinaron las actividades de luciferasa y se normalizaron sobre la base de la actividad de luciferasa de *Gaussia* secretada. Los resultados se muestran como media \pm SD y son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 3. La electroporación de CD inmaduras con ARNm de CD40L y/o caTLR4 induce la maduración fenotípica, potencia la secreción de IL-12 y la estimulación de células T CD4⁺ vírgenes para diferenciarse en células secretoras de IFN-gamma. (A) Las CD sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 se tiñeron después de 24 h para las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83 y CD86 y para moléculas de HLA clase I. Se indica el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia. Los resultados son representativos de al menos 8 experimentos independientes. (B) La IL-12p70 producida dentro de las 24 horas posteriores a la electroporación se dosificó en el sobrenadante. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica mediante una línea horizontal. (C) Se usaron CD sometidas a electroporación para estimular células T CD4⁺ vírgenes CD45RA⁺ alogénicas. Seis días después, las células T CD4⁺ se volvieron a estimular con perlas expansoras de células T CD3/CD28. Después de 24 horas, la secreción de IFN-gamma se evaluó en el sobrenadante mediante ELISA. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica mediante una línea horizontal.

Figura 4. Aumento de la inducción de células T CD8⁺ específicas para MelanA y restringidas a HLA-A2, células T CD8⁺ citolíticas y células T CD8⁺ secretoras de IFN-gamma/TNF-alfa por las CD sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 y sometidas a pulsos con péptido MelanA-A2. (A) Las células T CD8⁺ vírgenes se estimularon 3 veces con CD sometidas a electroporación y pulsos con péptido. Después, las células T

se contaron y se tiñeron para determinar la especificidad de CD8 y MelanA. Se muestra el aumento en veces sobre las CD inmaduras sometidas a electroporación con ARNm irrelevante. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica mediante una línea horizontal. (B) La actividad citolítica de las células T específicas para MelanA se determinó mediante un ensayo de movilización de CD107a. Las células T estimuladas se volvieron a estimular con células T2 sometidas a pulsos con péptido de gag o MelanA en presencia del AcM anti-CD107-PE-Cy5 y Golgi-stop. Después del cultivo durante la noche, las células se cosecharon, se tiñeron con anti-CD8-FITC y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células T se clasificaron en base a las características de FSC/SSC y la positividad a CD8. (C) La producción intracelular de IFN-gamma/TNF-alfa por las células T CD8⁺ estimuladas con MelanA se midió mediante citometría de flujo. Las células T estimuladas se volvieron a estimular con células T2 sometidas a pulsos con péptido de gag o MelanA en presencia de Golgi-plug. Después del cultivo durante la noche, las células T se tiñeron para la positividad a CD8, IFN-gamma y TNF-alfa. Las células T se clasificaron en base a las características de FSC/SSC y la positividad a CD8. Se proporciona el porcentaje de células que secretan IFN-gamma y/o TNF-alfa, después de restar la respuesta de fondo inducida por T2 sometidas a pulsos con péptido gag. Los resultados en los paneles (B) y (C) se proporcionan para el Experimento 2 (ver la Tabla 2). Se indica el porcentaje de células positivas para tetrámeros de MelanA-A2. Para todos los otros experimentos, la positividad para CD107a y la secreción de IFN-gamma/TNF-alfa se correlacionaron con el porcentaje de células T específicas para MelanA presentes en el cultivo. (D) Fenotipo de células T CD8⁺ específicas para MelanA. Las células T se tiñeron para determinar la positividad para CD8 y para tetrámeros de MelanA-A2 en combinación con los siguientes marcadores de células T: CD45RA, CD45RO, CD27, CD28, CCR7 y CD62L. Los resultados se muestran para las células T CD8⁺ específicas para MelanA inducidas por CD sometidas a electroporación con ARNm de CD40L, CD70 y CaTLR4 y son representativos de todas las células T CD8⁺ específicas para MelanA, independientemente de las CD que se utilizaron para la estimulación.

Figura 5. Eficacia de la electroporación, fenotipo y secreción de IL-12p70 por las CD sometidas a electroporación con ARNm TriMix solo o en combinación con ARNm de un antígeno tumoral. (A) Las CD se sometieron a electroporación con ARNm TriMix (ARNm que codifica CD40L, CD70 y caTLR4) solo o en combinación con ARNm de un antígeno tumoral. Veinticuatro horas más tarde, la eficacia de la electroporación se investigó mediante la tinción de la expresión superficial de CD70. Las CD inmaduras sometidas a electroporación con ARNm de NGFR irrelevante se utilizaron como control negativo. Los resultados son representativos de al menos 5 experimentos independientes. (B) Veinticuatro horas después de la electroporación, las CD se tiñeron para las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83 y CD86 y para las moléculas de HLA clase I y II. Se indica el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia. El fenotipo se compara con las CD inmaduras y maduras con un coctel de citocinas, sometidas a electroporación con ARNm de NGFR irrelevante. Los resultados son representativos de al menos 5 experimentos independientes. (C) La IL-12p70 producida dentro de las 24 horas después de la electroporación se dosificó en el sobrenadante. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica mediante una línea horizontal.

Figura 6. Inducción *in vitro* de células T CD8⁺ específicas para MelanA y restringidas a HLA-A2, células T CD8⁺ activadas/citolíticas y células T CD8⁺ secretoras de IFN-gamma/TNF-alfa, por las CD sometidas a electroporación con ARNm TriMix (ARNm que codifica CD40L, CD70 y caTLR4) sometidas a pulsos con un péptido antigénico o sometidas a co-electroporación con el ARNm del antígeno tumoral. (A) Las células T CD8⁺ vírgenes se estimularon 3 veces, con un intervalo semanal con CD con TriMix, es decir, CD sometidas a electroporación con una mezcla de moléculas de ARNm que codifican las proteínas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLR4. Cada semana, las células T se contaron, se tiñeron para determinar la especificidad para CD8 y MelanA y se calculó el número absoluto de células CD8⁺ específicas para MelanA presentes en el cultivo. Se muestra el porcentaje relativo en comparación con la cantidad de células T CD8⁺ específicas para MelanA obtenidas después de 3 estimulaciones con CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido de MelanA-A2 (establecido al 100 %). (B) El estado de activación y la actividad citolítica de las células T específicas para MelanA se determinó mediante un ensayo de CD137/CD107a. Las células T estimuladas se volvieron a estimular con células T2 sometidas a pulsos con péptido de gag o MelanA en presencia de AcM anti-CD107-PE-Cy5 y Golgi-stop. Después del cultivo durante la noche, las células se cosecharon, se tiñeron con anti-CD8-FITC, CD137-PE y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células T se clasificaron en base a las características de FSC/SSC y positividad para CD8. Se proporciona el porcentaje de células positivas dobles para CD137/CD107a, después de restar la respuesta de fondo inducida por T2 sometidas a pulsos con péptido gag. (C) La producción intracelular de IFN-gamma/TNF-alfa por las células T CD8⁺ estimuladas con MelanA se midió mediante citometría de flujo. Las células T estimuladas se volvieron a estimular durante la noche con células T2 sometidas a pulsos con péptido gag o MelanA en presencia de Golgi-plug. A continuación, las células T se tiñeron para determinar la positividad a CD8, IFN-gamma y TNF-alfa. Las células T se clasificaron en base a las características de FSC/SSC y positividad para CD8. Se proporciona el porcentaje de células que secretan IFN-gamma y/o TNF-alfa, después de restar la respuesta de fondo inducida por T2 sometidas a pulsos con péptido gag. Los resultados en los paneles B y C se proporcionan para el Experimento 1 (ver la Tabla 3). En cada experimento, la positividad para CD137/CD107a y la secreción de IFN-gamma/TNF-alfa se correlacionaron con el porcentaje de células T específicas para MelanA presentes en el cultivo.

Figura 7. Capacidad estimuladora de células T CD4⁺ por las CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido antigénico, o sometidas a co-electroporación con ARNm de antígeno tumoral. Las CD se sometieron a pulsos con péptido MageA3-DP4 o sometidas a co-electroporación con ARNm de MageA3-DCLamp. Cuatro horas después, las células se cocultivaron con células T específicas para MageA3, restringidas a HLA-DP4, durante 20 h. Se usaron CD inmaduras sometidas a electroporación con ARNm de NGFR irrelevante como control negativo. Se muestra la producción de IFN-gamma. Cada punto representa un experimento individual y la media se indica mediante una línea horizontal.

Figura 8. Inducción de las células T CD8⁺ específicas para otros antígenos diferentes a MelanA en pacientes con melanoma tanto *in vitro* como *in vivo*. (A) Las CD con TriMix preparadas para la vacunación se utilizaron para estimular las células T CD8⁺ aisladas de la sangre de pacientes con melanoma HLA-A2⁺ antes de la vacunación. Las CD 5
maduradas con un coctel de citocinas y sometidas a pulsos con péptido específico para gp100, Mage-A3, Mage-C2 o Tirosinasa, y restringido a HLA-A2, se utilizaron como control. Después de 3 estimulaciones semanales, las células se tiñeron con un panel de tetrámeros de HLA-A2 cargados con diferentes péptidos específicos para Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp100 y Ac anti-CD8. Las células T CD8⁺ específicas para TAA se identificaron después mediante citometría de flujo. Se restó la tinción de fondo con tetrámeros de HLA-A2 específicos para NY-ESO-1. (B) El estado de 10
activación y la actividad citolítica de las células T CD8⁺ de pacientes con melanoma antes o después de la vacunación con CD con TriMix se determinaron mediante un ensayo de CD107a/137. Las células T CD8⁺ aisladas de la sangre de los pacientes con melanoma HLA-A2⁺ antes o después de la vacunación con CD con TriMix se estimularon 2 veces *in vitro* con las mismas CD que se utilizaron para la vacunación. Una semana después de la última estimulación, las células se volvieron a estimular durante la noche con CD maduras sometidas a electroporación con ARNm de TAA o NGFR como control irrelevante en presencia de AcM anti-CD107-PE-Cy5 y Golgi-stop. Las células se cosecharon, se 15
tiñeron con anti-CD8-FITC, CD137-PE y se analizaron mediante citometría de flujo. Las células T se clasificaron en base a las características de FSC/SSC y positividad para CD8. Se proporciona el porcentaje de células doblemente positivas para CD137/CD107a. (C) La producción de citocinas de las células T CD8⁺ de pacientes con melanoma antes o después de la vacunación con CD con TriMix se determinó mediante tinción intracelular de citocinas. Las células T CD8⁺ 20
aisladas de la sangre de pacientes con melanoma HLA-A2⁺ antes o después de la vacunación con CD con TriMix se estimularon 2 veces *in vitro* con las mismas CD que se utilizaron para la vacunación. Una semana después de la última estimulación, las células se volvieron a estimular durante la noche con CD maduras sometidas a electroporación con ARNm de TAA o NGFR como control irrelevante en presencia de Golgi-plug. A continuación, las células T se tiñeron para determinar la positividad a CD8, IFN-gamma y TNF-alfa. Las células T se clasificaron en base a las características de FSC/SSC y positividad para CD8. Se proporciona el porcentaje de células secretoras de IFN-gamma y/o TNF-alfa. 25

Figura 9. Las CD maduras mediante electroporación de TriMix estimulan eficazmente a las células T con especificidad antigénica. Las superposiciones de los histogramas en (A) muestran el fenotipo de las CD sometidas a electroporación con ARNm de tNGFR y dejadas inmaduras o maduras por coelectroporación de TriMix o adición de 30
LPS (n = 10). Los gráficos en (B) muestran las citocinas secretadas por estas CD (n = 6). El gráfico en (C) representa la incorporación de timidina 3H por las células del bazo, alogénicas, cultivadas con estas CD (n = 3). D-F, los ratones se inmunizaron por vía intravenosa con 5 x 10⁵ CD sometidas a electroporación con ARNm de OVA y maduras por coelectroporación de ARNm TriMix o adición de LPS. Cinco días más tarde, se evaluó la expansión de células T CD8⁺ funcionales, específicas para OVA. Se muestran los resultados de (D) la tinción de pentámeros, (E) el ensayo de 35
citotoxicidad *in vivo* y (F) la tinción intracitoplasmática de IFN-gamma en células del bazo reestimuladas con CD que presentan SIINFEKL (n = 2). G, los ratones, inmunizados con CD que presentan Trp2, se sometieron a un ensayo de citotoxicidad *in vivo* para evaluar la estimulación de células T CD8⁺ específicas para Trp2 (n = 2).

Figura 10. Formulación y farmacocinética del ARNm. A, las CD de ratón se sometieron a pulsos con ARNm de FLuc en el tampón indicado. La luminiscencia se midió 4 horas más tarde. El gráfico representa la emisión de fotones (n = 4). B y 40
C, los ratones se inyectaron por vía intranodal con ARNm de FLuc. B, Las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* se obtuvieron en los puntos de tiempo indicados (n = 4). C, para evaluar la estabilidad del ARNm de FLuc *in vivo*, los ganglios linfáticos se aislaron 6, 12 y 24 horas después de la inyección y la PCR se llevó a cabo en ADNc sintetizado a partir de ARNm extraído (n = 4). D, los ratones recibieron una inyección intranodal de ARNm de eGFP formulado en 0,8 45
RL. Cuatro horas más tarde, se reseco el ganglio linfático, se preparó una suspensión de células individuales y se tiñeron para CD11c. La fotografía obtenida por microscopía de fluorescencia muestra la expresión de eGFP (verde) por las células CD11c⁺ (rojo, n = 4). E, los ratones CD11c-DTR transgénicos, que recibieron un pretratamiento con PBS o DT, recibieron una inyección intranodal con ARNm de FLuc. Las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* se obtuvieron 4 horas después. Se prepararon suspensiones de células individuales a partir de los ganglios linfáticos y se analizaron 50
mediante citometría de flujo para detectar la presencia de células CD11c⁺ (n = 3). F, los ratones, de los cuales la piel se trató previamente con PBS o GM-CSF, se inyectaron por vía intradérmica con ARNm de FLuc. Las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* se obtuvieron 6 horas más tarde (n = 3).

Figura 11. La administración intranodal de TriMix genera un ambiente inmunoestimulante. A y B, Las CD se sometieron a pulsos con ARNm de FLuc en presencia de estímulos de activación, después de lo cual se analizó la captación de 55
ARNm y el fenotipo de las CD (n = 4). El gráfico en (A) muestra la emisión de fotones como la media SEM de 4 experimentos. Las superposiciones de los histogramas en (B) muestran la expresión de CD70, CD40, CD80 y CD86 por las CD sometidas a pulsos en ausencia de un estímulo de maduración, en presencia de LPS, poli[*I*:C] o TriMix. C, los ratones se inyectaron por vía intranodal con ARNm de FLuc solo o combinado con TriMix o LPS después de lo cual se obtuvieron las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* (n = 5). D, la activación de CD en ratones pretratados con Flt3-L e 60
inyectados con ARNm de FLuc solo o combinado con LPS o TriMix se evaluó mediante citometría de flujo. Los histogramas representan la expresión de CD40, CD80 y CD86 por las células CD11c⁺ obtenidas de nódulos linfáticos inyectados con ARNm de FLuc solo o este último junto con ARNm TriMix o LPS (n = 3).

Figura 12. La administración intranodal de TriMix pero no de LPS junto con ARNm de OVA dio como resultado la estimulación de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para OVA. Las células OT-II CD4⁺ marcadas con CFSE o las células 65

OT-I CD8⁺ se transfirieron adoptivamente 1 día antes de la inmunización de los ratones con ARNm de tNGFR, ARNm de OVA solo o combinado con TriMix o LPS. La cantidad de ARNm se mantuvo constante mediante la adición de ARNm de tNGFR. Cinco días después de la inmunización, se analizó la estimulación de las células T dentro del ganglio linfático. A, la proliferación de las células OT-II CD4⁺ se analizó mediante citometría de flujo (n = 3). B y C, la estimulación de las células OT-I CD8⁺ se analizó mediante (B) tinción con pentámeros (n = 5) y (C) ensayo de citotoxicidad *in vivo* (n = 3). D, la estimulación de CTL después de la inmunización con ARNm de OVA y TriMix administrados por vía intradérmica en ratones pretratados con GM-CSF o por vía intranodal se analizó mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo* (n = 2).

Figura 13. La inclusión de TriMix en la vacuna de ARNm potencia la inducción de CTL específicos para TAA. Un ensayo de citotoxicidad *in vivo* se realizó para evaluar la inducción de CTL en ratones inmunizados por vía intranodal con ARNm de TAA solo o combinado con TriMix. Los gráficos representan la lisis específica de células diana tras la inmunización contra (A) Trp2 (n = 2), (B) WT1 (n = 3) y (C) tirosinasa (n = 2).

Figura 14. La inmunización *in situ* con ARNm de antígeno y TriMix es tan eficaz en la estimulación de CTL y en la terapia como la inmunización con CD modificadas *ex vivo*. A-C, Los ratones C57BL/6 se inmunizaron por vía intravenosa con CD modificadas con ARNm TriMix y antígeno o por vía intranodal con ARNm TriMix y antígeno. El ensayo de citotoxicidad *in vivo* se realizó 5 días más tarde. Los gráficos muestran la lisis específica de células diana en sangre periférica tras la inmunización contra (A) OVA (n = 2), (B) Trp2 (n = 2) o (C) WT1 (n = 2). D-H, los ratones portadores de tumores palpables (10 ratones por grupo) se inmunizaron mediante inyección intravenosa de CD sometidas a electroporación con ARNm TriMix y antígeno o mediante inyección intranodal con ARNm TriMix y antígeno. Los gráficos muestran el crecimiento tumoral (izquierda) y la supervivencia (derecha) en el modelo MO4 después de la inmunización con el antígeno OVA (D) o el TAA Trp2 (E), en el modelo EG7-OVA después de la inmunización con OVA (F), en el modelo C1498-WT1 después de la inmunización con el TAA WT1 (G) todos en ratones C57BL/6 y en el modelo P815 después de la inmunización con el TAA P1A (H) en ratones DBA-2.

Figura 15. La inyección intranodal del ARNm de FLuc conduce a la expresión de la proteína FLuc.
 A) Un ganglio linfático cervical de un cerdo se inyectó por vía transcutánea con ARNm de FLuc disuelto en lactato de Ringer. Cuatro horas después de la inyección, se reseco el ganglio linfático inyectado y se realizó un estudio de imágenes de bioluminiscencia para obtener imágenes bioluminiscentes de pseudo-color, en las que se muestra una alta luminiscencia [una medida de la cantidad de células FLuc+] mediante la flecha.
 B) Se inyectó un ganglio linfático humano de un donante de órganos sin latidos del corazón con 50 µg de ARNm de FLuc disuelto en lactato de Ringer. Después de 4 h de incubación en PBS, se realizó un estudio de imágenes de bioluminiscencia *in vivo* para obtener imágenes bioluminiscentes, en las que se muestra una alta luminiscencia [una medida de la cantidad de células FLuc+] mediante la flecha.

Figura 16. La inyección intradérmica de ARNm TriMix y ARNm de pp65 de CMV estimula una respuesta inmunitaria específica. Se inyectó ARNm TriMix solo o en combinación con ARNm de pp65 de CMV por vía intradérmica en la parte inferior de la espalda de un sujeto. A) 72 h después de la inyección, una reacción DTH es visible en ambos sitios de la inyección (enrojecimiento e induración), pero más pronunciada donde está presente el antígeno de CMV. B) Se observó una respuesta de células T CD4⁺ específicas para CMV en las células derivadas de una biopsia de piel después de la inyección de ARNm TriMix+CMV.

Figura 17. La administración intratumoral de TriMix da como resultado la inducción de respuestas inmunitarias específicas para el antígeno. Las células OT-I CD8⁺ marcadas con CFSE se transfirieron adoptivamente 1 día antes de la inmunización de ratones con ARNm de tNGFR, OVA o ARNm TriMix solos, o su combinación. Cinco días después de la inmunización, se analizó la estimulación de las células T dentro del tumor. La proliferación de células OT-I CD8⁺ se analizó mediante citometría de flujo.

Figura 18. Las células CD11 c⁺ residentes en el tumor engullen el ARNm administrado por vía intratumoral. Los ratones CD11c-DTR transgénicos, que recibieron un pretratamiento con PBS o DT, recibieron una inyección intratumoral con ARNm de FLuc. Se obtuvieron imágenes de bioluminiscencia *in vivo* 4 horas después de la administración de ARNm de FLuc. Posteriormente se prepararon suspensiones de células individuales a partir de los tumores y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la presencia de células CD11 c⁺ (A). La cinética de bioluminiscencia se realizó hasta 11 días después de la inyección intratumoral (B).

Figura 19. El ambiente tumoral de ratones tratados con ARNm TriMix contiene un mayor número de células CD11c⁺, que tienen un estado de maduración similar a las células CD11c⁺ de los ratones tratados con tNGFR (A). Por el contrario, la cantidad de células CD11c⁺ en los ganglios linfáticos que drenan los tumores no difiere entre los ratones tratados con TriMix o tNGFR, mientras que el estado de maduración de los primeros aumenta (B).

Figura 20. El ambiente tumoral de ratones tratados con TriMix contiene un número menor de células CD11 b⁺, en particular células CD11 b⁺ Ly6G⁺. Estas células son MDSC (células supresoras derivadas de tejido mieloide) inmunosupresoras.

Figura 21. Reducción de la inhibición de las Treg sobre las células T CD8⁺ no estimuladas. Las CD modificadas diferencialmente (CDi = células dendríticas inmaduras, CC-CD = CD maduras con coctel de citocinas, DiMix-CD = CD

sometidas a electroporación con caTLR4 y CD40L; TriMix-CD = CD sometidas a electroporación con caTLR4, CD40L y CD70), las Treg recién purificadas y las células T CD8⁺ marcadas con CFSE no estimuladas (relación de CD:células T CD8⁺ de 1:10 y relación de células T CD8⁺: Treg de 1:1) se cocultivaron durante 6 días en presencia de perlas recubiertas con anti-CD3 (panel izquierdo). La supresión de la proliferación se calculó como $1 - (\text{el \% de proliferación de células T CD8}^+ \text{ en presencia de Treg dividido por el \% de proliferación de células T CD8}^+ \text{ sin Treg}) \times 100$. Las barras horizontales indican la media de 6 experimentos independientes, un experimento representativo mostrado (panel derecho) con histogramas rellenos que indican proliferación en presencia de Treg e histogramas vacíos la ausencia de Treg en los cocultivos de células T CD8⁺. Se utilizó un ANOVA de una vía para comparar los diferentes grupos y una corrección de Bonferroni para la comparación post hoc por pares.

Figura 22. Protección contra la supresión de Treg sobre las células T CD8⁺ efectoras. Las células T CD8⁺ no estimuladas se cultivaron primero con CD modificadas diferencialmente (CDi = células dendríticas inmaduras; CC-CD = CD maduras con coctel de citocinas, DiMix-CD = CD sometidas a electroporación con caTLR4 y CD40L; TriMix-CD = CD sometidas a electroporación con caTLR4, CD40L y CD70) durante 6 días después de lo cual las células T CD8⁺ se cosecharon y cocultivaron con Treg recién purificadas durante 6 días en presencia de perlas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28; las relaciones de las células y el cálculo de la supresión fueron como se describieron para la Figura 21. Las barras horizontales indican la media de 5 experimentos independientes, un experimento representativo mostrado con histogramas rellenos que indican la proliferación en presencia de Treg e histogramas vacíos en ausencia de Treg en los cocultivos de células T. Se utilizó un ANOVA de una vía para comparar los diferentes grupos y una corrección de Bonferroni para la comparación post hoc por pares.

Figura 23. Influencia de las CD sobre la capacidad supresora de las células T reguladoras. Las CD modificadas diferencialmente (CDi = células dendríticas inmaduras, CC-CD = CD maduras con coctel de citocinas, DiMix-CD = CD sometidas a electroporación con caTLR4 y CD40L, TriMix-CD = CD sometidas a electroporación con caTLR4, CD40L y CD70) se cocultivaron con Treg durante 3 días, después de lo cual se evaluó el fenotipo y la función de las Treg. A, La expresión de CD27 como % de células positivas se muestra en el panel superior izquierdo, CD27 MFI se muestra en el panel inferior izquierdo. n = al menos 4 para cada condición, un experimento representativo se muestra en el panel derecho. Las Treg se determinaron primero mediante clasificación en células CD3⁺ CD4⁺ y, posteriormente, en la población CD25^{alto}, CD127⁻ y Foxp3⁺. B, Después del precultivo con CD durante 3 días, las Treg se purificaron y se cocultivaron con células T CD8⁺ no estimuladas y marcadas con CFSE durante 6 días. La supresión se calculó de nuevo como en la Figura 21 (n = 3, se muestra un experimento representativo con histogramas rellenos que indican proliferación en presencia de Treg e histogramas vacíos la ausencia de Treg en los cocultivos de células T CD8⁺). Se utilizó un ANOVA de una vía para comparar los diferentes grupos y una corrección de Bonferroni para la comparación post hoc por pares.

Figura 24. Diferenciación de las células T reguladoras hacia células Th tras el cocultivo con CD. Después del precultivo con CD modificadas diferencialmente (CDi = células dendríticas inmaduras, CC-CD = CD maduras con coctel de citocinas, DiMix-CD = CD sometidas a electroporación con caTLR4 y CD40L, TriMix-CD = CD sometidas a electroporación con caTLR4, CD40L y CD70) durante 5 días, las Treg se evaluaron para determinar la expresión de CD25 (A), así como la expresión del factor de transcripción Foxp3 (B) (n = 4, excepto para las condiciones de control; un experimento representativo se muestra en cada panel). Se extrajo el sobrenadante de estos cultivos y se evaluaron las citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-13, IL-17, IL-2 e IL-10 (C, sólo se muestra IFN- γ , IL-10 y TNF- α , de izquierda a derecha) (n = 3). D, expresión de T-bet, MFI en el panel izquierdo y % en el panel derecho de Treg que ya se han seleccionado en el fenotipo de las CD3⁺ CD4⁺ CD25^{alto} CD127⁻. (n = 4 excepto para las condiciones de control extra; se muestra un experimento representativo en cada panel) Se utilizó un ANOVA de una vía para comparar los diferentes grupos y una corrección de Bonferroni para la comparación post-hoc por pares.

Figura 25: Efecto del ARNm TriMix intratumoral sobre el ambiente tumoral. Los ratones C57Bl/6 se inocularon por vía subcutánea con células tumorales (células de timoma EL-4 que expresan ovoalbúmina (E.G7-OVA)).

- A) Se inyectó ARNm de control o TriMix en los nódulos tumorales cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³. Tres días más tarde, los ganglios linfáticos que drenan el tumor se resecaron y se obtuvo una suspensión de células individuales. Las células CD11c⁺ presentan un epítipo derivado. Se analizó la inducción de proliferación de las células T y la secreción de interferón- γ por estas células T. La inducción de proliferación y la inducción de secreción de IFN- γ por las células T específicas para OVA por las CD residentes en el tumor que migraron indican que las CD residentes en el tumor se han cargado de antígenos tumorales presentes en el microambiente tumoral;
- B) Cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con células T OT-I CD8⁺ que reconocen un epítipo derivado de ovoalbúmina. Al día siguiente, se inyectó ARNm de control (tNGFR) o TriMix en los nódulos tumorales. Cinco días más tarde, los ganglios linfáticos que drenan el tumor se resecaron y se obtuvo una suspensión de células individuales. Se analizó la inducción de proliferación de las células T lo que indica que las CD residentes en el tumor se han cargado con antígenos tumorales presentes en el microambiente tumoral y se activan para migrar a los ganglios linfáticos que drenan el tumor;
- C) Se inyectó ARNm de control o TriMix en los nódulos tumorales cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³. Cinco días más tarde, se analizó la inducción de una respuesta de células T

citotóxicas específicas para la OVA. Se demuestra que la administración intratumoral de ARNm TriMix induce una respuesta inmunitaria específica para el antígeno tumoral.

Figura 26. Efecto de la inyección intratumoral de ARNm TriMix sobre el tamaño del tumor, tanto en el tumor inyectado como en el tumor distal

A) Los ratones DBA/2 se inocularon por vía subcutánea con células de mastocitoma P815 en el flanco izquierdo y derecho. Se inyectó ARNm de control o TriMix en los nódulos tumorales de la izquierda cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³. Los volúmenes de tumores se midieron en el tiempo. B) Los ratones Balb/C se inocularon por vía subcutánea con células de linfoma A20 B en el flanco izquierdo y derecho. Se inyectó ARNm de control o TriMix en los nódulos tumorales de la izquierda cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³. Los volúmenes de tumores se midieron en el tiempo.

Figura 27: Efecto de la inyección intratumoral de ARNm TriMix sobre la supervivencia. Los ratones DBA/2 se inocularon con células de mastocitoma P815 y los ratones Balb/C con células de linfoma A20 B en el flanco izquierdo y derecho. Se inyectó ARNm de control o TriMix en los nódulos tumorales de la izquierda cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³. Se registró la supervivencia de los animales.

Descripción detallada de la solicitud

En la búsqueda de nuevos métodos para producir vacunas contra el cáncer, los inventores investigaron si el estado de activación de las CD es un factor crítico para determinar si las CD que presentan un antígeno específico de una diana serán potentes inductores de una respuesta inmunitaria contra la diana después de la vacunación o no. Los inventores encontraron de manera inesperada que la eficacia de los protocolos de vacunación con DC actualmente utilizados podría mejorarse significativamente proporcionando las DC con una señal de activación más potente y mediante el uso de un proceso de manipulación más corto. Los inventores encontraron además que el uso de una combinación de moléculas de ARNm o ADN que codifican un conjunto de proteínas inmunoestimuladoras específicas podría usarse para madurar las CD tanto *in vitro* como *in vivo*, es decir a través de la administración *in situ* al sujeto, por ejemplo, los ganglios linfáticos o directamente en el sitio de la infección o en el tumor.

A lo largo de la solicitud, el término "TriMix" representa una mezcla de moléculas de ARNm que codifican las proteínas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLR4.

A lo largo de la solicitud, el término "CD con TriMix" o "TriMix APC" significa respectivamente CD o APC que se han modificado para expresar la mezcla TriMix de moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLR4.

El ARNm o ADN utilizado o mencionado en la presente puede ser ARNm o ADN desnudos, o ARNm o ADN protegidos. La protección del ADN o ARNm aumenta su estabilidad, preservando aún la capacidad de usar el ARNm o el ADN con propósitos de vacunación. Los ejemplos no limitantes de protección tanto del ARNm como del ADN pueden ser: encapsulación en liposomas, protección por protaminas, formación de lipocomplejos lipídicos (catiónicos), composiciones lipídicas, catiónicas o policatiónicas, formación de lipocomplejos manosilados, formación de liposomas en burbujas, protección con polietilénimina (PEI), protección con microburbujas cargadas con liposomas, etcétera.

El término "diana" usado a lo largo de la descripción no se limita a los ejemplos específicos que puedan describirse en la presente. Cualquier agente infeccioso tal como un virus, una bacteria o un hongo puede ser una diana. Además, cualquier tumor o célula cancerosa puede ser una diana.

El término "antígeno específico de la diana" utilizado a lo largo de la descripción no se limita a los ejemplos específicos que puedan describirse en la presente. Para el experto será evidente que la solicitud está relacionada con la inducción de inmunoestimulación en las APC, independientemente del antígeno específico de la diana que se presente. El antígeno que se va a presentar dependerá del tipo de diana contra el que se pretende inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto. Ejemplos típicos de antígenos específicos de dianas son los marcadores expresados o secretados que son específicos de las células tumorales, bacterianas y fúngicas o de proteínas virales específicas o estructuras virales. Sin querer limitar el alcance de la protección de la solicitud, a continuación se enumeran algunos ejemplos de posibles marcadores.

El término "célula presentadora de antígeno" utilizado a lo largo de la descripción incluye todas las APC. Ejemplos específicos no limitantes son CD, líneas de células dendríticas, células B o líneas de células B. Las CD o las células B pueden aislarse o generarse a partir de la sangre de un paciente o sujeto sano. El paciente o sujeto puede haber sido objeto de una vacunación previa o no.

Los términos "neoplasias", "cáncer" y/o "tumor" usados a lo largo de la descripción no se pretende que estén limitados a los tipos de cáncer o tumores que pueden haberse ejemplificado. Por lo tanto el término abarca todos los trastornos proliferativos tales como neoplasia, displasia, lesiones premalignas o precancerosas, crecimientos celulares anormales, tumores benignos, tumores malignos, cáncer o metástasis, en donde el cáncer se selecciona del grupo de: leucemia, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de SNC, melanoma, cáncer

de ovario, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioma, cáncer de colon, cáncer de vejiga, sarcoma, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepático, cáncer óseo, cáncer de la médula ósea, cáncer de estómago, cáncer de duodeno, cáncer esofágico, cáncer de tiroides, cáncer hematológico y linfoma. Los antígenos específicos para el cáncer pueden ser, por ejemplo, MelanA/MART1, antígenos de la línea germinal del
 5 cáncer, gp100, tirosinasa, CEA, PSA, Her-2/neu, survivina, telomerasa.

El término "enfermedad infecciosa" o "infección" utilizados a lo largo de la descripción no pretende limitarse a los tipos de infecciones que pueden haberse ejemplificado en la presente. Por lo tanto, el término abarca todos los agentes infecciosos contra los que la vacunación sería beneficiosa para el sujeto. Ejemplos no limitantes son las siguientes
 10 infecciones o trastornos causados por virus: Síndrome de inmunodeficiencia Adquirida - Infecciones por Adenoviridae - Infecciones por Alfavirus - Infecciones por Arbovirus - Parálisis de Bell - Enfermedad de Borna - Infecciones por Bunyaviridae - Infecciones por Caliciviridae - Varicela - Resfriado Común - Condiloma Acuminado - Infecciones por Coronaviridae - Infecciones por Coxsackievirus - Infecciones por Citomegalovirus - Dengue - Infecciones por Virus de ADN - Ectima Contagioso, - Encefalitis, Encefalitis, Arbovirus - Encefalitis, Herpes Simple - Infecciones por Virus de Epstein-Barr - Eritema Infeccioso - Exantema súbito - Síndrome de Fatiga, Crónico - Infecciones por Hantavirus - Fiebres Hemorrágicas Virales - Hepatitis Viral, en humanos - Herpes Labial - Herpes Simple - Herpes Zoster - Herpes Zoster ótico - Infecciones por Herpesviridae - Infecciones por VIH - Mononucleosis Infecciosa - Influenza en Aves - Influenza Humana - Fiebre de Lassa - Sarampión - Meningitis Viral - Molusco Contagioso - Viruela de los monos - Paperas - Mielitis - Infecciones por Papillomavirus - Infecciones por Paramyxoviridae - Fiebre de Phlebotomus -
 20 Poliomieltis - Infecciones por Polyomavirus - Síndrome Postpoliomielitis - Rabia - Infecciones Respiratorias por Virus Sincitial - Fiebre del Valle del Rift - Infecciones por Virus de ARN - Rubéola - Síndrome Respiratorio Agudo Severo - Enfermedades Virales Lentas - Viruela - Panencefalitis Esclerosante Subaguda - Enfermedades transmitidas por garrapatas - Infecciones por Virus Tumorales - Verrugas - Fiebre del Nilo Occidental - Enfermedades Virales - Fiebre Amarilla - Zoonosis - etcétera. Los antígenos específicos para los virus pueden ser HIV-gag, -tat, -rev o -nef, o antígenos de la Hepatitis C.

Otros ejemplos no limitantes son las siguientes infecciones o trastornos causados por bacterias u hongos: Abscesos - Actinomicosis - Anaplasmosis - Ántrax - Artritis Reactiva - Aspergilosis - Bacteriemia - Infecciones bacterianas y micosis - Infecciones por Bartonella - Botulismo - Absceso Cerebral - Brucelosis - Infecciones por Burkholderia - Infecciones por
 30 Campylobacter - Candidiasis - Candidiasis, Vulvovaginal - Enfermedad por Rasguño de Gato - Celulitis - Infecciones del Sistema Nervioso Central - Chancroide - Infecciones por Chlamydia - Infecciones por Chlamydiaceae - Cólera - Infecciones por Clostridium - Coccidioidomicosis - Úlcera Corneal - Infección Cruzada - Criptococosis - Dermatomicosis - Difteria - Ehrlichiosis - Enfisema, Pleural - Endocarditis Bacteriana - Endoftalmítis - Enterocolitis, Pseudomembranosa - Erisipela - Infecciones por Escherichia coli - Fascitis necrotizante - Gangrena de Fournier - Forunculosis - Infecciones por Fusobacterium - Gangrena Gaseosa - Gonorrea - Infecciones Bacterianas Gram-negativas - Infecciones Bacterianas Gram-positivas - Granuloma Inguinal - Hidradenitis Supurativa - Histoplasmosis - Orzuelo - Impétigo - Infecciones por Klebsiella - Legionelosis - Lepra - Leptospirosis - Infecciones por Listeria - Angina de Ludwig - Absceso Pulmonar - Enfermedad de Lyme - Linfogranuloma Venéreo - Maduromicosis - Melioidosis - Meningitis, Bacteriana - Infecciones por Mycobacterium - Infecciones por Mycoplasma - Micosis - Infecciones por Nocardia - Onicomycosis - Osteomielitis - Paroniquia - Enfermedad inflamatoria pélvica - Peste - Infecciones Pneumocócicas - Infecciones por Pseudomonas - Psitacosis - Infección Puerperal - Fiebre Q - Fiebre por la Mordedura de Rata - Fiebre Recidivante - Infecciones del Tracto Respiratorio - Absceso Retrofaríngeo - Fiebre Reumática - Rinoescleroma - Infecciones por Rickettsia - Fiebre Maculosa de las Montañas Rocosas - Infecciones por Salmonella - Fiebre escarlata - Fiebre Tsutsugamushi - Sepsis -
 40 Enfermedades de transmisión sexual - Enfermedades de transmisión sexual, bacterianas - Choque séptico - Enfermedades cutáneas, bacterianas - Enfermedades cutáneas, infecciosas - Infecciones por estafilococos - Infecciones por estreptococos - Sífilis - Sífilis Congénita - Tétanos - Enfermedades transmitidas por garrapatas - Tiña - Tiña Versicolor - Tracoma - Tuberculosis - Tuberculosis de la médula espinal - Tularemia - Fiebre Tifoidea - Tifus, Epidémico transmitido por Piojos - Infecciones del tracto urinario - Enfermedad de Whipple - Tos ferina - Infecciones por Vibrio - Pian - Infecciones por Yersinia - Zoonosis - Cigomicosis - etcétera.

El término "trastorno inmunitario" abarca cualquier trastorno inmunitario, que incluye todos los trastornos o síndromes que implican una respuesta inmunitaria afectada o reducida. Ejemplos no limitantes de trastornos o síndromes que implican una respuesta inmunitaria afectada o reducida son las denominadas deficiencias inmunitarias primarias tales como: defectos congénitos del sistema inmunitario, deficiencia selectiva de IgA, inmunodeficiencia variable común, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (tipo Bruton, infantil ligada al cromosoma X o agammaglobulinemia congénita), Enfermedad Granulomatosa Crónica, Síndrome Hiper-IgM y SCID (la clásica enfermedad del "niño burbuja"). Además, pueden ocurrir inmunodeficiencias adquiridas, tales como, pero sin limitarse a: SIDA o a sujetos que reciben quimioterapia o medicamentos inmunosupresores, tales como sujetos con cáncer y sujetos sometidos a un trasplante de órgano, o para otras diversas afecciones. Además, los pacientes con diabetes pueden sufrir de supresión
 55 inmunitaria leve y las personas mayores o los niños y los recién nacidos pueden tener un sistema inmunitario debilitado o más débil. Todas estas afecciones, síndromes o trastornos se entiende que están cubiertos por el término "trastornos inmunitarios".

La presente solicitud proporciona nuevos métodos para potenciar las capacidades inmunoestimulantes de las CD humanas mediante la transfección con al menos dos moléculas diferentes de ARNm o ADN que codifican adyuvantes moleculares seleccionados de la lista de CD40L, CD70, caTLR4, IL12p70, EL-selectina, CCR7 y/o 4-1BBL; o en
 65

combinación con la inhibición de la expresión o función de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3, por ejemplo mediante transfección de siARN.

5 Además, la solicitud proporciona métodos para potenciar las capacidades inmunoestimulantes de las CD humanas *in situ* en un sujeto, mediante la administración de moléculas de ARNm o ADN que codifican adyuvantes moleculares CD40L y CD70, caTLR4, o ambas a dicho sujeto, preferentemente en los nódulos linfáticos, donde las CD residen y maduran. Alternativamente, dichas moléculas de ARNm o ADN pueden administrarse por vía intratumoral, subcutánea o intradérmica.

10 Opcionalmente, pueden coadministrarse moléculas de ARNm o ADN adicionales que codifican una o más de las siguientes proteínas: IL-12p70-, EL-selectina, CCR7 y 4-1BBL.

15 El uso de la combinación de CD40L y caTLR4 en CD inmaduras derivadas de monocitos a través de electroporación de ARNm genera CD maduras, secretoras de citocinas/quimiocinas, como se ha demostrado para la ligación de CD40 y TLR4 mediante la adición de CD40L y LPS solubles.

La introducción de CD70 en las CD proporciona una señal coestimuladora para las células T CD27⁺ vírgenes mediante la inhibición de la apoptosis de células T activadas y el apoyo a la proliferación de las células T.

20 Como alternativa a caTLR4, podrían usarse otros Receptores tipo Toll (TLR). Para cada TLR, se conoce una forma activa constitutiva, y posiblemente podría introducirse en las CD para inducir una respuesta inmunitaria del huésped. Sin embargo, en nuestra opinión, caTLR4 es la molécula activadora más potente y por lo tanto se prefiere.

25 La introducción de ARNm que codifica una citocina adicional tal como IL-12p70 en las CD podría ser beneficiosa para aumentar adicionalmente la excreción de citocinas de las CD, estimulando más aun posteriormente la respuesta inmunitaria del huésped.

30 La introducción adicional de EL-selectina o CCR7 en las CD podría ser beneficiosa para promover la migración *in vivo* de las CD manipuladas hacia los ganglios linfáticos, el lugar donde la respuesta inmunitaria se inicia naturalmente en el huésped.

Otras moléculas coestimuladoras tales como 4-1 BBL o una forma constitutivamente activa de Akt también podrían introducirse en las CD o co-administrarse *in situ*.

35 Además, la expresión y/o función de moléculas inhibitoras tales como SOCS, A20, PD-L1, STAT3 podrían reducirse o detenerse mediante la introducción adicional de moléculas inhibitoras específicas tales como moléculas de ARNic específicas en las CD, o pueden co-administrarse *in situ*.

40 La incubación adicional *in vitro* de las CD con factores solubles tales como ligandos de TLR, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, PGE2 y/o IL-1beta también podrían utilizarse para la maduración de las CD. Alternativamente, la administración *in situ* de dicho factor o factores podría realizarse para madurar las CD *in vivo* en un sujeto.

45 La solicitud utiliza preferentemente CD derivadas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas directamente de la sangre del paciente, pero también podrían usarse alternativas tales como CD diferenciadas de células positivas a CD34 o líneas de células dendríticas comercialmente disponibles.

50 El método *in vitro* de la solicitud utiliza electroporación con ARNm, transducción viral (por ejemplo, a través de lentivirus, adenovirus o virus vaccinia), lipofección de ARNm o transfección de ADN para introducir moléculas inmunoestimuladoras y antígenos específicos de la diana en las CD. La electroporación con ARNm se prefiere especialmente debido a su alta eficacia y su amplio uso aceptado en ambientes clínicos a diferencia de la transducción viral. Para la introducción de los antígenos específicos de la diana, se puede usar la pulsación de las células con péptidos específicos del antígeno o con la proteína como una alternativa a la electroporación con ARNm. El ARNm introducido puede ser una secuencia sintetizada específicamente basada en marcadores conocidos específicos de tumores, o puede aislarse de una o más líneas de células tumorales o de una biopsia de tumor del paciente.

55 Para la producción de las CD, la solicitud utiliza preferentemente plasma autólogo obtenido del paciente, pero además se puede usar suero AB humano, que está disponible comercialmente.

60 Los métodos *in vivo* o *in situ* incluyen preferentemente la inyección intranodal de las moléculas de ARNm o ADN que codifican los factores inmunoestimulantes como se ha explicado anteriormente. Alternativamente, la inyección intratumoral o intradérmica puede usarse para dirigir las CD *in vivo*. En una modalidad preferida, dicha inyección intradérmica está precedida por una inyección intradérmica con GM-CSF, FLT3L o tratamiento local con imiquimod.

65 En una modalidad preferida, la solicitud se basa en la administración combinada de CD40L y CD70 a las CD, ya sea *in vitro* o *in vivo*, lo que conduce a un aumento de los efectos inmunoestimulantes de las CD. En otra modalidad preferida, la combinación específica de CD40L, CD70 y caTLR4 se administra a las CD, de nuevo *in vitro* o *in vivo*, para mejorar

los efectos inmunoestimulantes de las CD. En ambas modalidades, cualquiera de los siguientes marcadores podría administrarse adicionalmente: IL-12p70, EL-selectina, CCR7, 4-1 BBL para aumentar la expresión o la inhibición de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3. Además de los adyuvantes moleculares, un antígeno específico de la diana o sus epítomos derivados se introducen en las CD para permitirles inducir una respuesta inmunitaria de células T hacia el antígeno específico de la diana. Se demostró que varias de las combinaciones enumeradas anteriormente tienen efectos inmunoestimulantes inesperadamente altos sobre las CD.

Hubo que superar varios obstáculos para hacer que el método funcione. Primero evaluamos la expresión transgénica de CD40L después de la electroporación en células K562 y CD. Aunque CD40L pudo detectarse fácilmente en la membrana de las células K562 sometidas a electroporación hasta 24 horas después de la electroporación, no pudimos detectarlo en la membrana de las CD. Esto se debe probablemente al hecho de que la proteína CD40L recién sintetizada encuentra rápidamente a CD40 en la membrana de las CD y se vuelve a internalizar, un proceso que no puede tener lugar en las células K562 negativas para CD40. De hecho, cuando el tráfico trans-Golgi de CD40L se bloqueó con brefeldina A, pudimos detectar la proteína CD40L intracelularmente en las CD.

Aunque se ha informado de una fuerte expresión de CD70 en CD murinas maduras tras la ligación de CD40 y TLR solos o en combinación, se sabe muy poco sobre la expresión de CD70 en CD humanas. En nuestras manos, las CD inmaduras, las CD maduras con coctel de citocinas o las CD sometidas a electroporación con CD40L y/o TLR4 no expresan CD70. Incluso después de la ligación combinada de CD40 a través de la ligación de TLR y CD40L asociada con 3T6 a través de LPS o dsARN, sólo un porcentaje menor de CD mostró expresión de CD70. Queda por establecer si esta baja expresión de CD70 por las CD humanas es un fenómeno general o podría estar relacionada con nuestro protocolo de generación de CD.

Las CD humanas se maduraron con diferentes estímulos de maduración y se colocaron en cocultivo con células 3T6 que expresaban CD40L con o sin IFN-gamma. Veinticuatro y 48 horas más tarde, se evaluó la expresión de CD70, que mostró muy poca regulación positiva de CD70. Estos datos muestran que incluso los estímulos de maduración combinados, muy fuertes (que incluye la ligación de CD40, la ligación de TLR y el IFN-gamma) son incapaces de inducir una regulación positiva de CD70 en las CD humanas. Esto está en evidente contraste con los datos publicados para las CD murinas, donde CD70 es fácilmente regulado positivamente después de la ligación de CD40 y/o TLR. Para las CD humanas, la expresión de CD70 necesita ser forzada a través de electroporación con ARNm. Estos experimentos demuestran claramente que la mera extrapolación del concepto inmunoestimulante en ratones a la situación humana de ninguna manera es directa. Por el contrario, tuvimos que inducir explícitamente la expresión de CD70 a través de la electroporación de las CD con ARNm70 en las CD humanas. Sólo entonces pudimos establecer una fuerte expresión que persistió durante varios días, lo que debería permitir a las CD interactuar con células T CD27⁺ durante un período prolongado de tiempo. A partir de los resultados experimentales esbozados en la presente, quedará claro que las CD modificadas con TriMix son mucho más potentes en la estimulación del sistema inmunitario que las CD modificadas con DiMix, modificadas con CD40L y caTLR4 solamente, lo que apunta nuevamente hacia una contribución importante de CD70.

Aunque técnicamente no fue posible investigar la expresión de la proteína caTLR4, el ensayo de activación de NF-kappaB indica que la electroporación de ARNm de nuestro plásmido con caTLR4 conduce a la expresión de una proteína funcional. Paralelamente, además pudimos demostrar que los plásmidos de CD40L y CD70 codifican proteínas funcionales, ya que las CD sometidas a electroporación con CD40L y CD70 activan la vía de señalización de NF-kappaB después de la ligación de CD40 y CD27, respectivamente.

En un experimento adicional, los inventores investigaron el efecto de la electroporación *in vitro* de CD40L, CD70 y caTLR4 en diferentes combinaciones sobre el fenotipo de las CD, su patrón de secreción de citocinas/quimiocinas y su capacidad para estimular las células T CD4⁺ vírgenes. Para las tres propiedades analizadas, se pueden sacar las mismas conclusiones:

- [1] Tanto la electroporación con CD40L como caTLR4 en las CD indujeron maduración fenotípica, potenciación de la secreción de citocinas/quimiocinas y estas CD sometidas a electroporación estimularon las células T CD4⁺ vírgenes para convertirse en células T tipo Th1 productoras de IFN-gamma,
- [2] La combinación de CD40L con la electroporación de caTLR4 reforzó aún más el efecto, mientras que
- [3] la (co-)electroporación de CD70 no tuvo ningún efecto sobre el fenotipo ni la secreción de quimiocinas/citocinas (que es como se esperaba porque las CD no expresan el ligando de CD70 (CD27)).

A nivel de fenotipo, se observó una mayor expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83, CD86 y de las moléculas de HLA clase I. Debe señalarse que el acoplamiento de CD40 a través de la electroporación de CD40L no perjudicó la regulación positiva de la expresión de CD40. A nivel de secreción de citocinas, se encontró una marcada regulación positiva en la secreción de la citocina de Th1 IL-12p70, varias citocinas proinflamatorias (IL-1beta, IL-6, TNF-alfa), factores de crecimiento hematopoyéticos (G-CSF, GM-CSF), IFN-gamma e IL-10. A nivel de secreción de quimiocinas, se observó una mayor secreción de IL-8 (reclutamiento de neutrófilos), MIP-1 alfa (reclutamiento de monocitos y células T), IP-10 (proteína de 10 kDa que puede inducir IFN-gamma; reclutamiento de monocitos y células T) y RANTES (reclutamiento de células T, basófilos y eosinófilos). MIP-1 alfa, RANTES e IP-10 son todas moléculas quimiotácticas para las células T, pero se ha demostrado que MIP-1 alfa y RANTES se producen por las CD promotoras de Th1/Th2, mientras que la producción de IP-10 se limita a CD que promueven Th1. La (co-)electroporación de CD70

no induce cambios fenotípicos o aumento de la secreción de citocinas/quimiocinas por las CD, porque las CD carecen de la expresión de su ligando de señalización CD27.

5 El patrón de secreción de citocinas y quimiocinas sugiere que las CD sometidas a electroporación con ARNm de CD40L y/o caTLR4 inducen preferentemente células Th1 productoras de IFN-gamma, un hallazgo que se confirmó en la estimulación alogénica de células T CD4⁺ CD45RA⁺. De hecho, las células T estimuladas con CD sometidas a electroporación con CD40L y caTLR4, solos o en combinación, produjeron cantidades muy elevadas de IFN-gamma, pero casi nada de IL-4 e IL-10, cuya secreción no aumentó en comparación con las células T estimuladas con CD sometidas a electroporación con ARNm irrelevante. No se observó una mayor secreción de IFN-gamma por las células T CD4⁺ estimuladas con CD sometidas a (co-)electroporación con CD70, lo que demuestra que las CD que expresan CD70 humano no instruyen directamente el desarrollo de Th1 y la secreción de IFN-gamma. No obstante, las CD que expresan CD70 humano podrían sensibilizar a las células T CD4⁺ vírgenes hacia el desarrollo de Th1 a través de la inducción de T-bet e IL-12Rbeta2.

15 En un experimento siguiente, los inventores analizaron si las CD sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 ejercían funciones coestimuladoras en un ambiente específico de un antígeno. De hecho pudimos demostrar que las CD sometidas a pulsos con un péptido de MelanA-A2, las cuales expresan CD40L, CD70 y caTLR4 en diferentes combinaciones indujeron mayor cantidad de células T CD8⁺ específicas para MelanA, donde la combinación de las tres moléculas produjo la mejor estimulación. Las CD sometidas a electroporación con CD70 solo no estimularon un aumento de la cantidad de células T CD8⁺ específicas para MelanA en comparación con las CD sometidas a electroporación con ARNm de NGFR. Por el contrario, la co-electroporación de CD70 con CD40L, junto o no con caTLR4, indujo un aumento adicional de células T específicas para MelanA cuando se comparó con las CD sometidas a electroporación con CD40L junto o no con caTLR4. Esto se debe probablemente a un efecto sobre la supervivencia inducido por la ligación de CD70 en las CD con CD27 en las células T durante la estimulación.

30 Después de haber establecido que la expresión de CD40L, caTLR4 y CD70 por las CD aumenta su capacidad para estimular las células T CD8⁺ específica para MelanA, los inventores investigaron las propiedades funcionales y fenotípicas de las células T estimuladas. En correlación con el aumento de la cantidad de células T CD8⁺ específicas para MelanA, se generaron más células productoras de IFN-gamma/TNF-alfa y se pudo detectar una mayor cantidad de células T CD8⁺ con capacidad citolítica. Al analizar el fenotipo de las células T CD8⁺ específicas de MelanA, todas las células parecen ser CD45RA-CD45RO⁺CD27⁺CD28⁺, junto con una expresión variable de CD62L y CCR7. Esto indica que se han inducido células T de memoria central (CD62L⁺ y CCR7⁺), así como células T de memoria efectoras tempranas o células EM1 (CD62L- y CCR7-), según la nomenclatura.

35 Los resultados de los experimentos enumerados más adelante en los ejemplos establecen claramente una prueba de principio de que las CD sometidas a co-electroporación con ARNm que codifica múltiples proteínas estimulantes y sometidas a pulsos con péptido antigénico son mejores estimuladores de células T que las CD inmaduras o maduras con cocteles de citocinas. Además, es posible co-electroporar estas CD con ARNm que codifica un antígeno específico de la diana, lo que proporciona así su espectro antigénico completo. Otros datos donde las CD se sometieron a co-electroporación con ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 junto con ARNm que codifica el antígeno de MelanA unido a la señal dirigida a HLA clase II de DC-LAMP indican que estas células son superiores además en la inducción de células T CD8⁺ específicas para MelanA, lo que conduce a un aumento en veces de 300 en comparación con las CD inmaduras. Los datos sugieren que las CD sometidas a co-electroporación con ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 también son capaces de cebar células T específicas para antígenos asociados a la diana distintos al MelanA, en particular MAGE-A3, gp100 y tirosinasa; antígenos para los cuales se han descrito menores frecuencias de precursores de células T. Es evidente que la presente solicitud no debe considerarse limitada a los ejemplos utilizados para probar el concepto de usar las APC de la solicitud para crear una respuesta inmunitaria en un sujeto. Cualquier antígeno posible contra el cual una respuesta inmunitaria podría ser beneficiosa para un sujeto, puede preverse por la solicitud y es parte integrante de la misma. Los marcadores pueden ser marcadores específicos de tumores o pueden ser específicos de virus, específicos de bacterias o específicos de hongos.

55 La solicitud proporciona por primera vez evidencias de que las CD modificadas genéticamente que expresan al menos dos moléculas estimulantes seleccionadas del lote de CD40L, CD70 y caTLR4, IL-12p70, EL-selectina, CCR7, 4-1 BBL; o en combinación con la supresión de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3 ofrecen una vacuna basada en CD que posee todas las características consideradas necesarias para la inducción de respuestas inmunitarias óptimas reactivas para la diana. En una modalidad preferida de la solicitud, la combinación de moléculas estimulantes es CD40L y CD70. En otra modalidad preferida, la combinación específica de moléculas estimulantes es el TriMix de CD40L, CD70 y caTLR4.

60 De importancia es que en los métodos de la solicitud, todas las estimulaciones específicas del antígeno se realizaron sin la adición de ninguna IL-2 y/o IL-7 exógenas para apoyar la proliferación y la supervivencia de células T, lo que está en contraste con la mayoría de los estudios que informan estimulaciones *in vitro*. En nuestra opinión, la omisión de citocinas exógenas crea un ambiente menos artificial y está más cerca de la situación *in vivo*. De hecho, se ha demostrado que la adición de IL-2 a 50 UI/ml durante la estimulación específica de un antígeno no tuvo efecto sobre la cantidad de células T específicas para el antígeno inducidas, pero sí influyó en el perfil funcional de las células T específicas inducidas, es decir, aumentando tanto la cantidad de células T líticas como secretoras de IFN-gamma/TNF-

alfa, lo que indica que la adición de citocinas exógenas a las estimulaciones de células T puede alterar el resultado de las técnicas de monitoreo.

5 El uso de los métodos de la solicitud tiene una ventaja adicional sobre la técnica anterior en que la manipulación *in vitro* de las CD se reduce al mínimo para evitar la excreción de citocinas fisiológicamente relevantes en el medio de cultivo *in vitro*. Esto se logra mediante el uso de un método de transducción de una sola etapa altamente eficiente, preferentemente mediante electroporación de ARNm, que permite la introducción simultánea de al menos dos moléculas de ARNm que codifican adyuvantes moleculares (posiblemente en combinación con un antígeno específico de una diana). Esto permite a las CD liberar sus citocinas naturales en su ambiente futuro, ya sea *in vitro* para los experimentos
10 o *in vivo* en el paciente, dando lugar a un aumento de la respuesta inmunitaria de células T.

En otra modalidad, las CD de la solicitud son útiles en métodos para identificar nuevos marcadores específicos de una diana. Las CD modificadas pueden usarse para estimular células T de donantes sanos o pacientes que tienen cáncer o una enfermedad infecciosa, que fueron vacunados previamente o no con una vacuna que contenía un antígeno
15 específico de la diana. Posteriormente, después de una o más estimulaciones con las CD modificadas, se pueden identificar las células T específicas para el antígeno diana y se puede caracterizar el epítipo derivado del antígeno diana contra el cual responden las células T.

Se demostró por primera vez que las CD humanas, derivadas de monocitos sometidas a electroporación con ARNm que codifica CD40L, CD70 y caTLR4 (creando así las CD con TriMix), adquieren un fenotipo maduro, aumentan su secreción de citocinas y quimiocinas y tienen una mayor capacidad para sesgar una respuesta de células CD4⁺ vírgenes a Th1 y para inducir células T CD8⁺ específicas para MelanA cuando se someten a pulsos con el péptido
20 inmunodominante MelanA-A2.

Además, los inventores muestran que las CD con TriMix pueden someterse a co-electroporación con ARNm que codifica un antígeno (tumoral) en lugar de ser sometidas a pulsos con péptidos antigénicos. Este enfoque ofrece varias ventajas adicionales. En primer lugar, la maduración y la carga del antígeno (tumoral) de las CD pueden combinarse en una sola etapa. Evitar la etapa de pulsos con péptidos en la producción de vacunas da como resultado menos manipulación de las células y menos pérdida de células y riesgo de contaminación. En segundo lugar, con el uso de un
25 ARNm que codifique un antígeno tumoral de longitud completa, se presentarán todos los epítopos antigénicos posibles del antígeno (tumoral) en lugar de algunos epítopos seleccionados. Por consiguiente, esta estrategia podría inducir una respuesta más amplia de células T específicas para el antígeno (tumoral) y no depende del conocimiento del haplotipo HLA de cada paciente ni de la identificación previa de los epítopos derivados del antígeno tumoral. En tercer lugar, el plásmido que codifica el antígeno (tumoral) puede modificarse genéticamente mediante la adición de una secuencia que se dirige al HLA clase II. Esto no sólo encamina el antígeno (tumoral) a los compartimentos de HLA clase II para su
30 procesamiento y presentación de péptidos derivados del antígeno (tumoral) y restringidos a HLA clase II, sino que además potencia el procesamiento y la presentación en el contexto de moléculas de HLA clase I. Por supuesto, esto también es válido para antígenos no tumorales tales como antígenos derivados de virus, bacterias u hongos.

Los inventores confirmaron que no hay diferencias en la eficacia de la electroporación, el potencial de maduración y la secreción de citocinas cuando las CD con TriMix se prepararon como tal o se sometieron a co-electroporación con
40 ARNm del antígeno tumoral.

Además, los inventores mostraron la capacidad de las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con ARNm del antígeno tumoral para estimular las células T CD8⁺ específicas para MelanA, restringidas a HLA-A2 y se compararon con las CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido. Se observó que las CD con TriMix sometidas a co-
45 electroporación con ARNm de sig-MelanA-DCLamp de hecho fueron capaces de cebar las células T CD8⁺ específicas para MelanA, derivadas de la sangre de donantes sanos y que, al igual que sus contrapartes sometidas a pulsos con péptido, éstas eran mucho más potentes que las CD inmaduras o maduras con cocteles de citocinas.

50 Cuando se compararon con las CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido, los inventores observaron que después de 1 o 2 estimulaciones, las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con ARNm del antígeno tumoral eran ligeramente menos potentes que las CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido, mientras que después de 3 estimulaciones eran igualmente potentes en 2 de 4 experimentos. Aunque las CD con TriMix sometidas a co-
55 electroporación parecen inducir una menor cantidad de células T específicas de un epítipo que sus contrapartes sometidas a pulsos con péptido en este contexto, esto no significa necesariamente que serán menos eficientes cuando se usen con fines de vacunación y esto tiene varias razones. En primer lugar, al investigar la funcionalidad cualitativa de las células T inducidas, observamos consistentemente que las células T estimuladas con CD con TriMix sometidas a co-
60 electroporación indujeron más células que secretaban IFN-gamma y TNF-alfa. Además, la intensidad de fluorescencia media de la tinción intracelular de IFN-gamma aumentó, lo que indica que se había producido más citocina por célula. Estos datos sugieren que estas células T son multifuncionales, lo que se ha correlacionado con una mejor función efectora. En segundo lugar, como se analizó anteriormente, mediante la electroporación de ARNm de un antígeno tumoral de longitud completa unido a una señal orientadora a HLA clase II en las CD, se introducen todos los epítopos antigénicos, incluidos los epítopos no identificados y los epítopos restringidos a todos los haplotipos de HLA posibles
65 tanto HLA clase I como clase II. Por lo tanto, este enfoque es propenso a inducir una respuesta más amplia de células T específicas para TAA.

El péptido inmunodominante de MelanA restringido a HLA-A2 es un epítipo para el cual existe una frecuencia muy alta de precursores en la sangre. A continuación, evaluamos si las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con otros antígenos tumorales serían capaces de inducir Respuestas de células T CD8⁺ específicas para los antígenos. Dado que este trabajo es parte de la evaluación preclínica de un estudio de vacunación donde las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con ARNm de Mage-A3, Mage-C2, tirosinasa o gp100 se inyectarán en pacientes con melanoma, se investigó si las respuestas específicas para estos antígenos podría inducirse tanto *in vitro* en la sangre de los pacientes con melanoma no vacunados como *in vivo* después de la vacunación. Hemos observado que en los pacientes no vacunados, las CD con TriMix pueden de hecho estimular células T específicas para TAA y al igual que para el antígeno MelanA, éstas fueron más potentes que las CD maduras con coctel de citocinas. Sin embargo, sólo pudimos observar respuestas específicas para el epítipo de tirosinasa restringido a HLA-A2, como se demostró mediante la tinción con tetrámeros. No se observaron respuestas para los otros epítipos restringidos a HLA-A2 Mage-A3, Mage-C2 o gp100 evaluados. Por otra parte, los ensayos funcionales no demostraron que las CD con TriMix habían inducido células T específicas para otros epítipos que los evaluados en la tinción con tetrámero, aunque en estos experimentos los resultados positivos pudieron haberse ocultado por la activación inespecífica relativamente alta de células T inducida por las CD con TriMix. Esta activación inespecífica de células T parece inherente a las CD con TriMix y se produce tanto *in vitro* como *in vivo*. La razón de esta observación todavía no se conoce. Por una parte, podría deberse al hecho de que las CD sometidas a electroporación con CD40L y caTLR4 secretan cantidades bastante altas de citocinas y quimiocinas, que podrían atraer y activar a las células T de una manera inespecífica. Por otra parte, se ha demostrado que la estimulación crónica de células T vírgenes por APC que expresan continuamente CD70, conduce a la activación del conjunto de células T y su conversión a células de memoria y efectoras. En este modelo de ratón transgénico de CD70, la activación de células T eventualmente condujo al agotamiento del conjunto de células T vírgenes y a una inmunodeficiencia letal. Aunque también usamos APC que expresan continuamente CD70, no esperamos esto en nuestro estudio de vacunación porque el conjunto de células T no se estimula continuamente con CD70, ya que las CD se inyectan cada dos semanas y tienen un tiempo de vida útil *in vivo* limitado.

Cuando se compara con la inducción masiva de células T específicas para MelanA por las CD con TriMix, la inducción de células T específicas para otros antígenos específicos de la diana *in vitro* es bastante pobre. Esto se debe muy probablemente a la baja frecuencia de precursores de las últimas. En general, los informes sobre la inducción de células T CD8⁺ específicas para Mage-A3, Mage-C3, tirosinasa o gp100 por las CD son escasos y las comparaciones con nuestros resultados son difíciles de hacer porque comúnmente se añaden IL-2 y/o IL-7 exógenas durante estas estimulaciones, que apoyan la activación y proliferación de células T y crean así un ambiente artificial estimulador de las células T.

Aunque las respuestas inducidas en las células T CD8⁺ de los pacientes no vacunados fueron bastante pobres, se observó que las CD con TriMix son capaces de inducir respuestas robustas para los antígenos Mage-A3, Mage-C2 y tirosinasa a través de la vacunación. La tinción con tetrámero mostró que estas respuestas no estaban dirigidas hacia los epítipos restringidos a HLA-A2 conocidos y evaluados, lo que evidencia la ventaja de usar ARNm del antígeno tumoral de longitud completa.

Aunque es evidente que las CD con TriMix inducen preferentemente células T CD4⁺ Th1, no habíamos investigado si además eran capaces de procesar y presentar péptidos restringidos a HLA clase II a partir de un ARNm que codifique un antígeno específico de la diana sometido a electroporación. La solicitud muestra además que las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con Mage-A3 unido a una secuencia que se dirige a HLA clase II pueden de hecho estimular células T CD4⁺ establecidas, específicas para Mage-A3 y restringidas a HLA-DP4. Además, su capacidad para hacerlo es similar a la capacidad estimuladora de células T CD4⁺ de las células sometidas a pulsos con péptidos.

Por lo tanto, la solicitud proporciona claramente la prueba de concepto de que las CD con TriMix sometidas a pulsos con un péptido específico de la diana o sometidas a co-electroporación con ARNm que codifica un antígeno específico de la diana pueden estimular células T con especificidad antigénica tanto *in vitro* como después de la vacunación y por lo tanto forman un nuevo enfoque prometedor para la inmunoterapia antitumoral, antiviral, antibacteriana o antifúngica.

El objetivo final de la solicitud es proporcionar una vacuna contra una diana que sea capaz de inducir o potenciar una respuesta inmunitaria específica del huésped en un paciente con cáncer o en un paciente infectado con un virus, una bacteria o un hongo. Con este fin, las CD se modifican con al menos dos moléculas inmunoestimuladoras y un antígeno específico de una diana o epítipo(s) derivado(s) del antígeno diana *in vitro* y se reintroducen en el paciente por vía intradérmica, intravenosa o mediante una combinación de estas. En el paciente, las CD son capaces de estimular las células T y provocar una respuesta inmunitaria mediada por el huésped debido a sus características inmunoestimulantes específicas.

Alternativamente, la estimulación de las CD puede realizarse *in situ*, mediante la inyección de las moléculas inmunoestimuladoras (el TriMix) y los antígenos específicos de la diana, por vía intranodal, intratumoral, subcutánea o intradérmica en el paciente de cáncer o en un paciente infectado con un virus, bacteria u hongo. Los agentes o proteínas inmunoestimuladores son capaces de madurar *in situ* las CD que residen naturalmente en los ganglios linfáticos del paciente, lo que da como resultado que las CD presenten los antígenos al sistema inmunitario y por lo tanto provoquen una respuesta inmunitaria en dicho sujeto.

La reacción inmunitaria en el huésped puede analizarse después mediante técnicas conocidas. El análisis del aumento de marcadores inflamatorios señala al establecimiento de una reacción inmunitaria en el huésped, probablemente dirigida hacia el antígeno diana. Para comprobar si la respuesta inmunitaria se dirige específicamente hacia el antígeno diana presentado por las CD en la preparación de la vacuna, varias técnicas conocidas tales como tinción intracelular de citocinas a través de citometría de flujo, ELISPOT o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) con el uso de fragmentos peptídicos del antígeno diana o el antígeno completo para capturar y detectar células T del huésped específicas para el antígeno. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse tanto en la sangre periférica del paciente como en la piel, después de la inducción de una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) y posterior biopsia de la región de DTH.

La solicitud proporciona además una vacuna que comprende:

- a) una o más moléculas de ARNm o ADN que codifican la proteína inmunoestimuladora funcional CD40L, en combinación con CD70, caTLR4, o ambas, y opcionalmente
- b) un antígeno específico de la diana. Preferentemente, dicho antígeno específico de la diana se selecciona del grupo que consiste en: ARNm total aislado a partir de (una) célula(s) diana, una o más moléculas de ARNm específico de la diana, lisados proteicos de (una) célula(s) diana, proteínas específicas de (una) célula(s) diana, un péptido o proteína sintéticos específicos de una diana y ARNm o ADN sintéticos que codifican un antígeno específico de una diana o su(s) péptido(s) derivado(s).

En una modalidad preferida de la vacuna, dicho antígeno específico de la diana es un antígeno tumoral. Alternativamente, el antígeno específico de la diana es un antígeno bacteriano, viral o fúngico.

En una modalidad preferida de la vacuna de la solicitud, la(s) molécula(s) de ARNm o ADN codifica(n) las proteínas inmunoestimuladoras CD40L y CD70. En una modalidad particularmente preferida de la vacuna de la solicitud, la(s) molécula(s) de ARNm o ADN codifica(n) las proteínas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLR4.

Dichas moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras pueden ser parte de una única molécula de ARNm o ADN. Preferentemente, dicha única molécula de ARNm o ADN es capaz de expresar las dos o más proteínas simultáneamente. En una modalidad, las moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras se separan en la única molécula de ARNm o ADN mediante un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o una secuencia que codifica un péptido 2a de autoescisión.

La solicitud comprende además un método para seguir los efectos del tratamiento con una vacuna contra el cáncer en un paciente con cáncer, que comprende la detección y el análisis de la respuesta inmunitaria hacia el antígeno específico del tumor inducida en el sujeto previamente inyectado con la vacuna contra el cáncer que puede obtenerse o se obtiene por los métodos de la solicitud.

Además, la solicitud abarca además un método para seguir los efectos del tratamiento con una vacuna antiviral, antibacteriana o antifúngica en un paciente infectado o en riesgo de infectarse con un virus, una bacteria o un hongo respectivamente, que comprende la detección y el análisis de la respuesta inmunitaria hacia el antígeno específico de la diana, inducida en el sujeto previamente inyectado con la vacuna que puede obtenerse o se obtiene por los métodos de la solicitud.

La solicitud proporciona además un estuche para mejorar las características inmunoestimulantes de las APC, que comprende una combinación de al menos dos moléculas diferentes de ARNm o ADN que codifican proteínas inmunoestimuladoras funcionales seleccionadas del grupo que consiste en CD40L, CD70, caTLR4, IL-12p70, EL-selectina, CCR7 y/o 4-1 BBL; o en combinación con moléculas que inhiben la expresión o función de SOCS, A20, PD-L1 o STAT3. En una modalidad preferida, la combinación comprende ARNm que codifica CD40L y CD70. En una modalidad de mayor preferencia, el estuche comprende el ARNm que codifica las moléculas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLR4.

En otra modalidad, las dos o más moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras forman parte de una única molécula de ARNm o ADN. Esta única molécula de ARNm o ADN preferentemente es capaz de expresar las dos o más proteínas independientemente. En una modalidad preferida, las dos o más moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras están unidas en la única molécula de ARNm o ADN por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), lo que permite la traducción separada de cada una de las dos o más secuencias de ARNm en una secuencia de aminoácidos. Alternativamente, se incorpora una secuencia que codifica al péptido 2a de autoescisión entre las secuencias codificantes de los diferentes factores inmunoestimulantes. De esta manera, dos o más factores pueden ser codificados por una única molécula de ARNm o ADN. Los datos preliminares donde las células se sometieron a electroporación con ARNm que codifica CD40L y CD70 unidos por una secuencia IRES o un péptido 2a de autoescisión muestran que este enfoque es realmente factible.

Por lo tanto, la solicitud proporciona además una molécula de ARNm que codifica dos o más factores inmunoestimulantes, en donde los dos o más factores inmunoestimulantes se traducen por separado a partir de la única molécula de ARNm a través del uso de un IRES entre las dos o más secuencias codificantes. Alternativamente, la

solicitud proporciona una molécula de ARNm que codifica dos o más factores inmunoestimulantes separados por una secuencia que codifica un péptido 2a de autoescisión, que permite la escisión de las dos secuencias de proteínas después de la traducción.

5 Además, la solicitud proporciona un método *ex vivo* para amplificar células T con especificidad antigénica derivadas de un paciente. Este paciente pudo haberse vacunado previamente o no.

Este conjunto amplificado *ex vivo* de células T puede usarse después con el propósito de una "transferencia celular adoptiva". La transferencia celular adoptiva de células inmunitarias autólogas que se amplificaron *ex vivo* con la ayuda de la solicitud podría realizarse en pacientes que recibieron o no un tratamiento de acondicionamiento (tal como, pero sin limitarse a una quimioterapia no mieloablativa) y podría realizarse con o sin administraciones concomitantes de la solicitud o con o sin tratamientos inmunomoduladores adicionales (tales como, pero sin limitarse a, la administración de citocinas o moléculas modificadoras de la señal coestimuladora). Por lo tanto, la solicitud proporciona un método para la amplificación *ex vivo* de un conjunto de células inmunitarias autólogas de un paciente, que comprende:

- 15 a) obtener o proporcionar células T de un paciente que se vacunó antes del aislamiento o no,
- b) poner las células T *ex vivo* en contacto con APC o un agente inmunoterapéutico obtenido por el método según la solicitud,
- c) identificar, aislar y expandir las células T *ex vivo* que son específicas para el antígeno presentado por las APC con las que se pusieron en contacto (estos antígenos podrían estar definidos o no, como sería el caso cuando se use ARN total del tumor como fuente de antígeno).
- 20 d) administración de estas células T con especificidad antigénica, estimuladas y expandidas *in vitro*, al paciente en un ambiente de un protocolo de tratamiento de transferencia de células T adoptivas que implica o no regímenes de preacondicionamiento y tratamiento inmunomodulador concomitante.

25 Alternativamente, la solicitud proporciona un método para amplificar *in vivo* las células T con especificidad antigénica en un paciente que comprende las etapas de estimular las CD *in situ* (*in vivo*) con la mezcla de ARNm o ADN de TriMix y el antígeno específico de la diana.

La solicitud proporciona además métodos para tratar a un paciente que lo necesite con un conjunto de APC de la solicitud o con la vacuna de la solicitud.

La solicitud proporciona además métodos para usar las APC modificadas de la solicitud o para usar la vacuna de la solicitud como se define en la presente para tratar el cáncer o enfermedades infecciosas (tales como infecciones virales, bacterianas o fúngicas, por ejemplo, infecciones por los virus de VIH y hepatitis). En el caso de una inmunoterapia activa para el cáncer o las enfermedades infecciosas, el tratamiento con las APC de la solicitud puede estar precedido por, combinado con, o seguido por cualquier tratamiento no específico de inmunomodulación para mejorar la actividad de la propia solicitud o explotar cualquier sinergia entre las diferentes modalidades de tratamiento (por ejemplo, mejorar la respuesta inmunitaria a la solicitud mediante la estimulación no específica del sistema inmunitario del paciente con citocinas (por ejemplo interleucina 2 o interferón alfa-2b) o ligandos de TLR; o por ejemplo mediante la combinación de la solicitud con un fármaco modificador de la señal coestimuladora tal como ipilimumab o tremelimumab); o cualquier otra forma de inmunoterapia. La solicitud proporciona, además, regímenes de tratamiento complejos en los que la propia solicitud y un número definido de otros tratamientos inmunomoduladores se utilizan para dar lugar a un plan de tratamiento más activo (por ejemplo, el uso secuencial de la solicitud con la modalidad 1 (por ejemplo, una citocina) seguido por el uso de la solicitud para la expansión *ex vivo* de células inmunitarias vacunales seguido por una transferencia celular adoptiva de estas células seguido por un tratamiento de combinación de la solicitud con otra modalidad adicional (por ejemplo, un modificador de la señal del receptor coestimulador) o cualquier combinación posible del uso concomitante y/o secuencial de la solicitud y tratamientos inmunomoduladores adicionales.

Los inventores analizaron después la posibilidad de estimular o madurar las CD *in situ* (*in vivo*), en lugar de *in vitro*. Esto tiene la ventaja de eludir las etapas de: generar CD a partir de la sangre del paciente, mantenerlas en cultivo, estimularlas *in vitro*, realizar un extenso ciclo de control de calidad y crio-preservación, y reinyectarlas en el paciente. Inesperadamente, los inventores han sido capaces de demostrar que la composición de ARNm TriMix de CD40L, CD70 y caTLR4 es capaz de estimular las CD *in vivo*, cuando se inyectan por vía intranodal, intratumoral o intradérmica. Cuando se co-inyectaron por ejemplo con moléculas de ARNm que codifican antígenos específicos de la diana, dicho ARNm fue incorporado por las CD, se expresó y se produjeron células T citotóxicas contra dicho antígeno específico de la diana en el sujeto tratado. Además, los inventores pudieron demostrar que los antígenos que se producen automáticamente en los sitios del tumor o los sitios de la infección se presentaron con éxito por las CD residentes o infiltrantes del sitio de la infección o del tumor, es decir, sin la necesidad de administrar realmente dichos antígenos específicos de la diana. La prueba experimental de esto se describe en los ejemplos más adelante.

Por lo tanto, la solicitud proporciona un método para inducir inmunidad o respuesta inmunitaria con especificidad antigénica en un sujeto, que comprende la etapa de administrar a dicho sujeto:

- 60 a) una o más moléculas de ARNm o ADN que codifican la proteína inmunoestimuladora funcional CD40L en combinación con CD70, caTLR4, o ambas, y opcionalmente
- 65 b) antígenos específicos de la diana.

Preferentemente, dichas moléculas de ARNm o ADN y dichos antígenos específicos de la diana se administran al ganglio(s) linfático(s), o dichas moléculas de ARNm o ADN se administran por vía intratumoral o intradérmica, por ejemplo, respectivamente, mediante inyección intranodal, intratumoral o intradérmica.

5 Preferentemente, dicha(s) molécula(s) de ARNm o ADN codifica(n) las proteínas inmunoestimuladoras CD40L y CD70, con mayor preferencia la(s) molécula(s) de ARNm o ADN codifica(n) las proteínas inmunoestimuladoras CD40L, CD70 y caTLR4 (denominadas TriMix en la presente).

10 En una modalidad preferida del método *in vivo*, el antígeno específico de la diana es un antígeno tumoral. Alternativamente, el antígeno específico de la diana es un antígeno bacteriano, viral o fúngico.

15 En cualquier modalidad, dicho antígeno específico de la diana se selecciona del grupo que consiste en: ARNm total aislado a partir de (una) célula(s) diana, una o más moléculas de ARNm específicas de la diana, lisados proteicos de (una) célula(s) diana, proteínas específicas de (una) célula(s) diana, un péptido o proteína sintéticos específicos de la diana y un ARNm o ADN sintéticos que codifican un antígeno específico de la diana o su(s) péptido(s) derivado(s). Dicha diana puede ser proteínas o ARNm derivados de virus, células bacterianas, fúngicas o tumorales.

20 El sujeto a tratar preferentemente padece de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en: neoplasia, presencia de tumor, cáncer, presencia de melanoma, infección bacteriana, viral o fúngica, infección por VIH, infección de hepatitis o trastornos inmunológicos tales como enfermedades o síndromes adquiridos o no, de una respuesta inmunitaria alterada, tales como SIDA, SCID, etcétera.

Ejemplos

25 La solicitud se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes

Ejemplo 1: Generación de células dendríticas inmaduras a partir de células mononucleares de la sangre (PBMC) de pacientes.

30 Día 0: Manipulación *in vitro* de PBMC: después que el paciente se sometió a una leucoféresis para obtener una cantidad significativa de PBMC, el producto de la leucoféresis se lavó a fondo y posteriormente se sembró en cámaras de cultivo para permitir que se adhieran al plástico de las cámaras durante dos horas a 37 °C, en el medio apropiado, tal como medio X-VIVO, suplementado con plasma autólogo al 1 %, obtenido previamente del mismo paciente. Después de estas dos horas, las cámaras de cultivo se lavan, por ejemplo, con tampón fosfato salino (PBS) para eliminar las células no adherentes. Las células adherentes a su vez se cultivan adicionalmente en medio de cultivo que comprende factores de diferenciación de células dendríticas tales como GM-CSF (en una concentración de aproximadamente 1000 U/ml) e IL-4 (en una concentración de 500 U/ml) en un medio apropiado (por ejemplo RPMI1640) suplementado con plasma autólogo del paciente al 1 %.

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

Día 6: Las CD inmaduras se cosechan de las cámaras de cultivo y pueden criopreservarse para su uso futuro o utilizarse inmediatamente.

45 La criopreservación se realiza en un medio apropiado tal como 1 ml de plasma autólogo del paciente complementado con DMSO al 10 % y glucosa al 2 %. Entre 5 y 20 x 10⁶ CD se congelan por recipiente y la congelación se lleva a cabo de acuerdo con las técnicas estándar en nitrógeno líquido a -192 °C.

50 Ejemplo 2: Modificación de las células dendríticas obtenidas de manera que expresen tanto un péptido derivado de un antígeno tumoral como los factores inmunoestimulantes CD40L, CD70 y TLR4 para obtener una vacuna antitumoral.

Materiales y métodos:

55 *Construcciones genéticas.*

La clonación del plásmido pGEM4Z-NGFR que codifica una forma truncada del receptor del factor de crecimiento nervioso (fragmento extracelular y transmembrana) se ha descrito anteriormente. CD40L se amplificó a partir de ADNc de células T CD4⁺ activadas con los siguientes cebadores: CD40LS 5'-GATGGATCCGTCATGATCGAAACATACAAC-3' (sec. con núm. de ident.:3) y CD40LAS 5'-GCT CGGTACCCATCAGAGTTTGAGTAAGCC-3' (sec. con núm. de ident.:4) y se insertó en el plásmido pGEM4Z-A64 (amablemente proporcionado por el Dr. N. Schaft, Departamento de Dermatología, Hospital Universitario de Erlangen, Alemania) como un fragmento BamHI-KpnI. CD70 se amplificó a partir del plásmido pIRESneo2-CD70 (un amable regalo del Dr. S. Iwamoto, Departamento de Bioquímica, Universidad de Showa, Japón) con los siguientes cebadores: CD70S 5'-AAAAGCTTCCACCATGCCGAGGAGGTTTC-3' (sec. con núm. de ident.: 5) y CD70AS 5'-GGGGGAATTCTCAGGGGCGCACCCAC-3' (sec. con núm. de ident.: 6) y se insertó en el plásmido pGEM4Z-A64 como un fragmento HindIII-EcoRI. Para la clonación del plásmido pGEM4Z-caTLR4-A64,

la secuencia líder (sig) de LAMP1 se fusionó a TLR4 humano, truncado entre los aa M620 y P621, lo que elimina así el dominio extracelular de unión a LPS y crea la forma constitutivamente activa de TLR4. El caTLR4 se amplificó a partir de ADNc de CD maduras humanas con los siguientes cebadores: caTLR4S 5'-GGGGATCCTGTGCTGAGTTTGAATA TCACC-3' (sec. con núm. de ident.: 7) y caTLR4AS 5'-GGGAATTCTCAGATAGATGTTCTTCCTG-3' (sec. con núm. de ident.: 8). El ADNc de caTLR4 se insertó en el pGEM4Z-sig-LAMP1-A64 como un fragmento BamHI-EcoRI, por lo que se elimina la secuencia dirigida a LAMP1 del vector. En paralelo, el ADNc de caTLR4 también se insertó como un fragmento BamHI-EcoRI en el vector pcDNA3 que contenía sig.

Transcripción *in vitro* de ARNm con caperuza y electroporación de las CD con ARNm. El ARNm con caperuza que codifica las diferentes moléculas inmunoestimuladoras se transcribió a partir del ADN plasmídico linealizado con polimerasa T7. En el día 6, 4×10^6 CD obtenidas como en el ejemplo 1 se sometieron a electroporación con 10 μ g de cada ARNm. La electroporación se realizó en 200 μ l de solución Optimix B (Equibio) en una cubeta de electroporación de 4 mm, con el uso del aparato EQUIBIO Easyject Plus[®]. Para la electroporación se usaron las siguientes condiciones: tensión 300 V, capacitancia 150 μ F y resistencia 99 Ω , lo que da como resultado un tiempo del pulso de aproximadamente 5 ms. Inmediatamente después de la electroporación, las células se transfirieron a IMDM que contenía suero AB inactivado por calor al 1 % (PAA Laboratories, Linz, Austria), PSG, L-asparagina 0,24 mM y L-arginina 0,55 mM (ambas de Cambrex) (denominado como medio de estimulación) a una concentración de 1×10^6 células/ml para uso posterior. No se añadieron GM-CSF, IL-4 o citocinas de maduración a las CD después de la electroporación.

Péptidos sintéticos y pulsos de péptidos.

El péptido derivado de MelanA/MART-1 restringido a HLA-A*0201 correspondiente al epítipo inmunodominante optimizado (aa 26-35, ELAGIGILTV) se adquirió de Thermo Electron (Thermo Electron Corporation, Ulm, Alemania). El péptido gag restringido a HLA-A2 (péptido gag-A2, conjunto de péptidos complejos de gag HXB2, NIH, Programa de Reactivos de Investigación y Referencia en SIDA, McKesson BioServices Corporation, Rockville, MD) se utilizó como control negativo. Para la pulsación de péptidos, las CD se diluyeron hasta una densidad final de 2×10^6 células/ml en IMDM que contenía péptido a 10 μ g/ml y se incubaron durante 2 h a 37 °C.

Citometría de flujo.

Las células se tiñeron mediante el uso de anticuerpos monoclonales (AcM) contra CD40L-PE o CD70-PE (Beckton Dickinson, BD, San José, CA). Para la tinción de CD40L, las CD se incubaron con Golgi-plug (brefeldina A, BD, San José, CA) durante 4 h, después de lo cual se realizó una tinción intracelular para CD40L mediante el uso del estuche de BD Cytotfix/Cytoperm plus.

Resultados:

Expresión transgénica después de la electroporación con ARNm.

Cuando las células K562 se sometieron a electroporación con ARNm de CD40L, más del 80 % de las células mostraron una fuerte expresión superficial de CD40L después de 4 h. Después de 24 horas, más del 40 % de las células todavía expresaban CD40L (datos no mostrados). Por el contrario, cuando las CD se sometieron a electroporación con ARNm de CD40L, no se pudo detectar ninguna expresión en la membrana. CD40L se pudo detectar intracelularmente, pero sólo cuando se añadió Golgi-plug inmediatamente después de la electroporación para prevenir el tráfico a la membrana celular. Bajo estas condiciones, aproximadamente el 60 % de las CD sometidas a electroporación expresaron CD40L durante las primeras 4 horas después de la electroporación (Figura 1A). El porcentaje de células positivas disminuyó ligeramente cuando el ARNm de CD40L se sometió a electroporación en combinación con uno o dos de otros ARNm.

Las CD inmaduras o maduras con coctel de citocinas no mostraron expresión de CD70 según se detectó por FACS, ni tampoco las CD sometidas a electroporación con ARNm de CD40L y/o caTLR4. Cuando estas células se sembraron en placas sobre fibroblastos 3T6 que expresan CD40L durante 48 h, se observó una ligera regulación positiva de la expresión de CD70 en aproximadamente $3 \pm 1,8$ % ($n = 2$) de las CD inmaduras y $4,9 \pm 2,1$ % ($n = 2$) de las CD maduras con coctel de citocinas (datos no mostrados). Cuando las células se maduraron con LPS o mediante pulsación pasiva o electroporación con el análogo de dsARN Ampligen, la expresión de CD70 se pudo detectar en aproximadamente $5,8 \pm 0,3$ %, $9 \pm 3,3$ % y $11,2 \pm 3$ % de las CD, respectivamente. Por otra parte, las CD sometidas a electroporación con ARNm de CD70 mostraron una fuerte y duradera expresión de CD70 en su membrana (Figura 1 B). Veinticuatro horas después de la electroporación, el 78 % de las CD sometidas a electroporación expresaron CD70, mientras que 96 horas después de la electroporación, el 67 % todavía expresaba CD70. De nuevo, la expresión de CD70 en las CD disminuyó ligeramente cuando se sometió a electroporación con una combinación de dos o tres ARNm diferentes en comparación con el ARNm de CD70 solo.

Las CD ya expresan TLR4 y los anticuerpos comercialmente disponibles contra TLR4 reconocen el dominio extracelular, el cual se eliminó en la construcción de caTLR4. Por lo tanto, no pudimos evaluar la expresión de caTLR4 después de la electroporación con ARNm.

Ejemplo 3: Ensayo del efecto inmunoestimulante de la vacuna antitumoral obtenida *in vitro*.

Materiales y métodos:

5 *Activación de la vía de NF-kappaB.*

10 Las construcciones genéticas usadas fueron las siguientes: el plásmido pNFconluc que codifica el gen de la luciferasa de la luciérnaga conducido por un promotor mínimo sensible al NF-kappaB fue proporcionado amablemente por el Dr. R. Beyaert (VIB, Universidad de Gante, Bélgica). El plásmido CSCW-GLuc-YFP, que codifica la luciferasa de *Gaussia* secretada, humanizada y fusionada a la proteína fluorescente amarilla, fue un amable regalo del Dr. B.A. Tannous (Hospital General de Massachusetts, Boston, MA). El GLuc-YFP se subclonó a partir de este plásmido en el vector pHR. CD27 se amplificó a partir de ADNc de células EBV-B con los siguientes cebadores: CD27S 5'-AA AAAGCTTCCACCATGGCACGGCCACATCCCTG-3' (sec. con núm. de ident.: 1) y CD27AS 5'-CCCCTCGAG TCAGGGGAGCAGGCAGG-3' (sec. con núm. de ident.: 2) y se insertó en el vector pCDNA3 como un fragmento HindIII-Xhl.

20 Para el ensayo de luciferasa y NF-kappaB, las células 293T (1 x 10⁵ células por pocillo) se sembraron en placas de 24 pocillos. Después de 24 h, las células se transfectaron con 10 ng del plásmido con el gen reportero pNFconluc, 10 ng de pHR-GLuc-YFP y con 100 ng del plásmido de expresión pCDNA3-caTLR4 o pCDNA3-CD27 cuando se indica. Las transfecciones se realizaron por triplicado con el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche) y las cantidades totales de plásmido se mantuvieron constantes mediante la adición de plásmido pCDNA3 vacío. Después de la transfección, 1 x 10⁵ CD sometidas a electroporación se añadieron a los pocillos cuando se indica. Los extractos celulares se prepararon 24 horas más tarde, y la actividad del gen reportero se determinó mediante el sistema de ensayo de la luciferasa (Promega, Leiden, Países Bajos). Los resultados se normalizaron con respecto a la actividad de la luciferasa de *Gaussia* secretada.

25 *Citometría de flujo.*

30 Las CD se tiñeron mediante el uso de anticuerpos monoclonales (AcM) contra CD40-PE, CD80-PE, CD83-FITC, CD86-FITC y HLA-ABC-FITC (todos de Pharmingen, San José, CA).

35 Las células T se fenotiparon con AcM contra CD4-FITC, CD8-FITC, CD8-APC-Cy7, CD27-APC, CD28-APC, CD45RA-biotina, CD45RO-APC, CD62L-FITC (todos de Pharmingen) y CCR7-APC (R&D Systems, Oxford, Reino Unido). El CD45RA biotinilado se detectó con estreptavidina conjugada con PerCP.

Como controles se utilizaron AcM no reactivos de similar isotipo (Pharmingen).

40 Los datos se recogieron mediante el uso de un citómetro de flujo FACSCanto y se analizaron con el uso del software FACSDiva o CellQuest. Las células se clasificaron electrónicamente de acuerdo con las propiedades de dispersión de la luz para excluir células muertas y contaminantes.

Ensayo de secreción de citocinas.

45 La secreción de 27 citocinas y quimiocinas diferentes por las CD durante las primeras 24 horas después de la electroporación se evaluó con el panel Bio-Plex human cytokine 27-Plex A de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bio-Rad, Nazareth, Bélgica).

Inducción de una respuesta de células T CD4⁺ vírgenes por las CD sometidas a electroporación.

50 Las células T CD4⁺ vírgenes se aislaron de la fracción no adherente de células mononucleares de sangre periférica mediante selección inmunomagnética con el uso del kit II de aislamiento de células T CD4⁺ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), después de lo cual las células T CD45RA⁺ se seleccionaron positivamente mediante el uso de microperlas CD45RA (Miltenyi Biotec). Las células T CD4⁺ eran consistentemente > 85 % puras y > 90 % positivas para CD45RA (datos no mostrados). A continuación, 5 x 10⁴ células T CD4⁺ vírgenes se co-cultivaron con 1 x 10⁴ CD alogénicas sometidas a electroporación con el ARNm indicado. Cada cocultivo se realizó en 12 veces en 200 µl de medio de estimulación por cada uno de los 96 pocillos de fondo redondo. Después de 6 días, las células T estimuladas se cosecharon, se resuspendieron a una densidad de 1 x 10⁶ células T/ml de medio de estimulación en presencia de 4,7 x 10⁴ perlas expansoras de células T CD3/CD28 (Dyna, Invitrogen) y se volvieron a sembrar en placas a 200 µl por cada uno de los 96 pocillos con fondo redondo. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se recogió el sobrenadante y se analizó el contenido de IFN-gamma (BioSource International, Camarillo, CA), IL-4 (Pierce Biotechnology, Aalst, Bélgica) e IL-10 (R&D Systems) mediante el uso de estuches de ELISA comercialmente disponibles. Cada cocultivo se evaluó por duplicado en ELISA.

Inducción de células T CD8⁺ específicas para MelanA.

65

Las células T y las CD se obtuvieron de donantes sanos HLA-A2⁺. Las CD se sometieron a electroporación con el ARNm indicado e inmediatamente se sometieron a pulsos con el péptido de MelanA-A2 durante 2 h. Después del lavado, las CD con electroporación de ARNm sometidas a pulsos con péptido se co-cultivaron con 10×10^6 células T CD8⁺ autólogas purificadas mediante selección inmunomagnética con el uso de microperlas CD8 (Miltenyi). Las células T CD8⁺ eran consistentemente > 90 % puras (datos no mostrados). Las estimulaciones se llevaron a cabo a una relación de CD:T de 1:10 en 5 ml de medio de estimulación por 6 pocillos. Las células T CD8⁺ se volvieron a estimular semanalmente con las mismas CD estimuladoras que se usaron en la estimulación primaria. Después de 3 rondas de estimulación, las células T CD8⁺ se cosecharon y se determinó su especificidad antigénica y función.

10 *Tinción con tetrámeros.*

Las células T se tiñeron con tetrámeros de HLA-A2 marcados con PE 10 nM que contenían péptidos MelanA (ELAGIGILTV) o MAGE-A3 (FLWGPRALV). Los tetrámeros se prepararon en el laboratorio. Posteriormente, las células se tiñeron con un Ac anti-CD8 marcado con FITC y 1×10^5 células se analizaron mediante citometría de flujo.

15

20 *Tinción intracelular de citocinas.*

La capacidad de las células T CD8⁺ estimuladas con MelanA para producir citocinas tras la reestimulación específica se investigó mediante el uso de tinción intracelular para IFN-gamma y TNF-alfa de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células T2 sometidas a pulsos con péptido de MelanA-A2 o gag-A2 se co-cultivaron con células T CD8⁺ estimuladas a una relación de respondedor:estimulador de 10:1 durante 2-3 horas a 37 °C. Después se añadió Golgi-plug para bloquear la secreción de citocinas y las células se incubaron durante otras 12 horas a 37 °C. Las células T CD8⁺ se tiñeron después con anti-CD8 conjugado con APC-Cy7, se lavaron, se permeabilizaron y se tiñeron intracelularmente con IFN-gamma-PE/TNF-alfa-FITC mediante el uso del estuche Cytotfix/Cytoperm plus de BD. Cien mil células se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células T CD8⁺ productoras de citocinas.

25

30 *Ensayo de movilización de CD107a.*

1×10^5 células T CD8⁺ estimuladas se volvieron a estimular con 4×10^4 células T2 cargadas con péptido de MelanA-A2 o gag-A2 en presencia de Golgi-stop (monensina, BD) y AcM anti-CD107a marcado con PE-Cy5 o un control de isotipo irrelevante. Después de 12 h de incubación a 37 °C, las células se cosecharon, se tiñeron con AcM anti-CD8 marcado con FITC y 1×10^5 células se analizaron mediante citometría de flujo para evaluar el porcentaje de células T CD8⁺ CD107a⁺.

35

Resultados:

40 *Activación de la vía de NF-kappaB.*

Como se muestra en la Figura 2, cuando se comparó con las CD sometidas a electroporación con ARNm de NGFR, ambas CD sometidas a electroporación con ARNm de CD40L y CD70 condujeron a la activación de NF-kappaB en células 293T que expresan CD40 o CD27, respectivamente. Aunque este tipo de experimento no fue factible con ARNm de caTLR, pudimos demostrar que las células 293T co-transfectadas con ADN de caTLR4 (que codifica la misma proteína que el ARNm de caTLR4) y el plásmido reportero de NF-kappaB también condujeron a una activación de la vía de NF-kappaB cuando se comparó con las células 293T cotransfectadas con el plásmido reportero NF-kappaB y el plásmido pcDNA3 vacío (Figura 2). Estos datos indican que los ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 codifican proteínas funcionalmente activas.

50

Fenotipo de CD sometidas a electroporación diferencial.

Se evaluó el fenotipo de las CD sometidas a electroporación con las diferentes combinaciones de ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 y se comparó con las CD inmaduras (inm) y maduras con coctel de citocinas (Mad) sometidas a electroporación con ARNm de NGFR irrelevante como controles negativo y positivo, respectivamente. Como se muestra en la Figura 3A, la electroporación de las CD inmaduras con ARNm de CD40L y/o caTLR4 indujo una marcada regulación positiva de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83 y CD86 y las moléculas de HLA clase I. En general, las CD sometidas a electroporación con ARNm de caTLR4 mostraron una maduración fenotípica ligeramente menos pronunciada que las CD sometidas a electroporación con ARNm de CD40L mientras que la combinación de ARNm de CD40L y caTLR4 indujo la maduración fenotípica más pronunciada, que es comparable con la maduración inducida por el coctel de citocinas. Por el contrario, la electroporación o co-electroporación de CD70 no tuvo ningún efecto sobre el fenotipo de las CD.

60

Secreción de citoquinas/quimiocinas por las CD sometidas a electroporación diferencial.

65

Además de una maduración fenotípica, la electroporación con ARNm de CD40L o caTLR4 indujo una secreción aumentada de IL-12p70 bioactiva. La combinación de CD40L y caTLR4 reforzó aún más la producción de IL-12p70. De nuevo, la electroporación o co-electroporación de CD70 no tuvo ningún efecto (Figura 3B). También se investigó la secreción de varias otras citocinas y quimiocinas. La secreción por las CD sometidas a co-electroporación con ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4, en comparación con las CD inmaduras y maduras con un coctel de citocinas sometidas a electroporación con ARNm de NGFR irrelevante se muestra en la Tabla 1. Para cada citocina/quimiocina enumerada en la Tabla 1, se encontró que la (co-)electroporación de CD70 no tuvo ningún efecto, mientras que la electroporación de CD40L y caTLR4 aumentó la secreción de citocinas/quimiocinas y la combinación de ambos produjo la secreción más alta. Además, no observamos ninguna secreción de IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17, eotaxina, FGF básico o PDGF por ninguna de nuestras preparaciones de CD.

Tabla 1. Producción de citocinas y quimiocinas (pg/ml) por las CD sometidas a electroporación. Las CD se sometieron a electroporación con ARNm irrelevante o la combinación de CD40L, CD70 y caTLR4. Después de la electroporación, las CD se cultivaron durante 24 h a una densidad celular de 1×10^6 células/ml en medio de estimulación sin adición de citocinas suplementarias. La secreción de citocinas y quimiocinas se midió con el panel Bio-Plex human cytokine 27-Plex A.

Se muestra uno de 3 experimentos.

		NGFR inm	CD40L + CD70 + caTLR4	NGFR mad	
5	Citocinas	IL-1beta	7.2	146	3.5
		IL-6	754	>20000	1093
		IL-10	43.4	902	54.1
		G-CSF	140	8553	68
		GM-CSF	9	101	10.3
10		IFN-gamma	51.5	508	71.6
		TNF-alfa	87.2	>20000	20
	Quimiocinas	IL-8	10521	>30000	3143
		MIP-1alfa	175	917	120
15		IP-10	1076	>20000	50.5
		RANTES	1071	>20000	598

20 *Estimulación de células T CD4⁺ vírgenes por las CD sometidas a electroporación diferencial.*

A continuación, se investigó si las CD sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 podrían inducir una respuesta de células T CD4⁺ vírgenes y se observó si existe un sesgo hacia una respuesta Th1 o Th2. Por lo tanto, las CD sometidas a electroporación se utilizaron para estimular células T CD4⁺ CD45RA⁺ alogénicas y después de la reestimulación con perlas expansoras de células T CD3/CD28 se evaluó el sobrenadante para determinar el contenido de IL-4, IL-10 e IFN-gamma. En general, las células T estimuladas secretaron cantidades muy bajas de IL-4 (<50 pg/ml) e IL-10 (<200 pg/ml) y no se encontraron diferencias entre las células T estimuladas diferencialmente (datos no mostrados). Por otra parte, las CD sometidas a electroporación con ARNm de CD40L y caTLR4 estimularon a las células T CD4⁺ para secretar grandes cantidades de IFN-gamma. Aquí además, la combinación de CD40L con caTLR4 reforzó aún más la secreción de IFN-gamma y la (co-)electroporación de CD70 no tuvo efecto (Figura 3C), aunque el análisis por FACS confirmó que las células T CD4⁺ CD45RA⁺ expresaron CD27.

35 *Inducción de células T específicas para MelanA CD8⁺ por las CD sometidas a electroporación diferencial.*

En un próximo conjunto de experimentos, investigamos si las CD sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 podrían cebar a las células T CD8⁺ vírgenes, específicas para MelanA. Por lo tanto, las CD de donantes sanos HLA-A2⁺ se sometieron a electroporación con diferentes combinaciones de ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4, se sometieron a pulsos con el péptido de MelanA inmunodominante y se co-cultivaron con células T CD8⁺ autólogas. Las CD inmaduras y maduras con coctel de citocinas, sometidas a electroporación con ARNm de NGFR irrelevante y sometidas a pulsos con péptido de MelanA se usaron como controles. Después de 3 estimulaciones semanales, se determinó la cantidad de células restantes y el porcentaje de células T CD8⁺ específicas para MelanA, positivas para tetrámeros (Tabla 2). A partir de estos datos, se calculó el número absoluto de células T CD8⁺ específicas para MelanA, positivas para tetrámeros (Tabla 2) y el aumento en veces sobre las CD inmaduras sometidas a electroporación con ARNm irrelevante (Figura 4A). Nuestros datos muestran que la electroporación de las CD con ARNm de CD40L o caTLR4 solos produjo un mayor número de células T CD8⁺ específicas para MelanA, que se incrementó adicionalmente mediante la combinación de electroporación de CD40L con CD70 o caTLR4. La combinación de las tres moléculas resultó consistentemente en el aumento más alto de la cantidad de células T con especificidad antigénica, con un incremento medio en veces de 573 y 203 sobre las CD inmaduras o maduras con coctel de citocinas, sometidas a electroporación con ARNm de NGFR, respectivamente.

Tabla 2. Inducción de células T CD8⁺ específicas para MelanA restringidas a HLA-A2, por las CD sometidas a electroporación con diferentes combinaciones de ARNm de CD40L CD70 y caTLR4 y sometidas a pulsos con péptido de MelanA. Los resultados se muestran para 4 experimentos individuales a partir de diferentes donantes sanos.

	% de células T CD8 ⁺ Intrámero de MelanA ⁺ /número de células T CD8 ⁺ (10 ³) [‡]				Número absoluto de células T CD8 ⁺ tetrámero de MelanA ⁺ (10 ³) [‡]			
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4
5 NGFR inm	0.4/3.4	0.5/2.1	0.1/2.8	0.1/1.35	13.7	10.7	2.8	1.35
CD40L	60.2/5.4	6.7/2.1	5.6/2.8	1.1/1.5	3271	141	157	16.5
10 CD70	3.3/3.6	0.9/1.7	0.2/2.2	0.2/1.65	120	15.4	4.4	3.3
caTLR4	20.8/4.3	40.3/4.0	1.3/2.2	9.3/1.8	892	1596	29.1	167
CD40L + CD70	65/8.9	17.3/2.0	17.1/4.0	1.8/1.75	5792	348	677	31.5
15 CD40L + caTLR4	64/6.7	49.5/4.7	39.9/4.0	16.8/2.2	4301	2317	1612	370
CD40L + CD70 + caTLR4	ND/ND	60.5/5.5	40.2/6.2	63.2/1.1	ND	3303	2506	695
20 NGFR mad	0.7/3.1	1.2/3.4	0.4/3.2	0.1/1.7	21.7	41.0	12.9	1.7

† La población de células T generada después de 3 estimulaciones semanales con electroporación. Las CD sometidas a pulsos con péptido de Melan4 se tiñeron con tetrámeros de MelanA HLA-A2 y anti-CD6. Después se identificaron las células T CD6⁺ específicas para MelanA mediante citometría de flujo. La tinción de fondo con tetrámeros de HLA-A2 específicos para MAGE-A3 que nunca reaccionaron por encima de 0,5 %, se restó. La cantidad de células vivas se determinó por exclusión de azul de tripan.

‡ el número absoluto de células T CD8⁺ específicas para MelanA se calculó con la siguiente fórmula: (número de células T CD8⁺/100) x % de células T CD8⁺ tetrámero de MelanA⁺.

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

Finalmente, se evaluaron las propiedades funcionales y fenotípicas de las células T CD8⁺ estimuladas 3 veces con CD sometidas a pulsos con péptido de MelanA-A2 y electroporación de manera diferencial. Se investigaron los principales mecanismos efectores de las células T CD8⁺ estimuladas, es decir, citólisis y producción de citocinas. Primero realizamos un ensayo de movilización de CD107a (Figura 4B), que mide la exposición de CD107a, presente en la membrana de gránulos citotóxicos, sobre la superficie de células T como resultado de la desgranulación tras la estimulación antigénica. Se ha demostrado que la movilización de CD107a puede usarse como un marcador para la actividad lítica. En segundo lugar, se realizaron tinciones intracelulares de citocinas para enumerar la cantidad de células secretoras de IFN-gamma y/o TNF-alfa, ambos mediadores principales de la respuesta inmunitaria, tras la estimulación antigénica (Figura 4C). Para todos los donantes evaluados se observó que el porcentaje de células T específicas para MelanA, se correlacionó con el porcentaje de células T líticas y con el porcentaje de células T productoras de IFN-gamma/TNF-alfa. Por otra parte, también se analizó el fenotipo de las células T CD8⁺ específicas para MelanA inducidas. Las células T CD8⁺ específicas para MelanA estimuladas eran todas CD45RA⁺ CD45RO⁺ CD27⁺ CD28⁺, junto con una expresión variable de CD62L y CCR7 (Figura 4D). En general, no hubo diferencias significativas en el fenotipo de las células T CD8⁺ específicas para MelanA de los diferentes donantes, independientemente del tipo de CD que se utilizó para la estimulación.

Ejemplo 4: Las CD con TriMix pueden someterse a co-electroporación con ARNm de TAA sin afectar su eficacia de electroporación, fenotipo maduro y secreción de citocinas.

50 Materiales y métodos:

Construcciones genéticas.

55 Se han descrito los plásmidos pGEM-CD40L, pGEM-CD70, pGEM-caTLR4 que codifican CD40L, CD70 y la forma constitutivamente activa de TLR4 (que contiene los fragmentos intracelular y transmembrana de TLR4), respectivamente; el plásmido pGEM-NGFR que codifica una forma truncada del receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR, que contiene los fragmentos extracelular y transmembrana); y el plásmido pGEM-sig-MelanA-DCLamp que codifica el antígeno de MelanA de longitud completa, que contiene el epítipo MelanA-A2 inmunodominante optimizado y unido a la señal dirigida a CD-Lamp.

Generación *in vitro* de CD derivadas de monocitos humanos, transcripción *in vitro* de ARNm con caperuza y electroporación de las CD con ARNm.

65 La generación, maduración y crioconservación de CD inmaduras y maduras con coctel de citocinas, la producción de ARNm con caperuza y la electroporación con ARNm de las CD TriMix sometidas a pulsos con péptido de MelanA se

han descrito anteriormente. Para la co-electroporación con ARNm de un antígeno tumoral, las CD se sometieron a electroporación de la misma manera descrita en el ejemplo 2, pero se incluyeron 20 µg de ARNm de un antígeno tumoral en la mezcla de ARNm.

5 *Citometría de flujo.*

Las CD se tiñeron mediante el uso de los siguientes AcM: CD40-APC, CD70-PE, CD80-PE, CD83-PE, CD86-PE, HLA-ABC-FITC (todos de BD Pharmingen, Erembodegem, Bélgica) y HLA-DR (purificado del clon L243). El anticuerpo anti-HLA-DR se marcó con biotina y se detectó a través de estreptavidina-APC (BD Pharmingen). Como controles se utilizaron AcM no reactivos de los mismos isotipos (BD Pharmingen). Los datos se recogieron con el uso de un citómetro de flujo FACSCanto y se analizaron con el software FACSDiva. Las células se clasificaron electrónicamente de acuerdo con las propiedades de dispersión de la luz para excluir células muertas y contaminantes.

15 *Ensayo de secreción de citocinas.*

La secreción de IL-12p70 por las CD durante las primeras 24 horas después de la electroporación se evaluó mediante ELISA con el uso de un estuche comercialmente disponible (eBioscience, Zoersel, Bélgica).

20 *Resultados:*

Las CD sometidas a electroporación con un TriMix de ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 típicamente tienen una electroporación muy eficiente: como promedio, aproximadamente el 80 % de las CD expresan la molécula CD70 en su superficie 24 horas después de la electroporación. Debido a que observamos que la eficacia de la electroporación disminuyó ligeramente cuando una combinación de tres ARNm diferentes se sometió a electroporación en comparación con un solo ARNm, investigamos si la adición de un cuarto ARNm afectaría la eficacia de la electroporación. Encontramos que, cuando las CD con TriMix se someten a co-electroporación con ARNm de TAA, la eficacia de la electroporación no se altera notablemente como se demuestra por la expresión de CD70 24 horas después de la electroporación (Figura 5A).

Después de la electroporación con ARNm TriMix, las CD inmaduras adquieren un fenotipo maduro y potencian su secreción de citocinas, como se demuestra mediante la regulación positiva de las moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD83, CD86) y las moléculas HLA, y la secreción de IL-12p70, respectivamente. Aquí además, cuando las CD con TriMix se someten a co-electroporación con ARNm de TAA el fenotipo maduro (Figura 5B) y la secreción de citocinas (Figura 5C) no se alteran marcadamente.

Ejemplo 5: Inducción de células T CD8⁺ específicas para MelanA por las CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido o a co-electroporación con el ARNm total del antígeno tumoral.

40 *Materiales y métodos:*

Las CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido o a co-electroporación con el ARNm completo del antígeno tumoral se prepararon como se describió anteriormente, así como la inducción *in vitro* de las células T CD8⁺ específicas para MelanA y tinción con tetrámeros.

45 *Citometría de flujo.*

Las células T se fenotiparon con los siguientes AcM: CD8- FITC, CD8- APC-Cy7, CD27-APC, CD28-APC, CD45RA-biotina, CD45RO-APC, CD62L-FITC (todos de BD Pharmingen) y CCR7-APC. El CD45RA biotinilado se detectó con estreptavidina conjugada con PerCP (BD Pharmingen). Como controles se utilizaron AcM no reactivos de los mismos isotipos (BD Pharmingen). Los datos se recogieron con el uso de un citómetro de flujo FACSCanto y se analizaron con el software FACSDiva. Las células se clasificaron electrónicamente de acuerdo con las propiedades de dispersión de la luz para excluir células muertas y contaminantes.

55 *Tinción intracelular de citocinas y ensayo de CD107a/CD137.*

Para la tinción intracelular de citocinas, 2 x 10⁵ células T CD8⁺ estimuladas se volvieron a estimular con 2 x 10⁴ células estimuladoras en presencia de Golgi-plug (BrefeldinA, Becton Dickinson, BD, Erembodegem, Bélgica). Después de 12 h de incubación a 37 °C, las células T CD8⁺ se tiñeron después con AcM anti-CD8 conjugado con FITC o APC-Cy7, se lavaron, se permeabilizaron y se tiñeron intracelularmente mediante el uso del estuche Cytofix/Cytoperm plus de BD con IFN-gamma-PE/TNF-alfa-APC o IFN-gamma-PE/TNF-alfa-FITC, respectivamente. Para el ensayo de CD107a/CD137, 1 x 10⁵ células T CD8⁺ estimuladas se volvieron a estimular con 2 x 10⁴ células estimuladoras en presencia de Golgi-stop (monensina, BD) y AcM anti-CD107a marcado con PE-Cy5 (BD Pharmingen). Después de 12 h de incubación a 37 °C, las células se cosecharon y se tiñeron con AcM anti-CD8 marcado con FITC y AcM CD137 marcado con PE (ambos de BD Pharmingen). Como células estimuladoras, se usaron células T2 HLA-A2⁺ deficientes de TAP sometidas a pulsos con péptido o CD maduras con coctel de citocinas sometidas a electroporación con ARNm de TAA. Las células se analizaron mediante citometría de flujo con el uso de un citómetro de flujo FACSCanto y el software FACSDiva. Las

células se clasificaron electrónicamente de acuerdo con las propiedades de dispersión de la luz para excluir células muertas y contaminantes.

Resultados:

5 Se investigó si las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con ARNm que codifica a MelanA de longitud completa podrían cebar a las células T CD8⁺ vírgenes específicas para MelanA. Por lo tanto, las CD de los donantes sanos HLA-A2⁺ se sometieron a electroporación con ARNm TriMix y lo mismo se sometieron a pulsos con el péptido de MelanA inmunodominante o se sometieron a co-electroporación con ARNm de MelanA-DCLamp. Las CD se cocultivaron después con células T CD8⁺ autólogas sin la adición de citocinas exógenas. Las CD inmaduras y maduras con coctel de citocinas, sometidas a electroporación con ARNm de NGFR irrelevante y sometidas a pulsos con péptido de MelanA se usaron como controles. Las células se estimularon 3 veces con un intervalo semanal. Después de cada ronda de estimulación, se determinó la cantidad de células restantes y el porcentaje de células T CD8⁺ específicas para MelanA y positivas para tetrámeros, y se calculó el número absoluto de células T CD8⁺ específicas para MelanA y positivas para tetrámeros (Tabla 3). Además, el porcentaje relativo de células T específicas para MelanA obtenidas después de cada estimulación se comparó con el número absoluto de células T CD8⁺ específicas para MelanA obtenidas después de 3 estimulaciones semanales con CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido (ajustado al 100 %) (Figura 6A). Se observó que, después de 1 o 2 estimulaciones, las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con ARNm de TAA fueron ligeramente menos potentes que las CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido, mientras que después de 3 estimulaciones, fueron igualmente potentes en 2 de 4 experimentos.

20 A continuación, evaluamos las propiedades funcionales y fenotípicas de las células T CD8⁺ estimuladas 3 veces con CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido o a co-electroporación con ARNm de TAA. Se investigaron los principales mecanismos efectores de las células T CD8⁺ estimuladas, es decir, activación, citolisis y producción de citocinas. Las células T se volvieron a estimular durante la noche con células T2 sometidas a pulsos con péptido de MelanA-A2 o péptido de gag como control negativo. Primero realizamos un ensayo de movilización de CD107a combinado con un ensayo de activación de CD137 (Figura 6B), que miden respectivamente la actividad lítica (14) y la activación de células T (15) tras la estimulación antigénica. En segundo lugar, se realizó tinción intracelular de citocinas para enumerar la cantidad de células que secretan IFN-gamma y/o TNF-alfa tras la estimulación antigénica; ambos son mediadores principales de la respuesta inmunitaria (Figura 6C). Para todos los donantes analizados se observó que el porcentaje de células T específicas para MelanA, se correlacionó con el porcentaje de células T líticas/activadas y con el porcentaje de células T productoras de IFN-gamma/TNF-alfa. En general, no se observaron diferencias importantes entre las células T estimuladas con CD sometidas a pulsos con péptido o sometidas a co-electroporación con TAA, excepto un aumento ligero pero reproducible en la intensidad media de la fluorescencia de la tinción para IFN-gamma y además en el porcentaje de células doblemente positivas IFN-gamma/TNF-alfa, lo que sugiere que las células T estimuladas con CD con TriMix sometidas a co-electroporación ejercen más funciones a la vez (16). También analizamos el fenotipo de las células T CD8⁺ específicas para MelanA inducidas. Las células T CD8⁺ específicas para MelanA estimuladas fueron todas CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD27⁺ CD28⁺, junto con una expresión variable de CD62L y CCR7 (datos no mostrados), lo que sugiere que tanto las células T de memoria central (CD62L⁺ y CCR7⁺) como las células T de memoria efectoras tempranas (CD62L⁻ y CCR7⁻) se han inducido (17). En general, no hubo diferencias significativas en el fenotipo de las células T CD8⁺ específicas para MelanA de los diferentes donantes, independientemente de si se usaron CD sometidas a pulsos con péptido o sometidas a co-electroporación con TAA para la estimulación.

Tabla 3. Inducción de células T CD8⁺ específicas para MelanA restringidas a HLA-A2 por las CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido de MelanA-A2 o a co-electroporación con ARNm de MelanA-CD Lamp*.

45

	% de células T CD8 ⁺ tratamiento con MelanA ⁺ /número de células T CD8 ⁺ (10 ⁶)†				Número absoluto de células T CD8 ⁺ tratamiento con MelanA ⁺ (10 ⁶)‡			
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4
Inm+ péptido de MelanA	0.3/1.2	0.1/1.38	1.2/4.2	0.5/3.8	3.5	1.3	50	19
TriMix+ péptido de MelanA	22,48.3/	83.2/1.8	82.4/8.3	8	4922	695	4884	6478

50

55

60

65

	% de células T CD8 ⁺ tetrámero de MelanA ⁺ /número de células T CD8 ⁺ (10°)†				Número absoluto de células T CD8 ⁺ tetrámero de MelanA ⁺ (10°)‡			
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4
5 TriMix+ ARNm de MelanA	72.5/6.3	25.9/1.6	43.3/5.7	44.8/14.7	4572	401	2455	6594
10 Mad + péptido de MelanA	ND	0.1/1.5	ND	2.1/2.4	No	1.5	ND	52
15	† Los péptidos de células T generados después de iniciar las 3 estimulaciones semanales con las CD con tetrámeros de péptido de MelanA y HLA-A2 y Ac anti-CD8. Las células T CD8 ⁺ específicas para MelanA se identificaron después mediante citometría de flujo. Se restó la tinción de fondo con tetrámeros de HLA-A2 específicos para MAGE-A3. La cantidad de células vivas se determinó por exclusión de azul de tripán.							
	‡ El número absoluto de células T CD8 ⁺ específicas para MelanA se calculó con la siguiente fórmula (número de células T CD8 ⁺ / 100) x % de células T CD8 ⁺ tetrámero de MelanA ⁺ .							
20	* Los resultados se muestran para 4 experimentos individuales de diferentes donantes sanos. Abreviaturas: líneas, CD inmaduras sometidas a electroporación con ARNm de NGFR irrelevante; Mad, CD maduras con coctel de citocinas de CD sometidas a electroporación con ARNm de NGFR: ND, no realizado.							

25 Ejemplo 6: Estimulación de células T CD4⁺ específicas para Mage-A3 por las CD con TriMix sometidas a pulsos con péptido o a co-electroporación con ARNm de TAA completo.

Debido a que todas las construcciones de TAA usadas contienen una señal dirigida a HLA clase II, quisimos investigar si las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con ARNm de TAA podrían estimular las células T CD4⁺ establecidas. Por lo tanto, las CD con TriMix se sometieron a pulsos con péptido de Mage-A3-DP4 o se sometieron a co-electroporación con ARNm de MageA3-DCLamp. Cuatro horas después, las células se cocultivaron con células T específicas para Mage-A3, restringidas a HLA-DP4 durante 20 h. Estas células T son restringidas a HLA-DP4 (HLA-DPB1*0401) y específicas para el epítipo de Mage-A3 aa 243-258 con la secuencia KKLLTQHFVQENYLEY. Se usaron CD inmaduras sometidas a electroporación con ARNm de NGFR irrelevante como control negativo. El IFN-gamma liberado en el sobrenadante durante el cocultivo se midió mediante ELISA (Figura 7). Se observó que las CD con TriMix son efectivamente capaces de presentar epítipos antigénicos en el contexto de moléculas HLA clase II, sin diferencias notables entre las células sometidas a pulsos con péptido y las sometidas a co-electroporación con TAA.

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

40 Materiales y métodos:

Construcciones genéticas.

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

50 *Electroporación de CD.*

Para la co-electroporación con ARNm de MageA3-DCLamp, MageC2-DCLamp, Tirosinasa-Lamp o gp100-Lamp, 50 x 10⁶ CD se sometieron a electroporación con 20 µg de ARNm de CD40L, CD70 y caTLR4 junto con 60 µg de ARNm que codifica TAA en una cubeta de electroporación de 4 mm y se usaron las siguientes condiciones para la electroporación: 55 tensión 300 V, capacitancia 450 µF y resistencia 99 Ω en un volumen final de 600 µl.

Péptidos sintéticos y pulsos de péptidos.

60 El Mage-A3 restringido a HLA-A*0201 (aa 112-120; KVAELVHFL), Mage-C2 (aa 336-344; ALKDVEERV), Tirosinasa (aa 369-377; YMDGTMSQV), gp100 (aa 209-217; ITDQVPFSV) y los péptidos derivados se adquirieron de Thermo Electron (Ulm, Alemania). El péptido gag restringido a HLA-A2 (péptido gag-A2, conjunto de péptidos complejos de gag HXB2, NIH, Programa de Reactivos de Investigación y Referencia en SIDA, McKesson BioServices Corporation, Rockville, MD) se utilizó como control negativo. Para la pulsación de péptidos, las células CD o T2 se diluyeron hasta una densidad final de 2 x 10⁶ células/ml en IMDM que contenía péptido a 10 µg/ml y se incubaron durante 2 h a 37 °C.

Inducción de células T CD8⁺ específicas para TAA.

5 Las células T CD8⁺ se aislaron de la sangre de pacientes con melanoma HLA-A2⁺. Las células T CD8⁺ se purificaron mediante selección inmunomagnética con el uso de microperlas CD8 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y eran consistentemente > 90 % puras (datos no mostrados). Veinte millones de células T CD8⁺ se cocultivaron con CD autólogas a una relación CD: células T de 1:10 por 6 pocillos en 7,5 ml de medio de estimulación que consistía en medio
 10 IMDM que contenía suero AB inactivado por calor al 1 % (PAA Laboratories, Linz, Austria), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM, L-asparagina 0,24 mM y L-arginina 0,55 mM (todos de Cambrex) sin ninguna otra adición de citocinas exógenas tales como IL-2 o IL-7. Como CD estimuladoras, se usaron las CD
 15 maduras con el coctel de citocinas que contenía IL-1 alfa, IL-6, TNF-alfa y PGE2 y se sometieron a pulsos con un péptido derivado de Mage-A3, Mage-C2, tirosinasa o gp100 restringido a HLA-A2 (secuencias KVAELVHFL, ALKDVEERV, YMDGTMSQV e ITDQVPFSV, respectivamente, mezclados en una relación 1:1:1:1); o CD con TriMix preparadas para la vacunación. Las células T CD8⁺ se volvieron a estimular semanalmente con las mismas CD
 20 estimuladoras que se usaron en la estimulación primaria. Después de 2 rondas de estimulación, se cosecharon las células T CD8⁺ y se determinó su especificidad antigénica y función.

Tinción con tetrámeros.

20 Las células T se tiñeron con un Ac anti-CD8 marcado con FITC (BD Pharmingen) y con tetrámeros de HLA-A2 marcados con PE 10 nM (preparados en el laboratorio). Los tetrámeros contenían uno de los siguientes péptidos derivados de TAA y restringidos a HLA-A2: FLWGPRALV - sec. con núm. de ident.:9 - o KVAELVHFL - sec. con núm. de ident.:10 - (derivado de Mage-A3); ALKDVEERV - sec. con núm. de ident.:11 - (derivado de Mage-C2);
 25 YMDGTMSQV - sec. con núm. de ident.:12 - (derivado de tirosinasa); ITDQVPFSV-sec. con núm. de ident.:13 -, YLEPGPVTA - sec. con núm. de ident.:14 - o KTWGQYWQV - sec. con núm. de ident.:15 - (derivado de gp100); o SLLMWITQC - sec. con núm. de ident.:16 - (derivado de NY-ESO-1, control negativo). Las células se analizaron mediante citometría de flujo.

30 La tinción intracelular de citocinas y el ensayo de CD107a/CD137 se realizaron como se describió en el ejemplo 5.

Resultados:

35 Debido a que este trabajo es parte de la evaluación preclínica de un estudio de vacunación donde las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con ARNm de Mage-A3, Mage-C2, tirosinasa o gp100 se inyectarán en pacientes con melanoma, quisimos investigar si estas CD son capaces de inducir las células T CD8⁺ específicas para estos antígenos *in vitro* en las PBMC de los pacientes con melanoma no vacunados. Por lo tanto, las células T CD8⁺ de los pacientes con melanoma HLA-A2⁺ se cocultivaron con CD autólogas como las preparadas para la vacunación, es decir, sometidas a electroporación con ARNm TriMix junto con uno de los cuatro ARNm de los antígenos tumorales y mezcladas
 40 posteriormente en cantidades iguales. Las CD maduras con coctel de citocinas, sometidas a pulsos con un péptido derivado de Mage-A3, Mage-C2, tirosinasa o gp100, restringido a HLA-A2 (también mezclados en cantidades iguales) se usaron como controles. Durante todo el período de estimulación, no se añadieron citocinas exógenas como IL-2 o IL-7 para apoyar la proliferación y supervivencia de células T. Después de 3 estimulaciones semanales, las células T se tiñeron con un panel de tetrámeros que reconocen 7 diferentes epítomos restringidos a HLA-A2, derivados de Mage-A3, Mage-C2, tirosinasa o gp100. Para los 3 pacientes evaluados, se observó que las CD con TriMix sometidas a co-
 45 electroporación con ARNm de TAA fueron capaces de inducir células T específicas para tirosinasa, restringidas a HLA-A2, mientras que las CD maduras con coctel de citocinas y sometidas a pulsos con el péptido de Tirosinasa-A2 no lo hicieron (Figura 8A). No se observaron células T que reconocieran los otros tetrámeros específicos de Mage-A3, Mage-C2 o gp100, ni cuando se utilizaron CD con TriMix ni CD maduras con coctel de citocinas para la estimulación *in vitro* (datos no mostrados). Aunque las CD con TriMix se sometieron a co-electroporación con ARNm de TAA de longitud completa que codifica todos los epítomos posibles derivados de TAA, no se observó inducción de otras células T específicas para Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp100, según se evaluó por los ensayos de CD137/CD107a y tinción intracelular de citocinas (Figura 8B y C y datos no mostrados), aunque las bajas frecuencias de las células T específicas podrían haberse ocultado por la activación inespecífica de células T inducida por las CD con TriMix.

55 Ejemplo 8: Inducción de células T CD8⁺ específicas para otros antígenos diferentes de MelanA en la sangre de pacientes con melanoma después de la vacunación con CD con TriMix sometidas a co-electroporación con ARNm de TAA.

60 El objetivo final de la solicitud es, por supuesto, proporcionar una vacuna contra el cáncer que comprende las CD manipuladas de acuerdo con la solicitud, presentar epítomos derivados de antígenos específicos de un tumor en el contexto de moléculas de HLA clase I o II en su superficie, que puede reintroducirse en el paciente, posteriormente provocar una respuesta inmunitaria contra el marcador tumoral específico. Este procedimiento de inmunovacunación comprende las etapas de (1) obtener y manipular las CD como se ha esbozado en los ejemplos 1 y 7 y (2) inyectar las
 65 CD en el sujeto. El sujeto será un modelo de ratón para análisis adicionales del efecto inmunestimulador de la vacuna *in vivo*, o el sujeto puede ser un paciente con cáncer, para ayudar a establecer una respuesta inmunitaria mediada por

el huésped hacia el antígeno específico del tumor. En resumen, una preparación de CD que comprende preferentemente $10\text{-}100 \times 10^6$ CD, con mayor preferencia $10\text{-}50 \times 10^6$ CD, resuspendidas en $250 \mu\text{l}$ de solución salina tamponada con fosfato (PBS), suplementada con albúmina sérica humana, se inyecta en el sujeto, preferentemente por vía intradérmica.

En el sujeto, las CD son capaces de estimular las células T y provocar una respuesta inmunitaria mediada por el huésped debido a sus características inmunoestimulantes específicas. La reacción inmunitaria en el huésped puede analizarse después mediante técnicas estándar. El análisis del aumento de marcadores inflamatorios apuntará al establecimiento de una reacción inmunitaria en el huésped, probablemente dirigida hacia el antígeno tumoral. Para comprobar si la respuesta inmunitaria está dirigida específicamente hacia el antígeno tumoral presentado por las CD en la preparación de la vacuna, pueden usarse varias técnicas conocidas, tales como tinción intracelular mediante citometría de flujo, ELISPOT o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), con el uso de fragmentos peptídicos del antígeno tumoral o el antígeno tumoral completo para capturar y detectar células T del huésped específicas de antígeno tumoral. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse tanto en la sangre periférica del paciente como en la piel, después de la inducción de una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) y posterior biopsia de la región con DTH.

Pacientes, preparación de la vacuna y programa de vacunación.

Tres pacientes HLA-A2⁺ (2M/1F) con melanoma recurrente en etapa III o IV se reclutaron en un ensayo piloto institucional en curso (UZ Bruselas) con la vacuna de TriMix-CD autólogas para pacientes con melanoma avanzado. Para los propósitos de la vacunación, las CD se sometieron a electroporación con ARNm que codifica uno de cuatro antígenos tumorales (Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa y gp100) y el ARNm TriMix. Después de un período de reposo de una hora, las células se mezclan en proporciones iguales. La primera vacuna se administró antes de la crioconservación de la vacuna de CD, las vacunas posteriores se obtuvieron con células que se descongelaron el día de la vacunación. Las vacunas consisten en $\pm 12,5 \times 10^6$ CD con TriMix por antígeno y se administran mediante 4 inyecciones intradérmicas cada dos semanas en 4 sitios de inyección diferentes (región axilar y/o inguinal).

A continuación se investigó si las CD con TriMix sometidas a co-electroporación con ARNm de Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp100 serían capaces de inducir una respuesta de células T CD8⁺ específicas para el antígeno *in vivo*. Por lo tanto, 2 pacientes con melanoma HLA-A2⁺ (pacientes 2 y 3) fueron vacunados 4 veces cada dos semanas con CD con TriMix. Dos semanas después de la última vacunación, las células T CD8⁺ aisladas de la sangre de estos pacientes se volvieron a estimular *in vitro* con CD autólogas, ya sea con CD con TriMix preparadas para la vacunación o con CD maduras con coctel de citocinas sometidas a co-electroporación con ARNm de un antígeno tumoral. De nuevo, durante todo el período de estimulación, no se añadieron citocinas exógenas. Después de 2 estimulaciones semanales, la especificidad antigénica y la funcionalidad de las células T se investigó mediante tinción con el panel de tetrámeros de HLA-A2 y mediante los ensayos de CD137/CD107a y de tinción intracelular de citocinas; y esto se comparó con la respuesta inducida en las células T CD8⁺ de los mismos pacientes, pero antes de la vacunación. En ambos pacientes no se observaron células T específicas para los epítopos conocidos derivados de Mage-A3, Mage-C2, Tirosinasa o gp100, restringidos a HLA-A2, en la tinción con tetrámeros (datos no mostrados), aunque habíamos sido capaces de inducir células T específicas para la Tirosinasa-A2 en las células CD8⁺ de estos mismos pacientes antes de la vacunación (Figura 8A). Este siguió siendo el caso después de que las células T habían recibido una ronda de estimulación *extra in vitro* (datos no mostrados). Debido a que los pacientes se vacunaron con CD sometidas a co-electroporación con ARNm del antígeno tumoral de longitud completa que codifica todos los epítopos posibles derivados del antígeno tumoral, investigamos si se había inducido una respuesta de células T específica para otros epítopos diferentes a los epítopos restringidos a HLA-A2 conocidos. Por lo tanto, una semana después de la segunda reestimulación *in vitro*, las células T se volvieron a estimular durante la noche con CD maduras sometidas a electroporación con ARNm de un antígeno tumoral o NGFR como control irrelevante después de lo cual se realizó un ensayo de CD137/CD107a (Figura 8B) y un ensayo de tinción intracelular de citocinas (Figura 8C). De hecho, se observaron fuertes respuestas inducidas por la vacuna contra otros epítopos de Mage-A3 (paciente 2), Mage-C2 (paciente 2 y 3) y Tirosinasa (paciente 2), que no estaban presentes antes de la vacunación. En general, se obtuvieron resultados similares cuando se usaron CD con TriMix o maduras con coctel de citocinas para la reestimulación *in vitro*, excepto por el hecho de que estas últimas indujeron menos células T inespecíficas (datos no mostrados).

Ejemplo 9: Combinación de los diferentes ARNm que codifican factores inmunoestimulantes en una única molécula de ARNm para la electroporación

Para la transfección de 2 o más moléculas de ARNm o ADN que codifican factores inmunoestimulantes funcionales y/o factores que inhiben moléculas inhibitoras, pueden usarse preparaciones separadas de ARNm o ADN como se muestra en los ejemplos anteriores. En este caso, cada factor individual está codificado por una única molécula de ARNm o ADN. En este ejemplo alternativo, varios factores están unidos entre sí por medio de una secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) o una secuencia que codifica un péptido 2a escindible. De esta manera, dos o más factores pueden ser codificados por una única molécula de ARNm o ADN. Los datos preliminares donde las células se sometieron a electroporación con ARNm que codifica CD40L y CD70 unidos por una secuencia IRES o un péptido 2a escindible demuestran que este enfoque es realmente factible. La extrapolación de este sistema a más de dos factores inmunoestimulantes también se prevé, por supuesto, en este ejemplo.

Ejemplo 10: Las CD maduras a través de electroporación con ARNm TriMix estimulan de manera eficaz a las células T específicas del antígeno

5 Como se quería investigar el uso de TriMix para la modificación *in situ* de CD de ratón, los inventores evaluaron si la electroporación de CD de ratón con TriMix da como resultado CD inmunogénicas. Se demostró que las CD sometidas a electroporación con TriMix mostraron un fenotipo (Figura 9A), un perfil de secreción de citocinas (Figura 9B), y una capacidad estimuladora de células T alogénicas (Figura 9C) comparables con los de las CD activadas por LPS. Es importante destacar que se demostró que las CD maduras con TriMix eran superiores a las CD maduras con LPS en la estimulación de células T CD8⁺ funcionales, con especificidad antigénica *in vivo*. Esto se demostró para OVA (Figuras 9D-F) y el TAA Trp2 (Figura 9G).

Ejemplo 11: Inmunización *in vivo* mediante inyección intranodal de ARNm de un antígeno en combinación con la composición de ARNm TriMix.

15

Materiales y Métodos

Ratones

20 Los ratones C57BL/6, DBA/2 y BALB/c, hembras, de 6 a 12 semanas de edad se adquirieron de Harlan. Los ratones transgénicos fueron proporcionados por B. Lambrecht (Universidad de Gante, Gante, Bélgica) e incluyen ratones OT-I que portan un receptor de células T CD8 transgénico (TCR) específico para el péptido de la ovoalbúmina restringida a MHC I (OVA) SIINFEKL, ratones OT-II que portan un TCR CD4 transgénico específico para el péptido de OVA restringido a MHC II ISQAVHAAHAEINEAGR y ratones con el receptor de la toxina c-diférica CD11 (DTR) en los que las células CD11c⁺ se agotan tras el tratamiento con 4 ng de toxina diférica (DT)/g de ratón (Sigma). Cuando se indicó los ratones recibieron una inyección hidrodinámica intravenosa con 10 microgramos de un plásmido que codifica el ligando Flt3 (un regalo de O. Leo, Universidad Libre de Bruselas, Bruselas, Bélgica) en NaCl al 0,9 % en un volumen final igual al 10 % del peso corporal del ratón. Los animales fueron tratados de acuerdo con las directrices europeas para la experimentación con animales. Los experimentos fueron revisados por el Comité de Ética para el uso de animales de laboratorio de la Vrije Universiteit Brussel (Jette, Bélgica).

25

30

Líneas celulares de ratón y CD

35 El melanoma MO4, el linfoma de células T EG7-OVA, el mastocitoma P815 y la leucemia mieloide C1498-WT1 se obtuvieron de la American Type Culture Collection, C. Uyttendhove (Université Catholique de Louvain, Bruselas, Bélgica) y H.E. Kohrt (Stanford University Medical Center, Stanford, CA), respectivamente. No se realizó la autenticación completa. Las líneas celulares se evaluaron para determinar la expresión de moléculas MHC y antígenos (OVA, MO4 y EG7-OVA, P1A, P815 y WT1, C1498-WT1) mediante PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) o citometría de flujo. Las CD derivadas de la médula ósea se generaron como se ha descrito (Van Meirvenne et al., 2002, Cancer Gene Ther. 9: 787-97).

40

ARN mensajero

45 El vector, pST1 fue proporcionado por U. Sahin (Johannes- Gutenberg University, Mainz, Alemania). Se han descrito los vectores pGEMli80tOVA, pST1-tirosinasa-CD-LAMP, pST1-sig-WT1-DNLSDC-LAMP, pST1-caTLR4 y pGEM-tNGFR (Benteyn y colegas, manuscrito en preparación, ref. Van Meirvenne et al., 2002, Cancer Gene Ther. 9:787-97). La secuencia que codifica la luciferasa de luciérnaga (FLuc) se clonó en pST1 con modificaciones menores. El vector pGEM-li80P1A se clonó análogamente a la clonación de pGEMli80tOVA. Los ADNc con optimización de codones, que codifican CD40L o CD70 de ratón se obtuvieron de Geneart y se clonaron como un fragmento Spel-XhoI en el vector pST1. Un fragmento del gen Trp2 de ratón que codifica SVYDFFVWL se amplificó con los siguientes cebadores: 50-GGGGATCCGGCCATCCTAAGACGG-30 y 30-GGGGATCCGTGCACACGTCACACTCGTTC-50 y se clonó como un fragmento BamHI en pST1-sig-CD-LAMP linealizado con BamHI y tratado con fosfatasa alcalina de camarón. La secuencia que codifica la GFP mejorada (eGFP) se aisló de p-eGFP-N1 como un fragmento HindIII-NotI y se clonó en el vector pST1 digerido con HindIII-NotI. Todas las enzimas se adquirieron de Fermentas. Antes de la transcripción *in vitro*, los vectores pGEM y pST1 se linealizaron con Spel y SapI, respectivamente. La transcripción *in vitro* se llevó a cabo como se ha descrito (Van Meirvenne et al., 2002 Cancer Gene Ther. 9: 787-98). El ARNm se disolvió en PBS, solución salina equilibrada de Hank que contenía Ca²⁺ (HBSS, Lonza) o lactato de Ringer 0,8 (0,8 RL; Baxter).

55

Pulsación pasiva y electroporación de ARNm

60

65 Para pulsar las CD con ARNm, 5 x 10⁶ CD se sedimentaron y se incubaron durante 15 minutos con 10 mg de ARNm de tNGFR o FLuc en 15 microlitros. Cuando se indicó la pulsación se llevó a cabo en presencia de LPS 1 ng/ml de Escherichia coli serotipo 055: B5 (Sigma-Aldrich), polil:C 10 mg/ml (Sigma) o monofosforil lípido A 100 ng/ml (MPL; GlaxoSmithKline). Las CD se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FCI al 5 % (Harlan), betamercaptoetanol 50 micromol/L y factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos de ratón 20 ng/ml (GM-CSF, preparado en el laboratorio) a una densidad celular de 10⁶ CD por ml. Cuatro horas después, las CD se

lisaron mediante el uso del tampón de lisis de Promega. Se añadió D-luciferina (Xenogen), se midió la luminiscencia con el luminómetro Glomax-96 y se analizaron los datos con el software Glomax (Promega). La electroporación de las CD con ARNm se llevó a cabo como se ha descrito (Van Meirvenne et al., 2002, Cancer Gene Ther. 9: 787-97). Cuando se indica, las CD se activaron durante 4 horas con LPS a 100 ng/ml.

5

Suministro in situ de ARNm

10 Para la administración intranodal de ARNm, los ratones C57BL/6 se anestesiaron con ketamina (70 mg/kg, Ceva) y xilacina (10 mg/kg, Bayer). El ganglio linfático inguinal se expuso quirúrgicamente y se inyectó con la cantidad indicada de ARNm (y donde se indicó 1 ng de LPS). Posteriormente, se cerró la herida. En 3 días consecutivos antes de la administración intradérmica de ARNm, los ratones se inyectaron por vía intradérmica con PBS o 20 ng de GM-CSF de ratón, después de lo cual se administró el ARNm.

15

Aislamiento de ARN, síntesis de ADNc y RT-PCR

El ARN se extrajo con el uso del Sistema de Aislamiento de ARN Total SV (Promega) y se convirtió a ADNc mediante el Kit de Síntesis de ADNc RevertAid H-Minus First Strand (Fermentas). La secuencia que codifica FLuc se amplificó con 50-AAGGTGTGGCCCTTCC-30 y 50-CCAAGAATGAAAATAGGGTTG-30, mientras que la secuencia que codifica la beta-actina se amplificó con 50-TGCTATCCAGGCTGTGCTAT-30 y 50-GATGGAGTTGAAGGTAGTTT-30 mediante el uso del siguiente programa de PCR: 94 °C 50", 45(94 °C 30", 52 °C 30", 72 °C 30"), 72 °C 100, mantener a 4 °C.

20

Matriz para la respuesta inmunitaria

25

El ARN de los ganglios linfáticos inyectados con 0,8 RL, 10 mg de ARNm de antígeno suplementado con 20 mg de ARNm de tNGFR o TriMix (10 microgramos por componente) se extrajo y se convirtió a ADNc. La RT-PCR cuantitativa mediante la matriz para la respuesta inmunitaria de ratón TaqMan (Applied Biosystems) y el análisis de la misma se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30

Citometría de flujo

Los anticuerpos anti-CD11c (HL3), -CCR7 (2H4) conjugados con alofocianina, y los anticuerpos anti-CD40L (MR1) y -CD70 (FR70) conjugados con ficoeritrina se adquirieron de Pharmingen. Los anticuerpos contra CD40 (FGK45), CD80 (16-10A1) y CD86 (GL-1) se prepararon en el laboratorio. Los anticuerpos con igual isotipo, no reactivos, sirvieron como controles (Pharmingen). El marcaje de las CD se llevó a cabo tal como se ha descrito (Van Meirvenne et al., 2002 Cancer Gene Ther. 9: 787-98). Los datos se recogieron mediante el uso del citómetro de flujo FACSCanto (Becton Dickinson) y se analizaron con el software FACSDiva o FlowJo.

35

Reacción linfocitaria mixta alogénica

40

La capacidad de las CD sometidas a electroporación para estimular células T alogénicas purificadas con CD90 (Miltenyi Biotec) se evaluó en una reacción linfocitaria mixta (Breckpot et al., 2010, J. Virol. 84: 5627-36).

45

ELISA

Los sobrenadantes se tamizaron en un ELISA sándwich para detectar la presencia de interleucina (IL)-6, IL-12p70, TNF-alfa o IFN-gamma (eBioscience).

50

Imágenes de bioluminiscencia in vivo

Las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* se obtuvieron como se ha descrito (Keyaerts et al., 2008 Eur. J. Nucl. Med Mol Imaging 35: 999-1007).

55

Microscopía de fluorescencia

Los ganglios linfáticos se inyectaron con 10 mg ARNm de eGFP, 1 día antes del aislamiento. Se prepararon suspensiones de células individuales y se tiñeron con un anticuerpo anti-CD11c conjugado con ficoeritrina. La expresión de CD11c y eGFP se evaluó con el microscopio de fluorescencia Evos^{fl}.

60

Inmunización de ratones

Los ratones se inmunizaron por vía intravenosa con 5×10^5 CD presentadoras de antígenos activadas con TriMix o LPS, o por vía intranodal o intradérmica con 10 microgramos de ARNm del antígeno suplementado con 30 mg de ARNm de tNGFR o TriMix (10 microgramos por componente). La inmunización con CD sometidas a electroporación con ARNm de

65

tNGFR o con ARNm de tNGFR como tal sirvió como control. Para la evaluación de la eficacia terapéutica, 5×10^5 células tumorales se administraron por vía subcutánea en la zona lumbar, 7 días antes de la inmunización.

Tinción intracitoplasmática de IFN-g

5

Las células del bazo de ratones inmunizados se estimularon durante 24 horas con CD sometidas a pulsos durante 2 horas con péptido SIINFEKL a 5 mmol/L y maduradas con LPS. Se añadió GolgiPlug 24 horas antes de la tinción intracitoplasmática de IFN-gamma.

Tinción con pentámeros

10

La tinción de las células T CD8⁺ con pentámeros de H2-K^b/SIINFEKL (Immunosource) se realizó como se ha descrito (Breckpot et al., 2010, J. Virol. 84: 5627-36).

Ensayo de citotoxicidad *in vivo*

15

Las células del bazo de ratones singénicos se marcaron con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) a 10 mmol/l como se ha descrito (Van Meirvenne et al., 2002 Cancer Gene Ther. 9: 787-98). Estas se sometieron a pulsos con el péptido SIINFEKL (OVA) o SVYDFVWL (Trp2, Thermo Electron Cooperation) o un conjunto de péptidos superpuestos que cubren WT1 (amable regalo de V. Van Tendeloo, University of Antwerp, Edegem, Bélgica) o tirosinasa (EMC microcultures) a 5 mmol/l durante 2 horas. Las células sometidas a pulsos con péptido se mezclaron en una relación 1:1 con células no sometidas a pulsos, marcadas con CFSE a 0,5 mmol/l. La lisis específica de las células diana se analizó 18 horas más tarde mediante citometría de flujo. El porcentaje de muerte se calculó tal como se ha descrito (Dullaers et al., 2006, Gene Ther. 13: 630-40).

20

25

Ensayo de proliferación *in vivo*

Un día antes de la inmunización, 10^6 células del bazo OT-I CD8⁺ marcadas con CFSE y purificadas o células OT-II CD4⁺ se transfirieron a los ratones mediante inyección intravenosa. Cinco días después de la inmunización, la proliferación de células T se analizó en sangre periférica, bazo y ganglios linfáticos (Dullaers et al., 2006, Gene Ther. 13: 630-40).

30

Análisis estadístico

Se realizó un ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Los tamaños de las muestras y el número de veces que se repitieron los experimentos se indican en las leyendas de las figuras. El número de asteriscos en las figuras indica el nivel de significación estadística de la siguiente manera: *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$. Los resultados se muestran en un diagrama de dispersión en el que cada ratón se representa como un punto y la media como una línea horizontal o en un gráfico de columnas o tabla como media \pm SEM. La supervivencia se visualizó en un diagrama de Kaplan-Meier. Las diferencias en la supervivencia se analizaron mediante la prueba log-rank.

35

40

Resultados:

11a. Formulación y farmacocinética del ARNm con fines de vacunación.

45

En este experimento, se evaluó el tampón que sería más adecuado para suministrar el ARNm a las CD. El ARNm de FLuc se disolvió en PBS, HBSS que contiene Ca²⁺, o 0,8 RL. El análisis de luminiscencia de las CD sometidas a pulsos pasivamente mostró una alta expresión de FLuc cuando el ARNm se disolvió en 0,8 RL o HBSS (Figura 10A).

50

A continuación, el ARNm de FLuc se administró por vía intranodal. Las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* mostraron una expresión de FLuc a corto plazo cuando el ARNm se formuló en PBS, en comparación con la alta y prolongada expresión de FLuc cuando el ARNm se formuló en HBSS o 0,8 RL (Figura 10B). Esto último fue inesperado ya que se considera que el ARNm desnudo tiene una corta vida extracelular. Para analizar la estabilidad del ARNm *in vivo* tras la administración en 0,8 RL, los inventores resecaron los ganglios linfáticos inyectados con ARNm de FLuc a las 6, 12 y 24 horas después de la inyección. La RT-PCR mostró la presencia de ARNm de FLuc hasta 12 horas después de la inyección. No se detectó ARNm de FLuc en puntos de tiempo posteriores (Figura 10C).

55

Después, se evaluó el papel de las CD en la captación de ARNm *in vivo*. Los ganglios linfáticos se inyectaron con ARNm de eGFP 24 horas antes de su aislamiento. Se prepararon suspensiones de células individuales y se tiñeron para CD11c. La microscopía de fluorescencia mostró un pequeño número de células eGFP⁺. Es importante destacar que todas las células eGFP⁺ fueron CD11c⁺, lo que demuestra la captación y traducción del ARNm por las CD (Figura 10D). Para obtener más evidencias del papel de las CD, los inventores utilizaron ratones transgénicos CD11c-DTR en los que la administración de DT da como resultado el agotamiento de las células CD11c⁺. Las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* mostraron la ausencia de expresión de FLuc en ratones que se trataron con DT antes de la administración intranodal de ARNm de FLuc. Los ratones tratados con PBS sirvieron como control (Figura 10E). El análisis de la citometría de flujo de los ganglios linfáticos de estos ratones confirmó que la ausencia de luminiscencia se correlacionó

60

65

con el agotamiento de las CD (Figura 10E). Dado que el suministro de ARNm en el ganglio linfático inguinal es técnicamente difícil, la viabilidad del suministro de ARNm por vía intradérmica se examinó finalmente. Debido a que se demostró en el experimento anterior que las células CD11c⁺ son responsables de la captación de las CD, los ratones recibieron un pretratamiento con una inyección intradérmica de PBS o GM-CSF en 3 días consecutivos antes de la inyección intradérmica de ARNm de FLuc. Las imágenes de bioluminiscencia *in vivo*, obtenidas 6 horas más tarde, mostraron expresión de FLuc sólo en ratones pretratados con GM-CSF (Figura 10F).

11 b. La administración intranodal de TriMix genera un ambiente inmunoestimulante

Para evaluar el efecto de TriMix y los estímulos clásicos de maduración sobre el englobamiento del ARNm y la inducción de un ambiente inmunoestimulante, los inventores primero sometieron a pulsos pasivamente a las CD *in vitro* con ARNm de FLuc y estos estímulos de maduración, lo que mostró una reducción en la expresión de FLuc después de la pulsación de las CD con ARNm de FLuc en presencia de LPS, MPL o polil:C. Esta reducción en la expresión de la proteína fue menos pronunciada cuando se coadministró TriMix (Figura 11A). Además, las CD sometidas a pulsos con ARNm TriMix mostraron una mayor expresión de CD40, CD70, CD80 y CD86 que las CD sometidas a pulsos con MPL (datos no mostrados), LPS o polil:C (Figura 11 B). A continuación, se evaluó la captación de ARNm de FLuc cuando se suministró como tal o junto con LPS o TriMix *in vivo*. Se demostró que la coadministración de TriMix tuvo un menor impacto en la captación de ARNm que su coadministración con LPS (Figura 11C). Para aumentar el número de CD que pueden recuperarse del ganglio linfático inyectado para el análisis, los ratones recibieron un pretratamiento con una inyección hidrodinámica de un plásmido que codifica el ligando Flt3. En analogía con los datos descritos por Kreiter y colegas (Kreiter S. et al., 2011, Cancer Res. 71: 6132-42), el ARNm de FLuc inyectado en estos ratones resultó en un aumento de la luminiscencia, lo que refleja la captación específica de las CD (datos no mostrados). La citometría de flujo mostró que las CD (CD11c⁺) de los ganglios linfáticos co-inyectados con TriMix mostraron la expresión más alta de CD40, CD80 y CD86 que las CD aisladas de los ganglios linfáticos inyectados con ARNm de FLuc solo o combinados con LPS (Figura 11D). Estos hallazgos incitaron a los inventores a analizar si la coadministración de TriMix promueve un ambiente de atracción y activación de células T, mediante la determinación del perfil de los niveles de expresión de marcadores asociados a la maduración mediante RT-PCR cuantitativa. Los inventores observaron una regulación positiva de varios marcadores en los ganglios linfáticos inyectados con ARNm de FLuc y tNGFR cuando se compararon con los ganglios linfáticos inyectados con 0,8 RL. Es importante destacar que la regulación positiva de los siguientes marcadores: MHC II, IL-6, IL-15, IFN- γ , MCP-1, IP-10, granzima B, SOCS1 y STAT1 fue al menos 2 veces mayor cuando se coadministró TriMix (véase la Tabla 4).

Tabla 4: La administración intranodal de ARNm TriMix genera un ambiente inmunoestimulante.

		ARNm de antígeno	ARNm TriMix
Moléculas presentadoras de antígenos			
	MHC II	6,2 ± 2,3	27,9 ± 6,5
Citocinas proinflamatorias			
	IL-6	3,7 ± 1,3	9,0 ± 3,0
	IL-15	5,9 ± 0,8	16,1 ± 1,5
	IFN- γ	2,3 ± 0,1	5,1 ± 0,1
Moléculas que atraen las células T			
	MCP-1	1,9 ± 0,2	6,1 ± 1,1
	IP-10	10,3 ± 2,3	35,9 ± 5,1
Moléculas de señalización			
	SOCS1	2,5 ± 0,6	7,1 ± 1,9
	STAT1	2,8 ± 0,7	4,3 ± 0,1
Otras			
	Granzima B	9,2 ± 1,7	2,4,4 ± 1,8

Nota: Los ratones recibieron una inyección intranodal de 0,8 RL, ARNm de antígeno combinado con ARNm de tNGFR, o con TriMix. Los ganglios linfáticos se resecaron 8 horas después, se extrajo el ARN, se sintetizó el ADNc y se llevó a cabo la RT-PCR cuantitativa. Se resumen las moléculas para las cuales la regulación positiva fue al menos dos veces mayor cuando las TriMix se co-administraron en comparación con el ARNm del antígeno solo. Los datos muestran la regulación positiva relativa en comparación con la inyección con 0,8 RL solo. Los resultados se muestran como media SEM de 3 experimentos.

11c. La administración intranodal de TriMix pero no de LPS junto con ARNm de OVA da como resultado la expansión de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para OVA con potente función efectora

5 La activación de las células T CD4⁺ es fundamental para la inducción de una inmunidad antitumoral duradera (Beva et al., 2004, Nat. Rev. Immunol. 4: 595-602). Por lo tanto, los inventores evaluaron la expansión de las células T CD4⁺ específicas para OVA tras la administración intranodal de ARNm de tNGFR, ARNm de OVA o combinados con TriMix o LPS. La proliferación de las células OT-II CD4⁺ marcadas con CFSE se evaluó mediante citometría de flujo, que mostró una proliferación aumentada de células OT-II en ratones que recibieron ARNm de OVA y TriMix. Debe señalarse que las células T transferidas apenas proliferaron cuando se coinyectó LPS con ARNm de OVA (Figura 12A). Se obtuvieron resultados similares con células OT-I CD8⁺ (datos no mostrados). Para evaluar aún más la expansión y la función de las células T CD8⁺ específicas para OVA, los ratones se inmunizaron 1 día después de la transferencia adoptiva de las células OT-I CD8⁺. Cinco días después de la inmunización, se realizó una tinción con pentámeros de H2-kb/SIINFEKL o un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. Ambos ensayos demostraron la estimulación aumentada de las células T CD8⁺ específicas para OVA cuando los ratones se inmunizaron con ARNm de OVA y TriMix en comparación con los ratones inmunizados con ARNm de OVA solo o combinados con LPS (Figura 12B y 12C). Con el uso del antígeno modelo de OVA, los inventores finalmente compararon la administración intradérmica de ARNm de OVA y TriMix en ratones tratados previamente con GM-CSF antes de su administración intranodal. Mediante el ensayo de citotoxicidad *in vivo* demostramos que la lisis de las células diana fue la más alta cuando el ARNm se administró por vía intranodal (Figura 20 12D), aunque la administración intradérmica también dio lugar a buenos resultados de lisis.

11d. La inclusión de TriMix en la vacuna antitumoral basada en ARNm potencia la inducción de células T citotóxicas específicas para TAA

25 Después, se evaluó si los resultados obtenidos con el antígeno OVA (ovoalbúmina) son representativos para otros TAA. Los ratones se inmunizaron con ARNm de Trp2, WT1 o tirosinasa solos o combinados con TriMix. El ensayo de citotoxicidad *in vivo* mostró una potenciación de la lisis de las células diana cuando se incluyó TriMix en el régimen de inmunización (Figura 13A-C).

30 11e. La inmunización con ARNm de antígenos y TriMix es tan eficaz en la estimulación de células T citotóxicas y en la terapia como la inmunización con CD modificadas *ex vivo*

A continuación, se comparó la eficacia de la inmunización basada en CD con la basada en ARNm, evaluando la inducción de CTL específicos del antígeno *in vivo*. Se demostró que la inmunización con ARNm TriMix y del antígeno era tan eficaz como la inmunización con CD sometidas a electroporación con ARNm del antígeno y TriMix para el antígeno OVA y los TAA, Trp2 y WT1 (Figura 14A-C).

40 En una etapa siguiente, se evaluó la eficacia terapéutica de tales vacunas. En primer lugar, los ratones portadores de tumores MO4 se trataron con CD modificadas con ARNm TriMix y del antígeno o con ARNm TriMix y del antígeno como tal. Se obtuvieron resultados similares tras la inmunización con OVA (Figura 6D) o Trp2 (Figura 14E) como antígeno. Los ratones tratados con CD sometidas a electroporación con tNGFR o ARNm de tNGFR como tal sirvieron como controles. Los ratones de los grupos control mostraron un rápido crecimiento tumoral, mientras que los ratones inmunizados con una sola inyección intravenosa de CD sometidas a electroporación con ARNm TriMix y del antígeno o una inyección intranodal de ARNm TriMix y del antígeno mostraron un crecimiento tumoral reducido, por lo tanto, una supervivencia prolongada. Estos datos se ampliaron al linfoma de células T de ratón EG7-OVA, a la leucemia mieloide C1498-WT1 en ratones C57BL/6 y al mastocitoma P815 en ratones DBA-2 mediante el uso de OVA, WT1 y P1A como el antígeno aplicado para la inmunización, respectivamente (Figura 14F-H).

50 Esto mostró que tanto la utilización de vacunas que comprenden CD estimuladas *in vitro*, así como el uso de la estrategia de estimulación de las CD *in vivo* resultó en una vacunación eficaz.

Ejemplo 12: Ensayos clínicos con CD manipuladas *in vitro* y reintroducidas por vía intradérmica y/o intravenosa

55 Las CD inmaduras se generaron por cultivo de monocitos en presencia de plasma autólogo al 1 %, GM-CSF a 1000 U/ml e interleucina (IL)-4 500 U/ml. Después de la leucofóresis, los monocitos se enriquecieron mediante adherencia al plástico. En el día 6, las CD se cosecharon y se sometieron a co-electroporación con ARNm TriMix (ARNm que codifica CD40L, CD70 y caTLR4) y ARNm que codifica 1 de 4 MAA (MAGE-A3, MAGE-C2, tirosinasa, o gp100) unido a una señal dirigida a HLA clase II. Después de la electroporación, los cuatro constituyentes celulares diferentes de TriMixDC-MEL (es decir, CD que expresan uno de los cuatro antígenos) se mezclaron en relaciones iguales y se crioconservaron. Las CD se descongelaron 2-3 horas antes de la inyección. Se realizó un proceso de control de calidad (QC) en curso del producto final.

65 Los pacientes se asignaron a cuatro cohortes secuenciales que recibían dosis crecientes de TriMixDC-MEL por vía intravenosa y/o intradérmica. La primera cohorte recibió 20x10⁶ CD por vía intradérmica (id) y 4x10⁶ CD por vía intravenosa (iv); la segunda cohorte 12x10⁶ CD id y 12x10⁶ CD iv, la tercera cohorte 4x10⁶ CD id y 20x10⁶ CD iv y la cuarta cohorte recibió 24x10⁶ CD iv solamente. Las cuatro primeras administraciones de TriMixDC-MEL se

administraron cada dos semanas con una 5ta administración programada 8 semanas después de la 4ta administración. Las CD (suspendidas en 15 ml de solución salina fisiológica) se administraron iv durante una infusión de 15 minutos a una tasa de flujo constante en una vena periférica, y/o las CD (suspendidas en 250 µl de solución salina tamponada con fosfato que contenía albúmina de suero humano al 1 %) se inyectaron por vía intradérmica en 2 sitios anatómicos diferentes (axila y/o región inguinal). Cada paciente se monitorizó estrechamente durante al menos 1 hora después de terminar la administración intravenosa. Los eventos adversos (EA) se monitorizaron continuamente y se calificaron con el uso de los Criterios Comunes de Toxicidad del Instituto Nacional del Cáncer, versión 4.0.

Los criterios de valoración secundarios incluyeron la inmunogenicidad de la terapia con TriMixDC-MEL, la respuesta tumoral (de acuerdo con los Criterios de Evaluación de la Respuesta en Tumores Sólidos [RECIST] v1.1), el tiempo hasta la progresión y la supervivencia global (evaluada por las estimaciones de probabilidad de supervivencia de Kaplan-Meier mediante el uso del software SPSS de IBM v19.0).

Características y disposición inicial de los pacientes

Entre diciembre de 2009 y febrero de 2011, se reclutaron 15 pacientes elegibles con melanoma avanzado pretratado. La mediana de la edad fue de 51 años (intervalo 41-78). La lactato deshidrogenasa sérica (LDH), la proteína C reactiva y el conteo de linfocitos al inicio del estudio fueron normales en la mayoría de los pacientes. La mayoría (10/15) pacientes tenían un PS de 0-1 y etapa de AJCC IV-M1c enfermedad (8/15, incluidos dos pacientes con metástasis cerebrales previamente irradiadas). Trece pacientes habían fracasado con terapia anterior con quimioterapia de DTIC o TMZ, y 3 pacientes habían fracasado en el tratamiento con un AcM de bloqueo de CTLA-4. Sólo un paciente se trató previamente con un inhibidor selectivo BRAF V600.

Los pacientes se reclutaron en 4 cohortes, recibiendo un número creciente de CD por la vía iv y números decrecientes id. Respectivamente, dos y tres pacientes se reclutaron en la primera y segunda cohorte. Ninguno de ellos experimentó efectos secundarios inesperados relacionados con el tratamiento. Entre los tres primeros pacientes reclutados en la tercera cohorte, un paciente experimentó un efecto adverso inesperado, relacionado con el tratamiento (escalofríos). Por lo tanto, esta cohorte se amplió con tres pacientes adicionales. El reclutamiento a la cuarta cohorte terminó cuando ninguno de los cuatro primeros pacientes experimentó toxicidad limitante relacionada con el tratamiento.

Ocho pacientes recibieron las cinco administraciones de TriMixDC-MEL planificadas. Cinco pacientes sólo recibieron las primeras cuatro administraciones cada dos semanas. Dos pacientes no pudieron recibir más de tres administraciones debido al deterioro clínico por el progreso de la enfermedad. No se observó relación entre el número de administraciones y la cohorte de tratamiento.

Eventos adversos relacionados con el tratamiento

TriMixDC-MEL fue bien tolerado y no se encontró toxicidad severa (eventos adversos de grado ≥ 3 según los Criterios de Terminología Comunes para Eventos Adversos). Todos los pacientes experimentaron reacciones cutáneas locales de grado 2 (irritación, eritema e hinchazón) en los sitios de inyección intradérmica. Se observaron escalofríos de grado 2 después de la infusión en 3 de los 15 pacientes. Los escalofríos comenzaron típicamente alrededor de 15 minutos después de terminar la infusión iv de TriMixDC-MEL, y se resolvieron espontáneamente en 30 minutos. Además, se informaron síntomas similares a la gripe de grado 2 y fiebre (38-39 °C) que persistieron durante 2-3 días después de la inyección de CD por 8 y 3 pacientes respectivamente.

Respuesta antitumoral y supervivencia

La mejor respuesta objetiva por RECIST consistió en una respuesta completa en dos pacientes, una respuesta parcial en dos pacientes (para una mejor tasa de respuesta objetiva de 26,6%) y una enfermedad estable en seis pacientes adicionales (para una tasa de control de la enfermedad del 66,6%). La regresión tumoral fue evidente en todos los pacientes que respondieron en la primera evaluación 8 semanas después de la primera administración de TriMixDC-MEL. Se observó una regresión adicional continuada de las metástasis FDG-avid hasta el último seguimiento en ambos pacientes con una respuesta parcial. Las cuatro respuestas tumorales objetivo se confirmaron y continúan después de un seguimiento de, respectivamente, 13,2+, 17,8+, 22,6+ y 23,1+ meses. Dos pacientes con una enfermedad estable tuvieron una supervivencia libre de progresión clínicamente significativa de más de seis meses (respectivamente 10 y 18,3+ meses). Después de una mediana de seguimiento de 18,2 meses (rango 11,9-23,7), 8 pacientes han muerto. La mediana de PFS y OS son respectivamente 5,1 meses (CI de 95 % 0-10,4) y 14,4 meses.

Evaluación de las respuestas de células T

Se obtuvo una biopsia de piel con DTH de 13 pacientes una semana después de la 4ta administración de CD. En 10 pacientes se obtuvieron suficientes células T para la evaluación de la especificidad antigénica de las células T infiltrantes de la piel (SKIL). En 4 (40 %) pacientes las células T CD8⁺ tuvieron especificidad para los antígenos asociados al melanoma (MAA) presentados por TriMixDC-MEL (MAA-CD). En otros 2 pacientes, con SKIL insuficiente para el monitoreo directo, pudieron detectarse SKIL CD8⁺ específicas para MAA después de la reestimulación *in vitro*. Así, en total el 60 % de los pacientes tenían SKIL CD8⁺ específicas para el tratamiento. Un repertorio de células T con

especificidad para más de un MAA se encontró en 4 pacientes y los cuatro MAA fueron reconocidos por las SKIL de 2 pacientes (Tabla 3). Las células T CD4+ específicas para MAA-CD pudieron detectarse en 5 de 12 (42 %) pacientes.

5 Ejemplo 13: La inyección intranodal de ARNm de FLuc conduce a la expresión de proteínas; y la inyección intranodal de ARNm TriMix y ARNm que codifica antígenos estimula una respuesta inmunitaria específica en los sujetos.

10 Un ganglio linfático cervical de un cerdo se inyectó por vía transcutánea con ARNm de FLuc disuelto en lactato de Ringer. Cuatro horas después de la inyección, se resecó el ganglio linfático inyectado y se realizó un estudio de bioluminiscencia para obtener imágenes de pseudo-color bioluminiscentes, en las que una alta luminiscencia [una medida de la cantidad de células FLuc+] se muestra mediante la flecha (Figura 15A).

15 Posteriormente, se inyectó un ganglio linfático humano de un donante de órganos sin latidos cardiacos con 50 µg de ARNm de FLuc disuelto en lactato de Ringer. Después de 4 h de incubación en PBS, se realizó un estudio de bioluminiscencia *in vivo* para obtener imágenes de pseudo-color bioluminiscentes, en las que una alta luminiscencia [una medida de la cantidad de células FLuc+] se muestra mediante la flecha (Figura 15B). La LUT [Tabla de búsqueda] muestra que los valores 'mín' y 'máx' correlacionan la luminiscencia con una cantidad absoluta de conteos [unidades de luz relativas].

20 A continuación, un voluntario sano, protegido contra CMV se inyectó en la espalda baja con ARNm TriMix o ARNm TriMix junto con el antígeno pp65 de CMV. 72 horas más tarde, una reacción de DTH es visible en ambos lugares de inyección (enrojecimiento e induración), pero fue más pronunciada donde estaba presente el antígeno de CMV. Se tomó una biopsia de piel del lugar de la inyección y se cultivó durante 2,5 semanas en medio que contenía IL2. Después, las células T se tamizaron para determinar la especificidad para CMV (Figura 16). Se observó una respuesta de células T CD4+ específicas para CMV en las células derivadas de la biopsia después de la inyección de ARNm de TriMix+ CMV, lo que indicó que incluso a través de la inyección intradérmica del coctel de ARNm TriMix en combinación con un antígeno diana es capaz de reclutar células T específicas para el antígeno al sitio de la inyección.

25 Ejemplo 14: La inyección intratumoral de ARNm TriMix (y antígenos) provoca una respuesta inmunitaria específica en los sujetos.

30 Se generaron ratones transgénicos para CD11c-DTR (se generó un modelo de ratón transgénico en el que el receptor de la toxina diftérica se expresa bajo el promotor de CD11c, véase Hochweller et al., 2008, Eur J Immunol. Oct; 38 (10): 2776-83), que se trataron previamente con PBS o DT, recibieron una inyección intratumoral con ARNm de FLuc. Las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* se obtuvieron 4 horas después de la administración del ARNm de FLuc. Posteriormente se prepararon suspensiones de células individuales a partir de los tumores y se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la presencia de células CD11 c+. La cinética de la bioluminiscencia se realizó hasta 35 11 días después de la inyección intratumoral. El experimento muestra que las células CD11 c+ residentes en el tumor engullen el ARNm administrado por vía intratumoral. El ambiente tumoral de los ratones tratados con ARNm TriMix contiene además una mayor cantidad de células CD11c+, que tienen un estado de maduración similar a las células CD11c+ de ratones tratados con tNGFR. Por el contrario, la cantidad de células CD11c+ en los ganglios linfáticos que drenan el tumor no difiere entre los ratones tratados con TriMix o tNGFR, mientras que el estado de maduración de los primeros aumenta. El ambiente tumoral de los ratones tratados con TriMix contiene una cantidad menor de células CD11 b+, en particular células CD11 b+ Ly6G+. Estas células son MDSC (células supresoras derivadas de tejido 40 mieloide) inmunosupresoras.

45 Estos datos demuestran dos cosas importantes (ver las Figuras 18-20). En primer lugar el ARNm que se ha inyectado por vía intratumoral es de hecho engullido por las APC residentes. Cuando se inyecta con ARNm TriMix, se espera que, en analogía a las CD residentes en los ganglios linfáticos, estas CD maduren y comiencen a presentar antígenos específicos del tumor. En este caso, los antígenos se originarían del ambiente tumoral (véase el Ejemplo 16) o se co- 50 inyectan. Estas CD serán capaces después de provocar una respuesta inmunitaria específica localmente en el tumor o en el ganglio linfático que drena el tumor (ya que nuestros datos muestran que hay más CD maduras presentes en el ganglio linfático que drena el tumor después de la inyección intratumoral de ARNm TriMix). A continuación, se muestra que la inyección intratumoral de ARNm TriMix conduce a un cambio en el ambiente tumoral. De hecho, están presentes menos MDSC en el ambiente tumoral. Como resultado, el ambiente tumoral inmunosupresor se altera por la inyección 55 de TriMix, y se crea un ambiente que es más propenso a la inducción de respuestas inmunitarias específicas para el tumor.

60 Se demostró además que la administración intratumoral de ARNm TriMix y antígeno da como resultado la inducción de respuestas inmunitarias específicas para el antígeno. Las células OT-I CD8+ marcadas con CFSE (células CD8+ transgénicas específicas para el antígeno OVA (ovoalbúmina)) se transfirieron adoptivamente 1 día antes de la inmunización de ratones con ARNm de tNGFR, OVA, ARNm TriMix solo o una combinación. Cinco días después de la inmunización, se analizó la estimulación de las células T dentro del tumor. La proliferación de células OT-I CD8+ se analizó mediante citometría de flujo. La Figura 17 muestra claramente que la inyección intratumoral de ARNm TriMix y de antígeno de OVA dio como resultado una respuesta inmunitaria específica hacia el antígeno de OVA. La tabla 65 siguiente muestra que tras la administración de ARNm TriMix en el tumor, pudo documentarse una clara regulación positiva de los marcadores de maduración y activación de las CD, tales como CCR5, CCR7, CD40, CD86 y aumento de

la secreción de citocinas tales como IL-6, IL-12 y TNF. Además, se redujo la expresión de reguladores negativos tales como IL-10 y STAT3.

		% de ARNm TriMix vs. tNGFR regulado positivamente	% de ARNm TriMix vs. tNGFR regulado negativamente
5	Marcadores de activación	12	
	CD80	12	
	CD86		
10	Citocinas proinflamatorias		
	IL-6	21	
	IL-12	52	
15	TNF- α	36	
	Otros		
	CCR5	31	
20	CCR7	12	
	IL-10		51
25	STAT3		9

30 Ejemplo 15: Las CD con TriMix son capaces de contrarrestar las funciones de las Treg y reprogramar las células Treg a Th1 en ciertas circunstancias.

Las células T reguladoras (Treg) contrarrestan las respuestas inmunitarias contra el cáncer a través de una serie de mecanismos, limitando la inmunoterapia contra el cáncer basada en CD. Aquí, los inventores investigaron la influencia de varios estímulos de activación de CD sobre la funcionalidad de las Treg. Las CD activadas por electroporación con ARNm que codifica TLR4 constitutivamente activo (caTLR4), CD40L y CD70 (TriMix-CD) se compararon con CD maduras en presencia de un coctel de citocinas inflamatorias (CC-CD) en cuanto a su capacidad para contrarrestar las Treg en diferentes niveles.

40 Las CD inmaduras (CDi) se descongelaron y se sometieron a electroporación con ARNm que codifica una forma constitutivamente activa de TLR4 (caTLR4) y CD40L (denominadas además DiMix-CD), o una combinación de DiMix y ARNm que codifica CD70 (denominadas además TriMix-CD). Las CD sometidas a electroporación simulada se mantuvieron inmaduras o se maduraron durante 24 horas con un coctel de citocinas inflamatorias (CC-CD) que contenía IL-1 β 100 IU/ml (preparado en el laboratorio), IL-6 1000 IU/ml (Gentaur), TNF- α 100 IU/ml (Bachem) y PGE2 1 μ g/ml (Pfizer) como se describe por Jonuleit et al. 1997 (Eur J Immunol 27: 3135-3142).

Los linfocitos se purificaron a partir de la fracción 2 y 3 del producto de elutriación y se usaron como fuente de células T. Después de la descongelación, las Teff CD8+ se clasificaron en columnas LS mediante el uso de perlas magnéticas MACS CD8+ (Miltenyi Biotec). Las Treg se clasificaron como se describió anteriormente (Ahmadzadeh y Rosenberg, 2006, Blood 107: 2409-2414). Para cada experimento, la pureza de las Treg se verificó mediante citometría de flujo. Para algunos experimentos, las Treg se enriquecieron previamente mediante la separación con MACS como se describió anteriormente y se clasificaron además mediante clasificación celular en un FACS Aria III (BD Biosciences) para aislar células T CD4+ CD25^{alto} CD127^{bajo} con alta pureza (> 97 %).

55 El análisis por citometría de flujo se realizó mediante el uso de un citómetro de flujo FACS Canto o un LSR-Fortessa (ambos de BD Biosciences). Se utilizó el software FACS Diva (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star Inc.) para la adquisición y el análisis de los datos de citometría de flujo, respectivamente. La maduración de las CD se evaluó mediante el uso de los siguientes anticuerpos: anticuerpos anti-CD11c y anti-CD40 conjugados con alofocianina (APC), anticuerpos anti-CD80 y anti-CD86 conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y anticuerpos anti-CD70 y anti-CD83 conjugados con ficoeritrina (PE) (todos de BD Pharmingen). El fenotipo de las células T se evaluó mediante el uso de anticuerpos anti-CD3 conjugados con APC, anti-CD8 conjugados con PE (BD Pharmingen) y anti-CD4 conjugados con PE-cianina 7 (Cy7) (eBioscience). Las Treg se tiñeron específicamente con una combinación de anticuerpos anti-CD4 conjugados con PE-Cy7, anticuerpos anti-CD25 conjugados con PE (Miltenyi Biotec) y anticuerpos anti-CD127 conjugados con FITC (eBioscience). La expresión intranuclear de Foxp3 se evaluó mediante el uso de un anticuerpo anti-Foxp3 marcado con APC (clon PCH101, eBioscience) en combinación con un conjunto de tampón de tinción para Foxp3 (eBioscience).

Para evaluar la inducción de Treg a partir de células T CD4⁺ vírgenes, las células T CD4⁺ CD25⁻ se clasificaron a partir de la fracción de linfocitos elutriados mediante el uso del estuche CD4 Multisort (Miltenyi Biotec). La fracción CD4⁺ se marcó con microperlas anti-CD25 y se realizó una selección negativa mediante el uso de columnas de LD MACS (Miltenyi Biotec). Las células T CD4⁺ CD25⁻ se cocultivaron con CD autólogas con maduración diferencial a una relación CD: células T de 1:10, de manera que 10⁴ CD se cultivaron con 10⁵ células T en IMDM (Gibco), suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml, L-glutamina 2 mM, aminoácidos (Cambrex), suero AB al 1 % e IL-2 25 U/ml (Chiron) denominado como medio completo de células T. La inducción de Treg se evaluó mediante citometría de flujo después de una semana, donde las Treg se definieron como células CD4⁺ CD25^{alto}CD127⁻Foxp3^{alto}. Estos experimentos se repitieron en un ambiente alogénico mediante el uso de una configuración similar.

Para evaluar el efecto de las Treg sobre la proliferación de células T CD8⁺ vírgenes, las células T CD8⁺ clasificadas se lavaron y resuspendieron en PBS (Lonza) a una densidad celular de 2×10^6 células/ml, después de lo cual se añadió un volumen igual de una solución de succinimidil éster de carboxifluoresceína 0,6 µM (CFSE) (Molecular Probes) para alcanzar una concentración final de 0,3 µM de CFSE. Las CD activadas se trataron como se describió anteriormente y después se cocultivaron con células T CD8⁺ marcadas con CFSE en una relación de 1:10 en medio completo de células T. La fracción CD8 se utilizó como una fuente de Treg CD4⁺ CD25^{alto}. Las Treg se añadieron inmediatamente a los cultivos en una relación de células T CD8⁺:Treg de 1:1. Para la estimulación de las células T, se prepararon perlas anti-CD3 mediante el uso de Dynabeads activadas con tosilo (Invitrogen) y anticuerpo anti-CD3 (clon OKT-3, preparado en el laboratorio). Las perlas se usaron en una relación de perlas:células T CD8⁺ de 1:1. Los cultivos consistieron en 105 células T CD8⁺ en 200 µl de medio completo de células T, mediante el uso de placas de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon). Después de 6 días de cultivo, las células T se tiñeron con CD3, CD4 y CD8, y la inhibición de la proliferación de células T CD8⁺ por las Treg se midió mediante citometría de flujo.

Para medir la supresión de células T CD8⁺ efectoras, las CD se cocultivaron con células T CD8⁺ vírgenes en medio completo de células T durante una semana, después de lo cual las CD se agotaron mediante el uso de perlas magnéticas revestidas con CD11c y una columna LD. Los linfocitos T CD8⁺ purificados se marcaron posteriormente con CFSE como se describió anteriormente. Las Treg se purificaron y cocultivaron con las células T CD8⁺ preactivadas a una relación de 1:1 en medio completo de células T. Para la estimulación de células T, se añadieron Dynabeads anti-CD3/CD28 (Invitrogen) a una relación de perlas: células T de 1:125. Seis días más tarde, el efecto de la inhibición de las Treg sobre la proliferación de células T CD8⁺ se evaluó mediante citometría de flujo.

Para estudiar la interacción entre las CD y las Treg así como su efecto posterior sobre la proliferación de células T CD8⁺, las CD maduras diferencialmente se cocultivaron con las Treg durante 48-72 horas a una relación de 1:1. Las Treg se aislaron de estos cocultivos mediante clasificación celular. Después las Treg clasificadas se añadieron a las células T CD8⁺ vírgenes, marcadas con CFSE, durante seis días en medio completo de células T en presencia de Dynabeads anti-CD3/CD28 a una relación de perlas:células T de 1:20. Después de seis días, la supresión mediada por las Treg, sobre la proliferación de células T CD8⁺ se evaluó mediante citometría de flujo. En una segunda configuración, las CD se cocultivaron con Treg durante cinco días. Como control, las CD se cocultivaron con células T CD4⁺ CD25⁻ vírgenes. La expresión intranuclear de Foxp3, T-bet y GATA3 se evaluó mediante el uso de anticuerpos anti-Foxp3 conjugados con APC o anticuerpos anti-T-bet conjugados con AlexaFluor647 respectivamente (ambos de eBioscience). Los sobrenadantes de estos cocultivos se evaluaron para TNF-α, IL-5, IL-13, IL-17, IL-2 e IL-10, en un lector Bio-Plex 200 System Luminex mediante el uso de un conjunto de perlas de 7-plex especialmente diseñado (BioRad) según las instrucciones del fabricante. La secreción de IFN-γ se midió mediante ELISA (Thermo Scientific).

Resultados:

En primer lugar se demostró que no hubo diferencias en el grado de inducción de Treg a partir de las células CD4⁺ CD25⁻T para los diferentes estímulos de maduración de las CD.

En segundo lugar, se demostró que las CD con TriMix pueden aliviar en parte la inhibición de las células T CD8⁺ por parte de las Treg (véase la Figura 21). Cabe señalar que el efecto cuando se utilizan CD con DiMix, maduras con CD40L y caTLR4 solamente, es mucho menos pronunciado.

En tercer lugar, se observó que las células T CD8⁺ que se habían precultivado con CD con TriMix, estaban parcialmente protegidas contra la supresión posterior por las Treg (véase la Figura 22). De nuevo, el efecto es mucho más pronunciado con el uso de las CD con TriMix.

Finalmente, se demostró que las Treg cocultivadas en presencia de CD con TriMix perdieron parcialmente su capacidad supresora. Este hallazgo se asoció con una disminución en la expresión de CD27 y CD25 en las Treg, así como un aumento en la expresión de T-bet y la secreción de IFN-γ, TNF-α e IL-10, lo que sugiere un desplazamiento del fenotipo de Treg hacia un fenotipo T helper 1 (Th1) (ver la Figura 23 para la expresión de CD27). Para confirmar esto, las CD con maduración diferencial se cocultivaron con Treg durante cinco días, después de lo cual estas Treg se analizaron para la expresión de los marcadores de Treg. Las células se tiñeron para el factor de transcripción de Th1 T-bet. Se observó un aumento en la expresión de T-bet para las Treg incubadas con CD-DiMix y TriMix pero no para las otras condiciones (Figura 24A). También observamos una regulación negativa de Foxp3 en las CD con DiMix y TriMix (Figura

24B). Una de las características de las Treg es su baja secreción de citocinas en comparación con Teff. Se observó un marcado aumento de la secreción de IFN- γ y TNF- α por las Treg que se cocultivaron con CD con DiMix o TriMix (Figura 24C), lo que apunta hacia una reprogramación de las Treg hacia un fenotipo Th1.

5 En conclusión, estos datos sugieren que las CD con TriMix no sólo son capaces de contrarrestar las funciones de las Treg, sino además son capaces de reprogramar las Treg a células Th1 en determinadas circunstancias.

Ejemplo 16: La inyección intratumoral de ARNm TriMix sin antígenos cambia el ambiente tumoral e induce una respuesta inmunitaria antitumoral específica y sistémica en los sujetos.

10

Las células dendríticas (CD) son potentes inductores de respuestas inmunitarias. Muchos tumores contienen cantidades apreciables de CD infiltrantes de tumores (TIDC), pero la capacidad estimuladora de estas CD está frecuentemente comprometida (Vicari, AP et al. Semin. Cancer Biol. 2002; 12: 33-42). Estas TIDC, que pueden presentar de manera cruzada los antígenos tumorales, están pobremente activadas debido a la falta de señales de peligro y al bloqueo de su maduración por las citocinas derivadas del tumor tales como el factor de crecimiento endotelial vascular, lo que conduce a una estimulación fallida de las células T en los ganglios linfáticos que drenan el tumor (TDLN). Las TIDC tienen el potencial de ser manipuladas y por lo tanto, pueden representar una diana prometedor para la inmunoterapia del cáncer. Las células cancerosas albergan muchos péptidos mutados inmunogénicos y liberan continuamente antígenos y cuerpos apoptóticos. Esta liberación espontánea puede potenciarse mediante radioterapia, quimioterapia inmunogénica o diferentes tipos de tratamientos ablativos, como la crioblación o ablación por radiofrecuencia. Estos antígenos liberados son adquiridos por las TIDC. Los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) reconocen generalmente los epítomos antigénicos mutados (Robbins, PF et al. Nat. Medicine 2013; 19: 747-752). En un estudio reciente apareció que sólo una pequeña parte de las células T presentes en el grueso de las poblaciones de TIL de 34 individuos con melanoma reconocen los antígenos de diferenciación de melanocitos y los antígenos de la línea germinal del cáncer (Kvistborg, P. et al. Oncoimmunology 2012; 1: 409-418). Sin embargo, los TIL son suprimidos por muchos factores dentro del ambiente tumoral. El principal de estos es un subconjunto de linfocitos denominados Tregs que juegan un papel central en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica a los tejidos normales.

15

20

25

30

Por lo tanto, realizamos el siguiente experimento: Los ratones C57Bl/6 se inocularon por vía subcutánea con células tumorales (células de timoma EL-4 que expresa ovoalbúmina (E.G7-OVA)).

En una primera etapa (Figura 25A), se inyectó ARNm de control o TriMix en los nódulos tumorales cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³. Tres días más tarde, los ganglios linfáticos que drenan el tumor se resecaron y se obtuvo una suspensión de células individuales. Las células CD11c+ presentes en esta suspensión celular se enriquecieron por MACS y se cocultivaron con células T CD8+ OT-I que reconocían un epítipo derivado de la ovoalbúmina. Se analizó la inducción de proliferación de las células T y la secreción de interferón- γ por estas células T. La inducción de la proliferación y la inducción de la secreción de IFN- γ por las células T específicas para la OVA por las CD migratorias residentes en el tumor indican que las CD residentes en el tumor se han cargado con antígenos tumorales presentes en el microambiente tumoral.

35

40

A continuación, de nuevo cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³, los ratones se inyectaron por vía intravenosa con células T CD8+ OT-I que reconocían un epítipo derivado de la ovoalbúmina. Al día siguiente, se inyectó ARNm de control (tNGFR) o TriMix en los nódulos tumorales. Cinco días más tarde, los ganglios linfáticos que drenan el tumor se resecaron y se obtuvo una suspensión de células individuales. La inducción de la proliferación de células T se analizó e indica que las CD residentes en el tumor se han cargado con antígenos tumorales presentes en el microambiente tumoral y se activan para migrar a los ganglios linfáticos que drenan el tumor.

45

Finalmente, (Figura 25C) se inyectó ARNm de control o TriMix en los nódulos tumorales cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³. Cinco días más tarde, se analizó la inducción de una respuesta de células T citotóxicas específicas para la OVA. Se muestra que la administración intratumoral de ARNm TriMix induce una respuesta inmunitaria específica del antígeno tumoral

50

En estos experimentos, se muestra que la administración intratumoral de ARNm TriMix puede reprogramar las TIDC. Las TIDC engullen y traducen el ARNm administrado en proteínas funcionalmente competentes (Figura 25 A). La administración intratumoral de ARNm TriMix activa las TIDC para migrar hacia el TDLN (Figura 25 B). Estas TIDC modificadas *in situ* se convierten en activadores potentes de TIL y pueden presentar de manera cruzada los antígenos tumorales a las células T presentes en los TDLN (Figura 25 B).

55

Para analizar más a fondo el efecto de TriMix sobre el crecimiento tumoral y la supervivencia, se inocularon ratones DBA/2 por vía subcutánea con células de mastocitoma P815 en el flanco izquierdo y derecho. Posteriormente, se inyectó ARNm de control o TriMix en los nódulos tumorales de la izquierda cuando el tumor alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³. Los volúmenes tumorales se midieron en el tiempo (Figura 26).

60

En un experimento paralelo, se inocularon ratones Balb/C por vía subcutánea con células de linfoma A20 B en el flanco izquierdo y derecho. Se inyectó ARNm de control o TriMix en los nódulos tumorales de la izquierda cuando el tumor

65

alcanzó un volumen de aproximadamente 150 mm³. Los volúmenes tumorales se midieron de nuevo en el tiempo (Figura 27).

5 Como se muestra en estos modelos de tumor singénico (ver las Figuras 26 y 27) la inmunomodulación *in situ* a través de la administración de ARNm en un sitio de tumor periférico genera una respuesta inmunitaria antitumoral dentro de los sitios tumorales distantes, lo que conduce a su erradicación y aumento de la supervivencia de los sujetos. Por lo tanto, la inmunomodulación *in situ* con ARNm TriMix constituye una poderosa 'vacuna de CD *in situ*' para la cual no se necesita conocimiento previo de los antígenos tumorales.

10 Listado de secuencias

15 <110> Vrije Universiteit Brussel
 <120> Potenciación de la capacidad de las células presentadoras de antígeno humanas para estimular células T tanto *in vitro* como *in vivo* y su uso en la vacunación
 <130> VUB-038-EP2
 <150> US 13/593,393
 <151> 2012-08-23
 <160> 16
 <170> PatentIn versión 3.3

20 <210> 1
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 1
 aaaaagcttc caccatggca cgccacatc cctg 34

25 <210> 2
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 2
 cccctcgagt cagggggagc aggcagg 27

30 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 3
 gatgatccg tcatgatcga aacatacaac 30

35 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 4
 cgtaccat cagagttga gtaagcc 27

40 <210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 5
 aaaagcttc accatgccg aggagggtc 30

45 <210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 6
 aaaagcttc accatgccg aggagggtc 30

50 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 7
 aaaagcttc accatgccg aggagggtc 30

55 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 8
 aaaagcttc accatgccg aggagggtc 30

60 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 9
 aaaagcttc accatgccg aggagggtc 30

65 <210> 10
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 10
 aaaagcttc accatgccg aggagggtc 30

5 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 6
 ggggggaatt ctcaggggcg cacccac 27

10 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 7
 ggggatcctg tgctgagttt gaatcacc 30

20 <210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 8
 ggggaattctc agatagatgt tcttctg 28

30 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 9
 Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val
 35 1 5

40 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 10
 Lys Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu
 45 1 5

50 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 11
 Ala Leu Lys Asp Val Glu Glu Arg Val
 55 1 5

60 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 12
 Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val
 1 5

5
 <210> 13
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 13
 Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
 1 5

10
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 14
 Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala
 1 5

15
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sintético
 <400> 15
 Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val
 1 5

20
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 16
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5

25
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 16
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5

30
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 16
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5

35
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 16
 Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys
 1 5

Reivindicaciones

- 5 1. Una vacuna que comprende una o más moléculas de ARNm o ADN que codifican todas las proteínas inmunoestimuladoras funcionales CD40L, CD70 y caTLR4 (TLR4 constitutivamente activo) para usar en la inducción de una respuesta inmunitaria hacia un tumor en un sujeto, caracterizada porque dicha vacuna se administra a través de inyección intratumoral.
- 10 2. La vacuna para usar de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un antígeno tumoral; o moléculas de ARN o ADN que codifican dicho antígeno tumoral.
- 15 3. La vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde dichas moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras forman parte de una única molécula de ARNm o ADN; y en donde la única molécula de ARNm o ADN es capaz de expresar simultáneamente las proteínas inmunoestimuladoras.
- 20 4. La vacuna para usar de acuerdo con la reivindicación 3, en donde las moléculas de ARNm o ADN que codifican las proteínas inmunoestimuladoras se separan en la única molécula de ARNm o ADN mediante un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) o una secuencia codificante de péptido 2a de autoescisión.
- 25 5. La vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, que comprende adicionalmente moléculas de ARNm o ADN que codifican una o más de las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: IL-12p70, CCR7 y 4-1 BBL.
6. La vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5, en donde dicho ARNm está protegido por encapsulación en liposomas; protección por protaminas; composiciones lipídicas, catiónicas o policationicas; formación de liposomas en burbujas; protección con polietilenoimina (PEI); y/o protección con microburbujas cargadas de liposomas.

Figura 1A

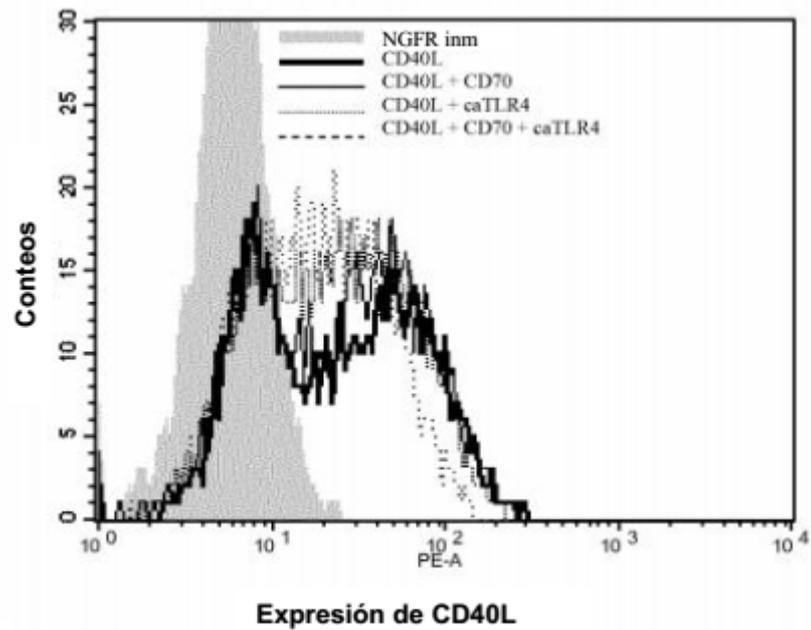


Figura 1B

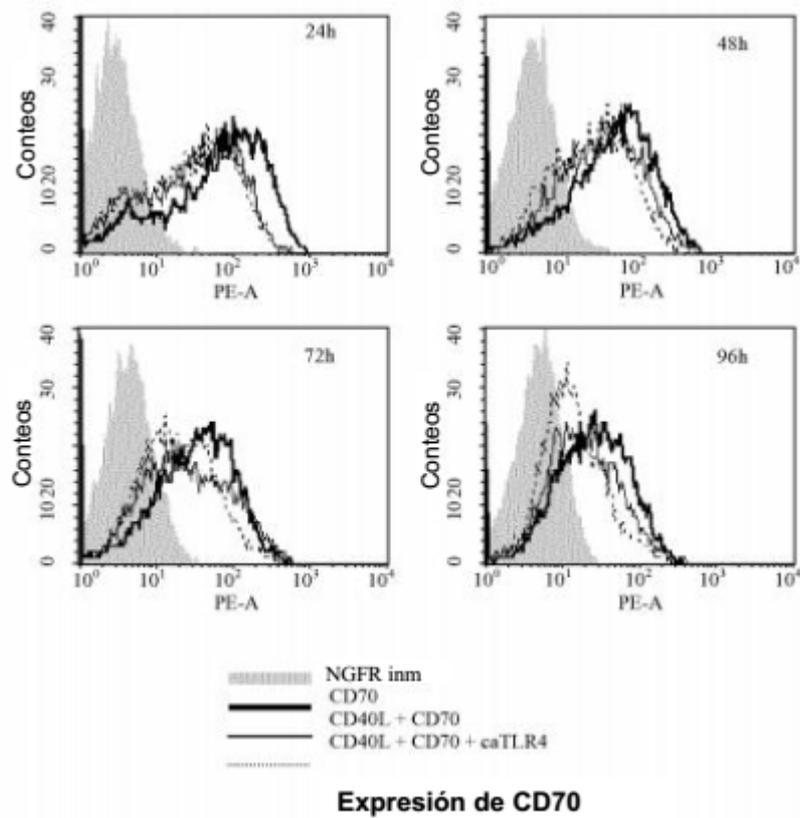


Figura 2

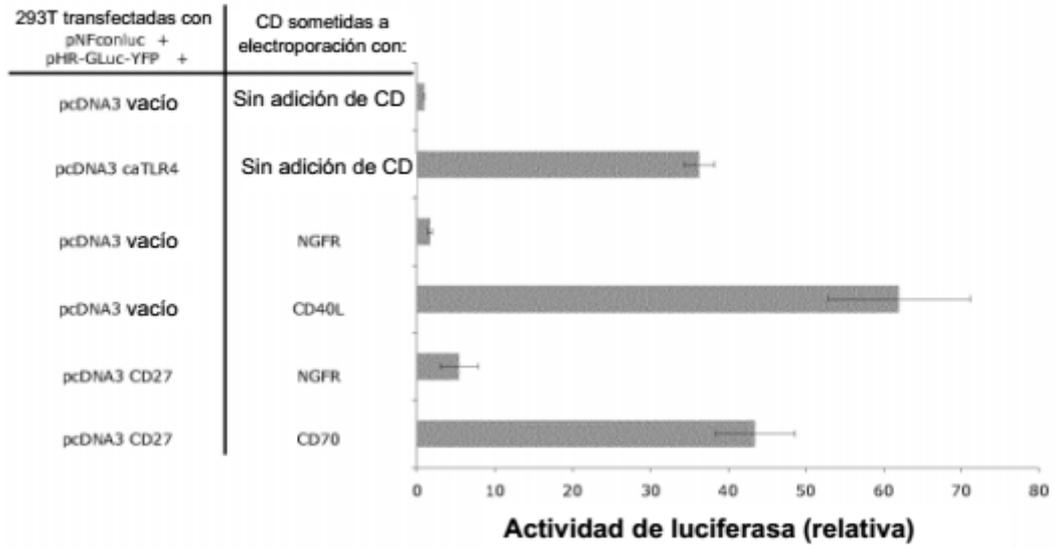


Figura 3A

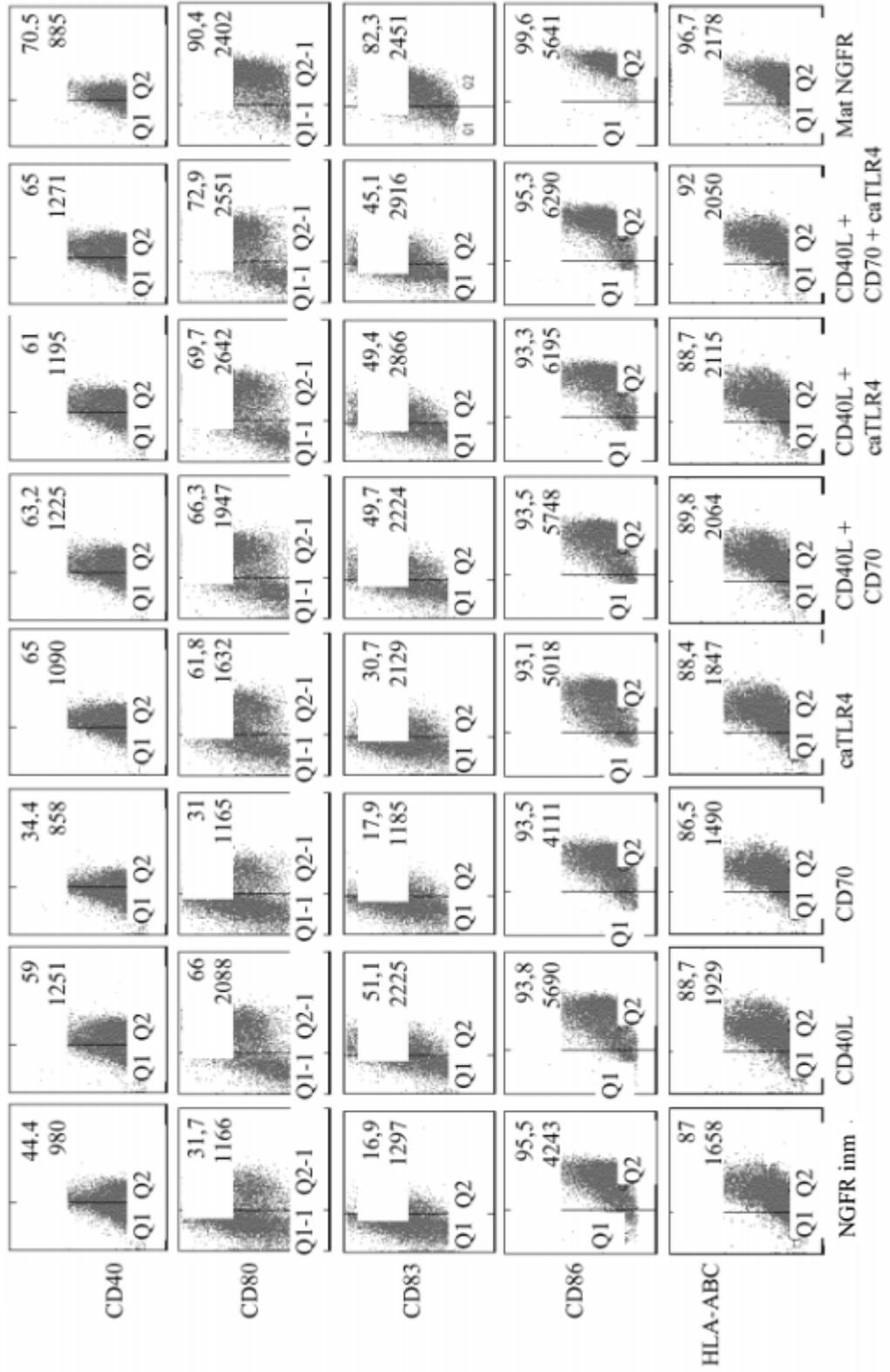


Figura 3B

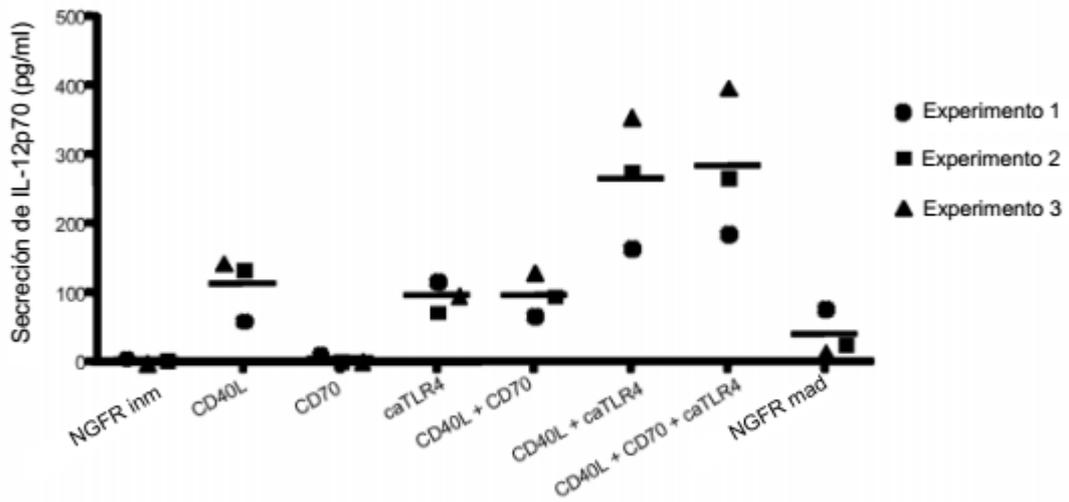


Figura 3C

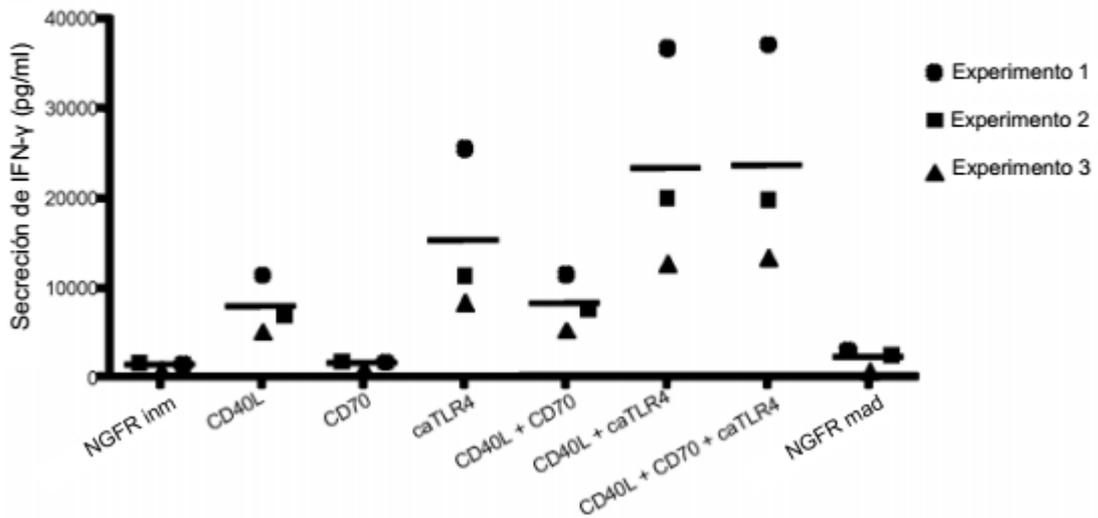


Figura 4A

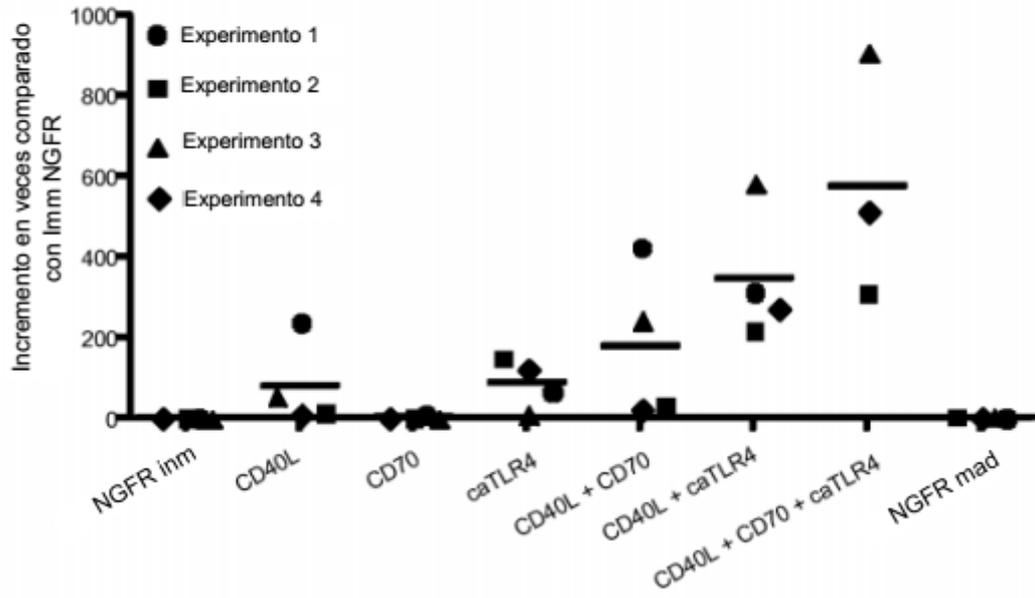


Figura 4B

Ensayo de CD107a

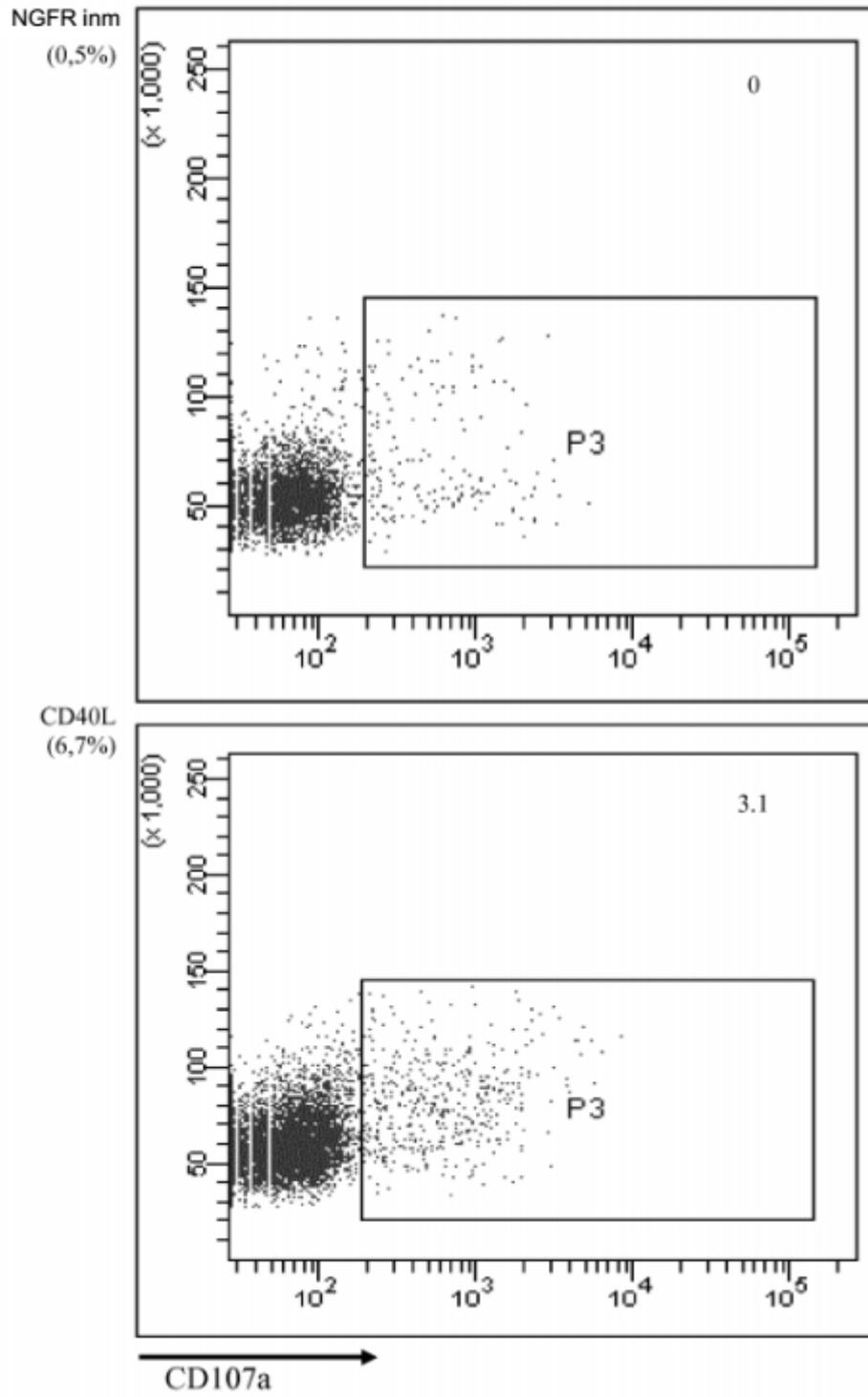


Figura 4B (continuación) Ensayo de secreción de citocinas

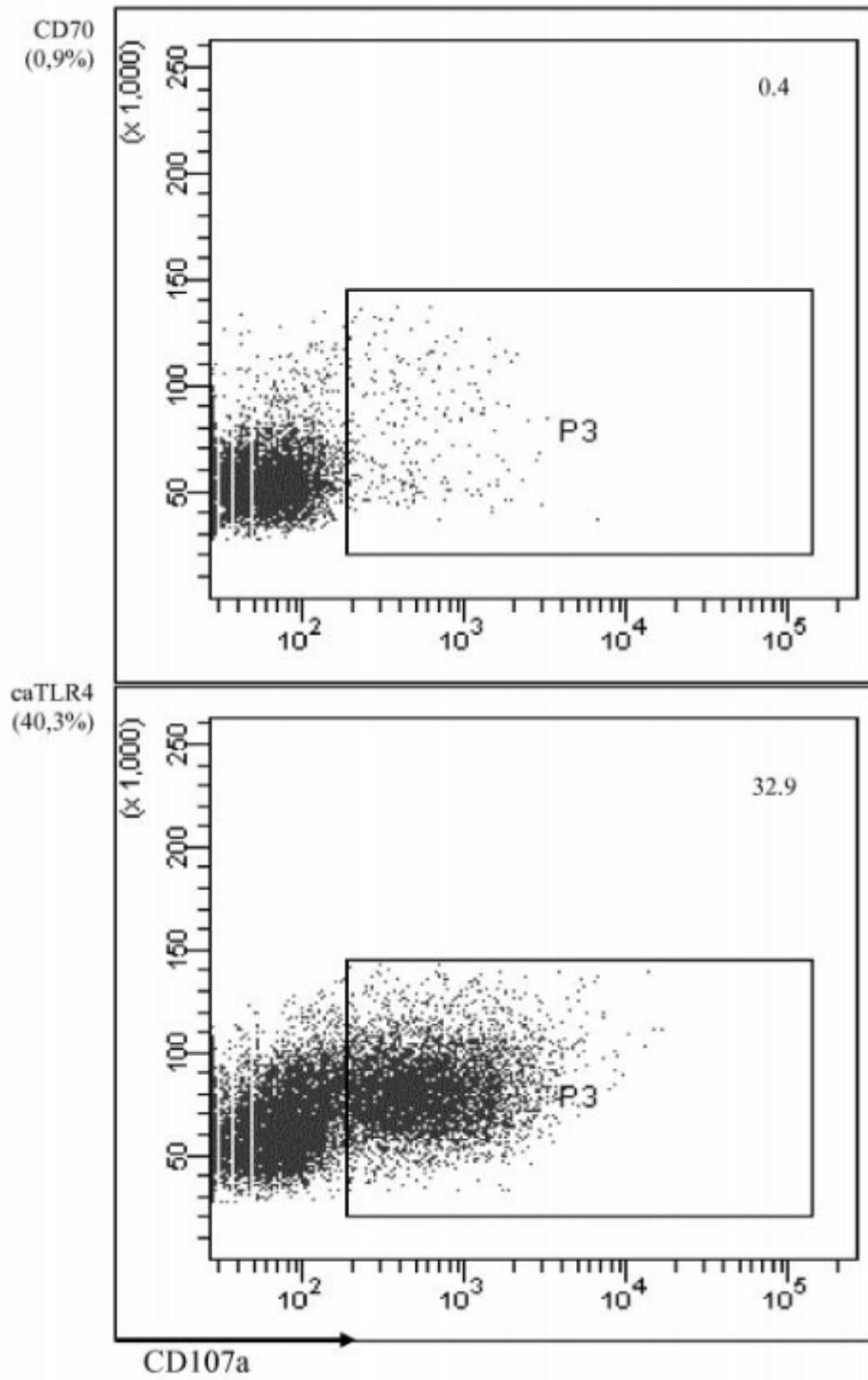


Figura 4B (continuación) Ensayo de secreción de citocinas

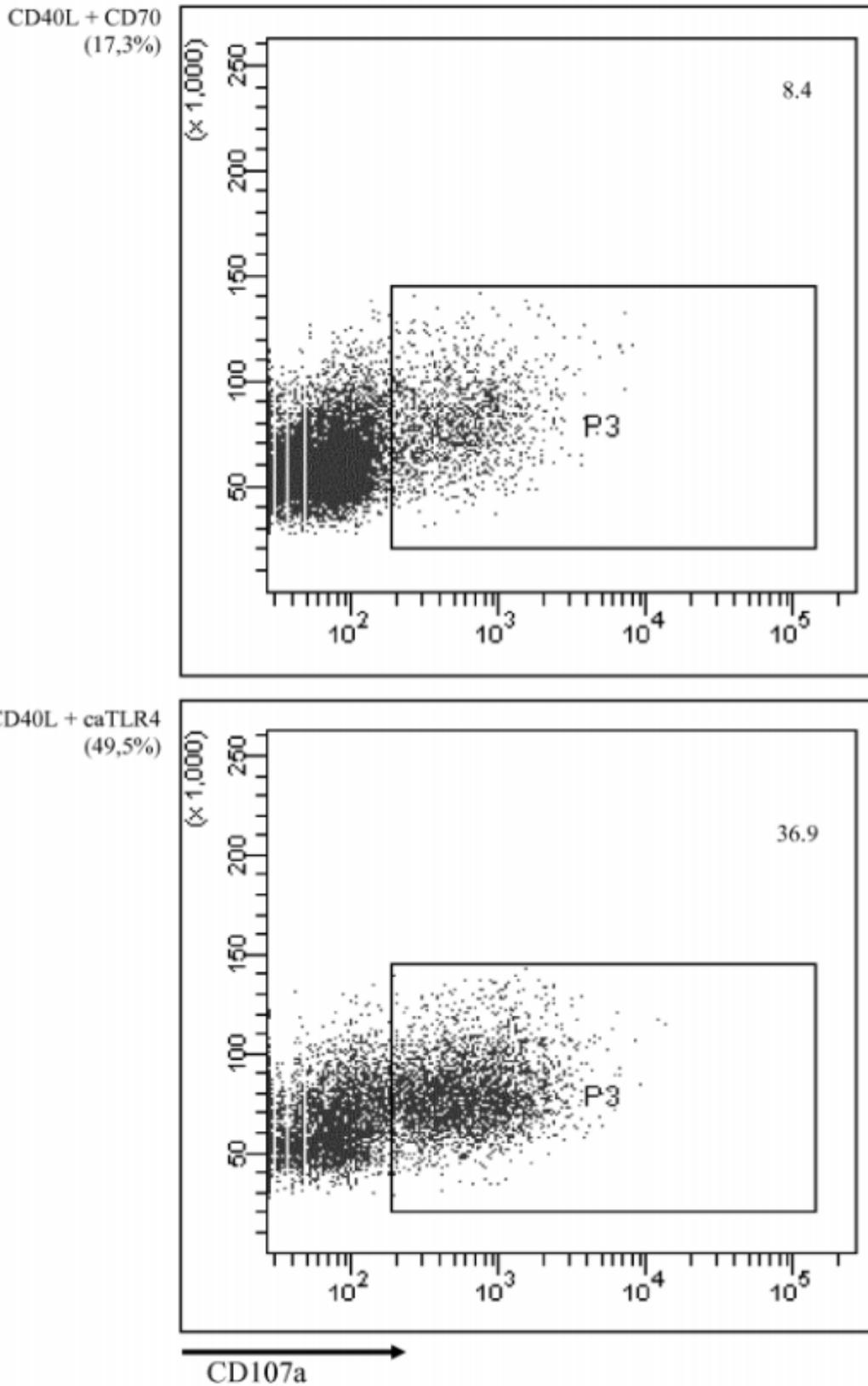


Figura 4B (continuación) Ensayo de secreción de citocinas

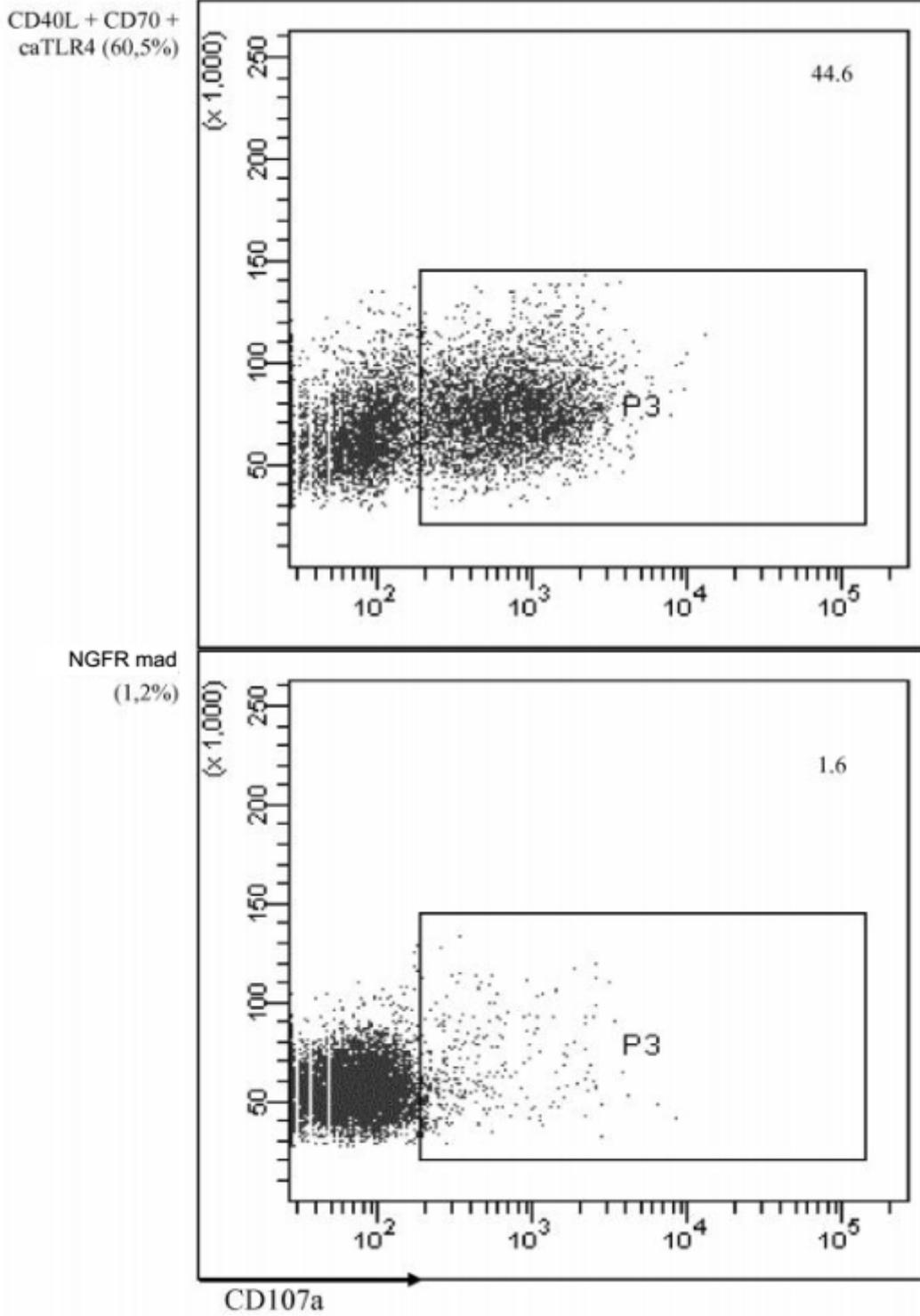


Figura 4C

Ensayo de secreción de citocinas

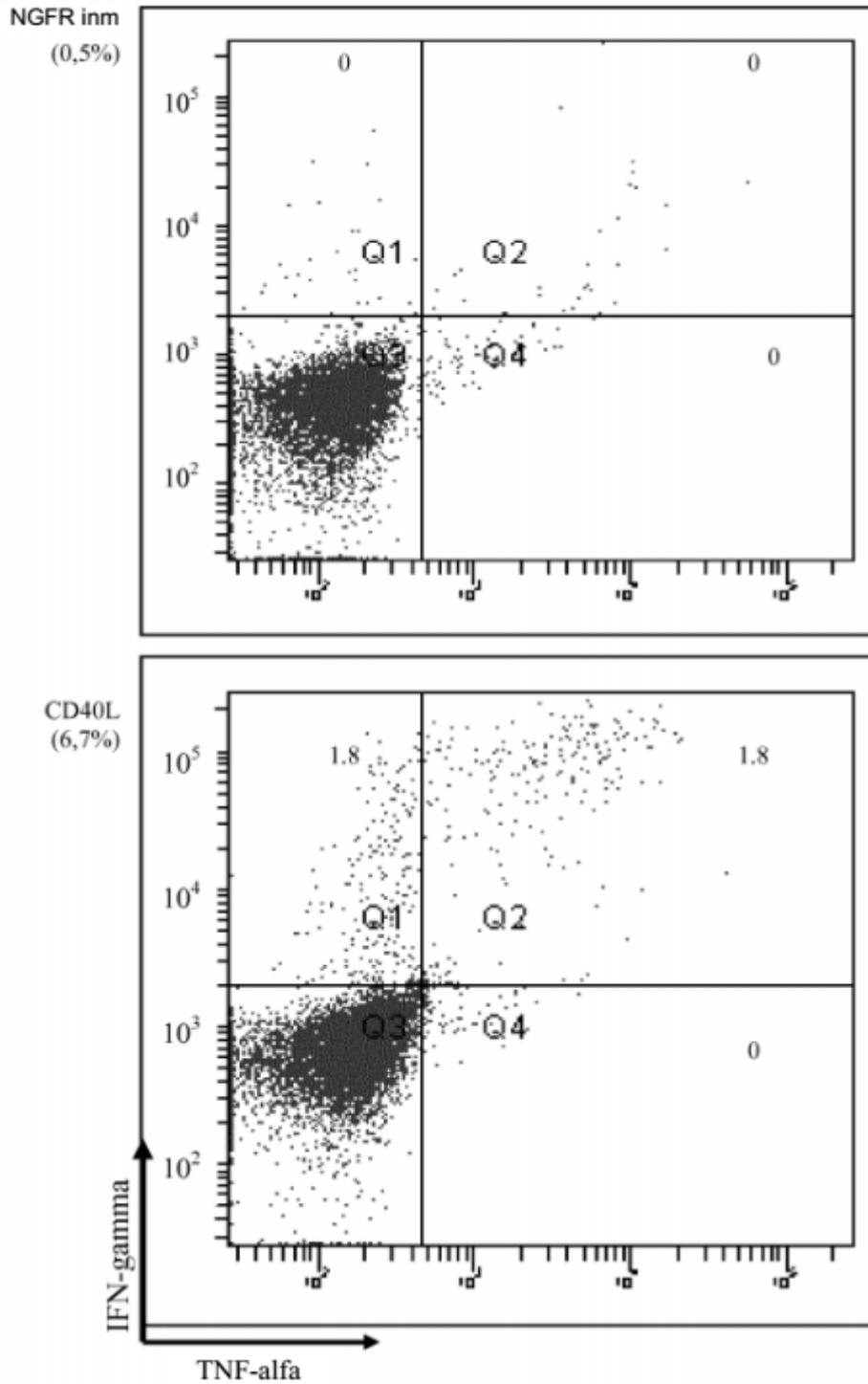


Figura 4C (continuación) Ensayo de secreción de citocinas

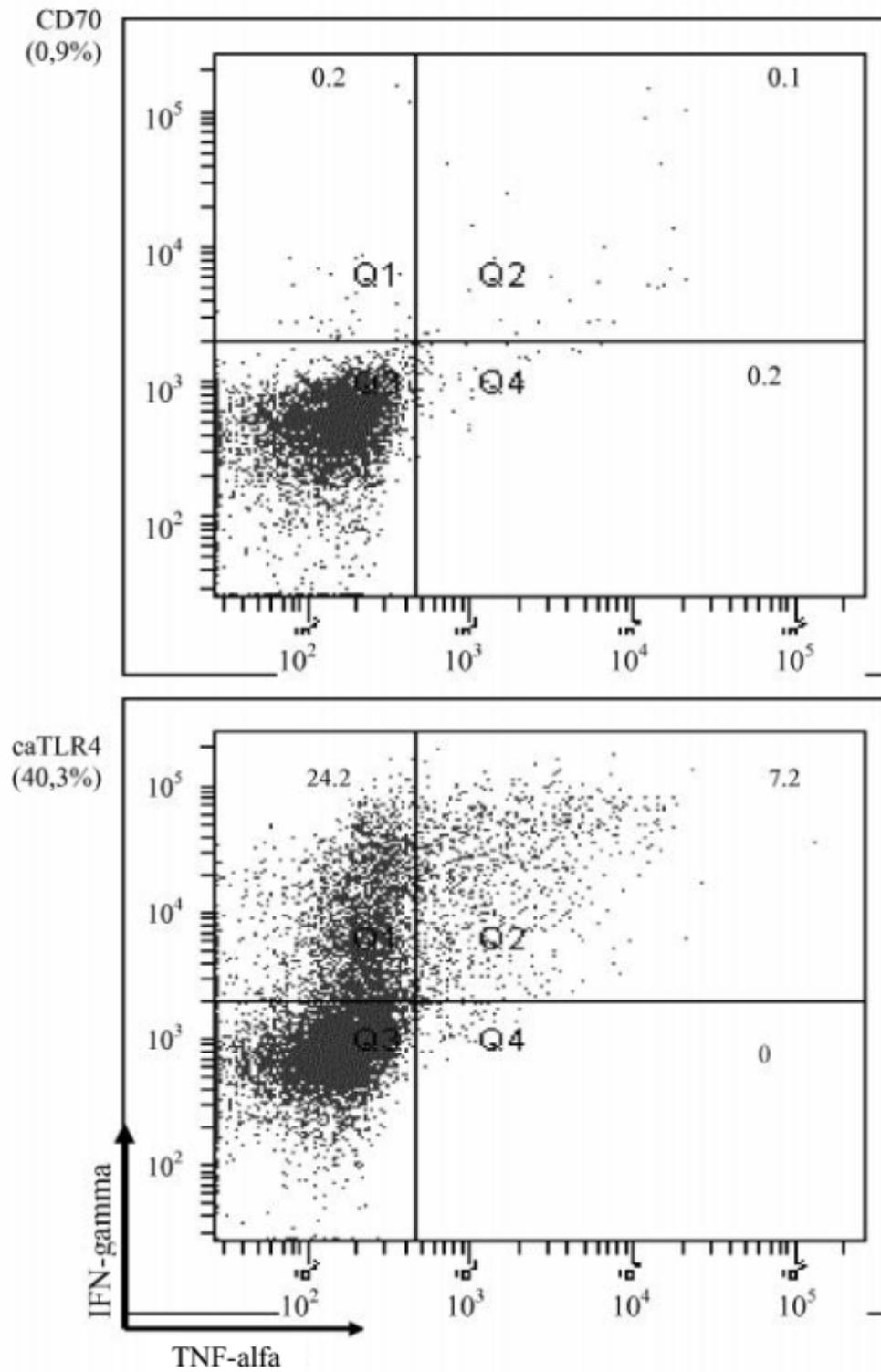


Figura 4C (continuación) Ensayo de secreción de citocinas

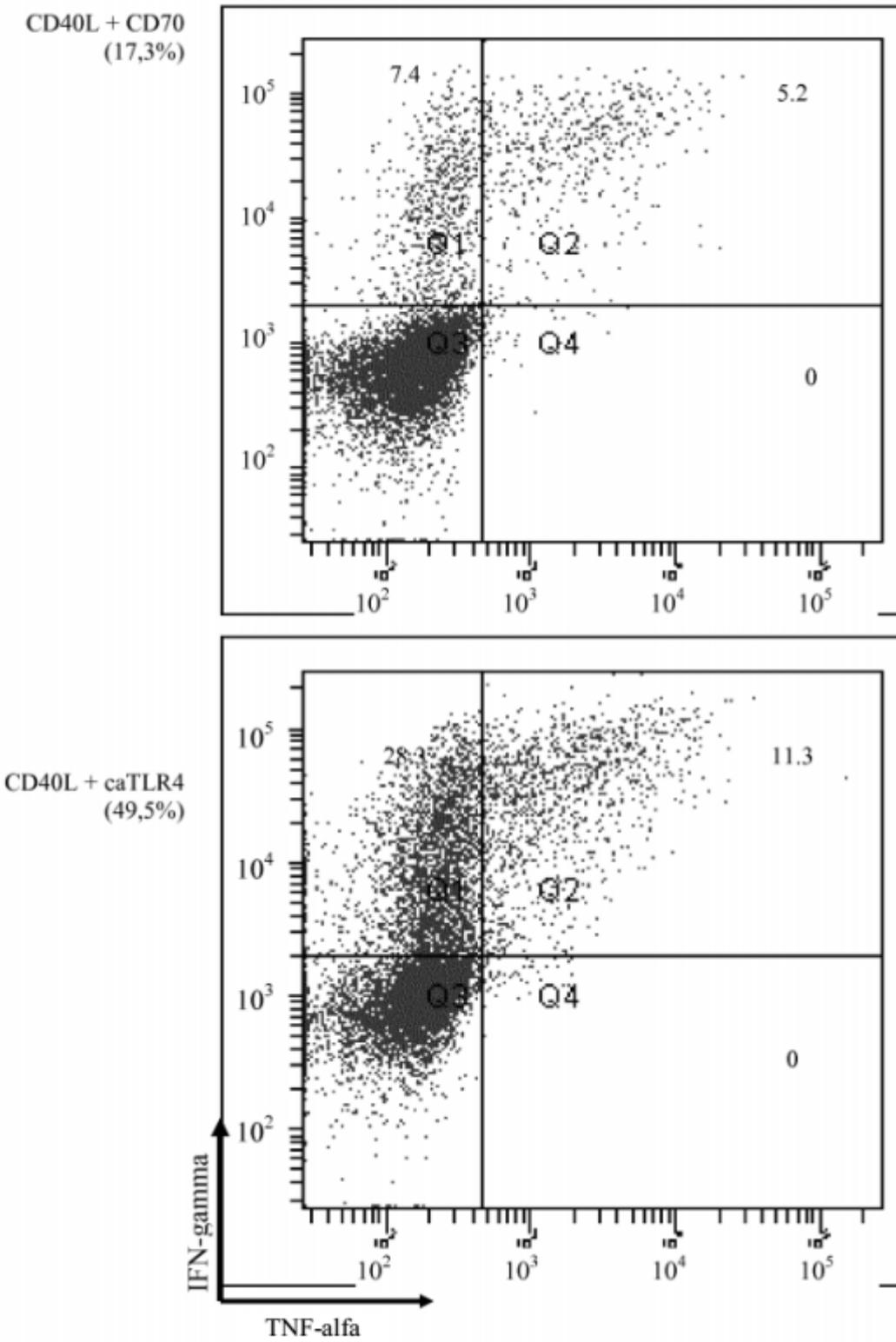


Figura 4C (continuación)

Ensayo de secreción de citocinas

CD40L + CD70 +
caTLR4 (60,5%)

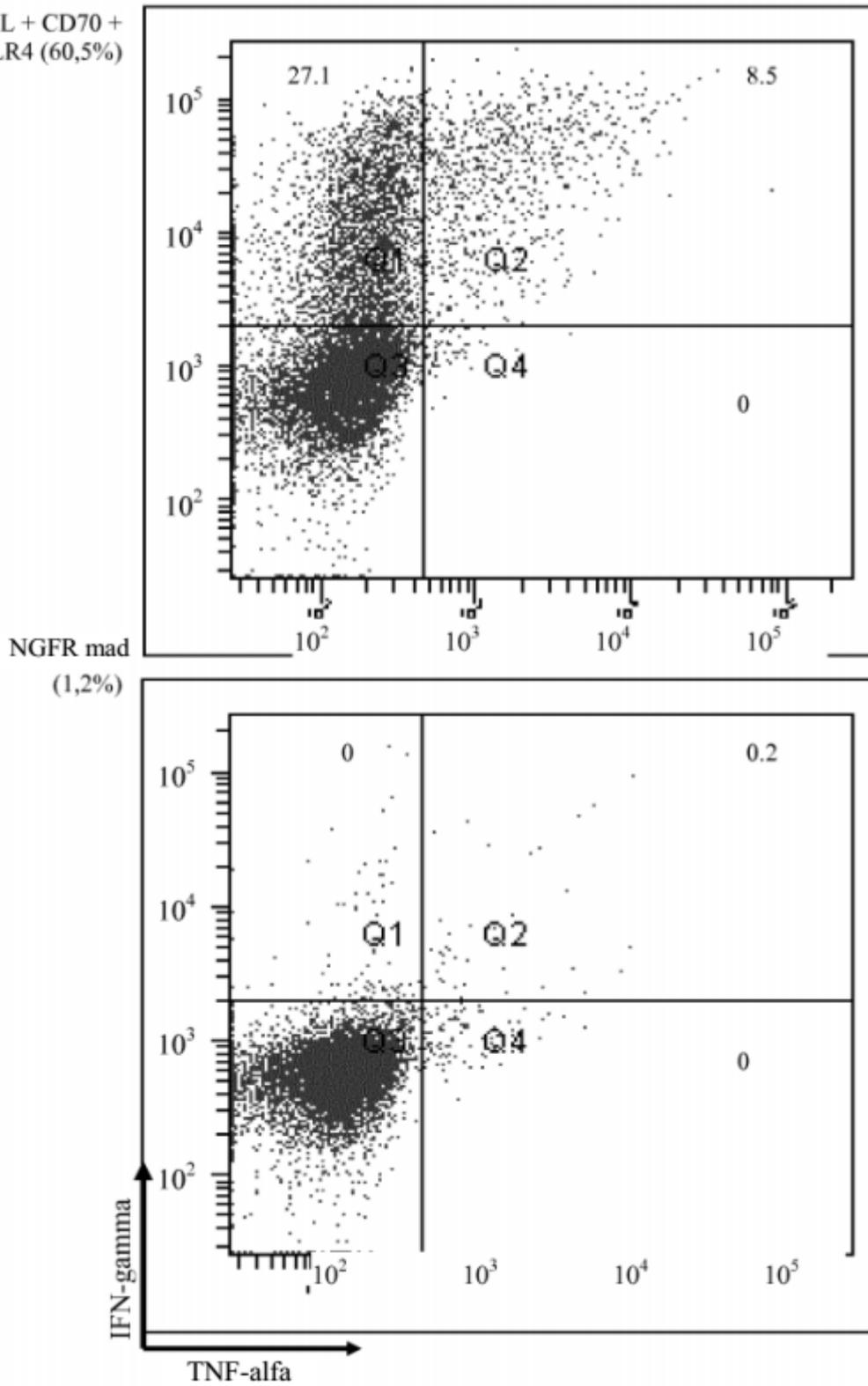


Figura 4D

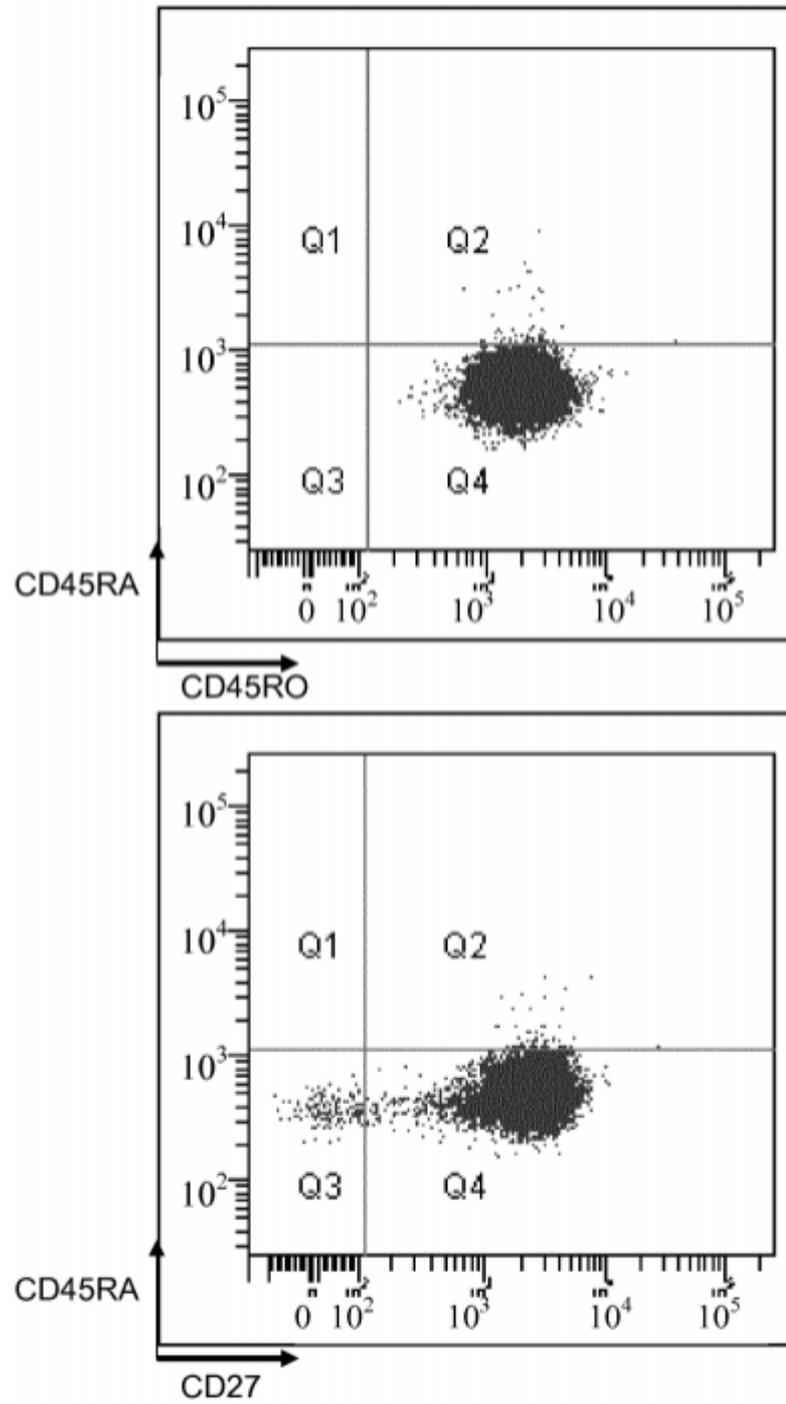


Figura 4D (continuación)

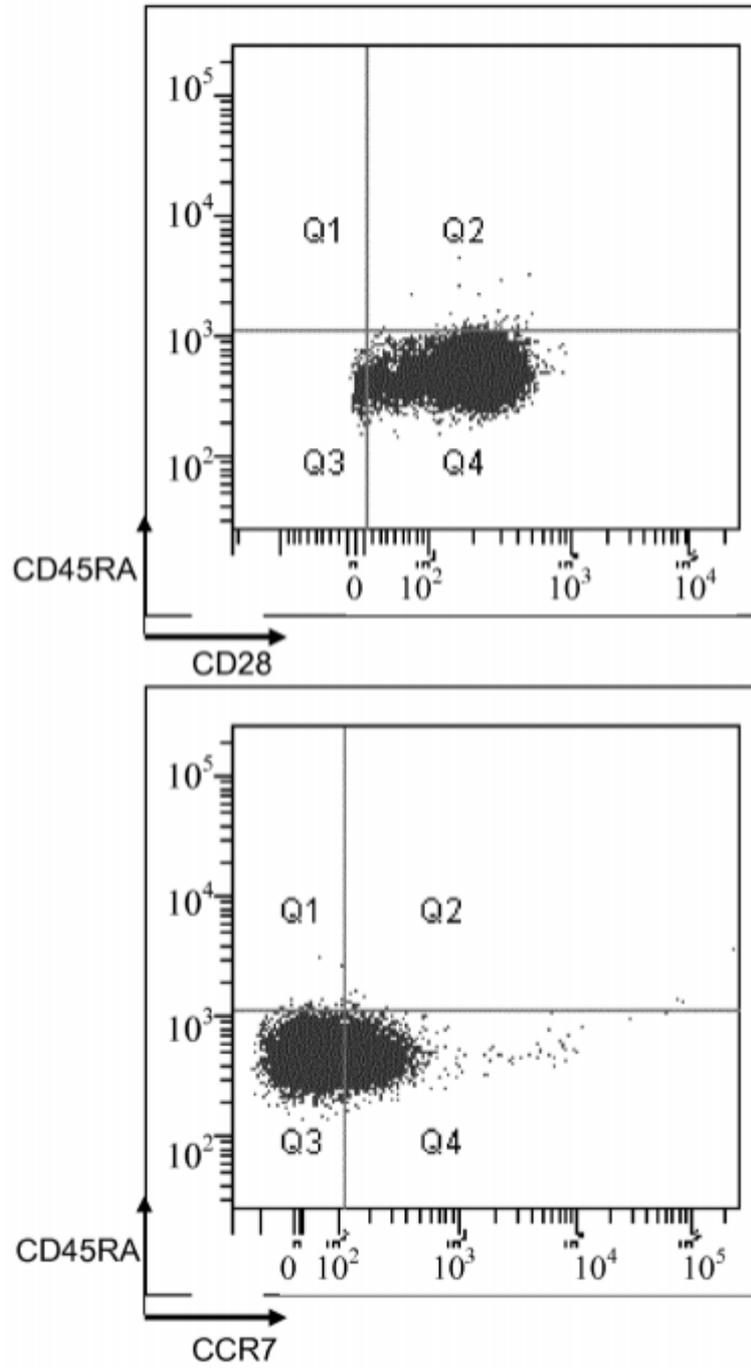


Figura 4D (continuación)

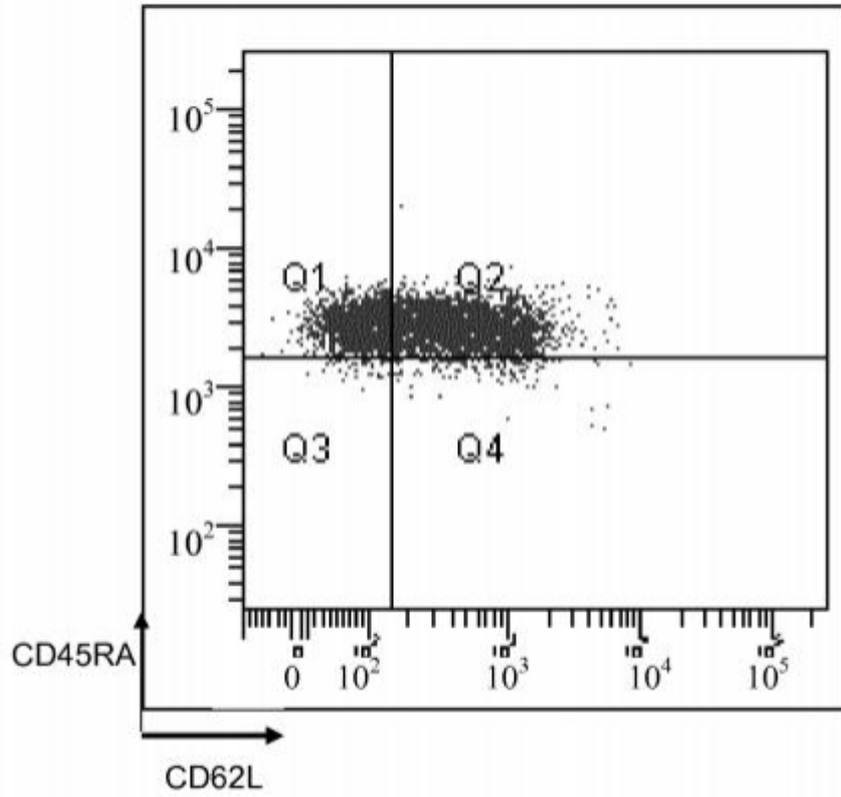


Figura 5A

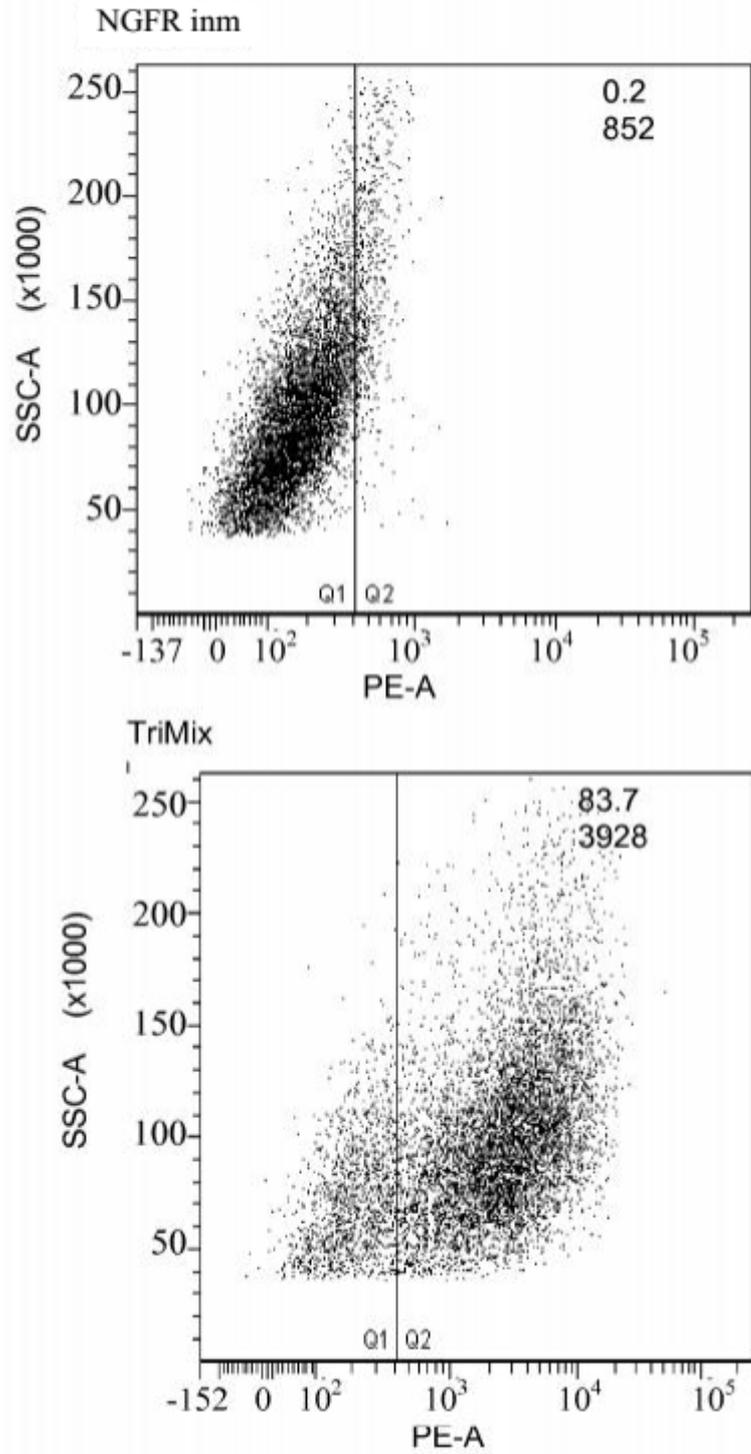


Figura 5A (continuación)

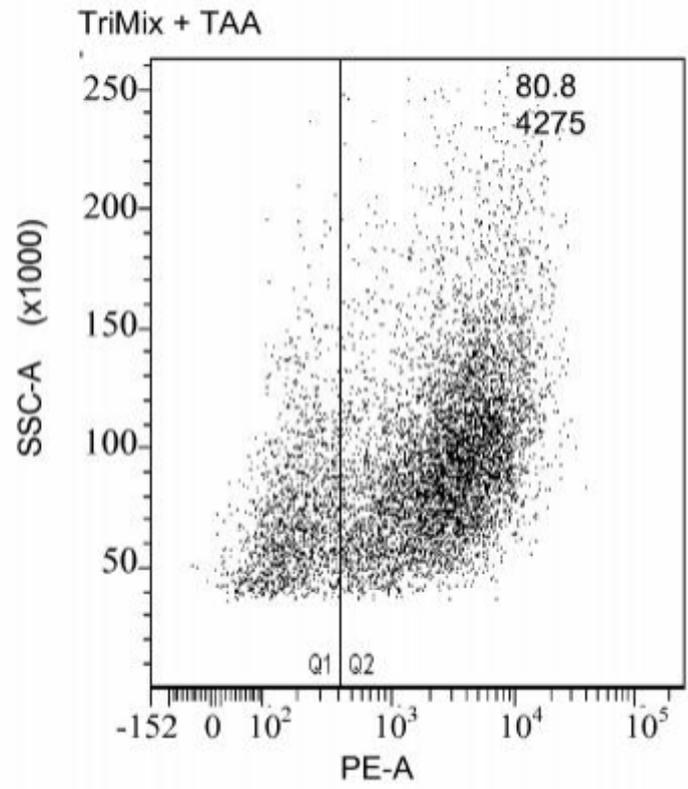


Figura 5B

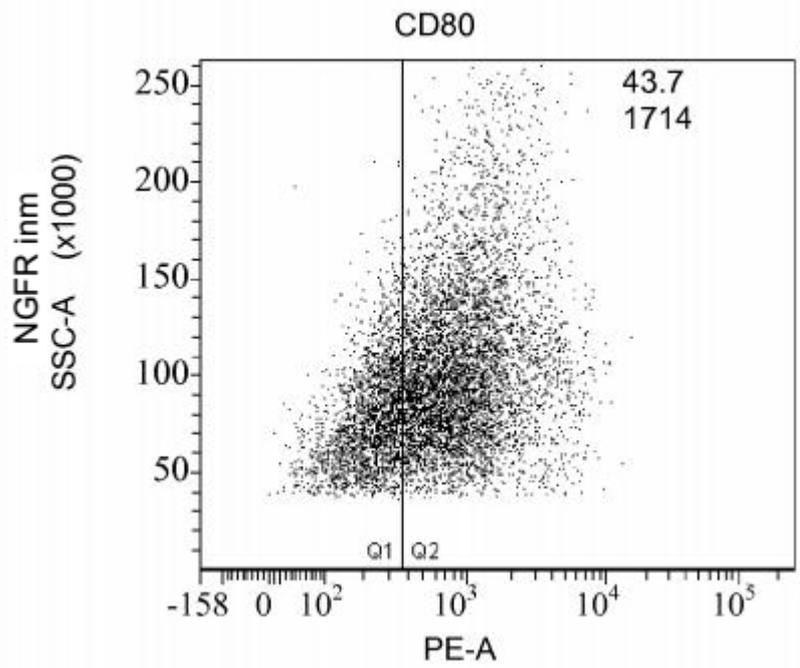
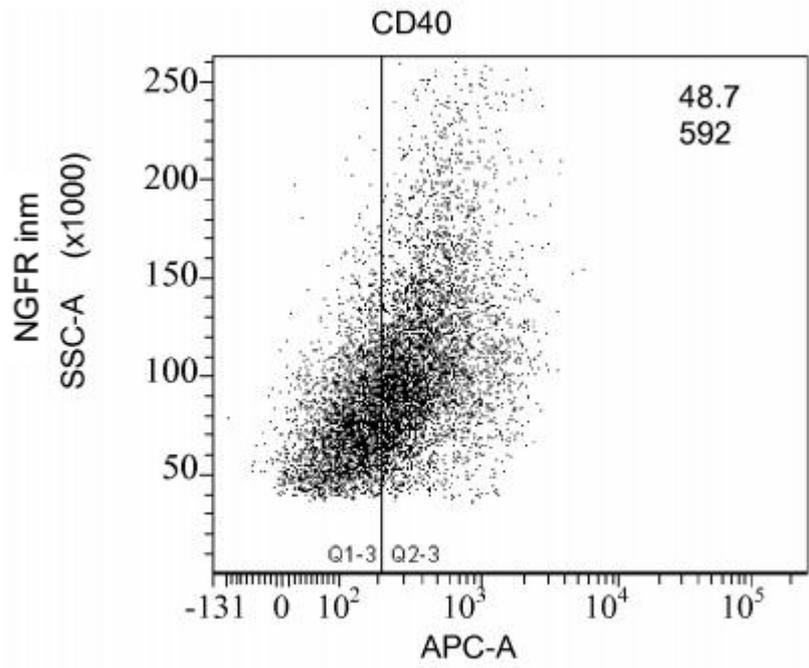


Figura 5B (continuación)

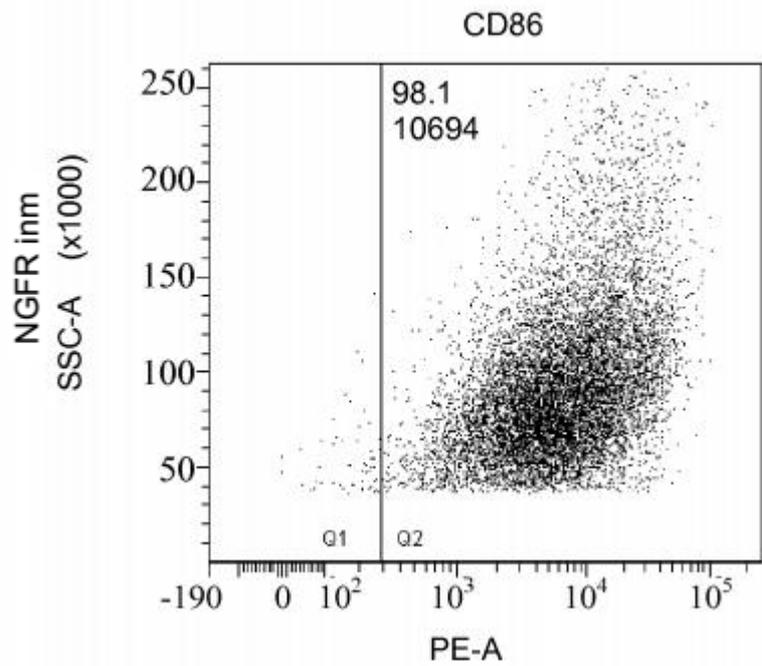
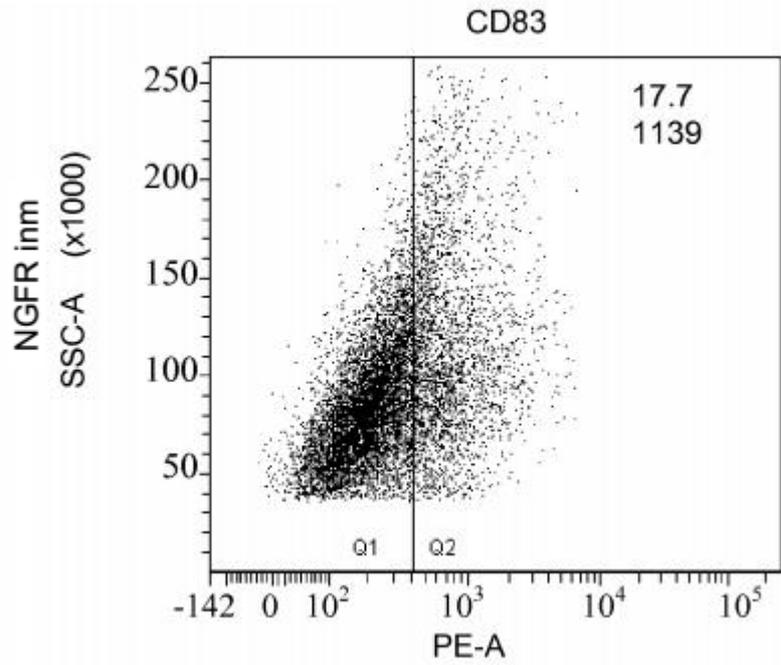


Figura 5B (continuación)

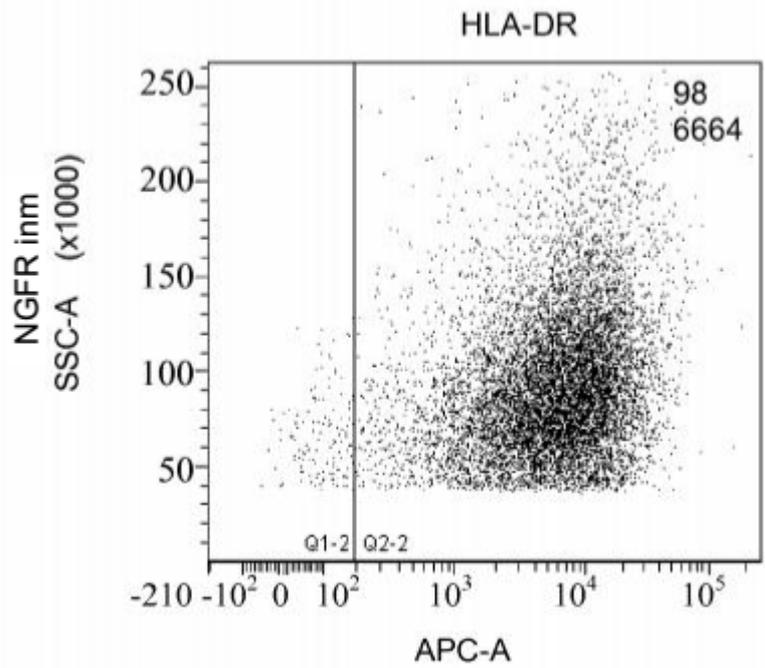
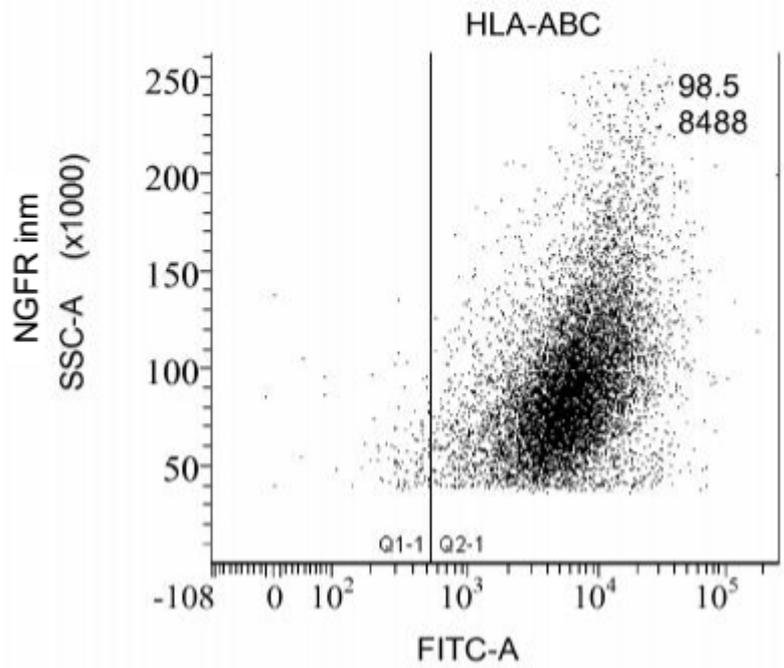


Figura 5B (continuación)

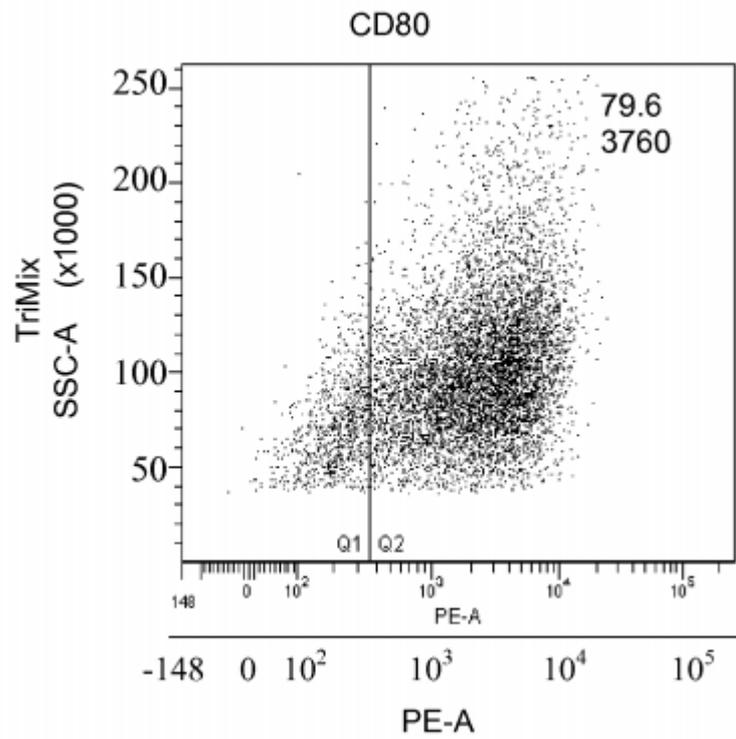
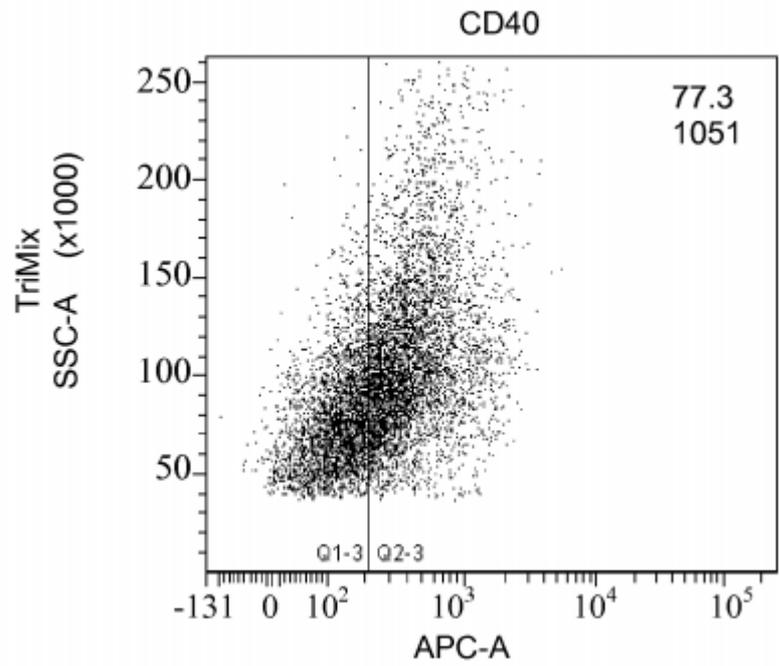


Figura 5B (continuación)

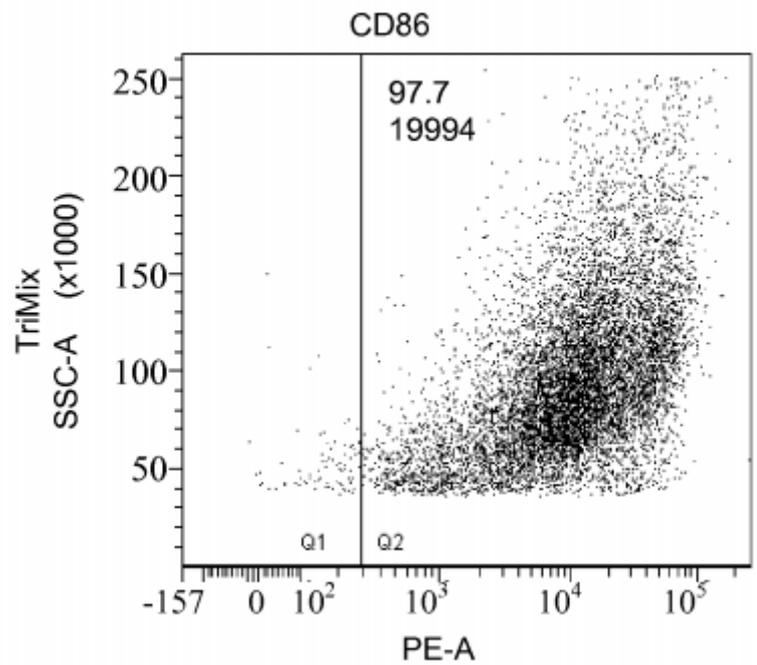
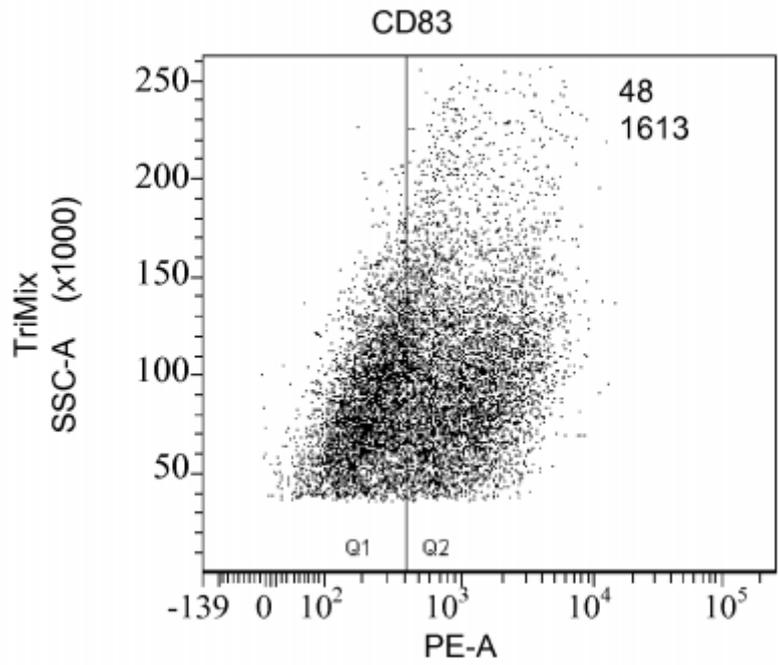


Figura 5B (continuación)

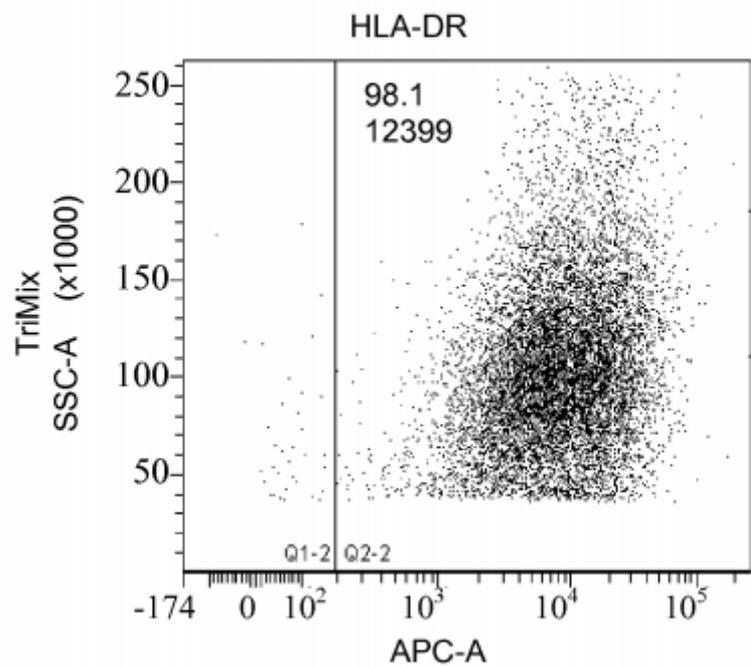
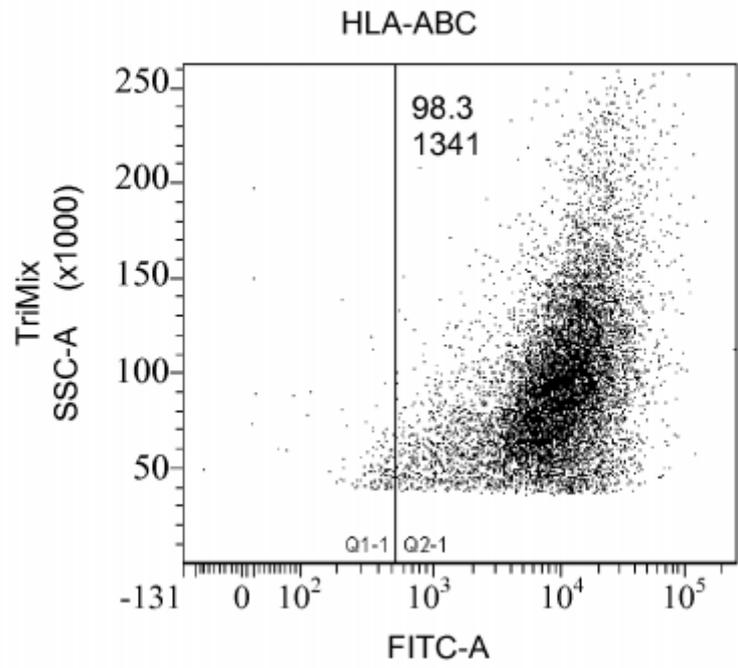


Figura 5B (continuación)

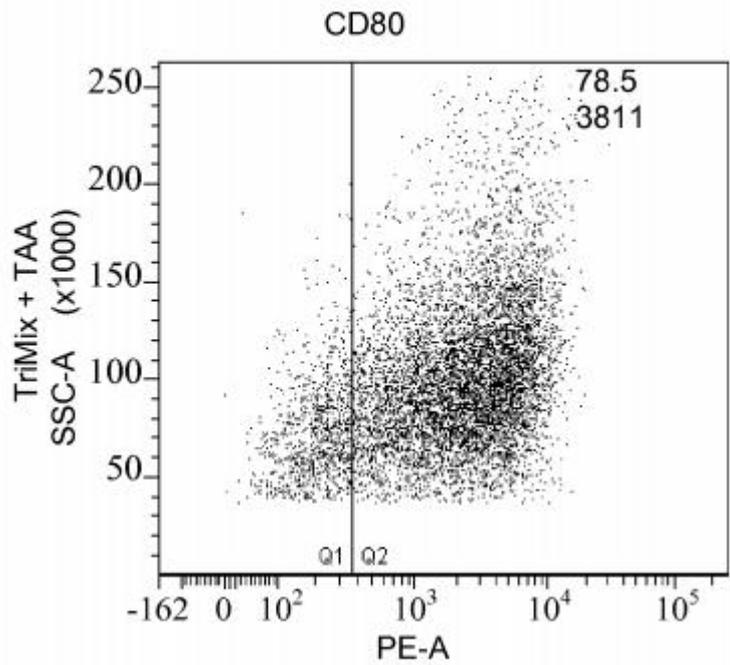
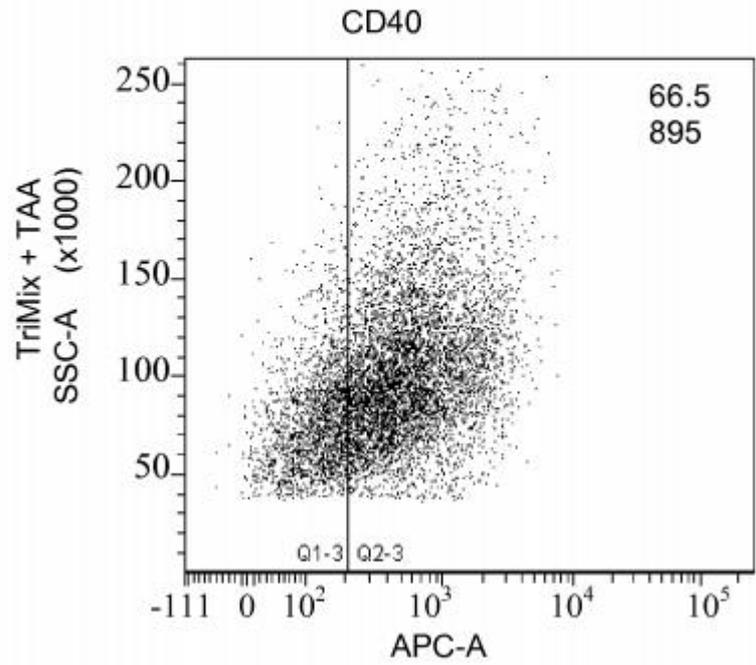


Figura 5B (continuación)

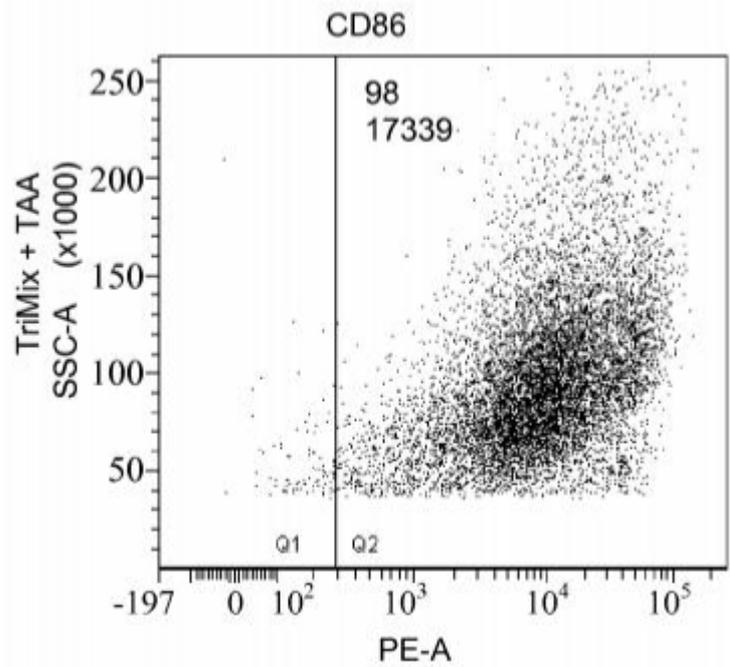
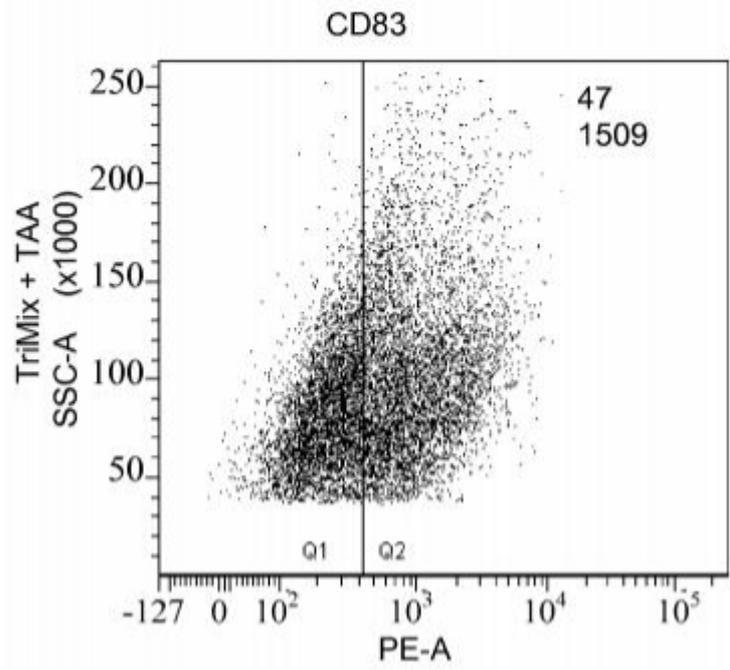


Figura 5B (continuación)

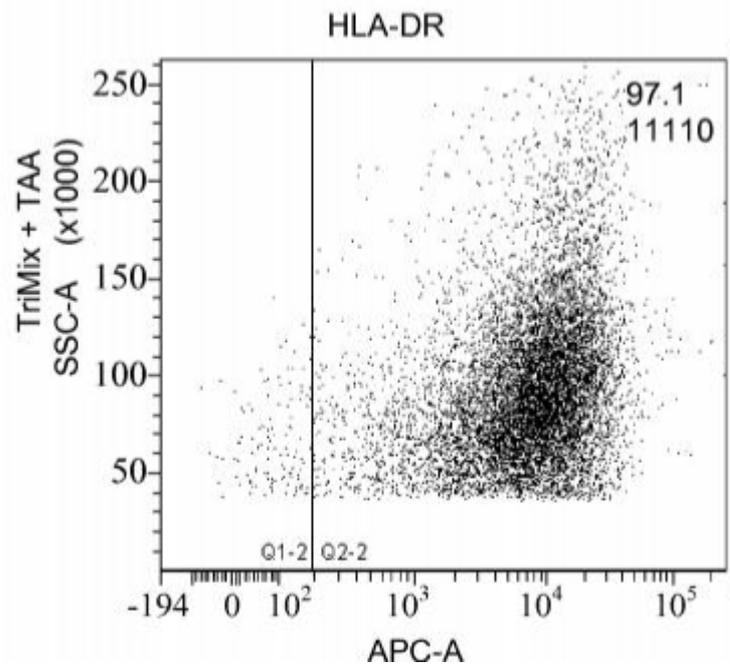
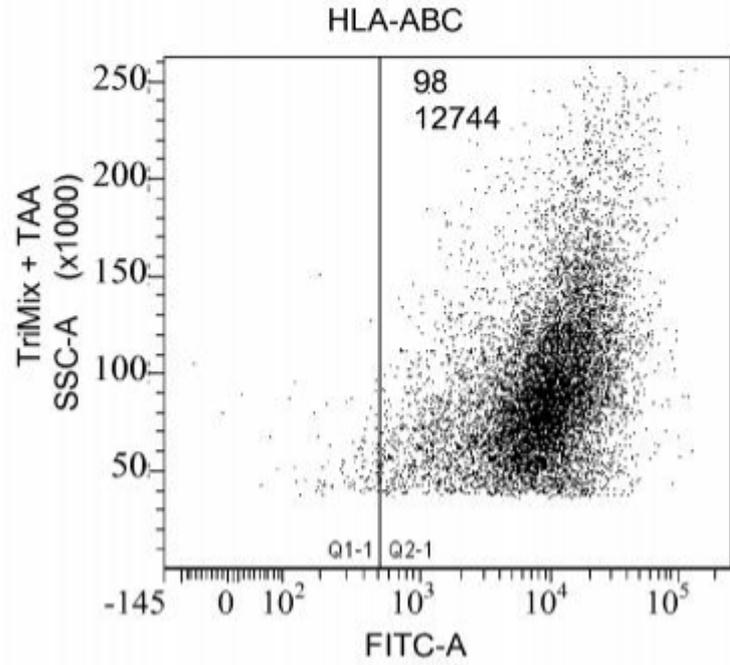


Figura 5B (continuación)

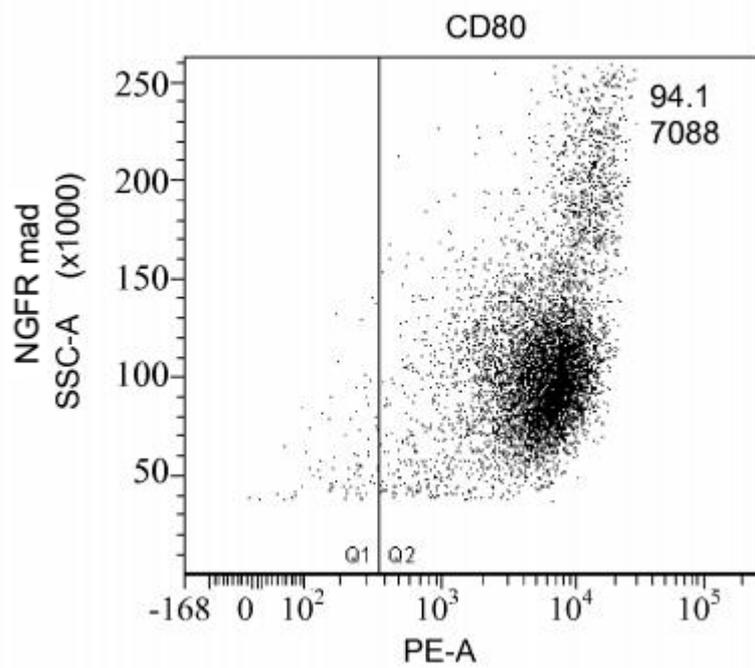
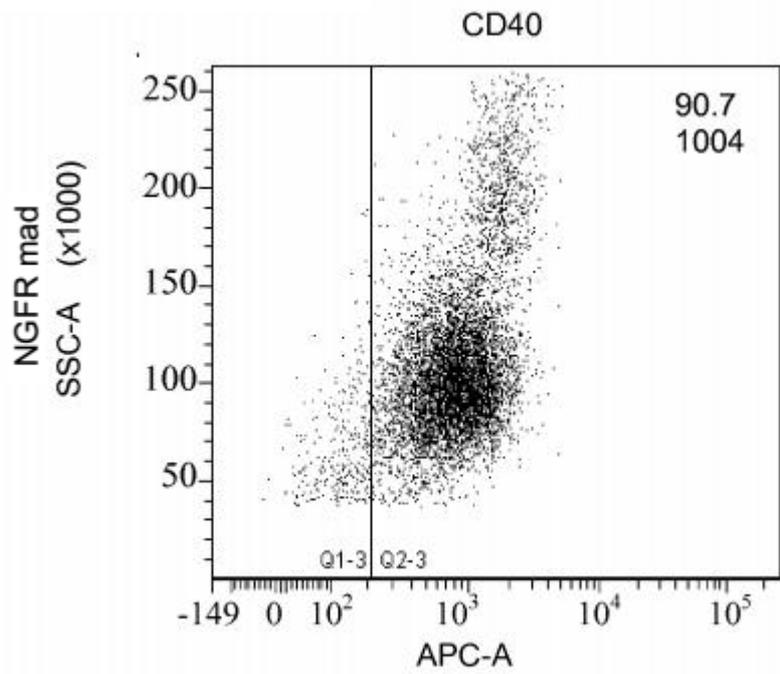


Figura 5B (continuación)

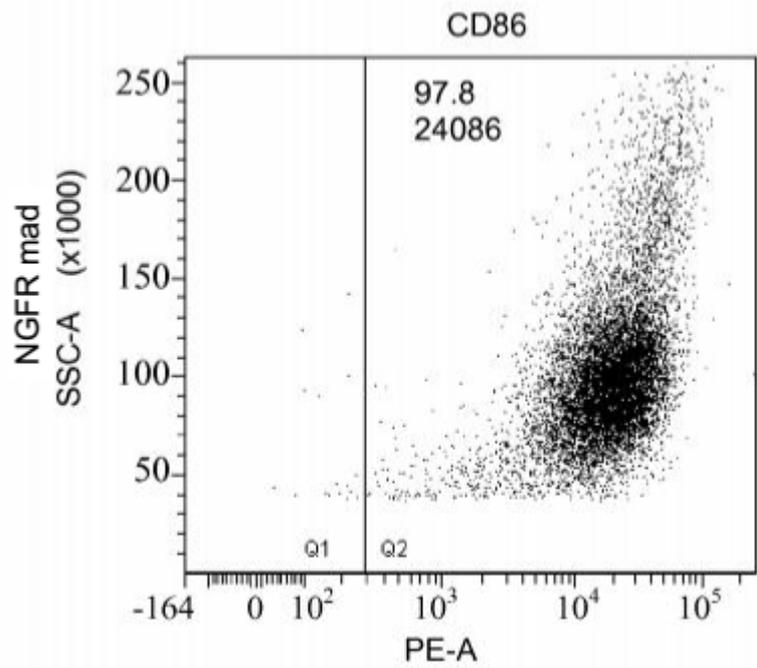
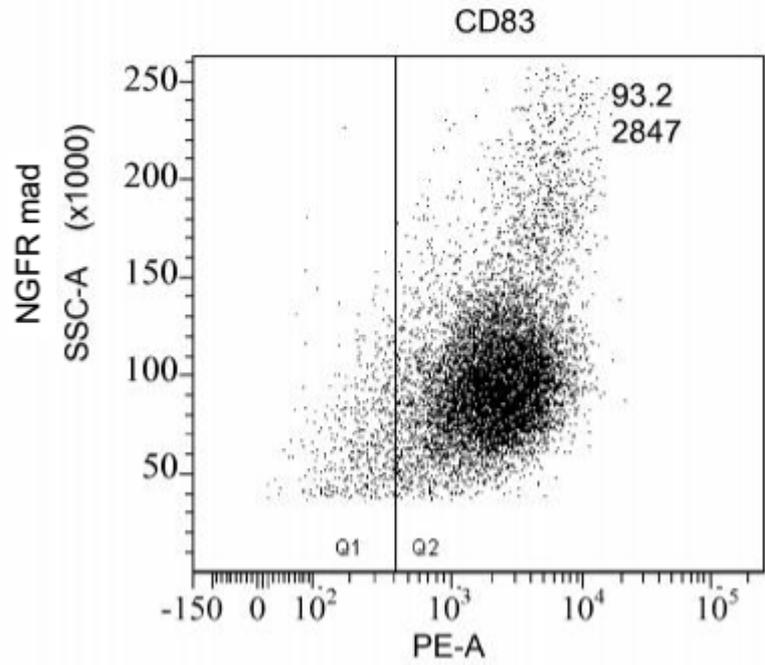


Figura 5B (continuación)

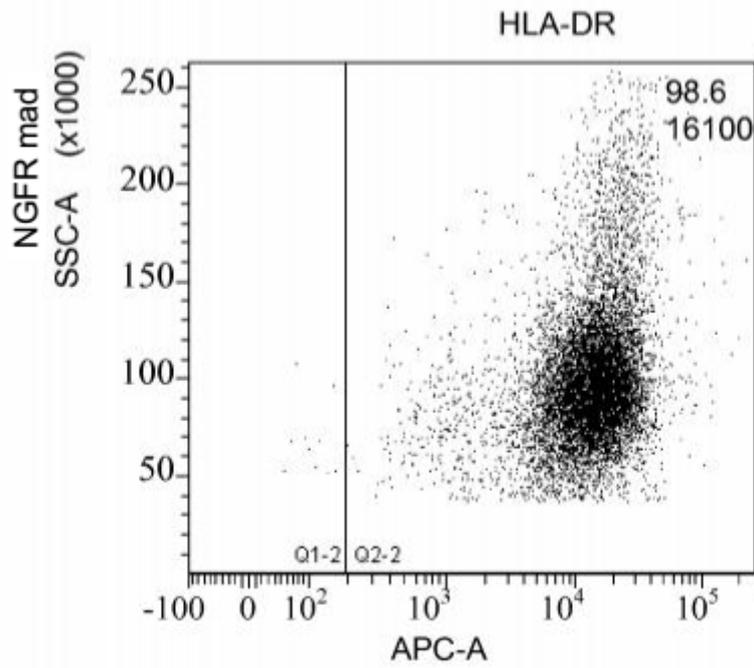
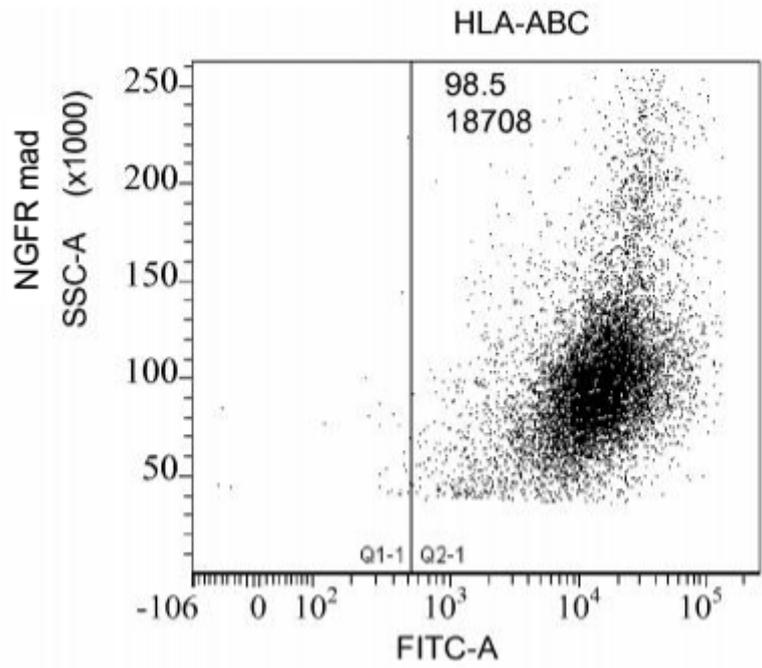


Figura 5C

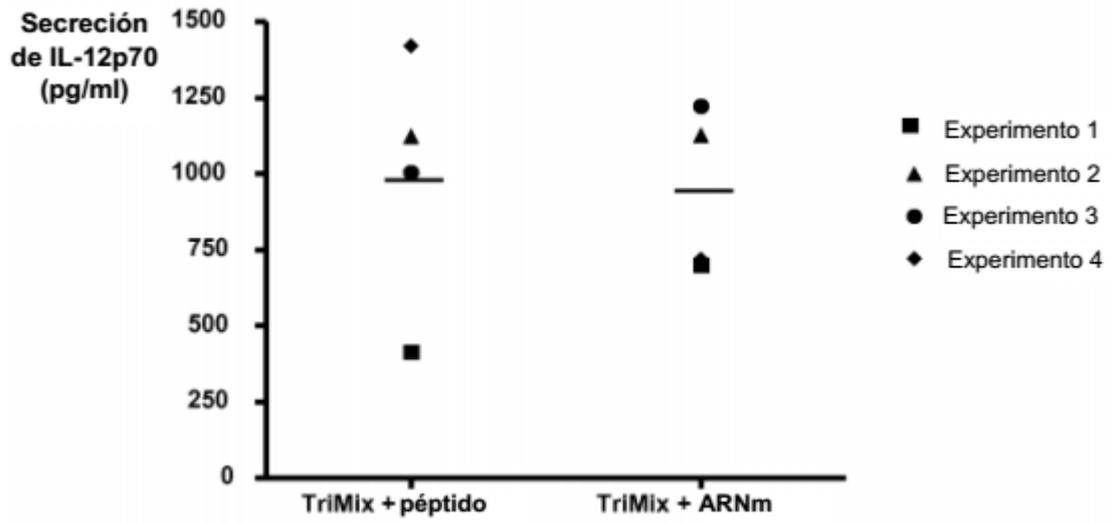


Figura 6A

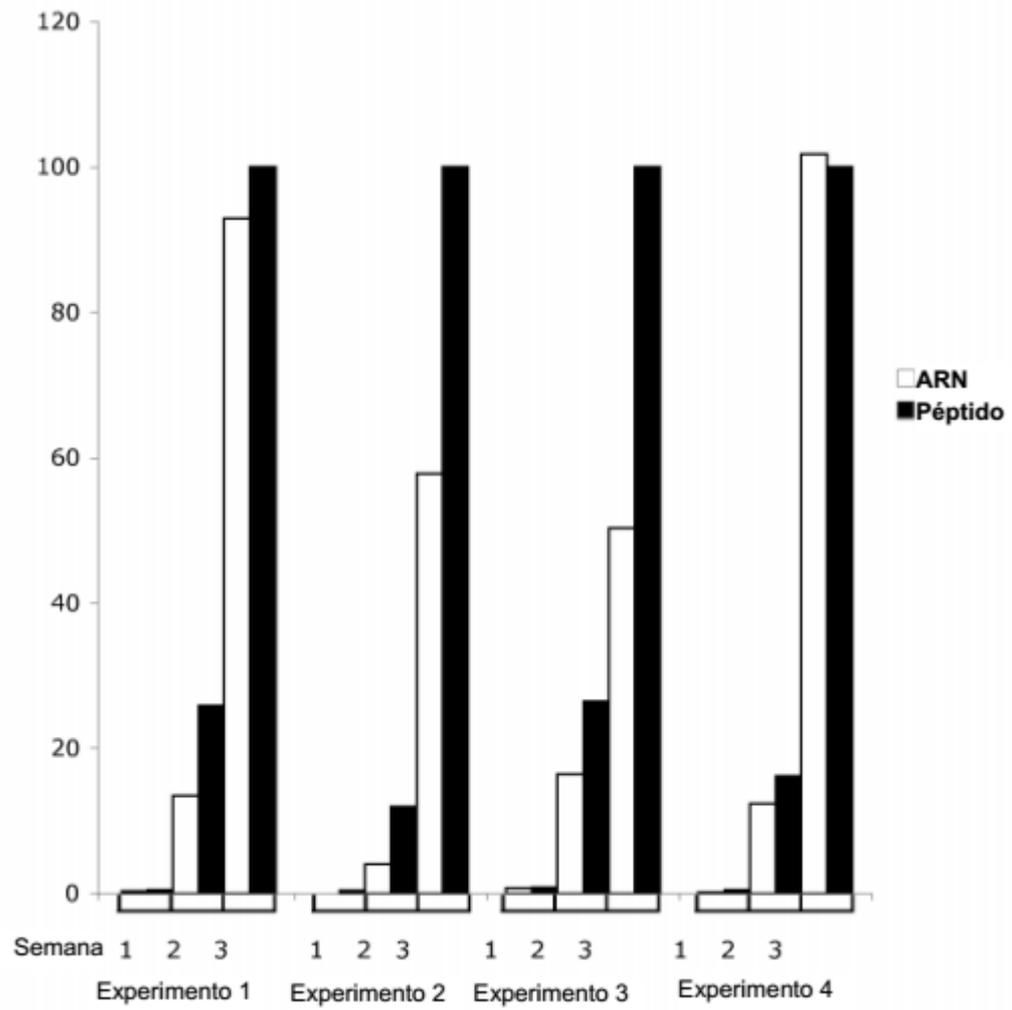


Figura 6B y C

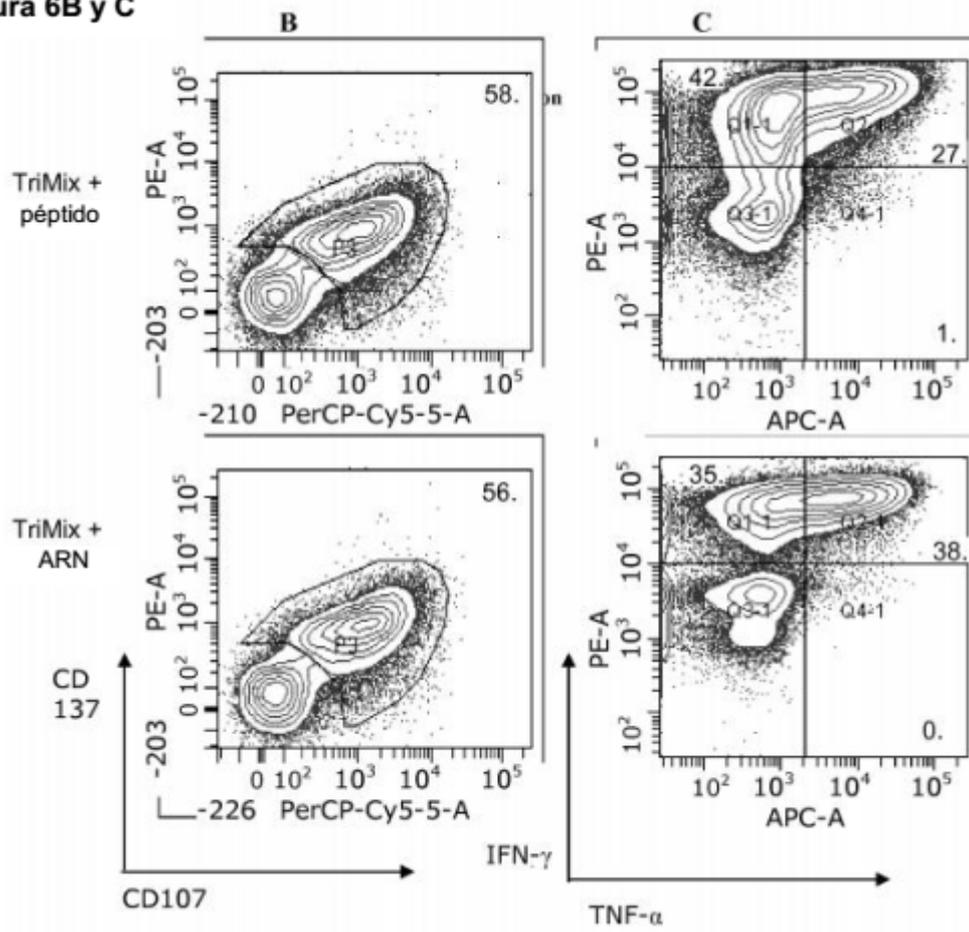


Figura 7

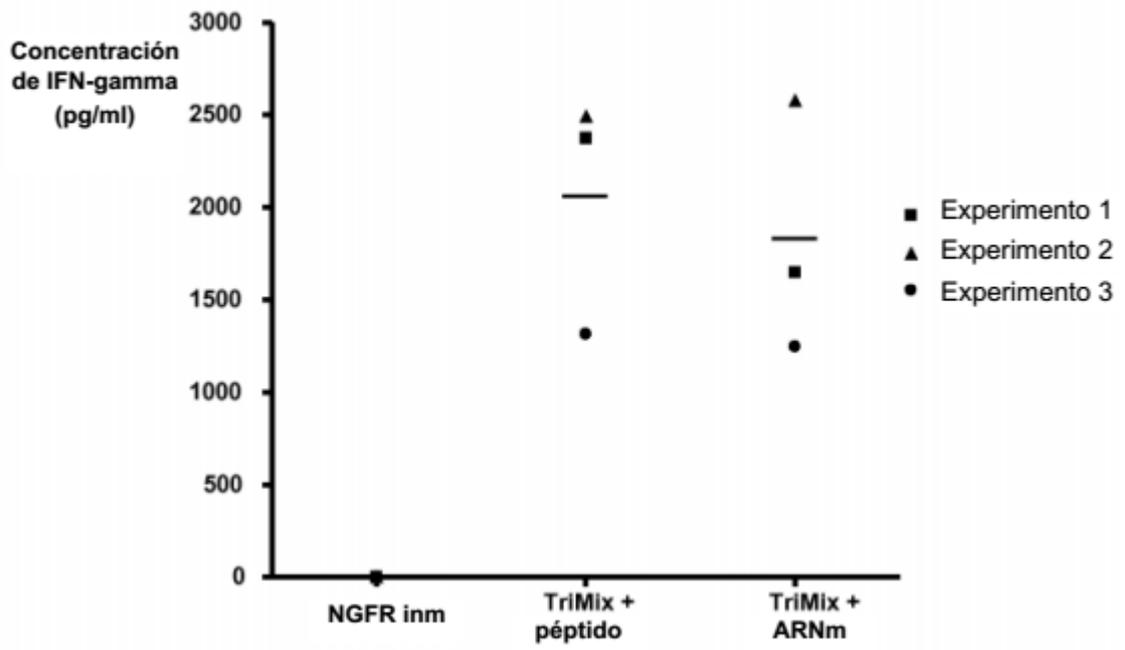
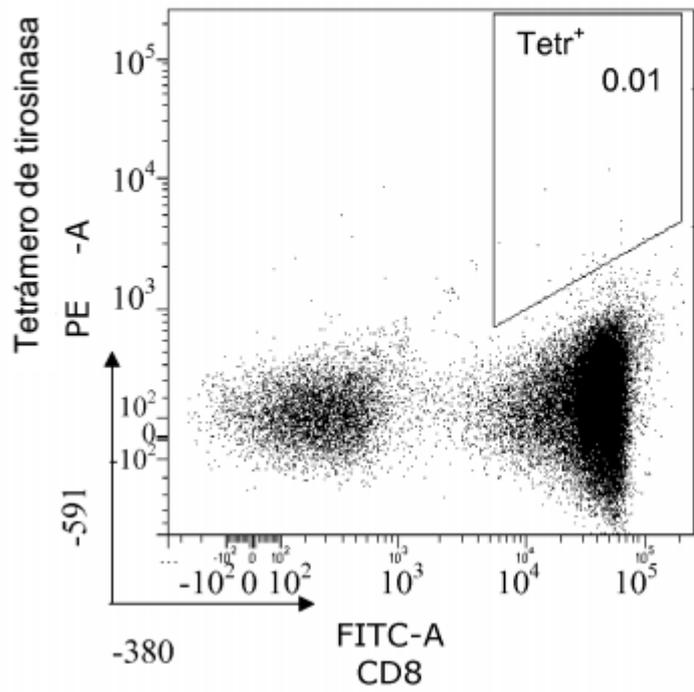
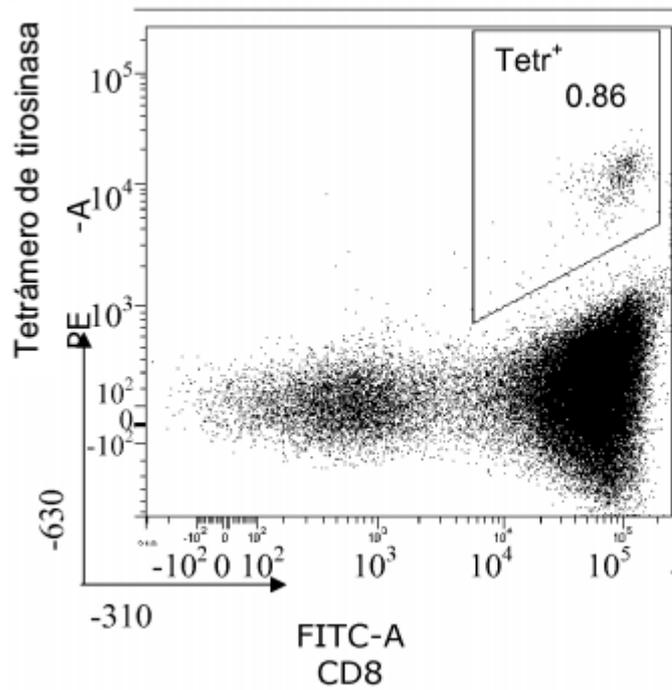


Figura 8A

Paciente 1



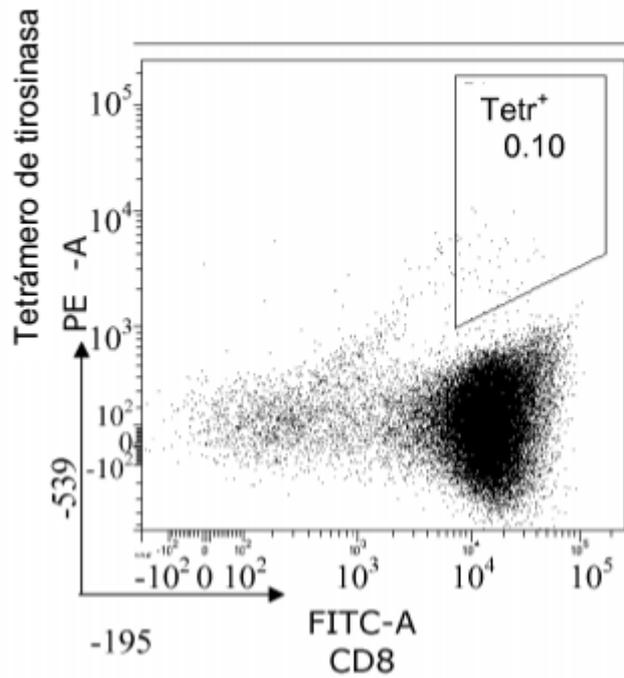
Coctel de citocinas +
péptido



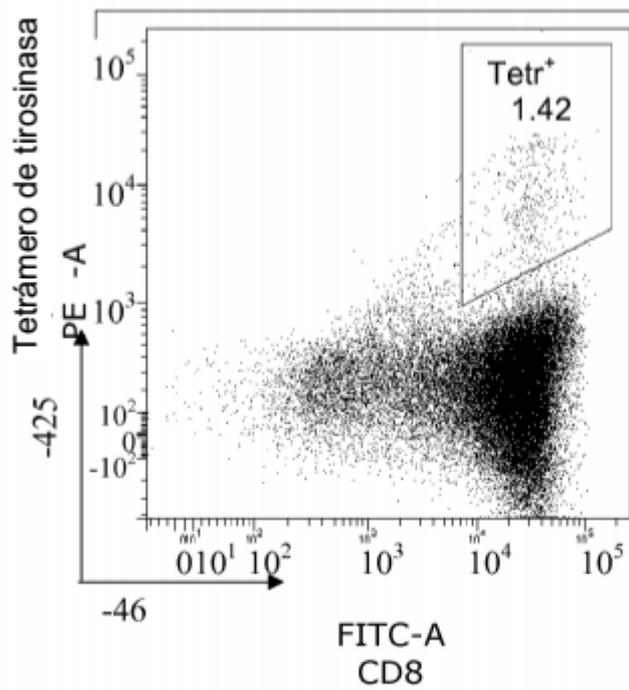
ARNm de TriMix +
TAA

Figura 8A (continuación)

Paciente 2



Coctel de citocinas +
péptido



ARNm de TriMix +
TAA

Figura 8A (continuación)

Paciente 3

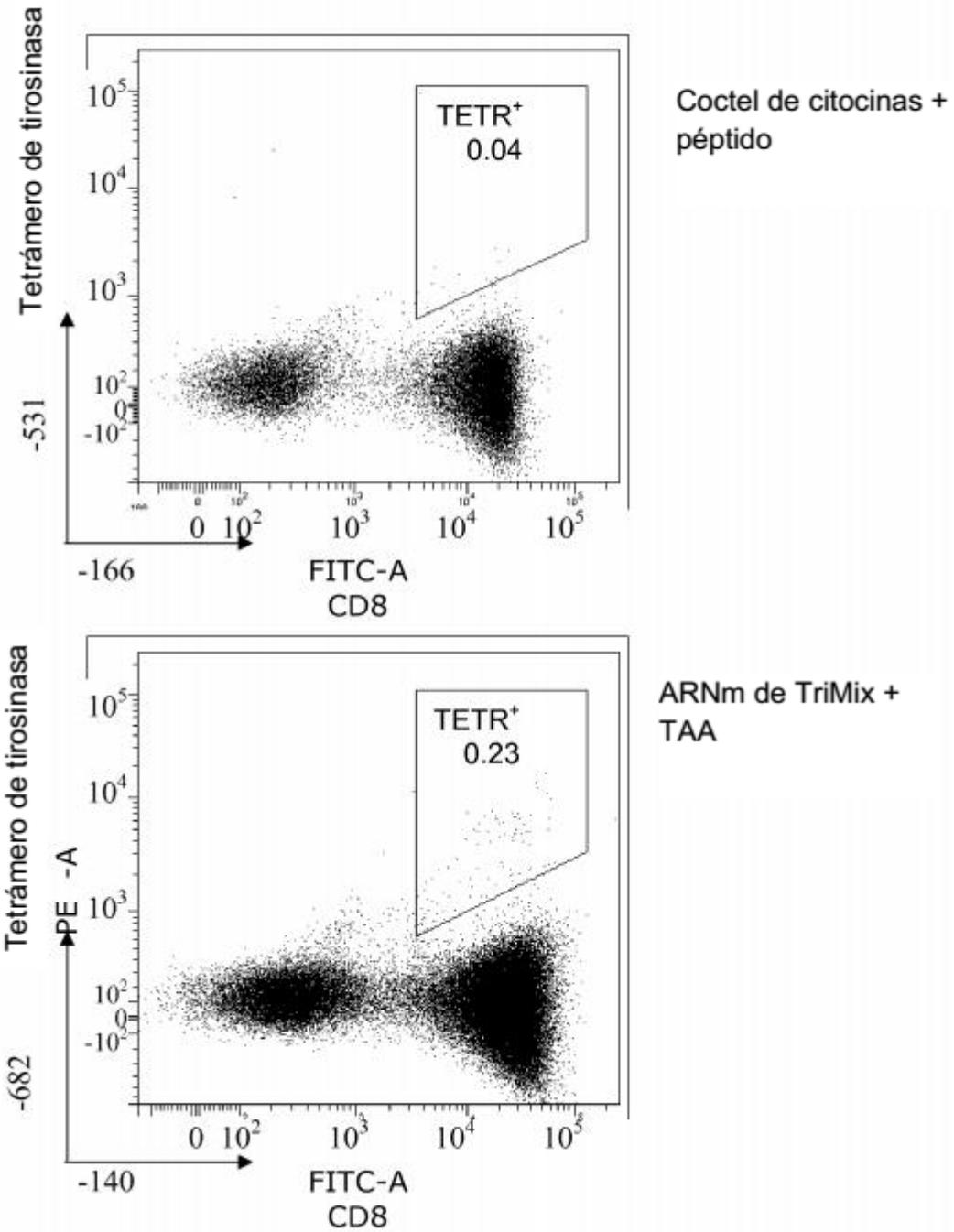


Figura 8B

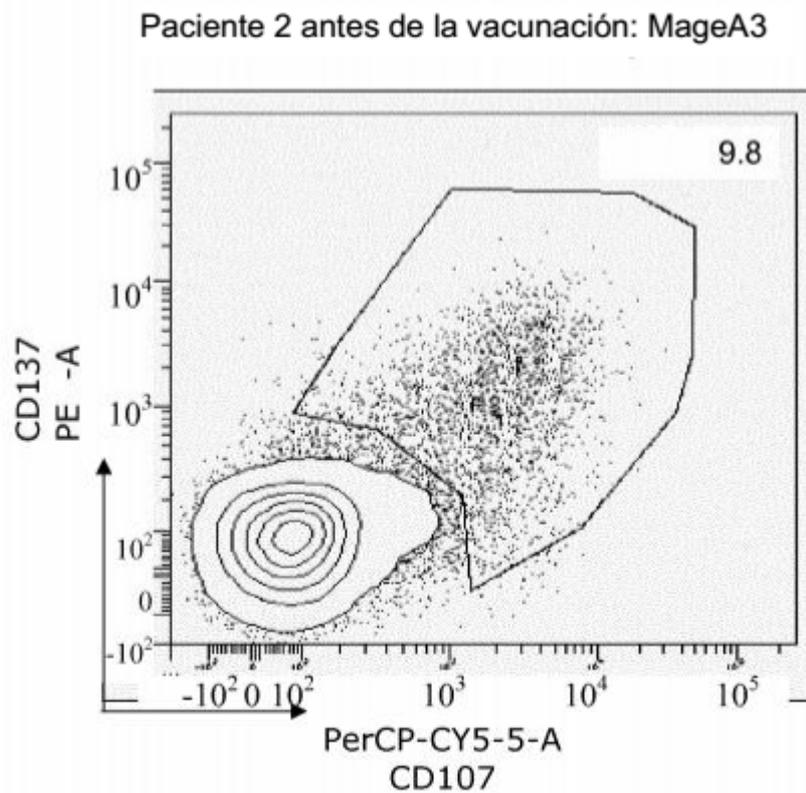
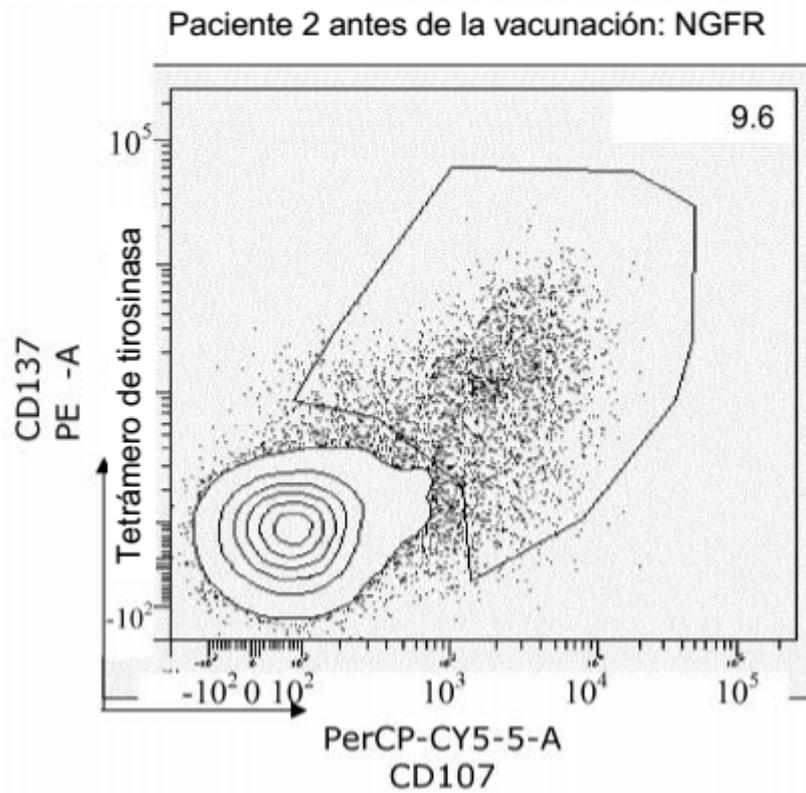
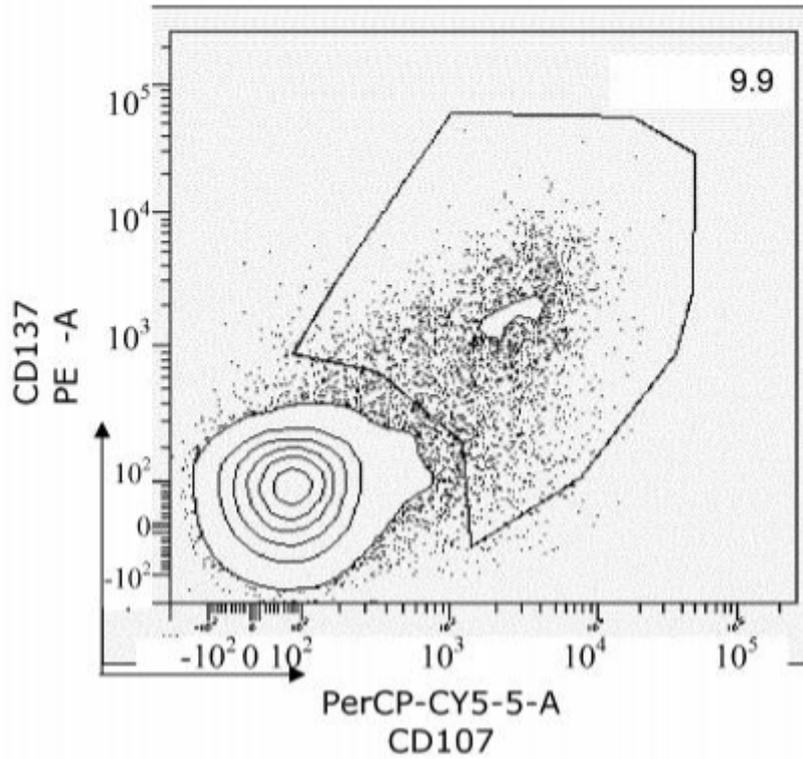


Figura 8B (continuación)

Paciente 2 antes de la vacunación: MageC2



Paciente 2 antes de la vacunación: Tirosinasa

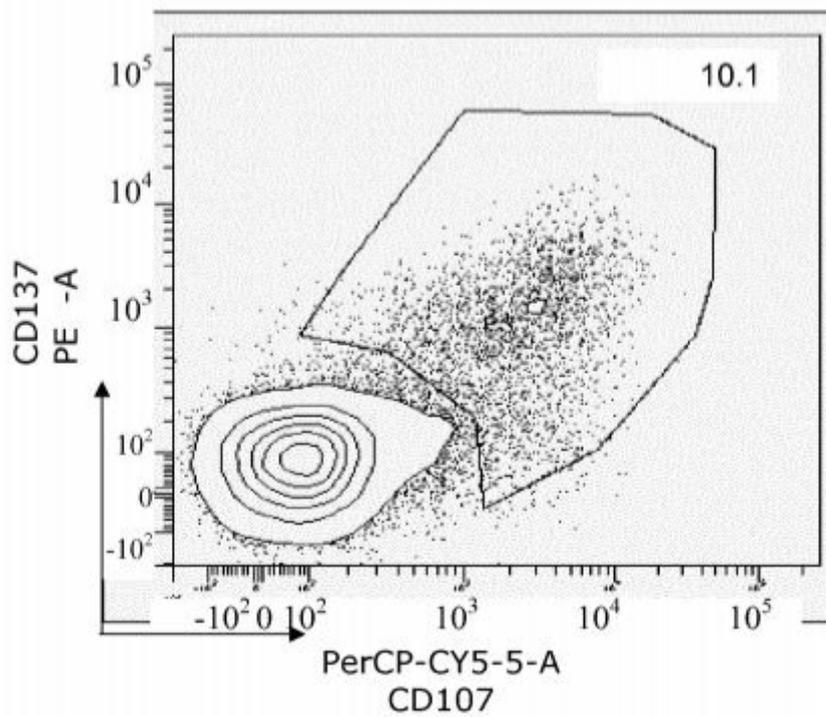


Figura 8B (continuación)

Paciente 2 antes de la vacunación: gp100

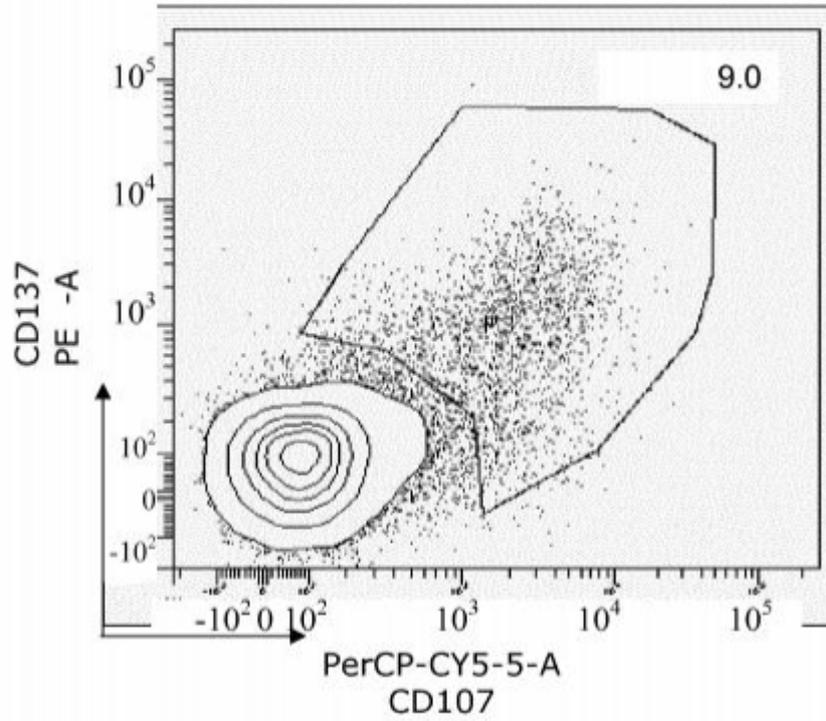


Figura 8B (continuación)

Paciente 2 después de la vacunación: NGFR

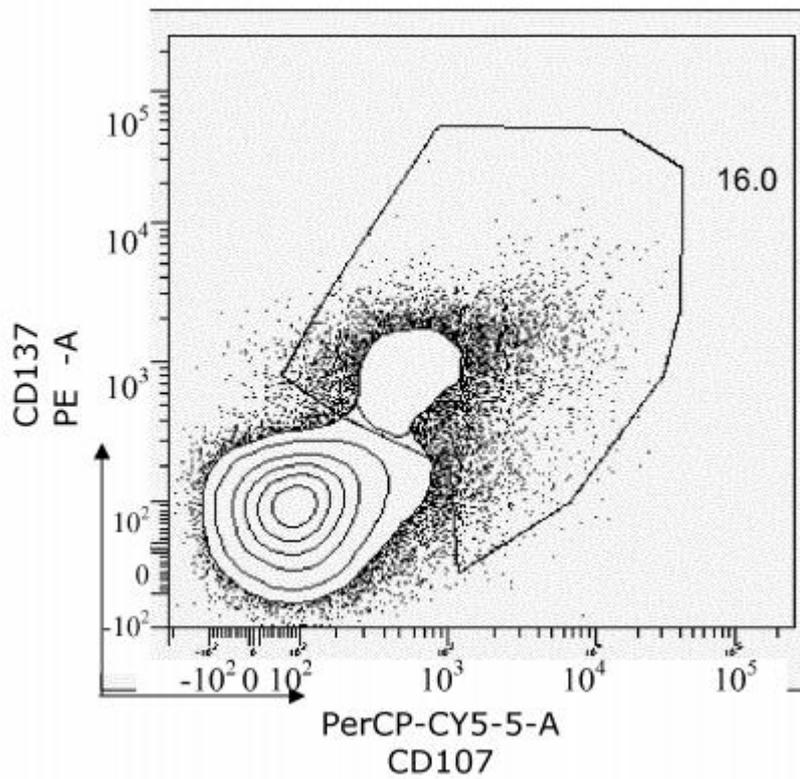
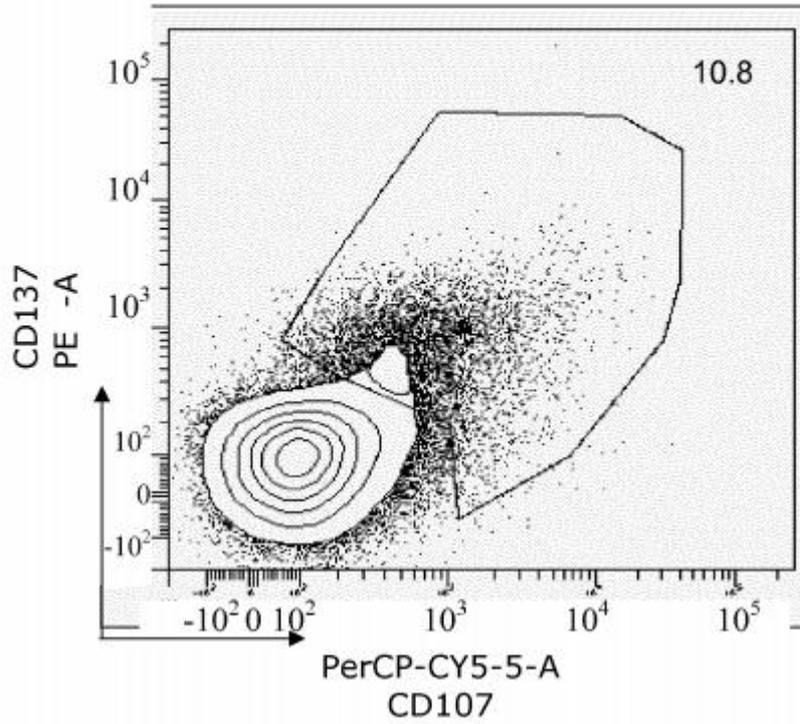


Figura 8B (continuación)

Paciente 2 después de la vacunación: MageC2

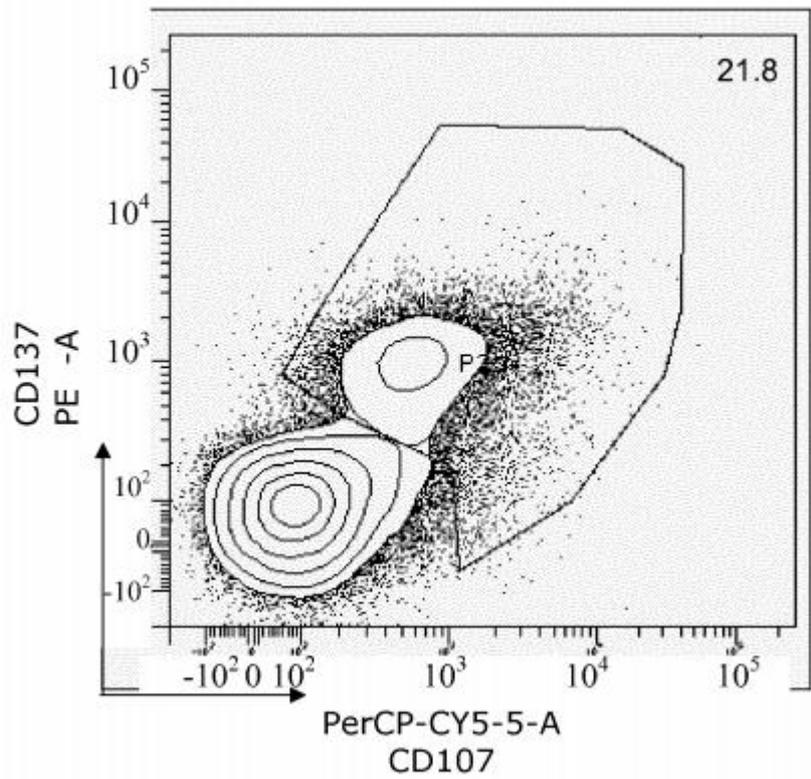
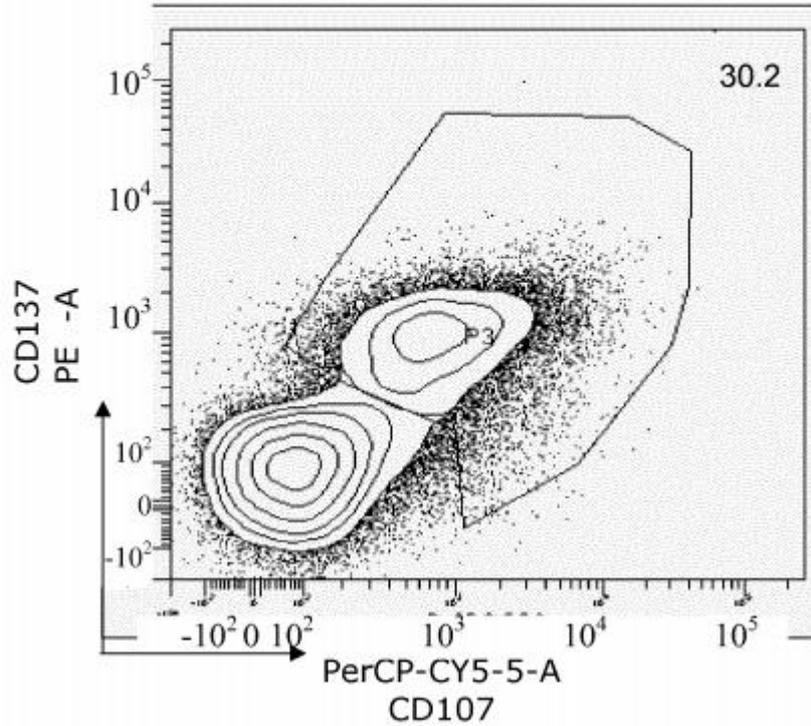


Figura 8B (continuación)

Paciente 2 después de la vacunación: gp100

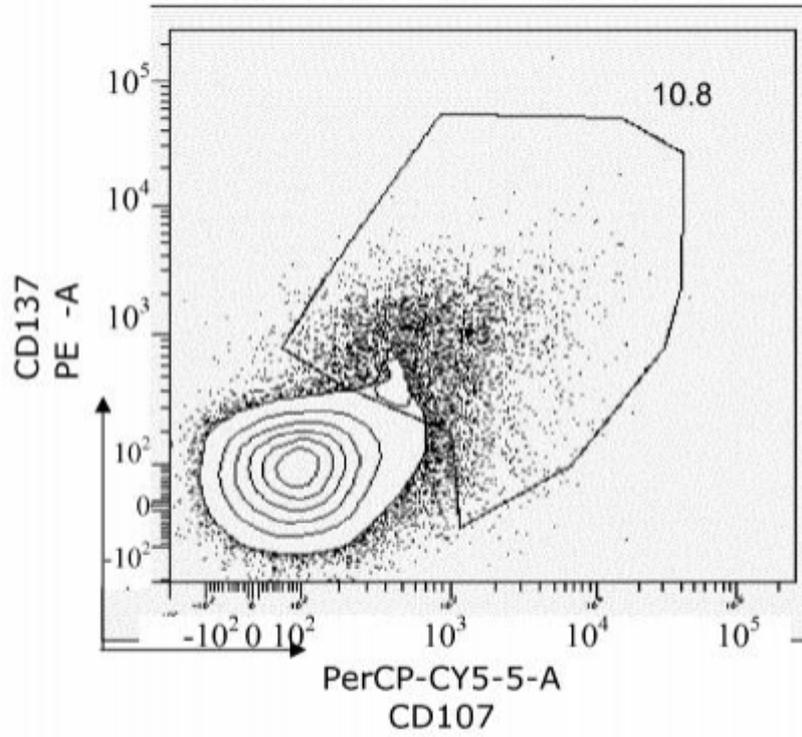


Figura 8B (continuación)

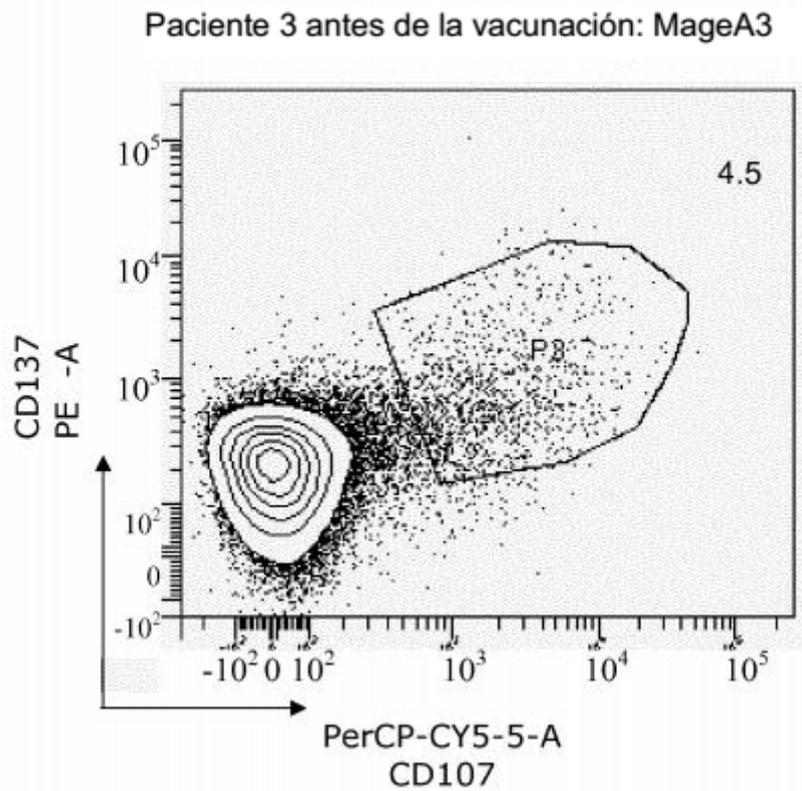
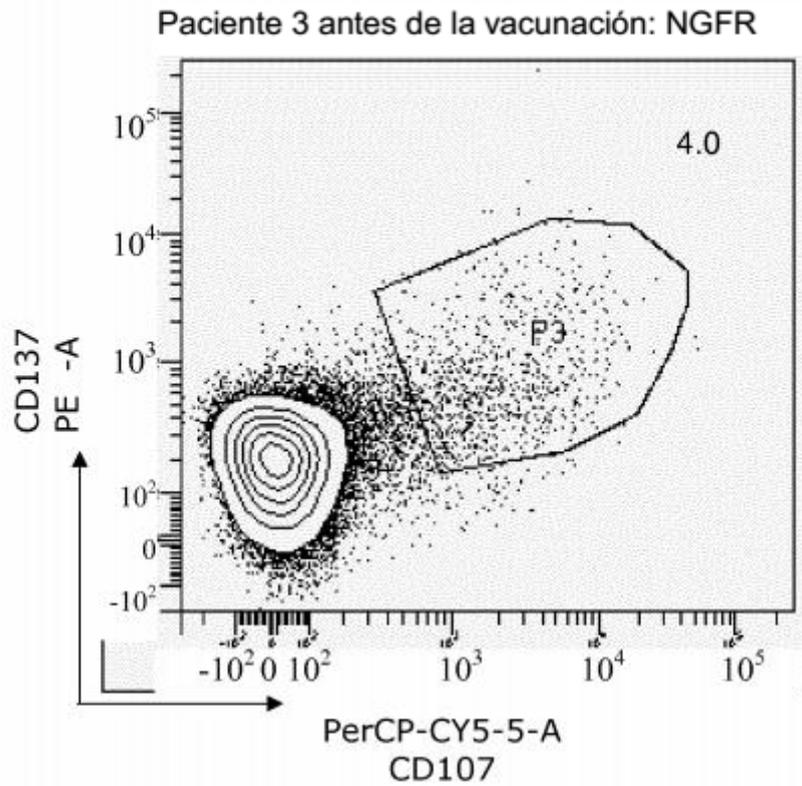
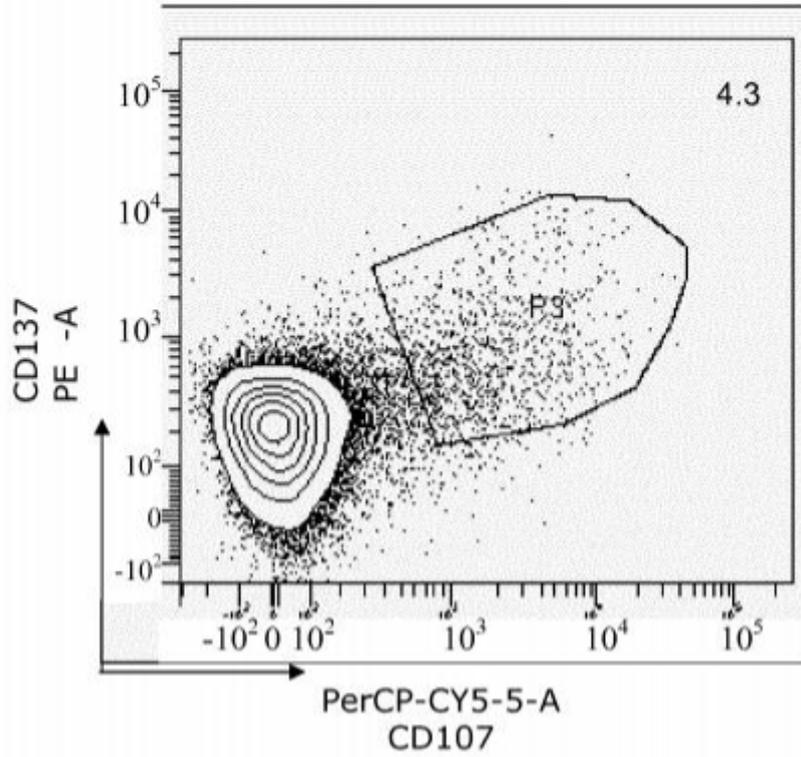


Figura 8B (continuación)

Paciente 3 antes de la vacunación: MageC2



Paciente 3 antes de la vacunación: Tirosinasa

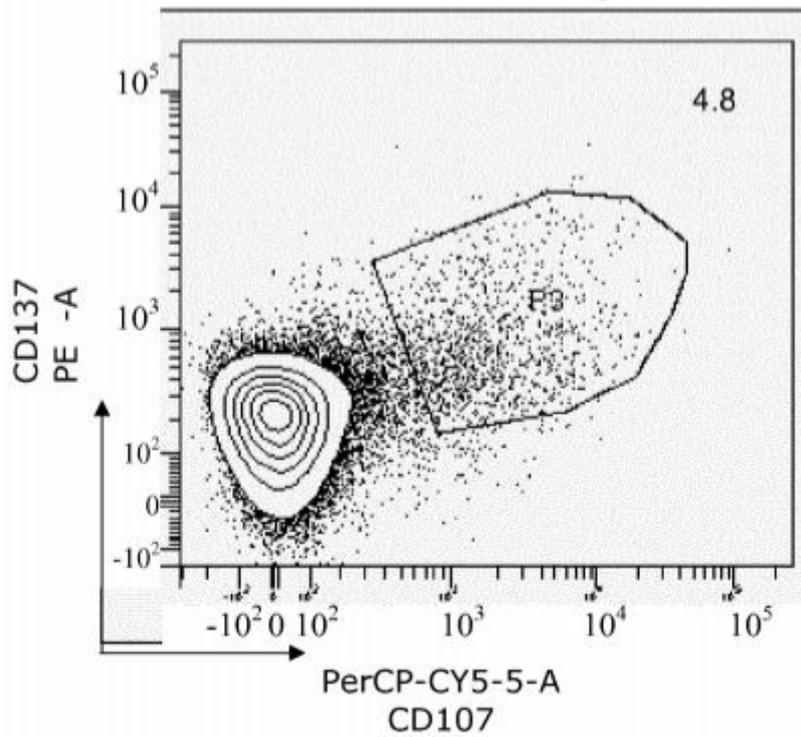


Figura 8B (continuación)

Paciente 3 antes de la vacunación: gp100

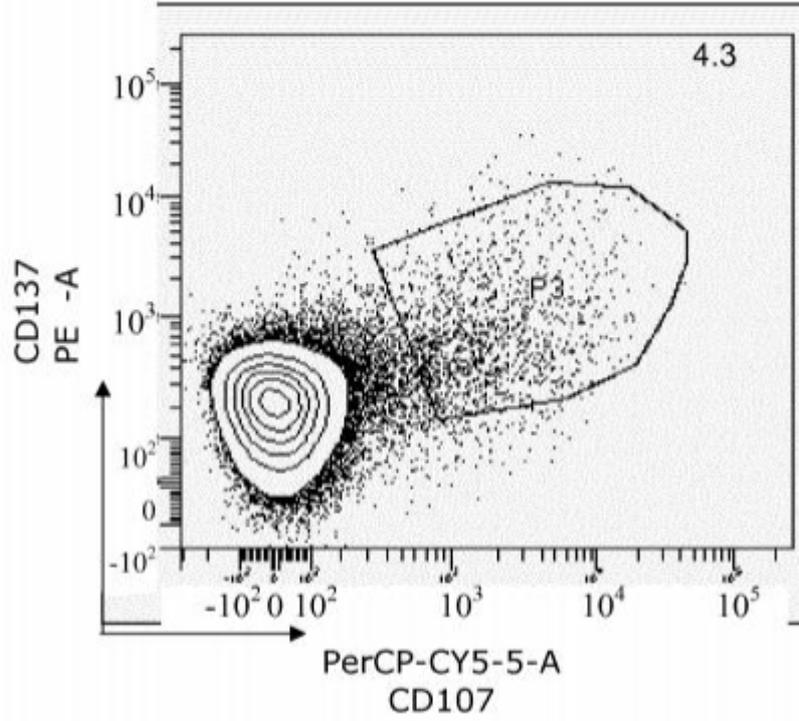
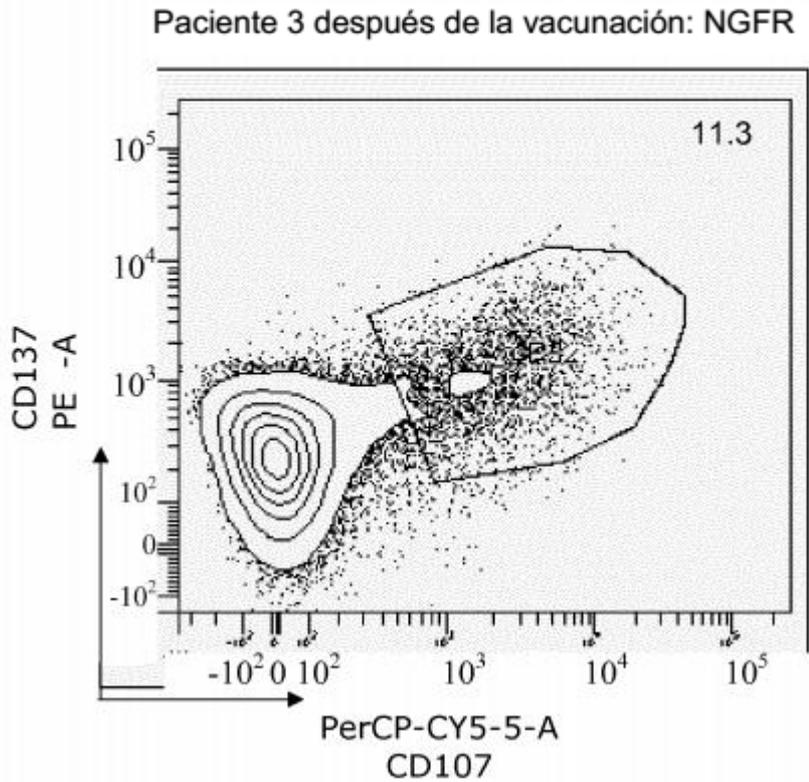


Figura 8B (continuación)



Paciente 3 después de la vacunación: MageA3

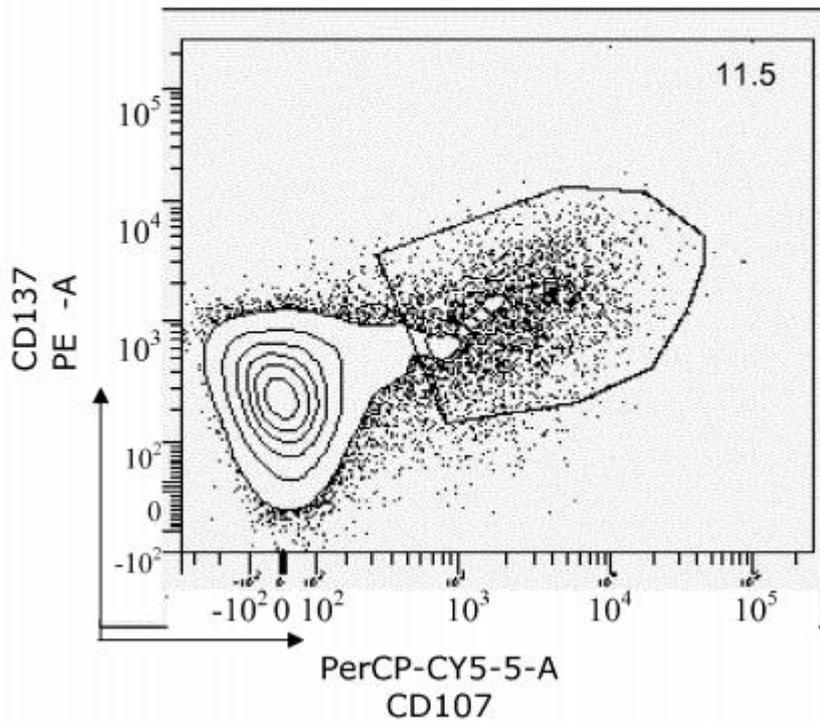
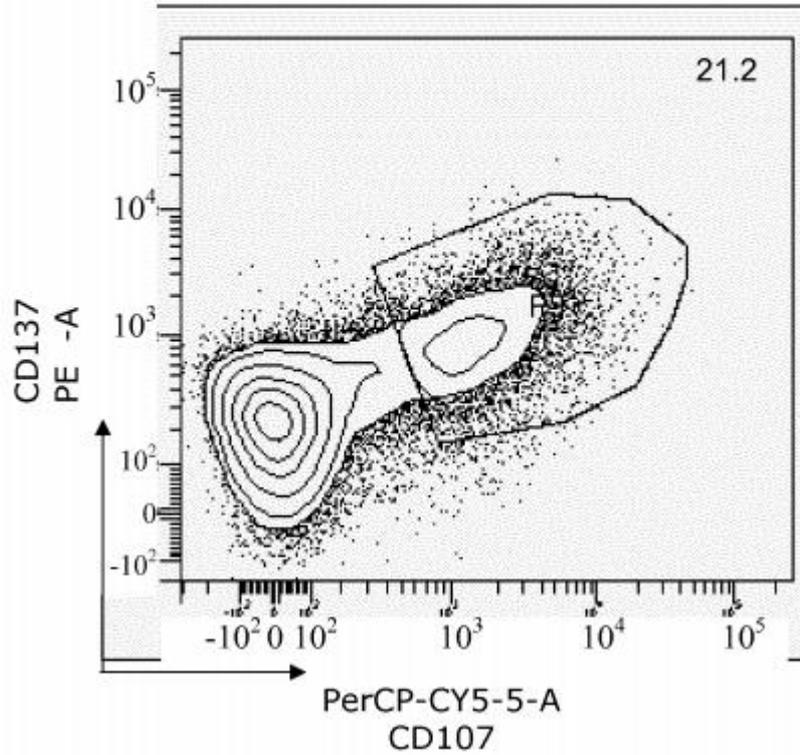


Figura 8B (continuación)

Paciente 3 después de la vacunación: MageC2



Paciente 3 después de la vacunación: Tirosinasa

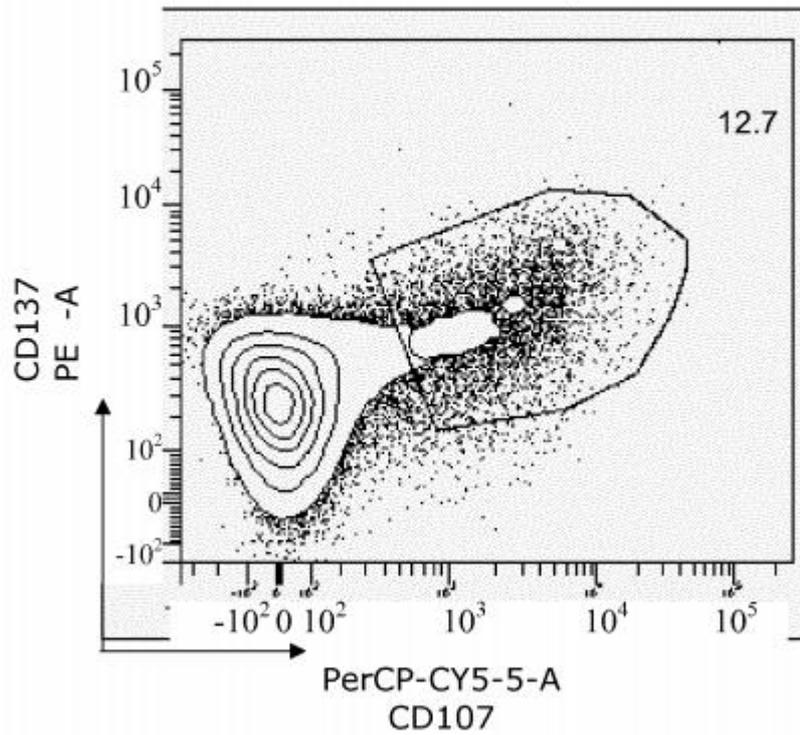


Figura 8B (continuación)

Paciente 3 después de la vacunación: gp100

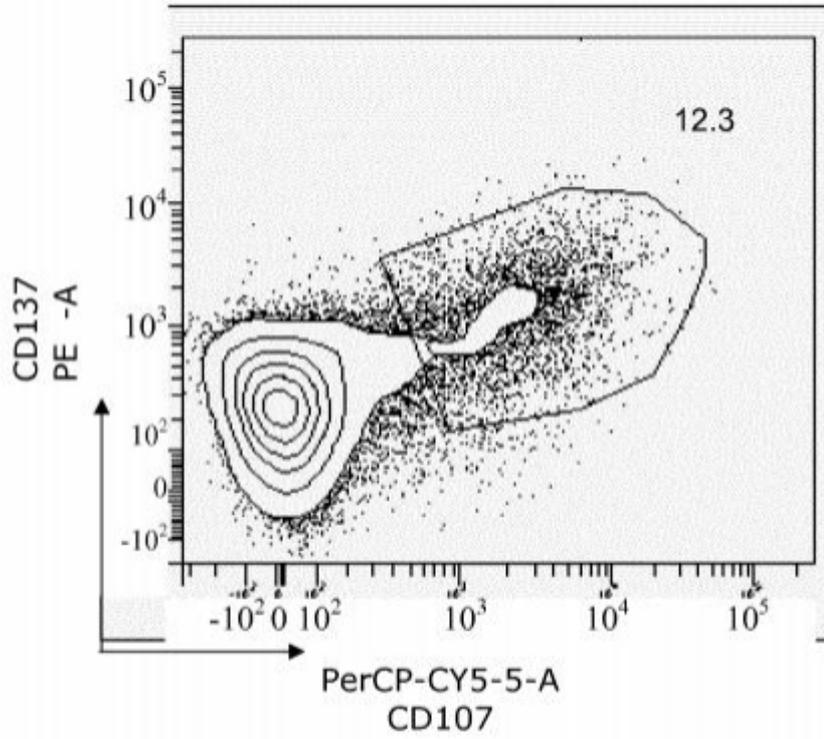
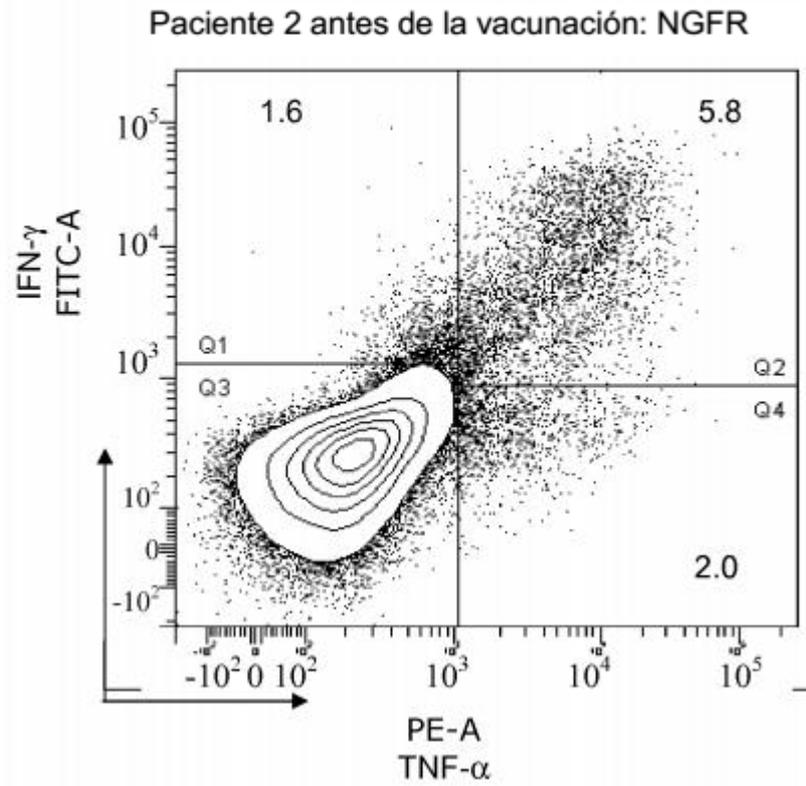


Figura 8C



Paciente 2 antes de la vacunación: MageA3

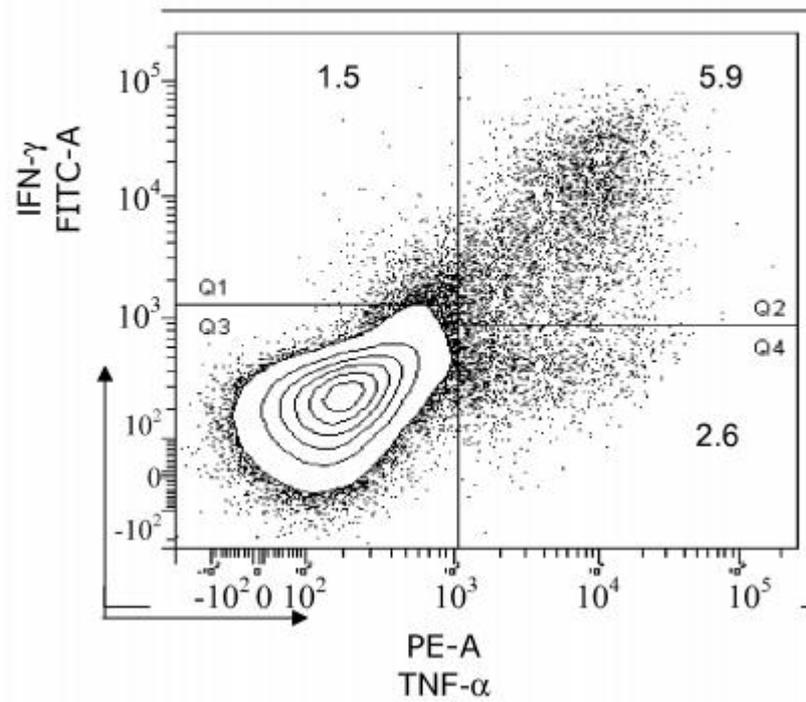
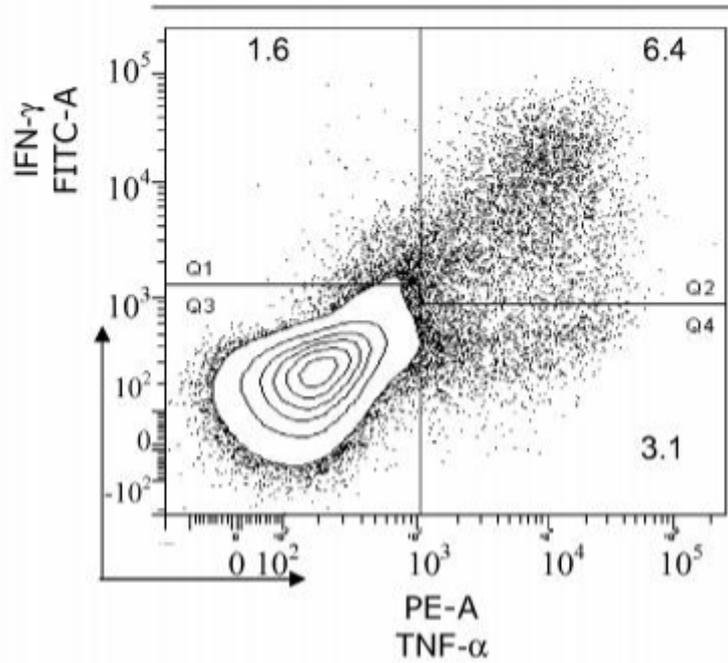


Figura 8C (continuación)

Paciente 2 antes de la vacunación: MageC2



Paciente 2 antes de la vacunación: Tirosinasa

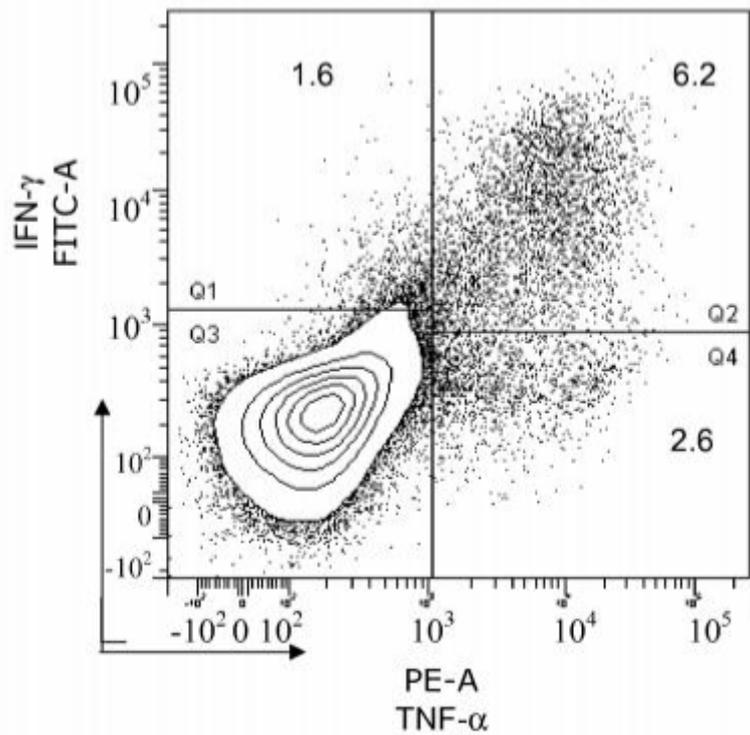


Figura 8C (continuación)

Paciente 2 antes de la vacunación: gp100

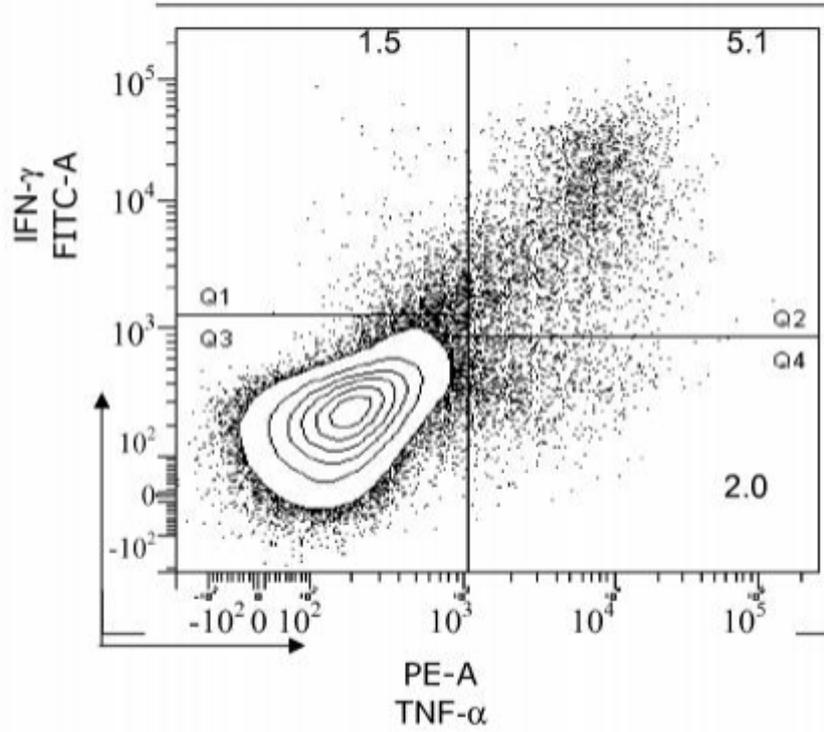
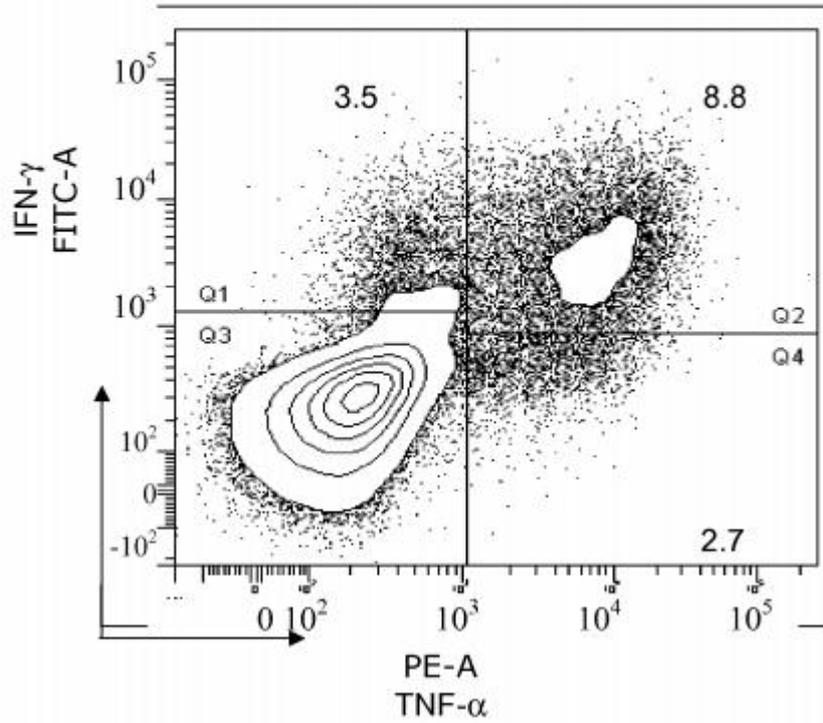


Figura 8C (continuación)

Paciente 2 después de la vacunación: NGFR



Paciente 2 después de la vacunación: MageA3

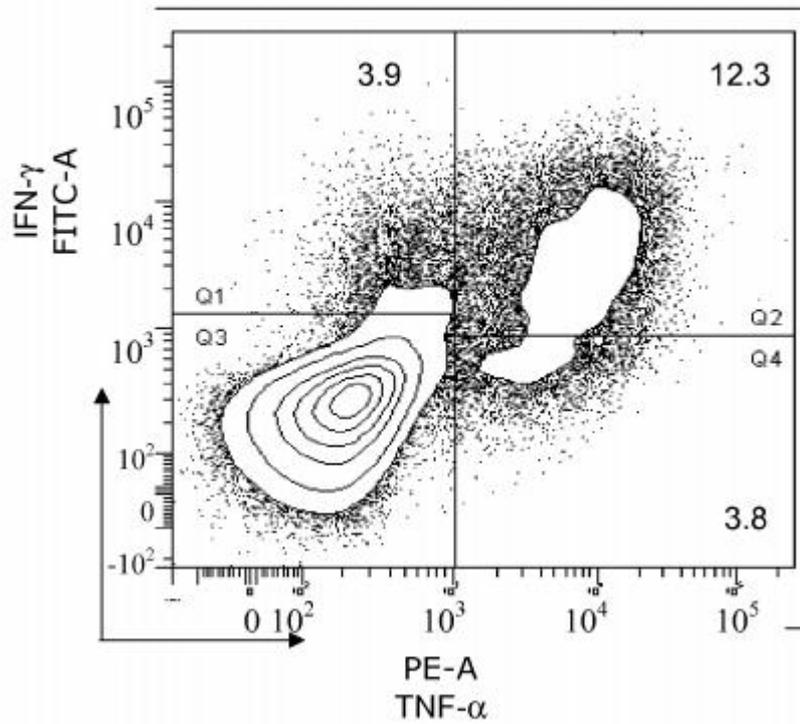
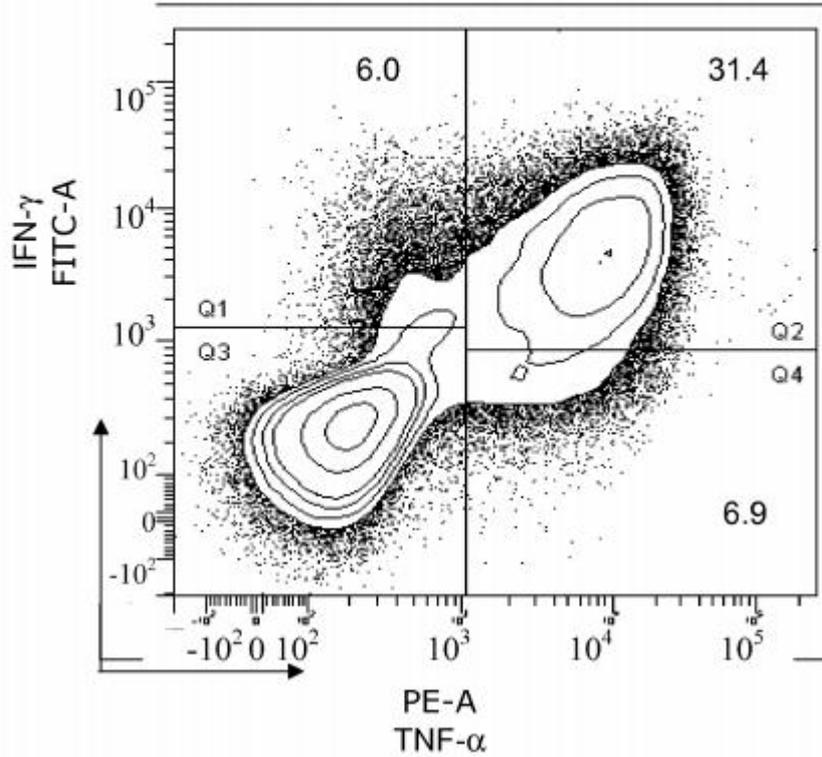


Figura 8C (continuación)

Paciente 2 después de la vacunación: MageC2



Paciente 2 después de la vacunación: Tirosinasa

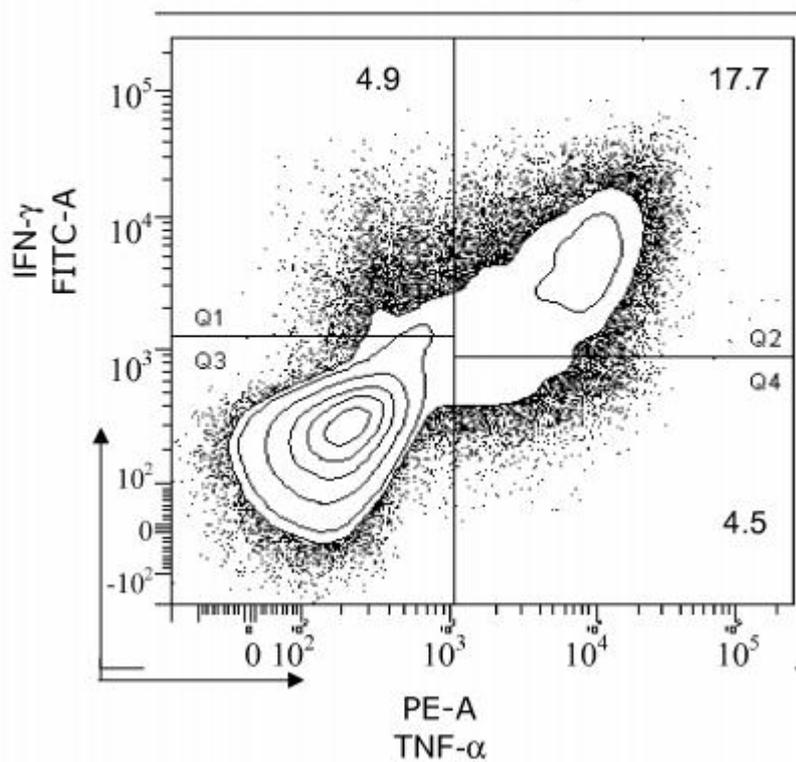


Figura 8C (continuación)

Paciente 2 después de la vacunación: gp100

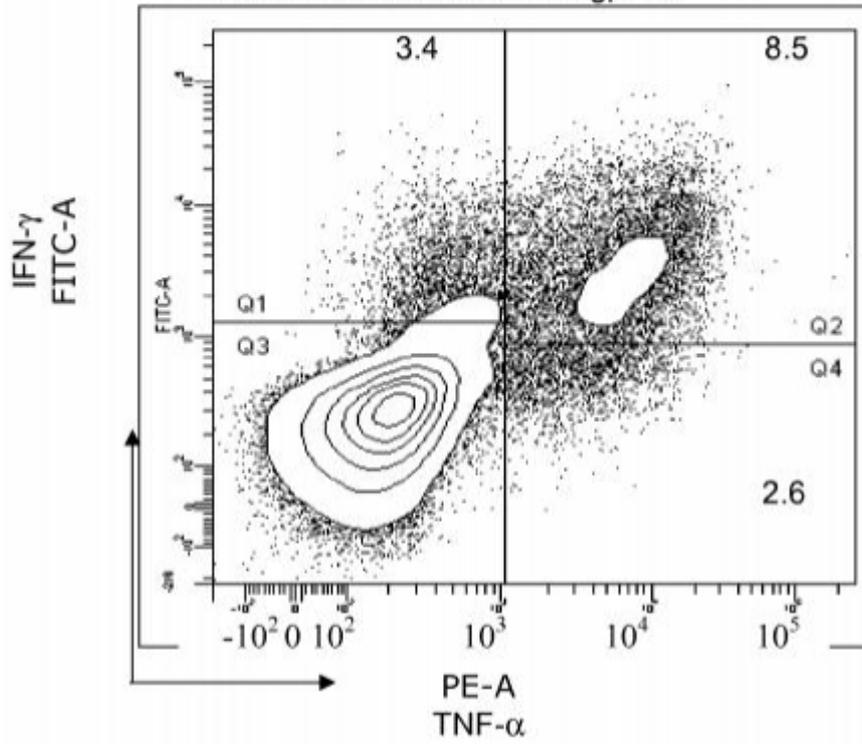
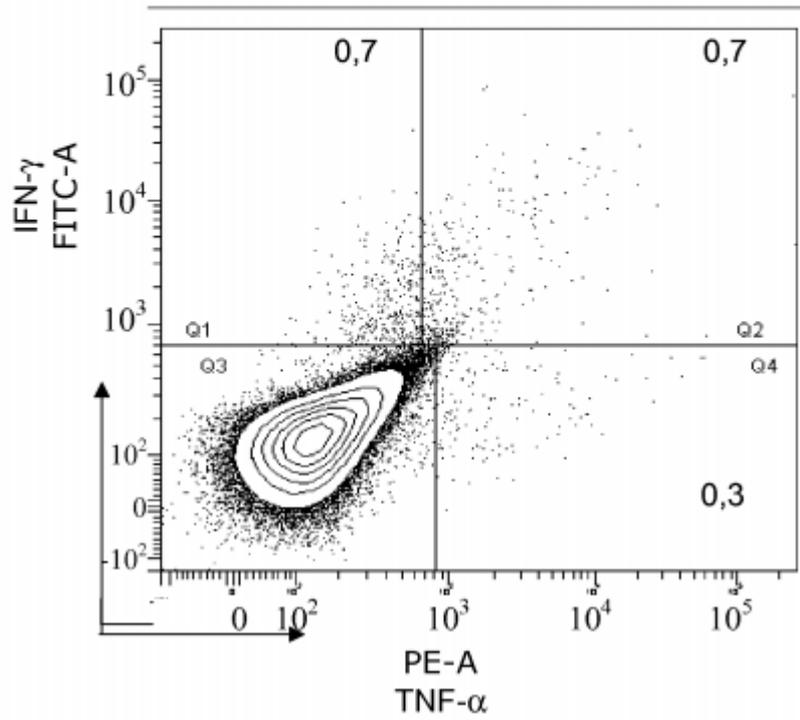


Figura 8C (continuación)

Paciente 3 antes de la vacunación: NGFR



Paciente 3 antes de la vacunación: MageA3

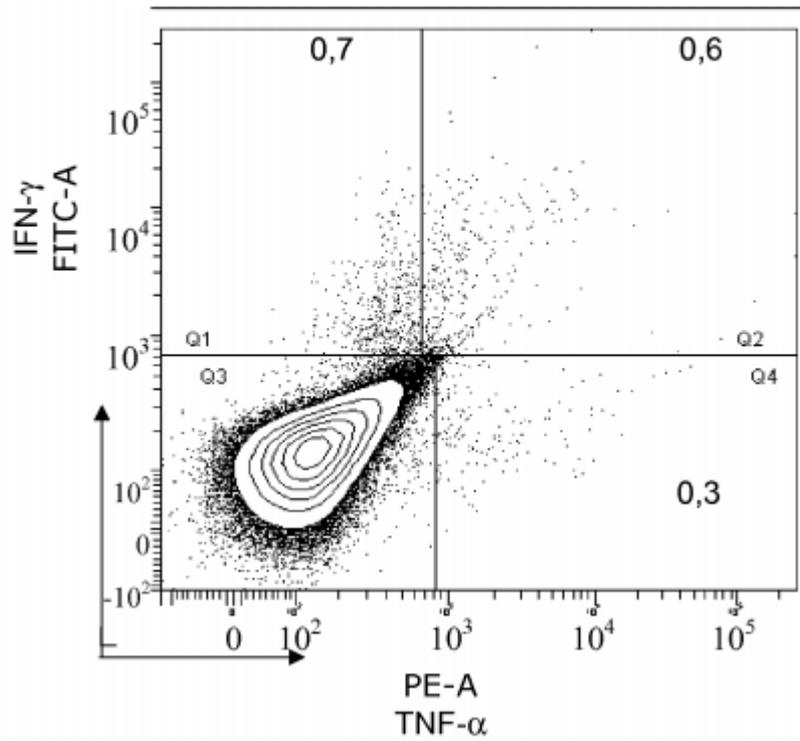
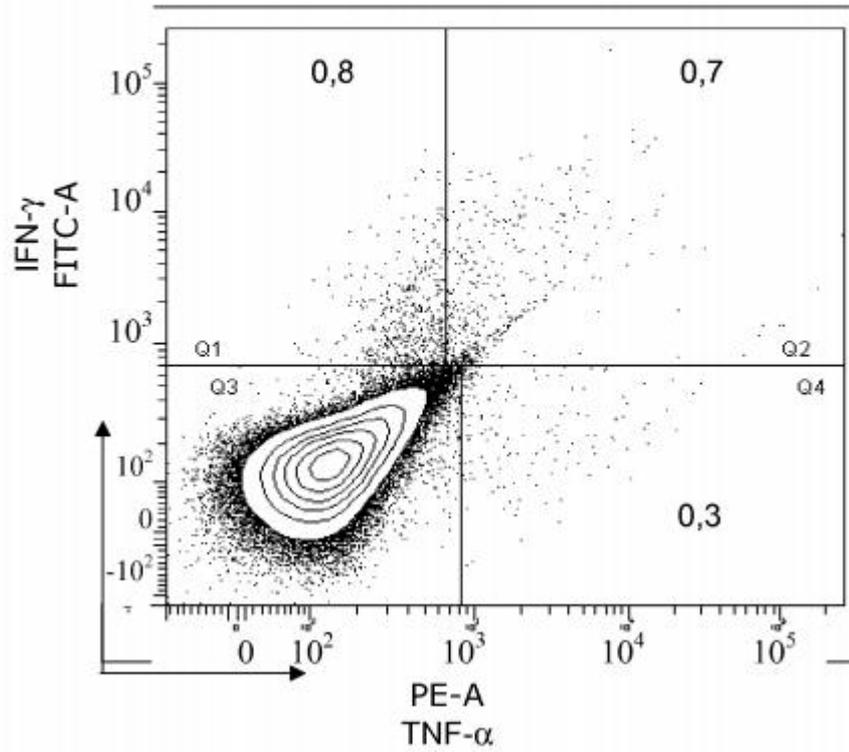


Figura 8C (continuación)

Paciente 3 antes de la vacunación: MageC2



Paciente 3 antes de la vacunación: Tirosinasa

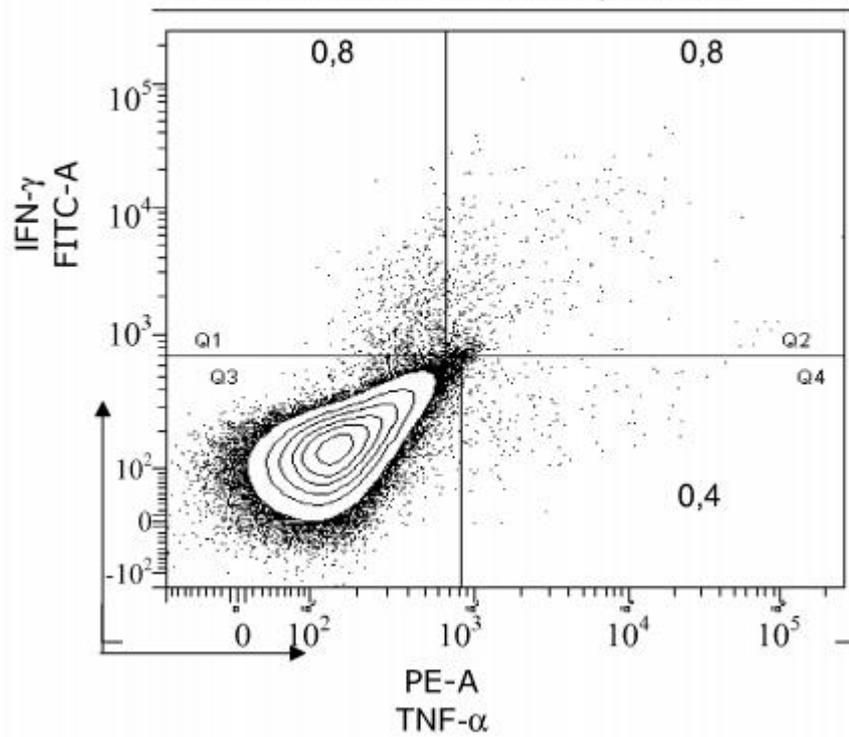


Figura 8C (continuación)

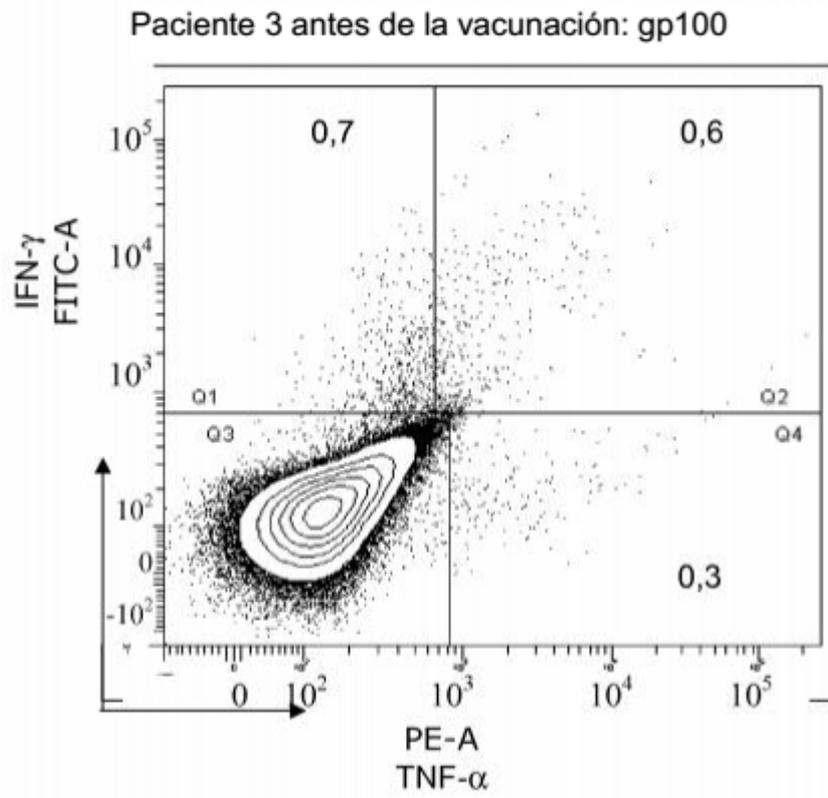
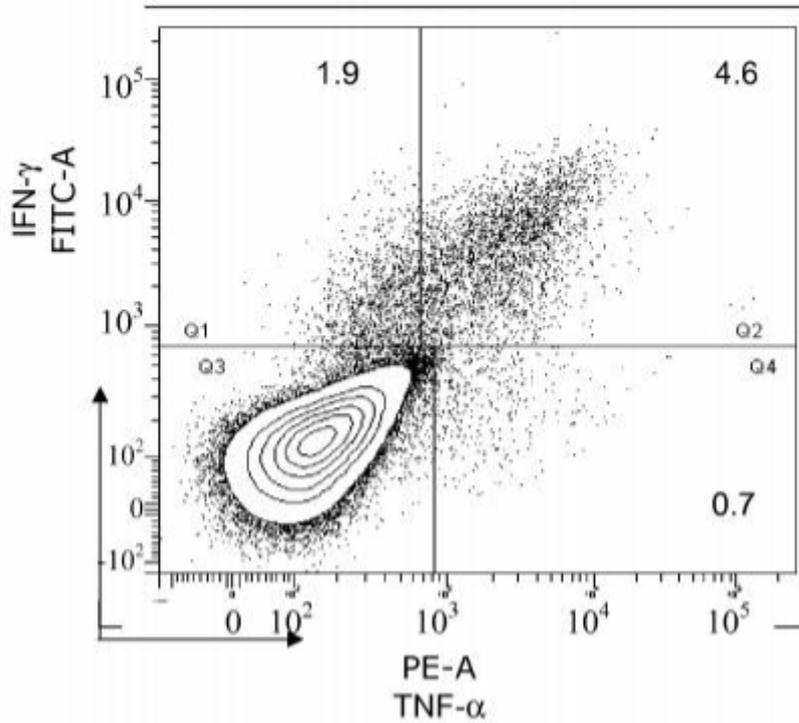


Figura 8C (continuación)

Paciente 3 después de la vacunación: NGFR



Paciente 3 después de la vacunación: MageA3

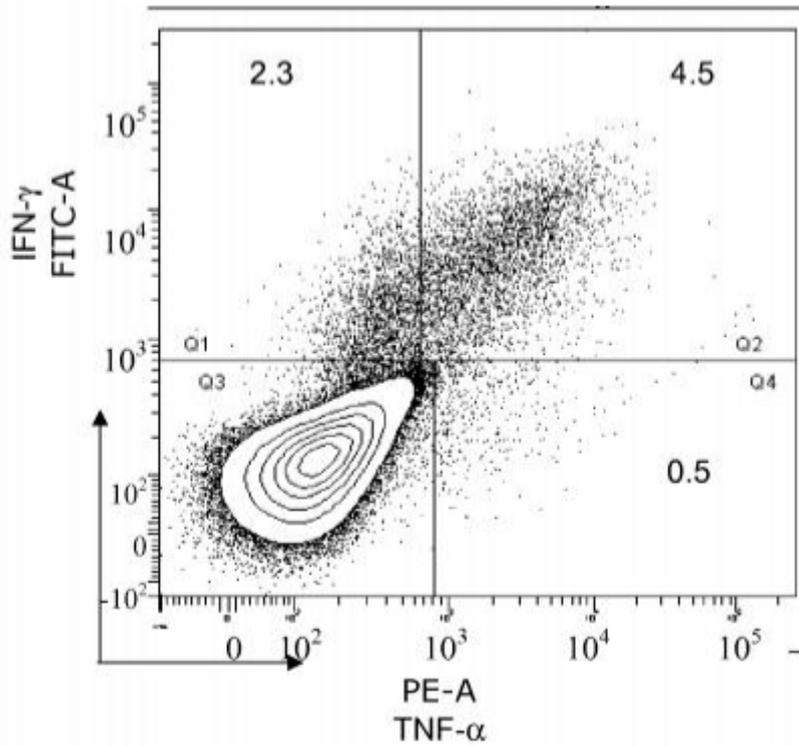
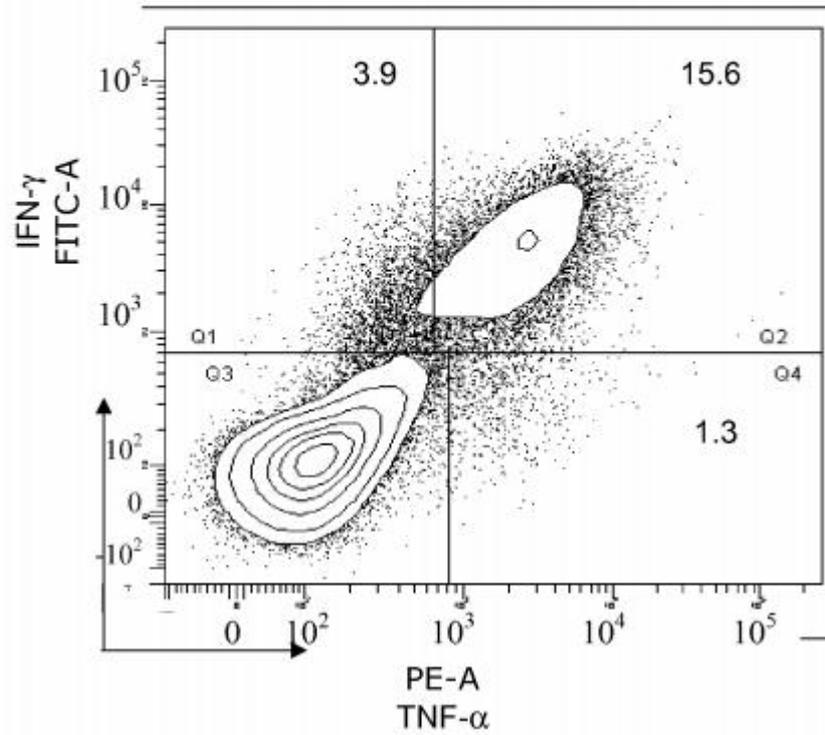


Figura 8C (continuación)

Paciente 3 después de la vacunación: MageC2



Paciente 3 después de la vacunación: Tirosinasa

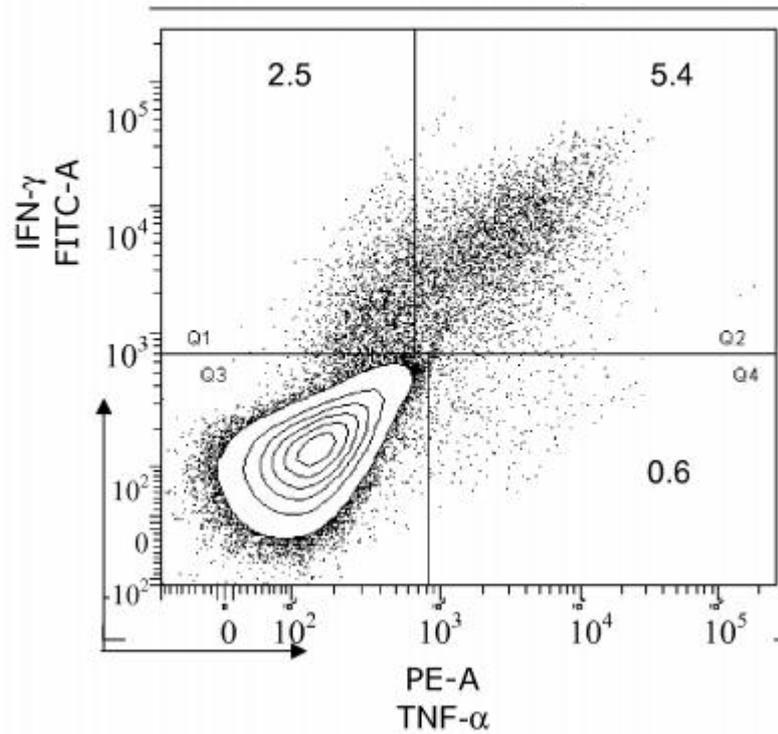


Figura 8C (continuación)

Paciente 3 después de la vacunación: gp100

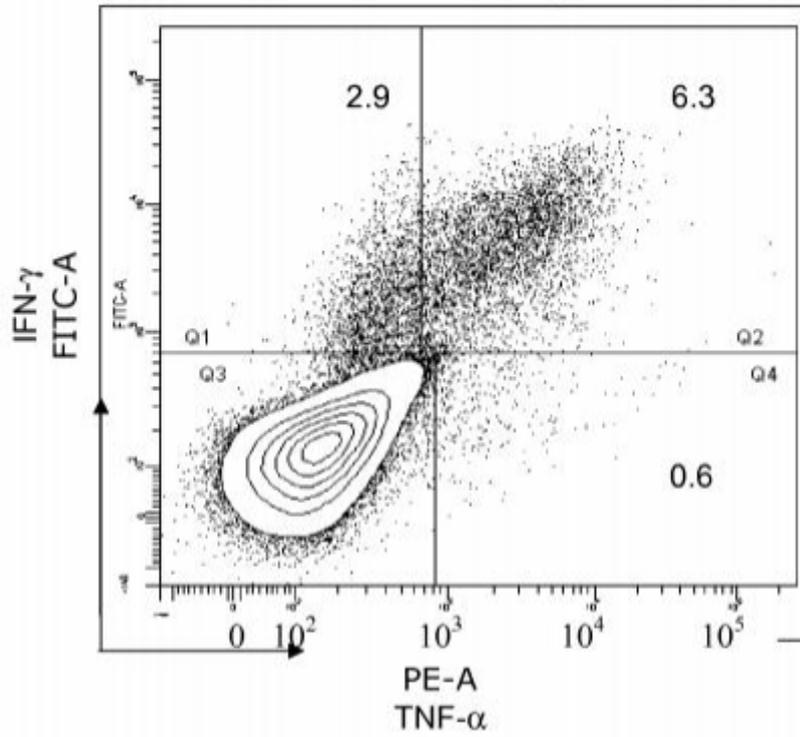


Figura 9

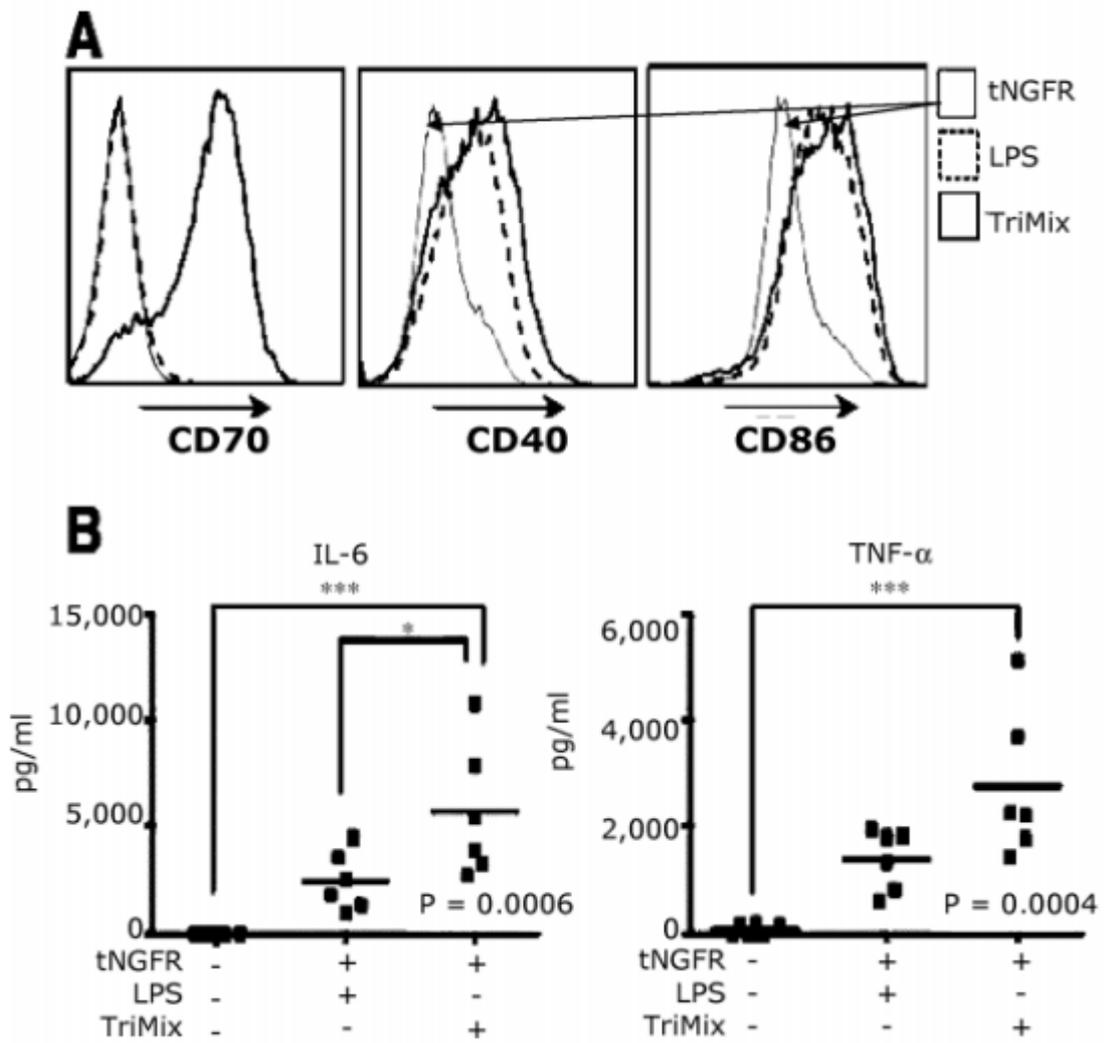


Figura 9 (continuación)

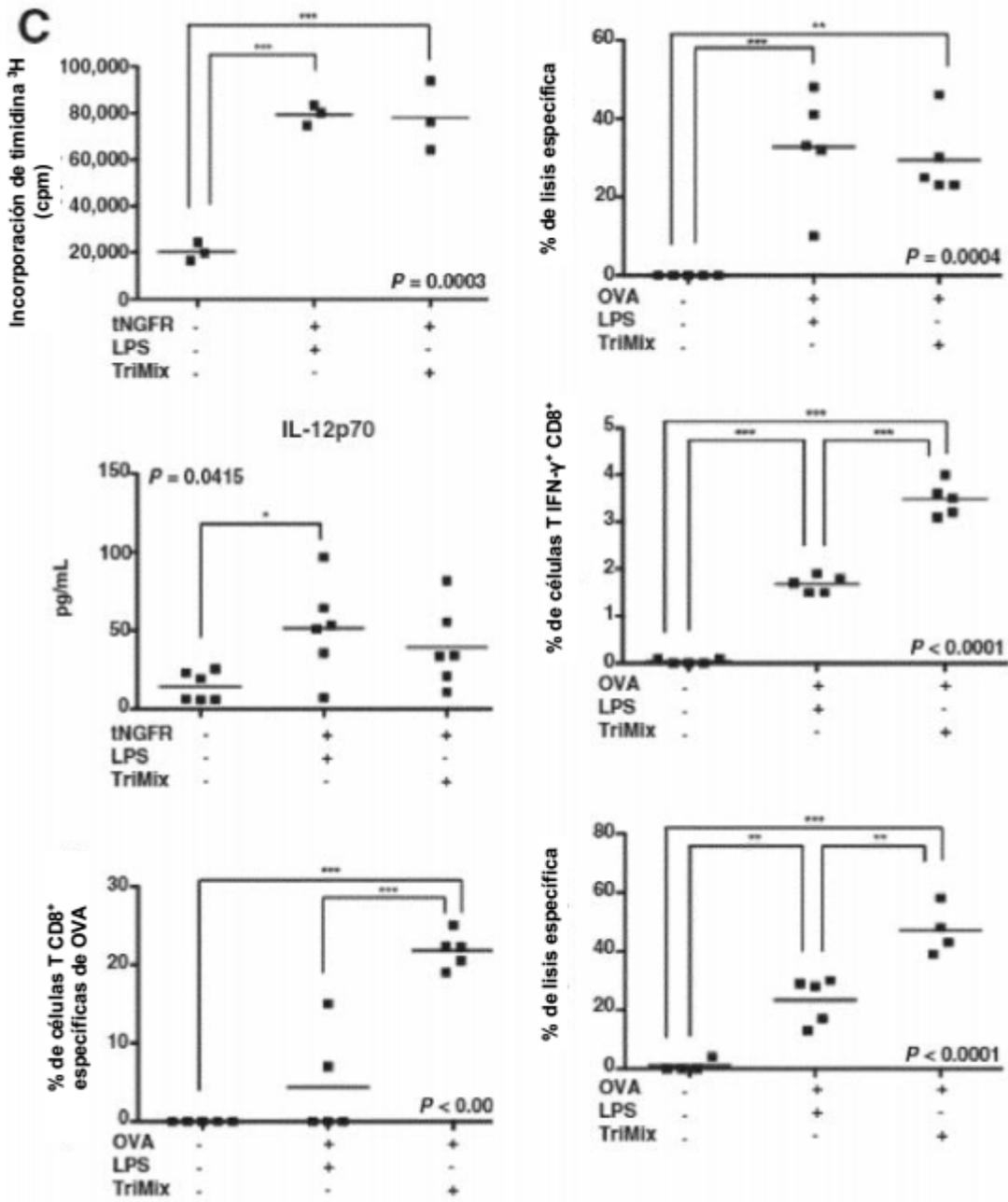


Figura 9 (continuación)

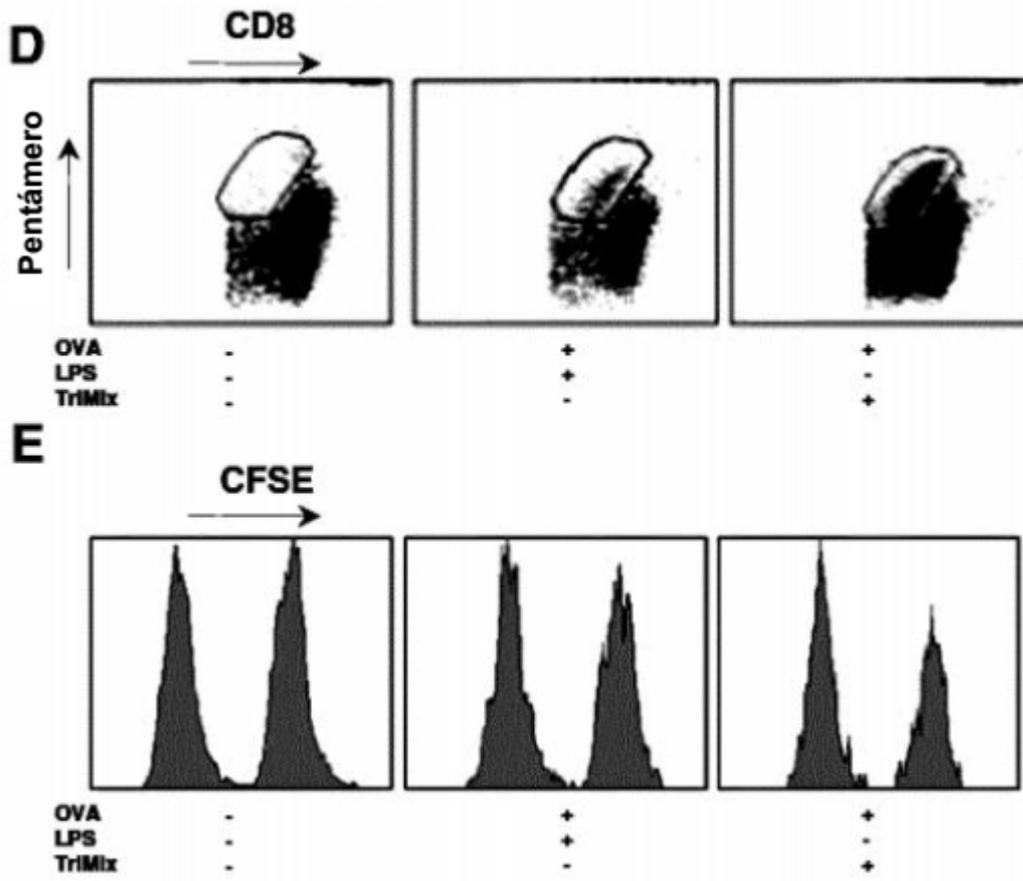


Figura 9 (continuación)

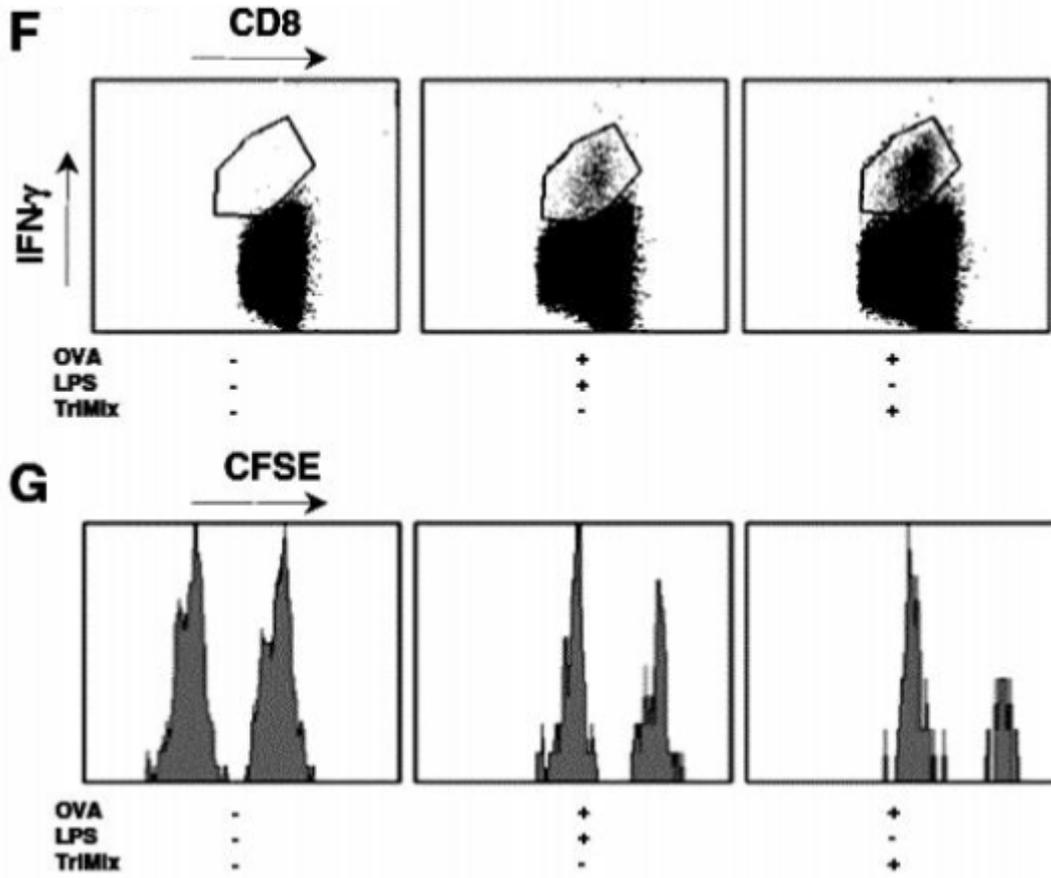
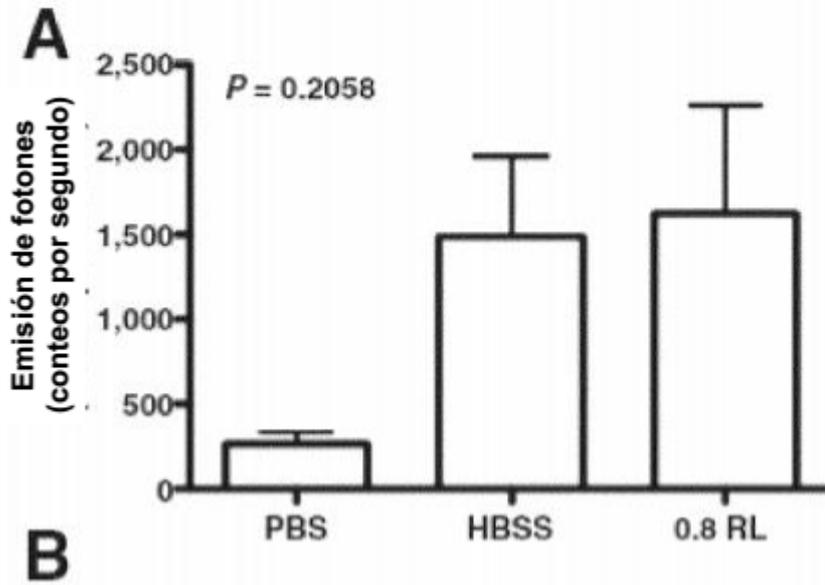


Figura 10



Horas después de la administración intranodal del ARNm de FLuc

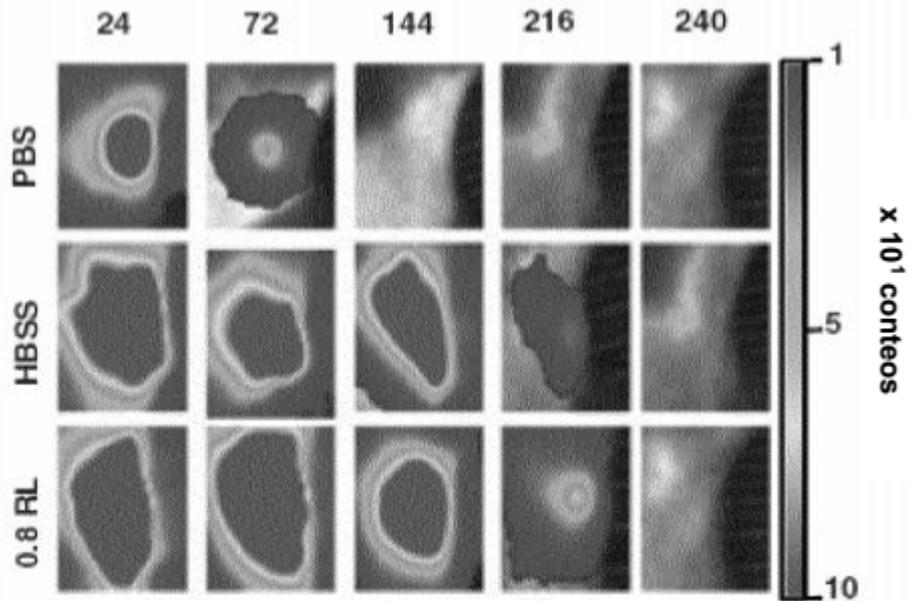


Figura 10 (continuación)

C

Horas después de la administración intranodal del ARNm de FLuc

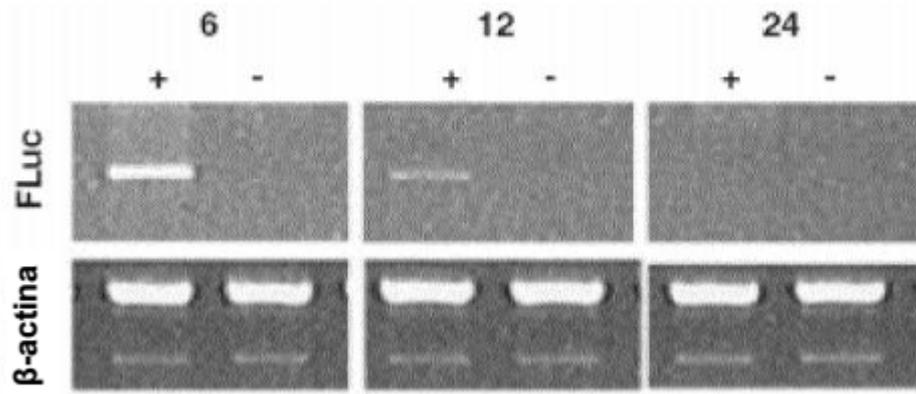


Figura 10

F

PBS	+	-
GM-CSF	-	+
ARNm de FLuc	+	+

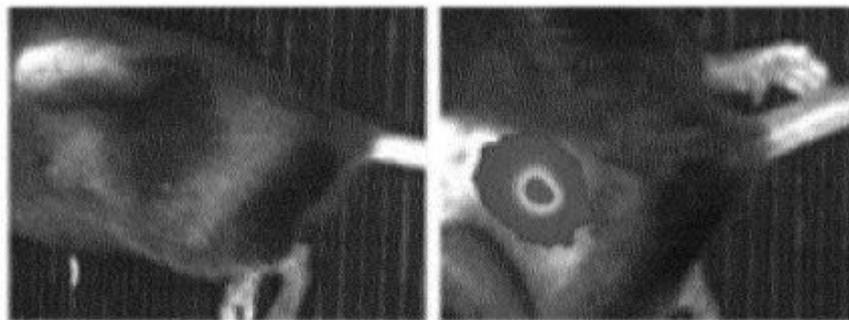
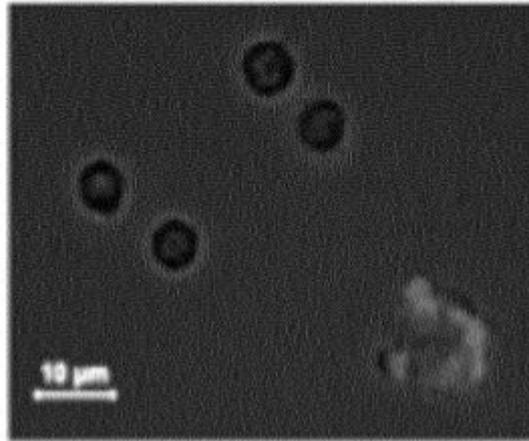


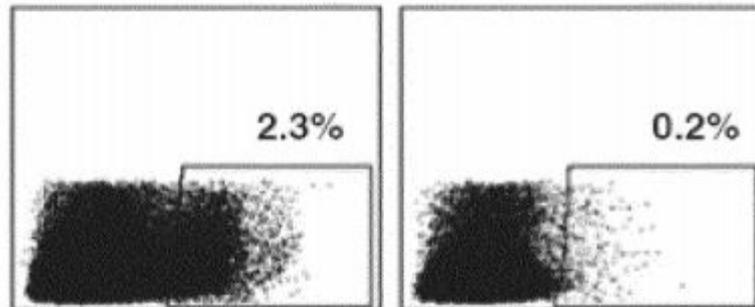
Figura 10 (continuación)

D



E

PBS	+	-
Toxina diftérica	-	+
ARNm de FLuc	+	+



→
CD11c

Figura 11

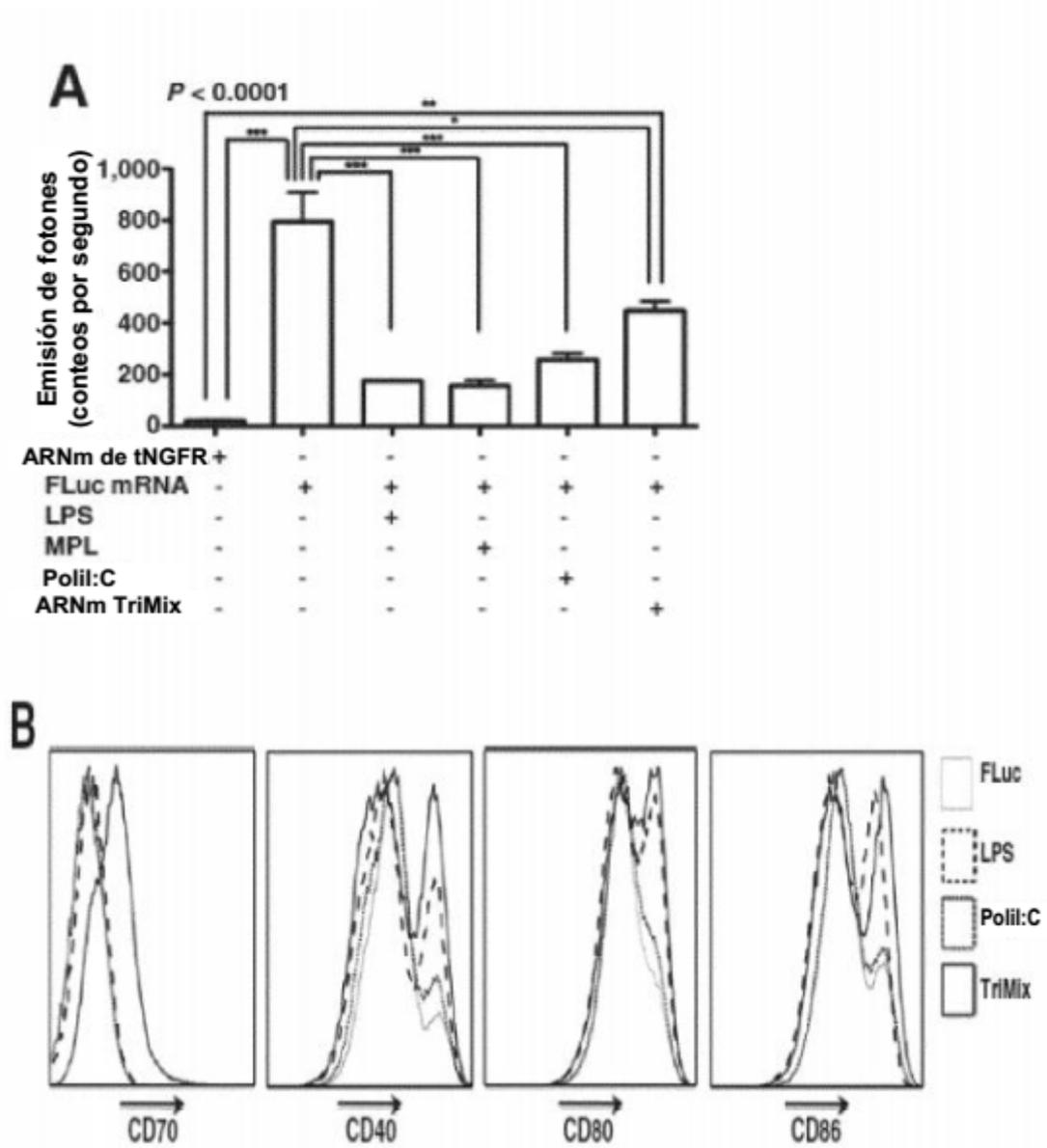


Figura 11 (continuación)

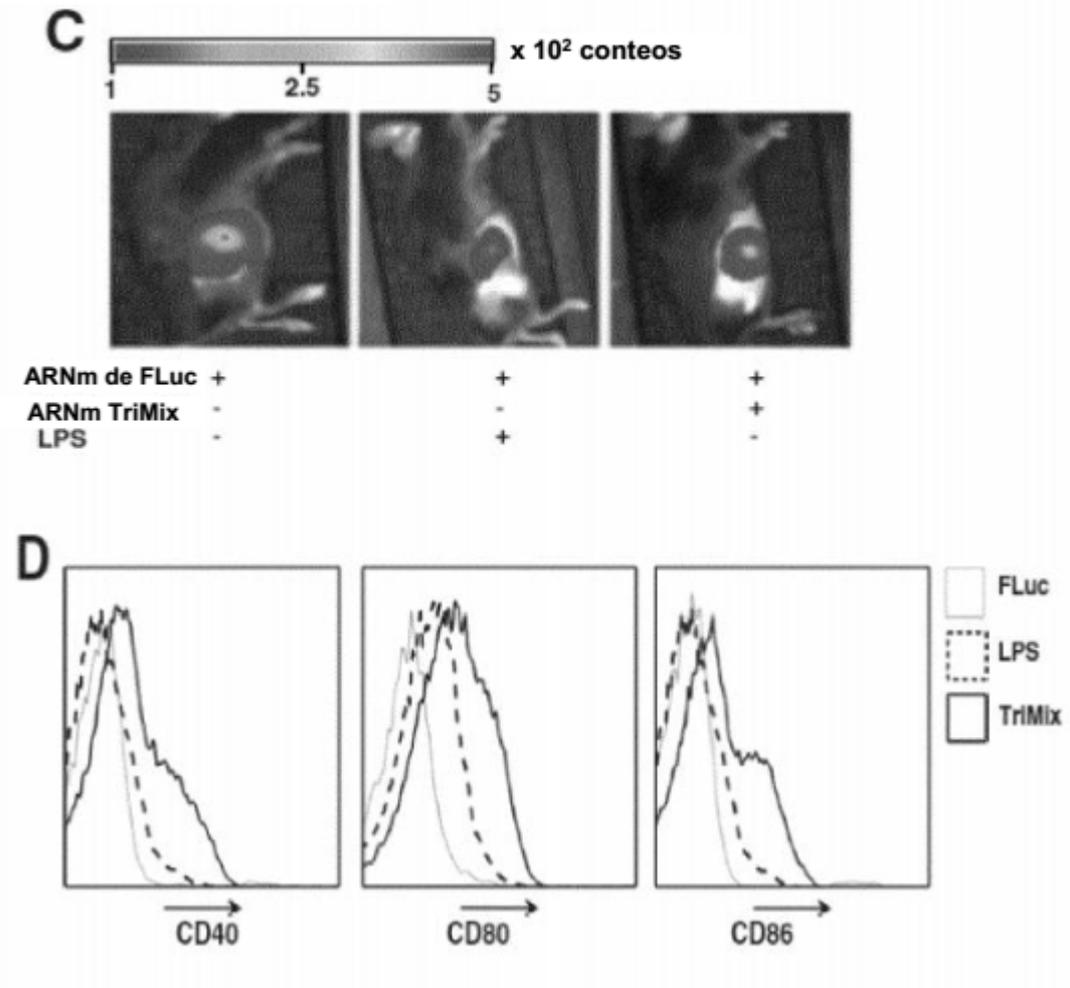


Figura 12

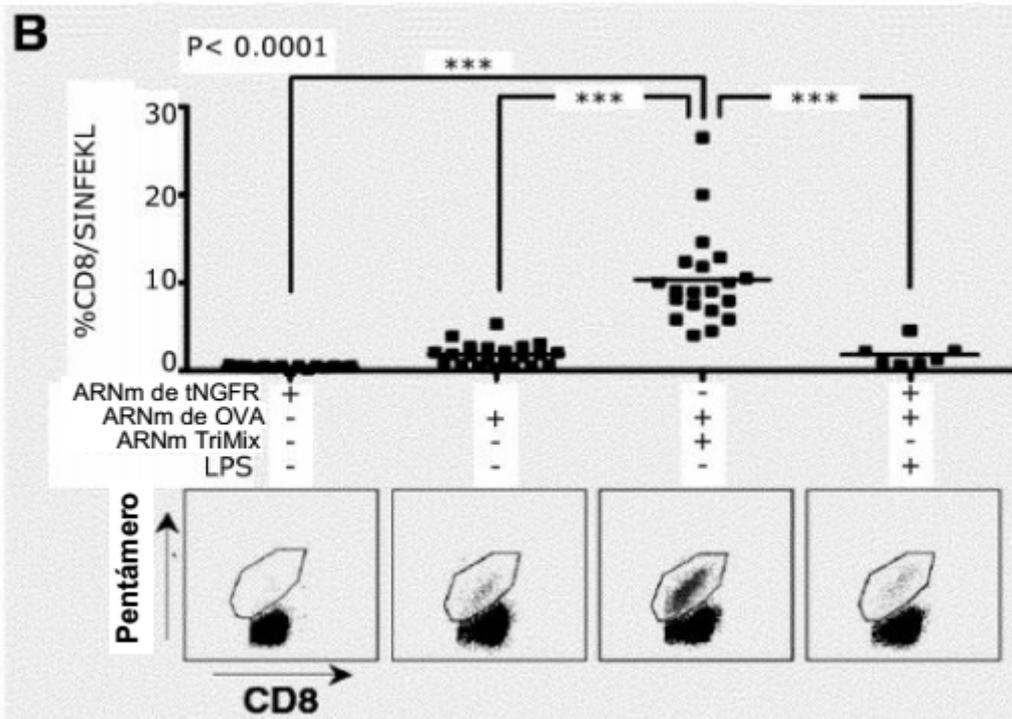
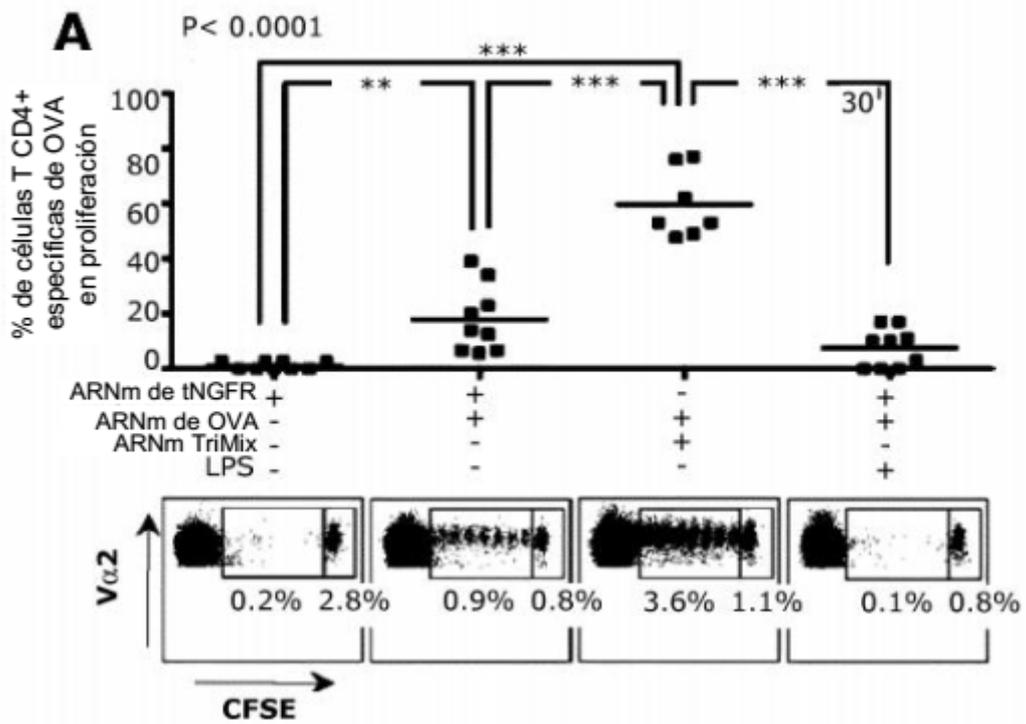


Figura 12 (continuación)

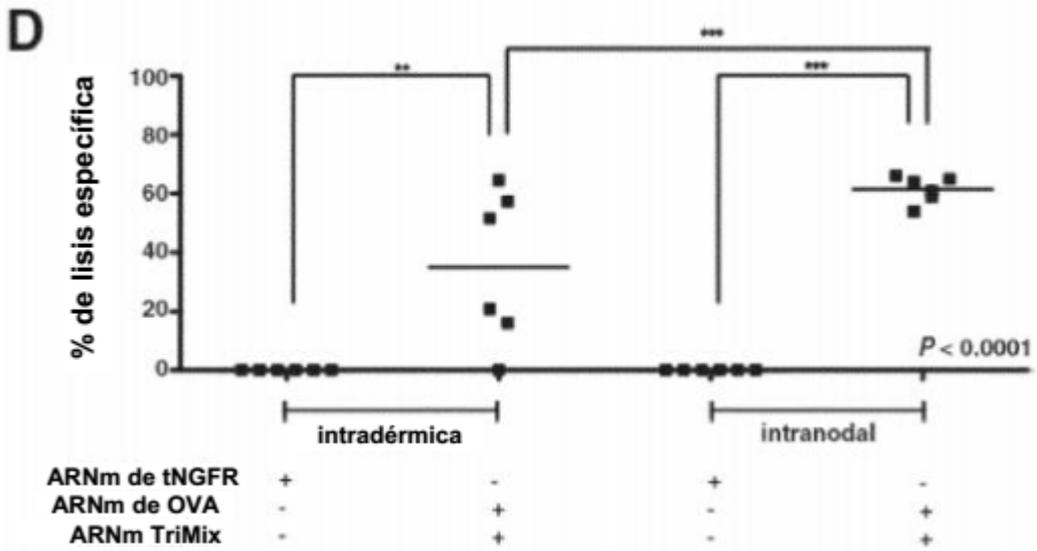
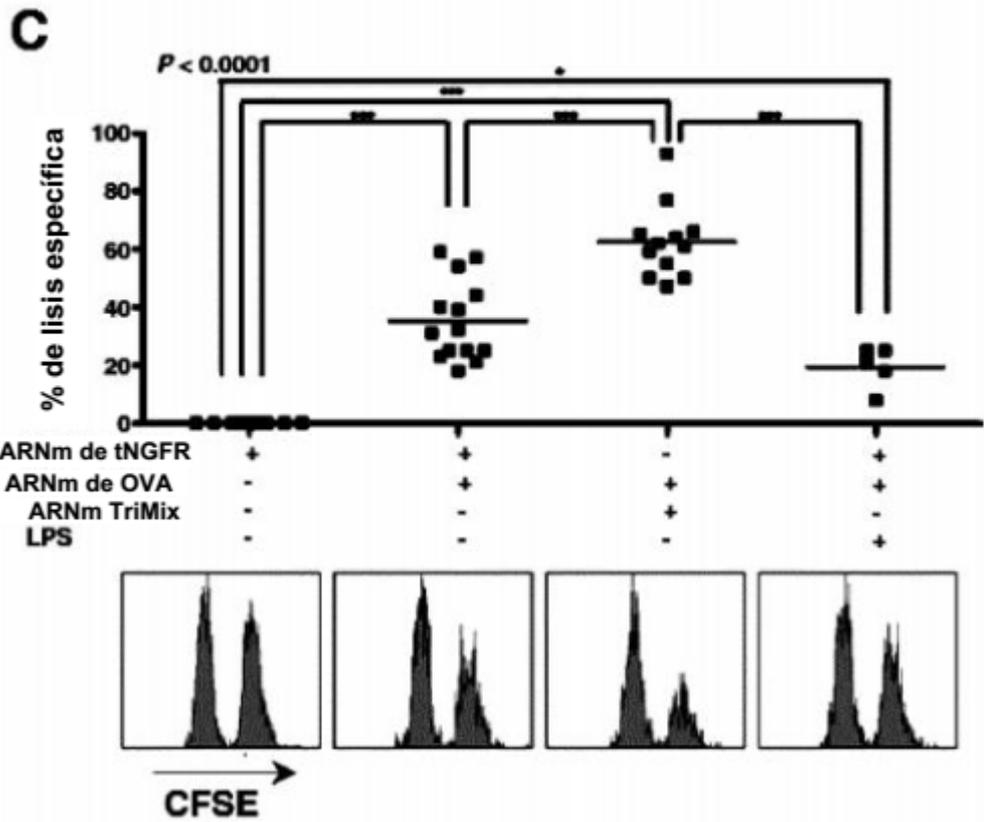


Figura 13

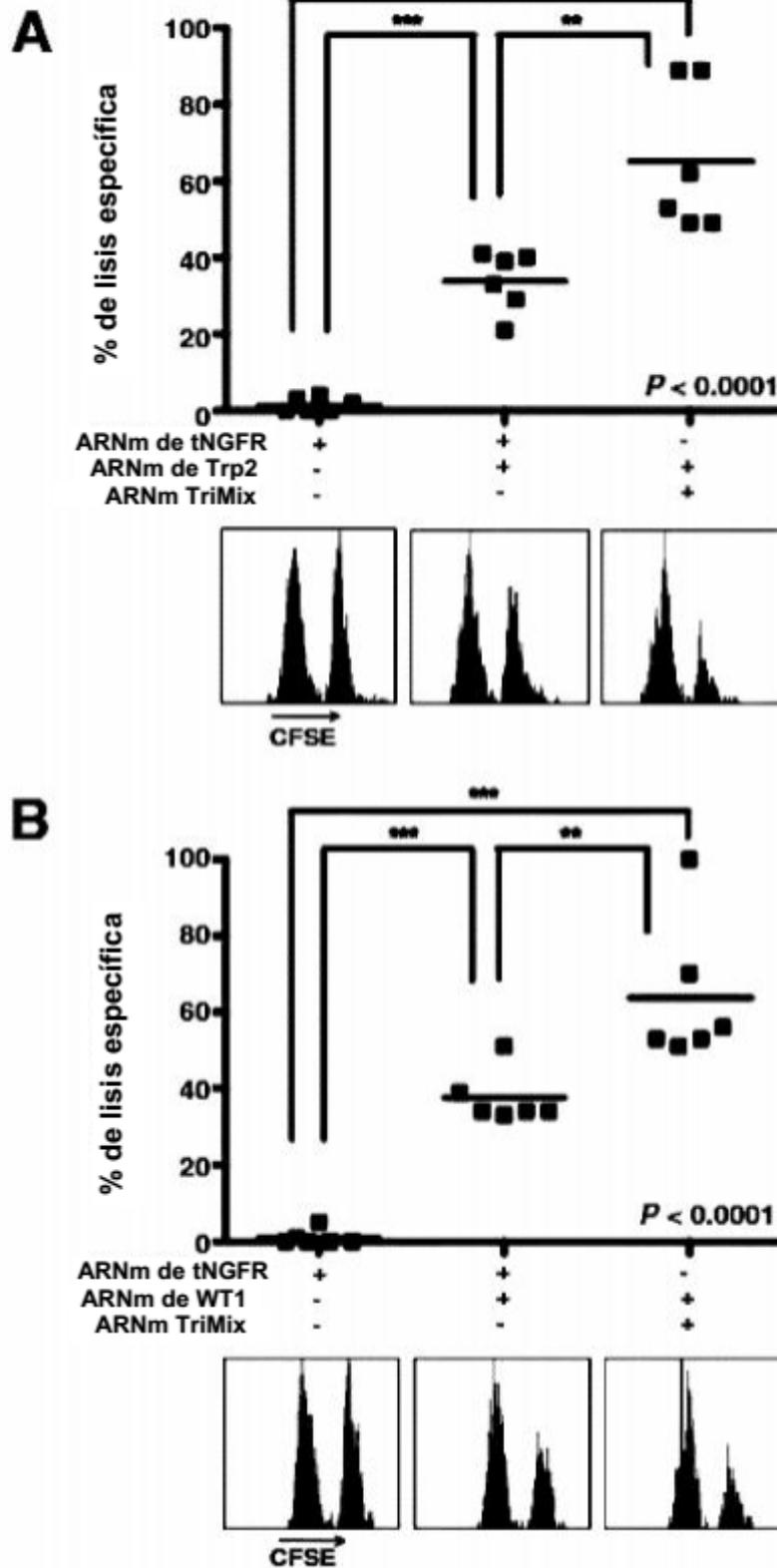


Figura 13 (continuación)

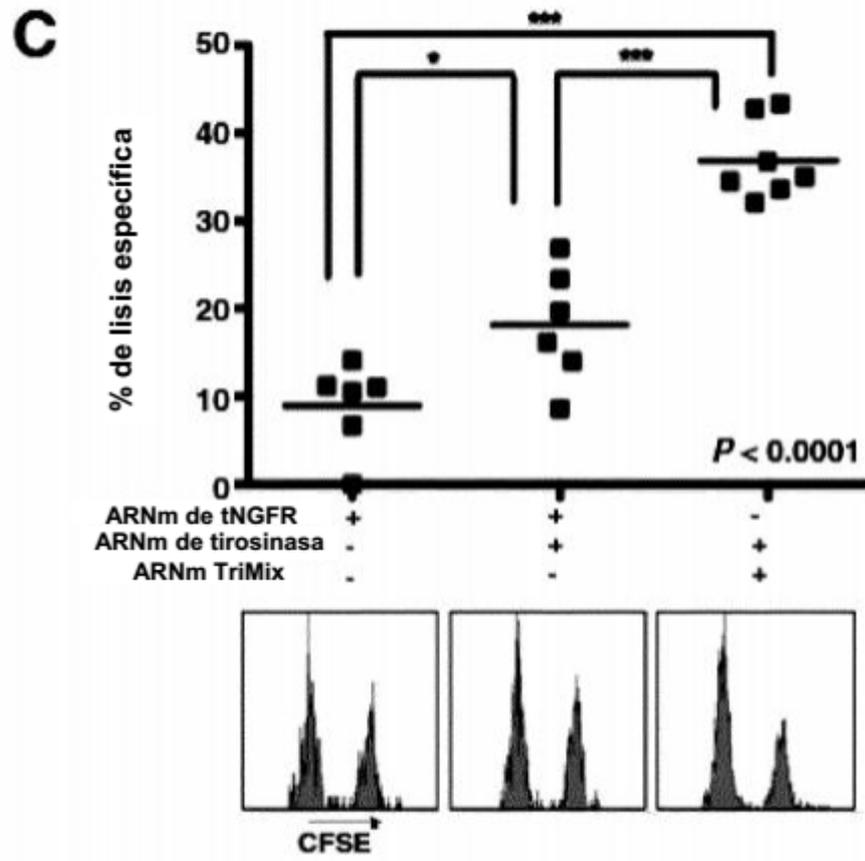


Figura 14

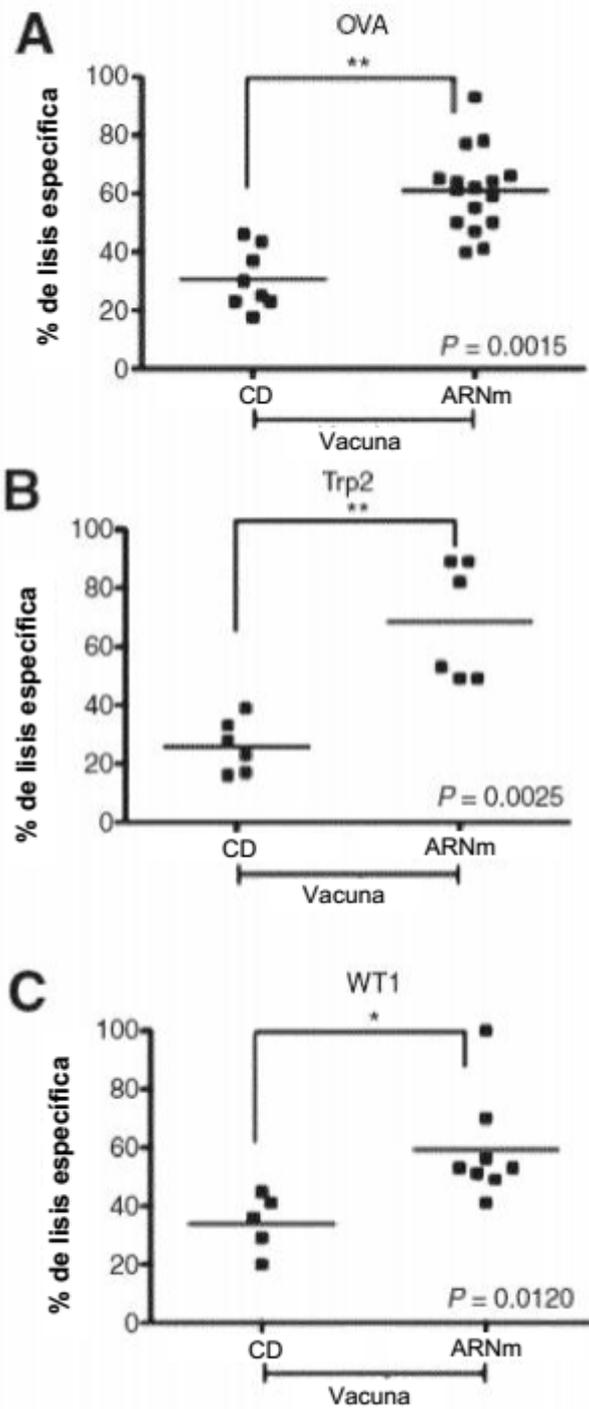


Figura 14 (continuación)

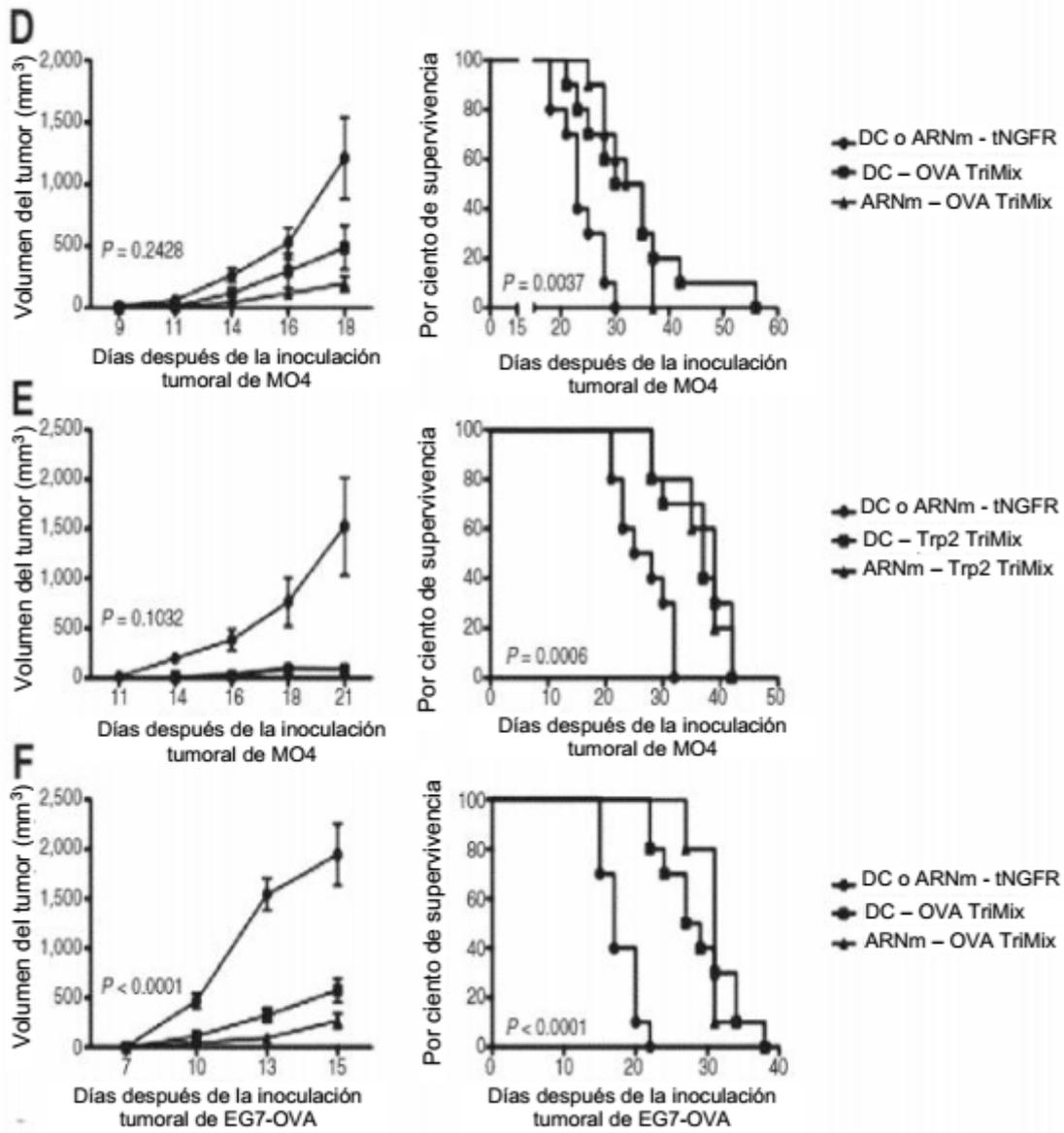


Figura 14 (continuación)

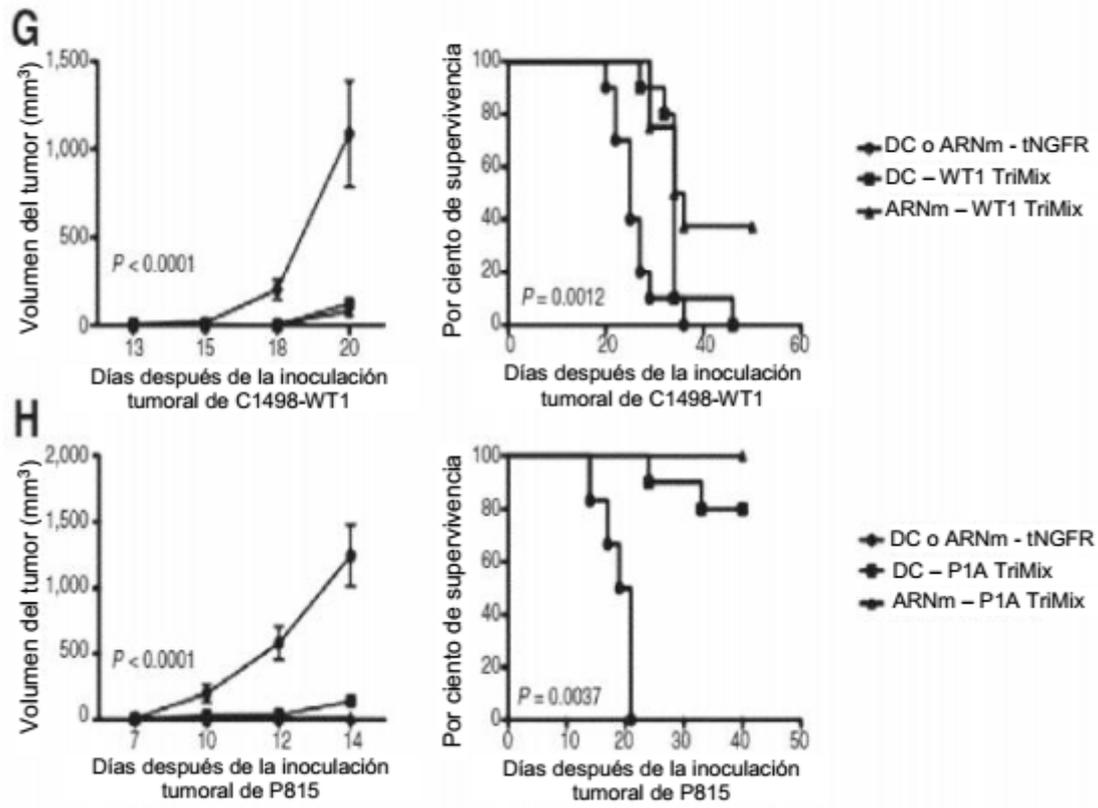
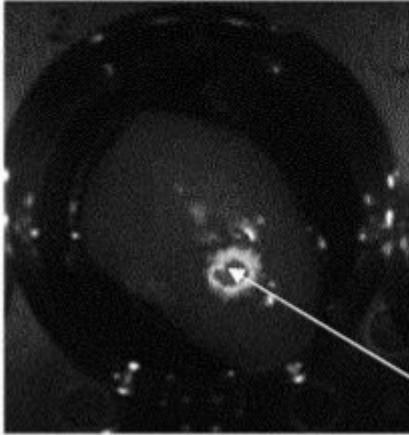
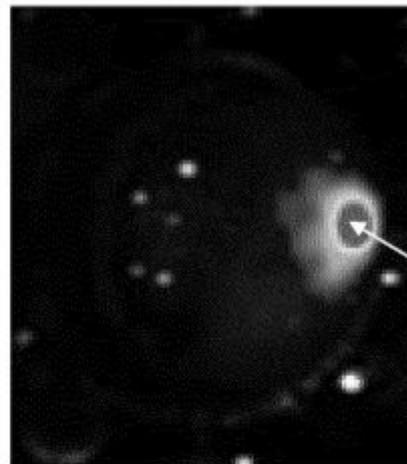
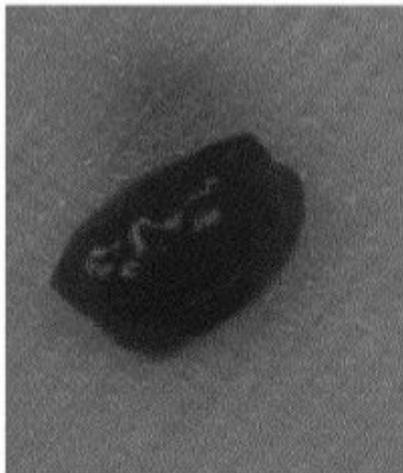


Figura 15 A



Alta expresión
del ARNm de
FLuc

Figura 15 B



Alta expresión
del ARNm de
FLuc

Figura 16 A



TriMix

pp65 de CMV-TriMix

Figura 16 B

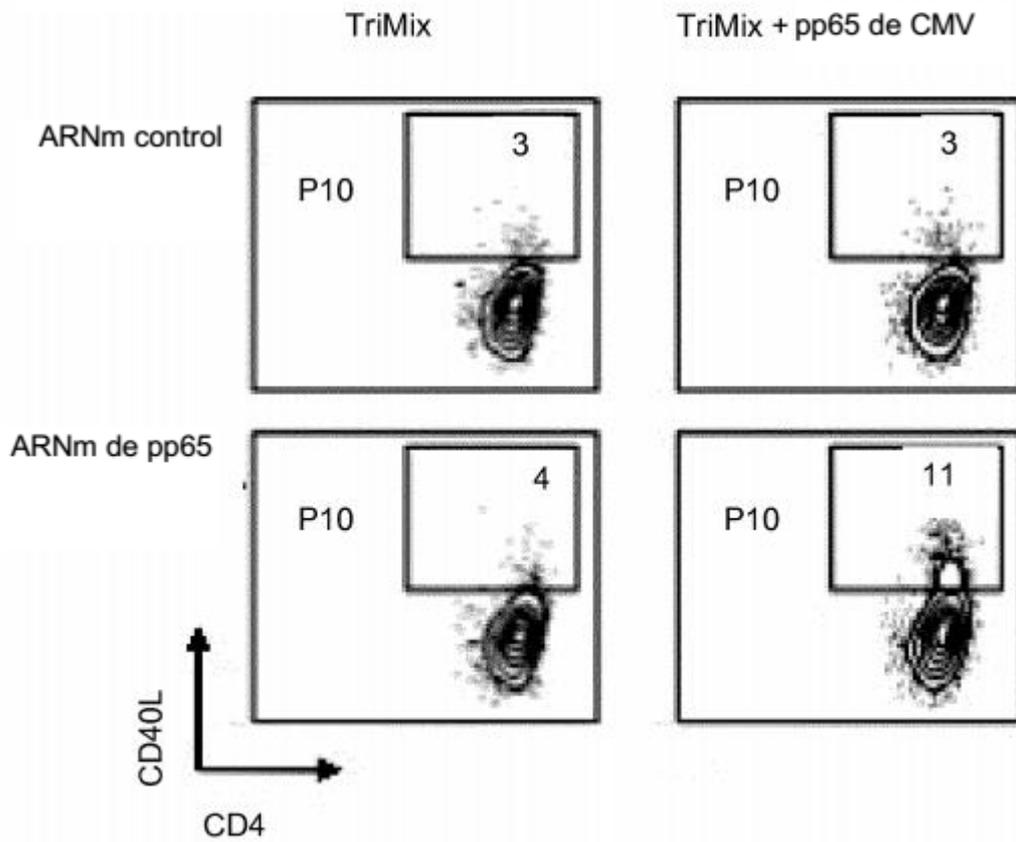


Figura 17

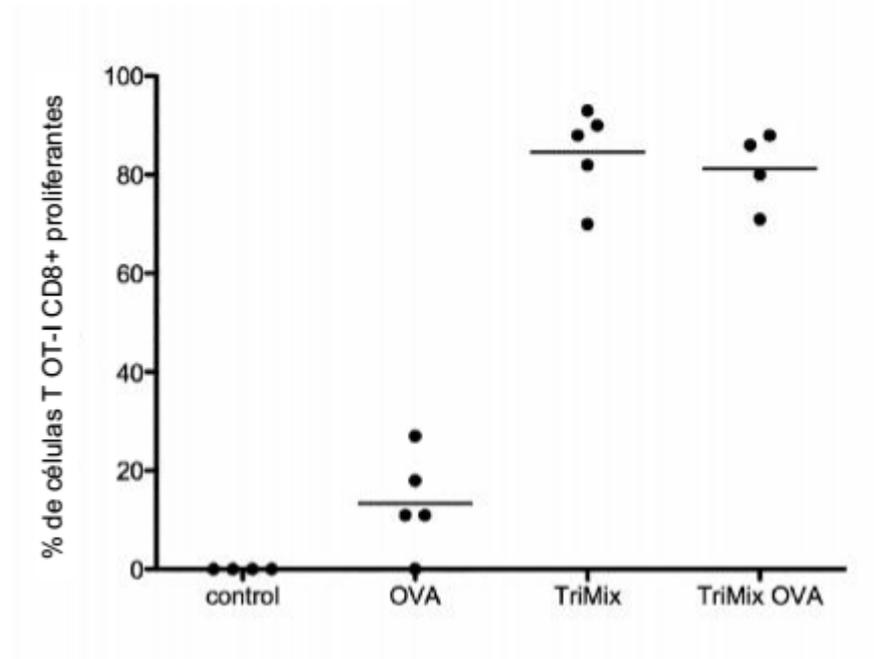


Figura 18 A

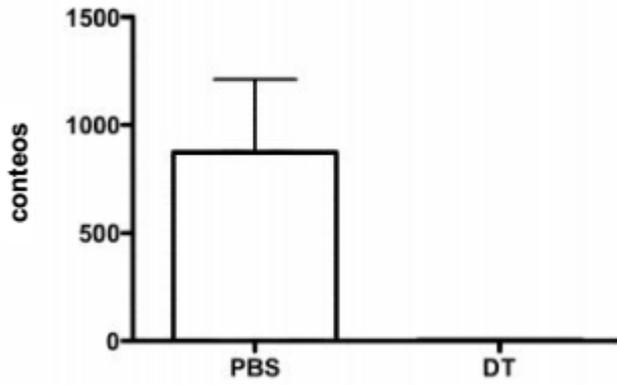


Figura 18 B

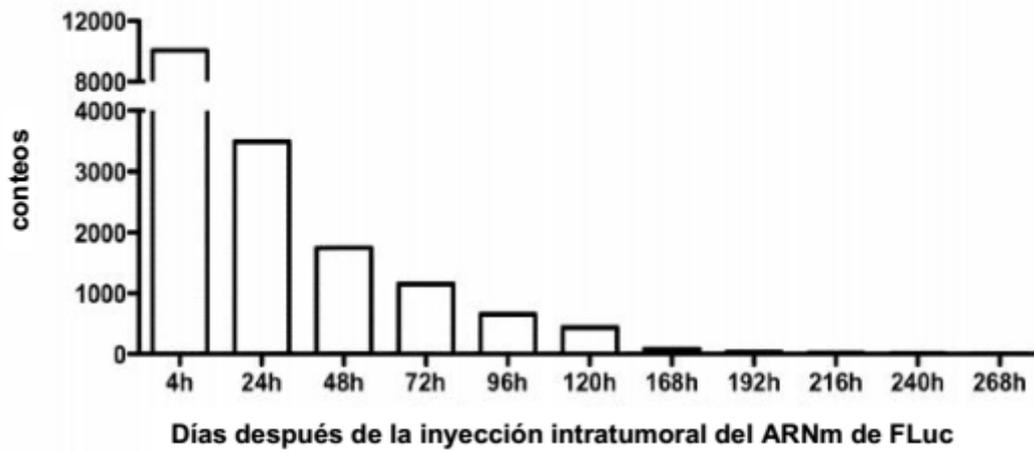


Figura 19

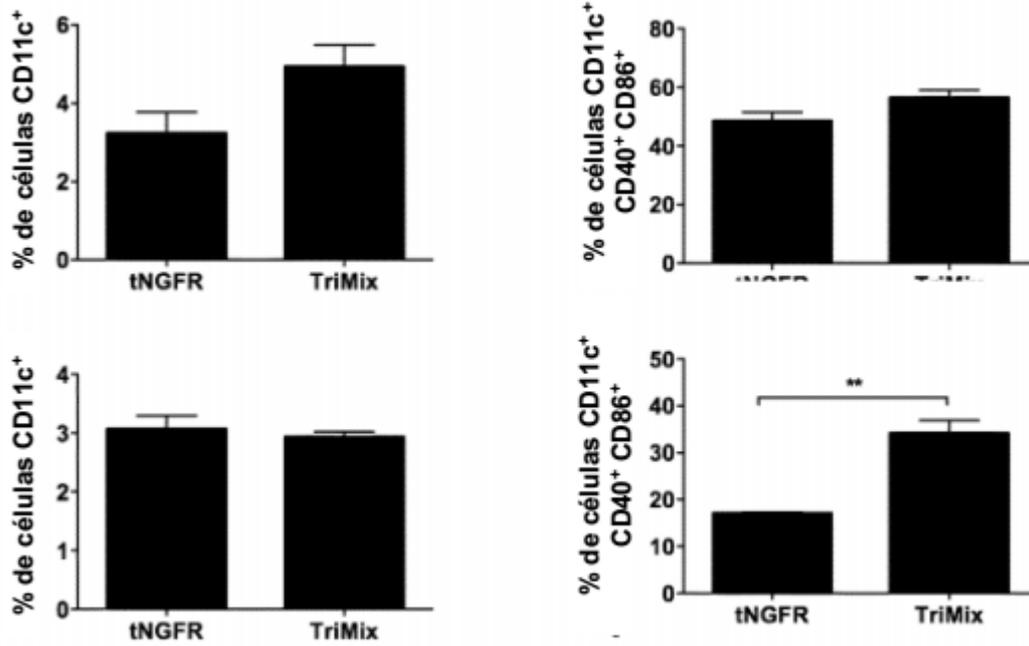


Figura 20

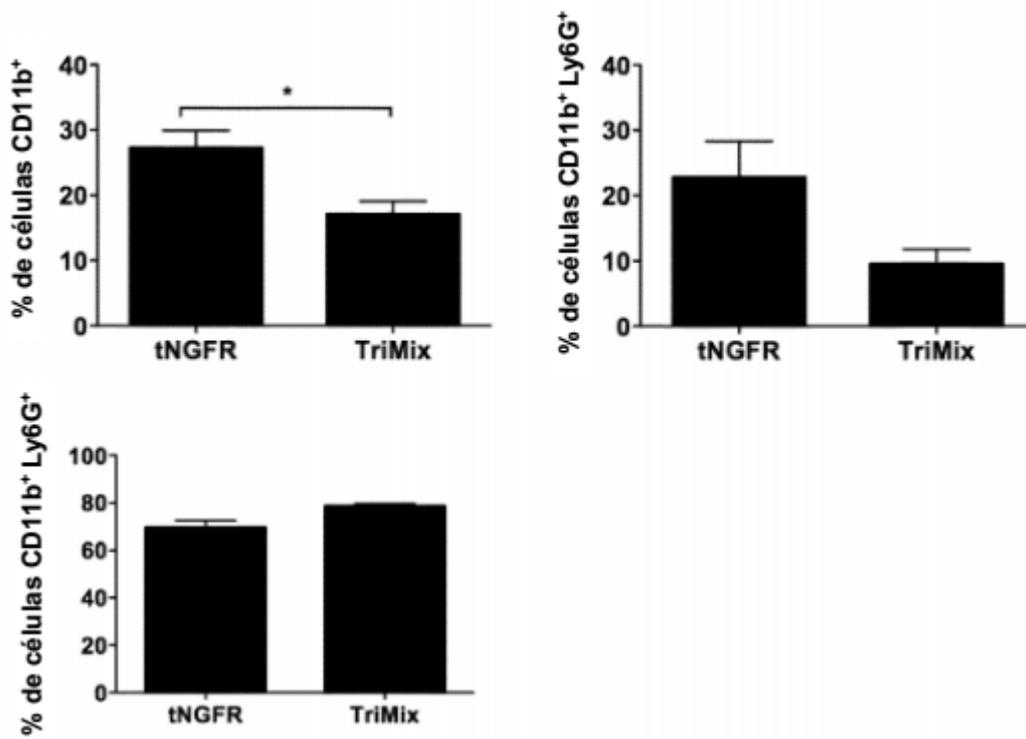


Figura 21

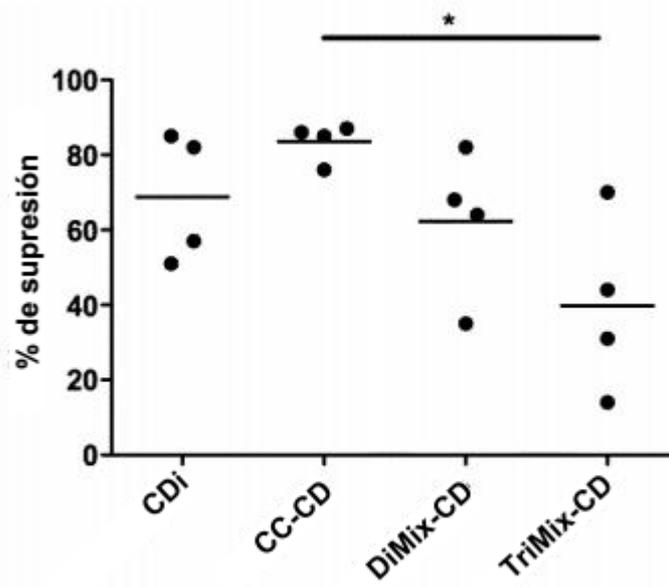


Figura 22

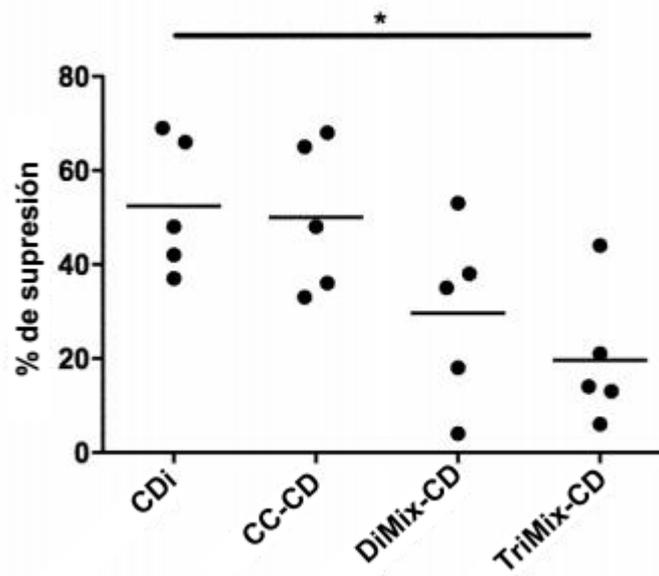


Figura 23

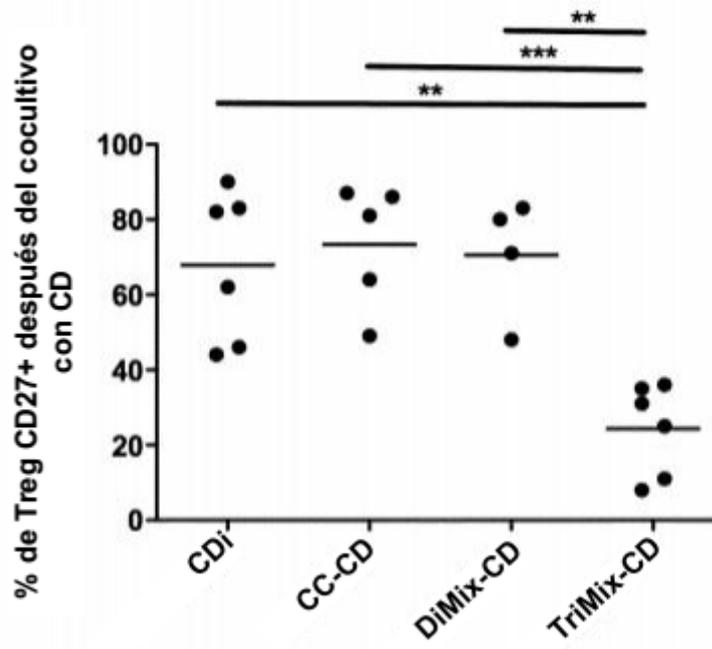


Figura 24A

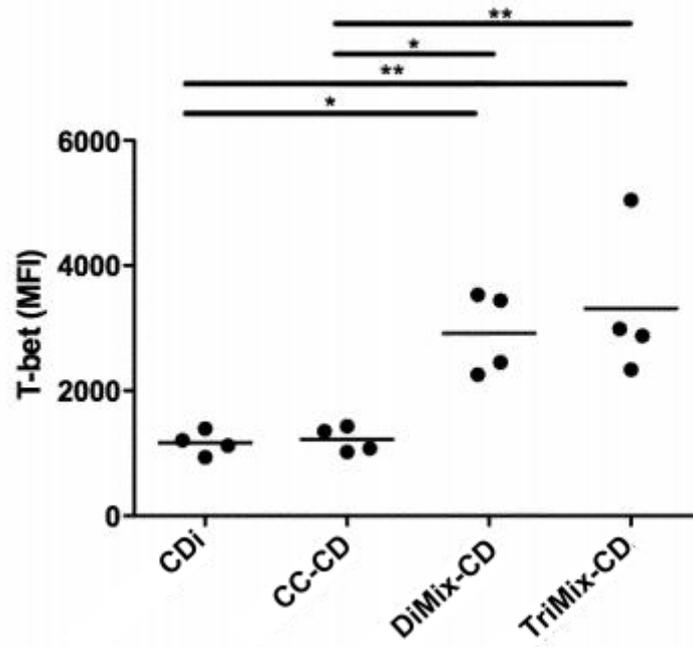


Figura 24B

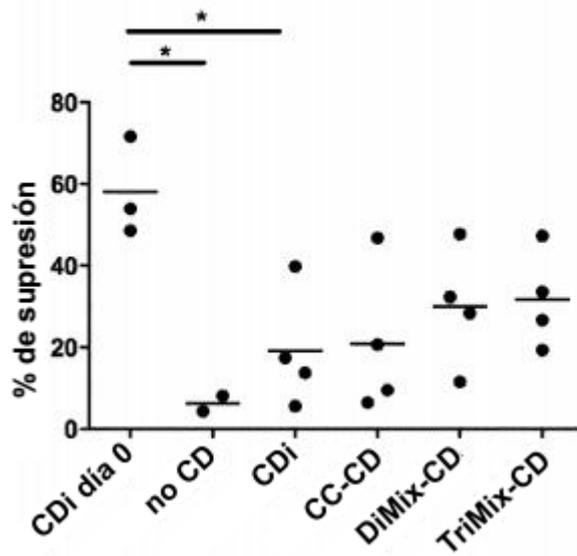


Figura 24C

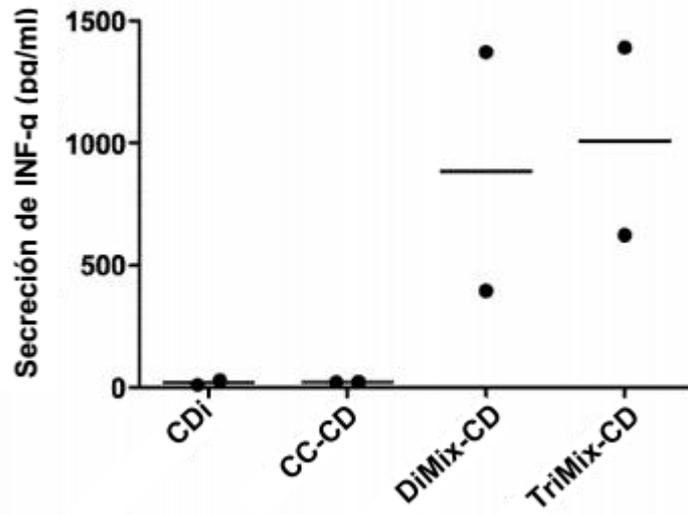
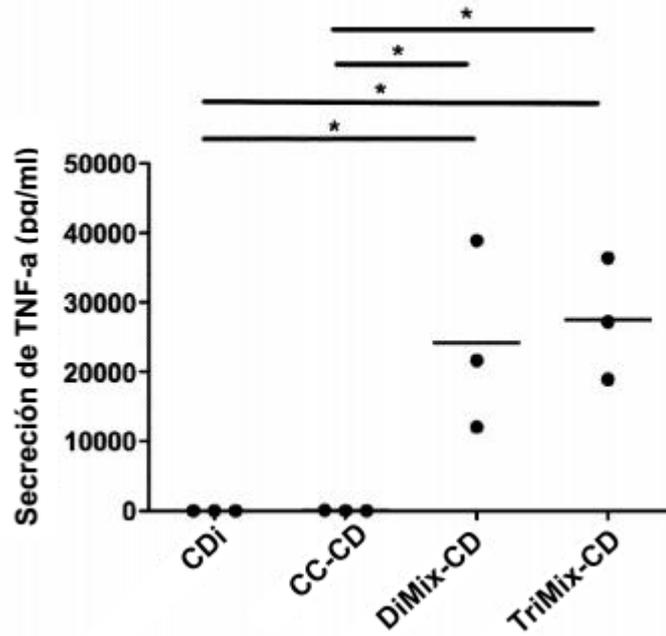


Figura 24D



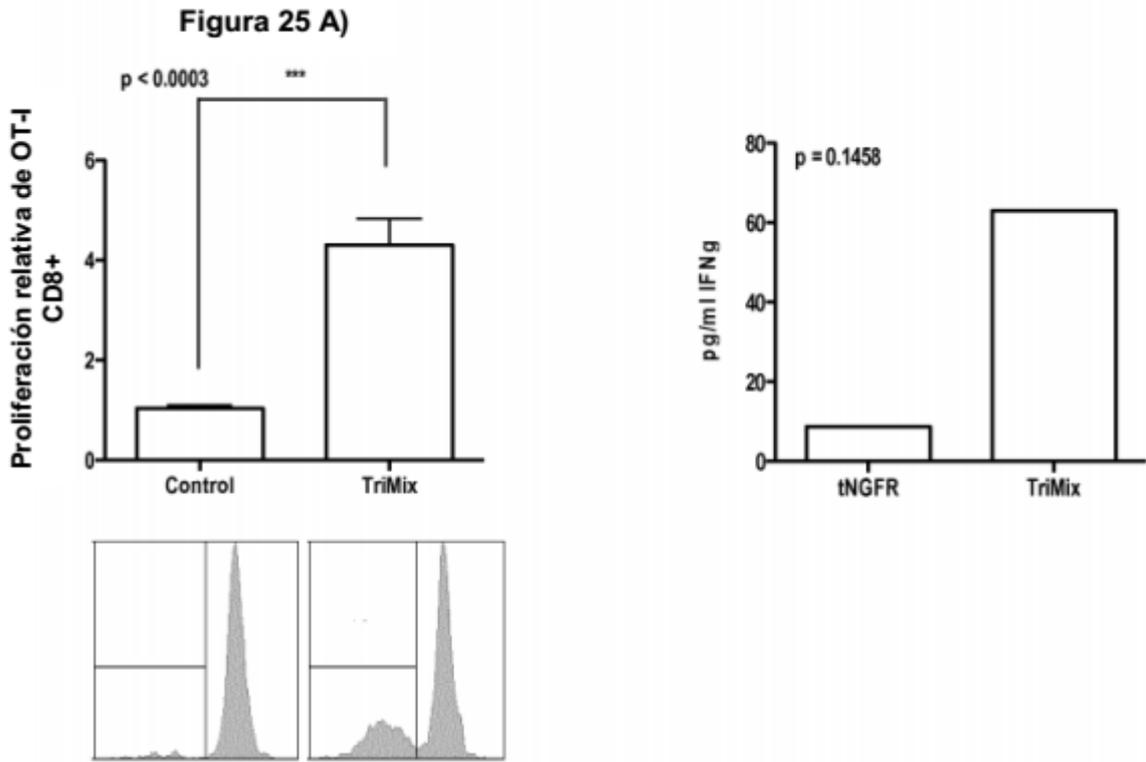


Figura 25 B)

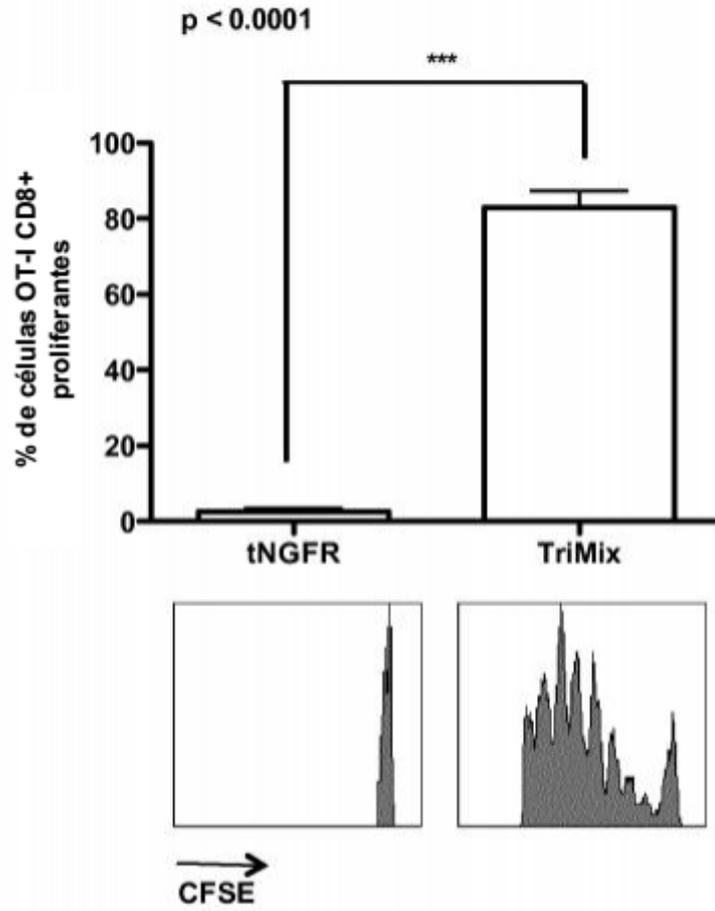


Figura 25 C)

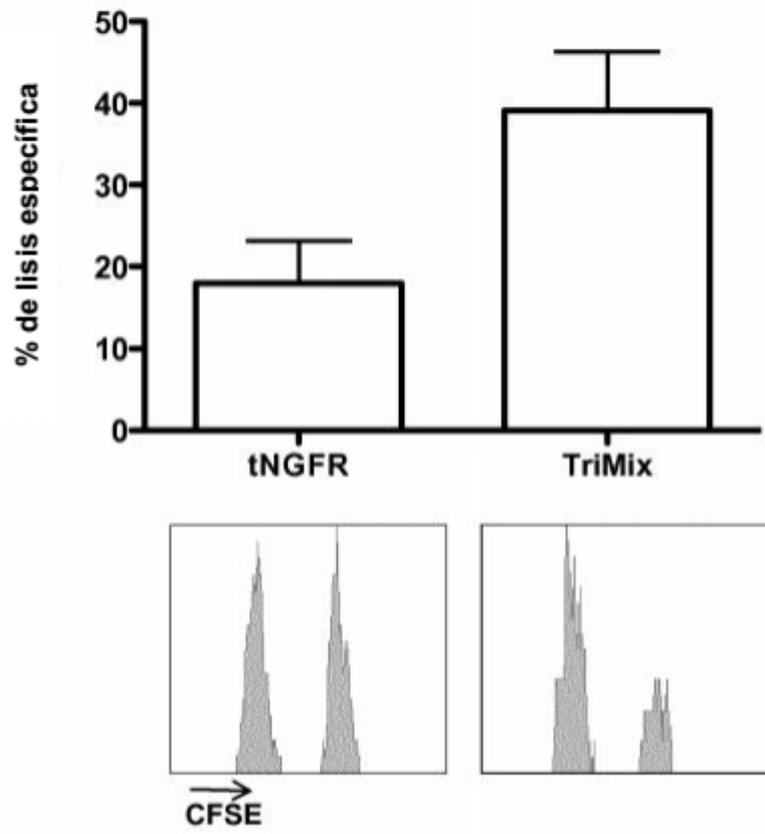


Figura 26 A)

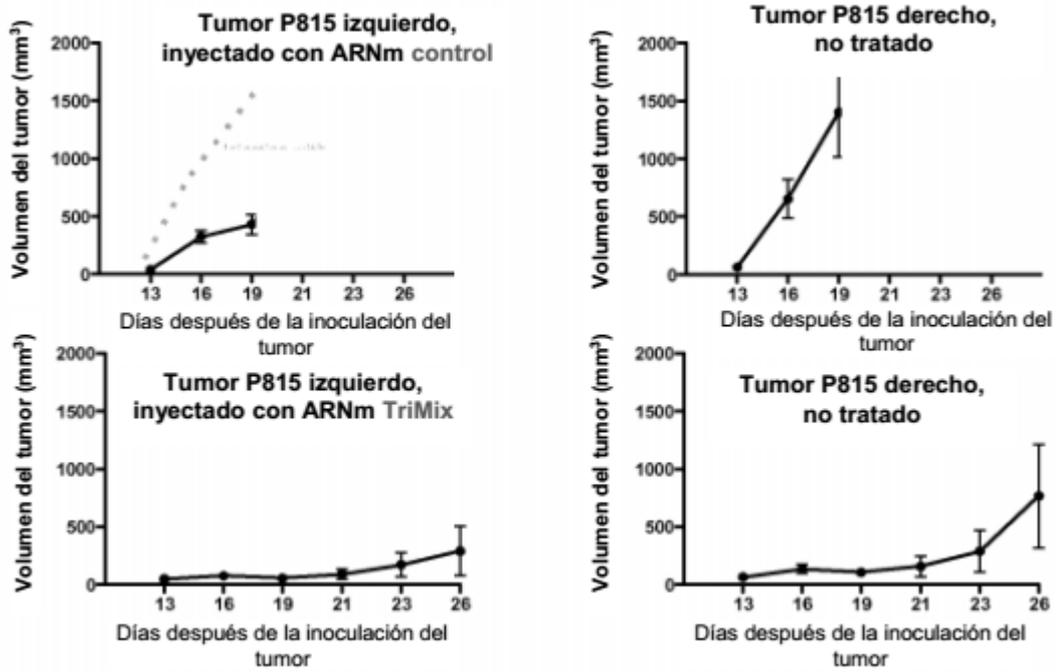


Figura 26 B)

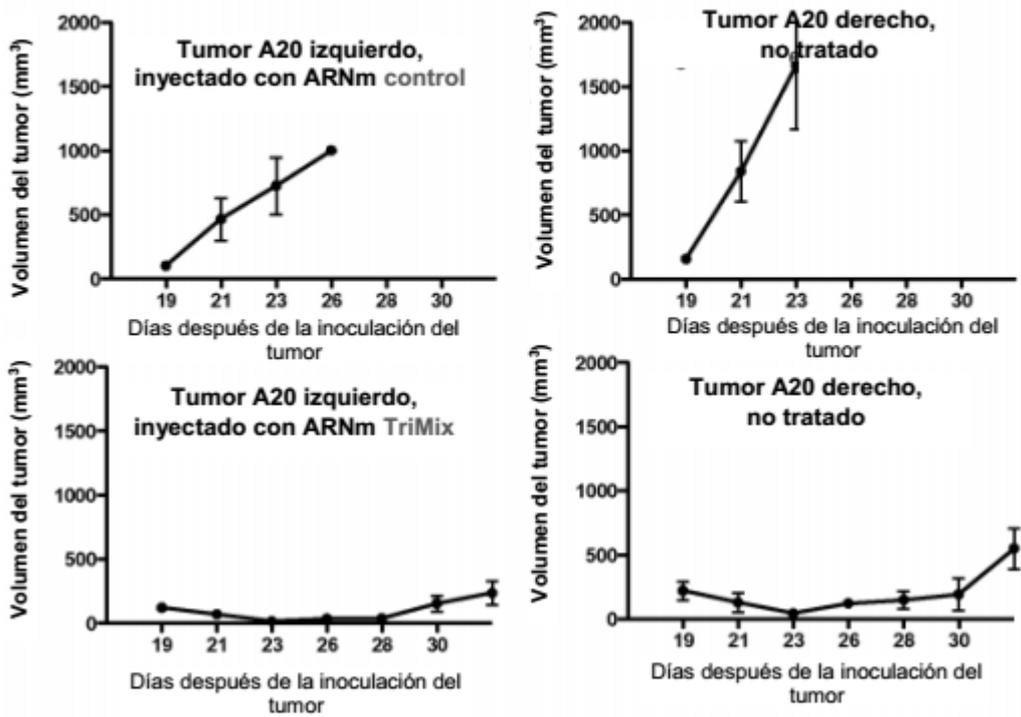


Figura 27

