

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 761**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/02** (2006.01)

**A61K 47/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2008 PCT/EP2008/060492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2009 WO09019317**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2008 E 08787072 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2185164**

54 Título: **Composición y vacuna antitumoral terapéutica**

30 Prioridad:

**08.08.2007 FR 0705767**  
**09.08.2007 US 954917 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.01.2018**

73 Titular/es:

**ERYTECH PHARMA (100.0%)**  
**60 AVENUE ROCKEFELLER**  
**69008 LYON, FR**

72 Inventor/es:

**GODFRIN, YANN y**  
**BANZ, ALICE**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

**ES 2 649 761 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

Composición y vacuna antitumoral terapéutica

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a una composición que induce, en un huésped, una respuesta citotóxica para propósitos antitumorales, y también a una vacuna antitumoral terapéutica que contiene esta composición.
- 10 **[0002]** La respuesta inmune natural contra los antígenos tumorales es relativamente ineficaz y se han identificado diversos mecanismos que permiten que los tumores escapen de la respuesta inmune antitumoral. Los enfoques de vacunas convencionales generan respuestas humorales que demuestran ser insuficientes.
- 15 **[0003]** Se han estudiado estrategias dirigidas a desarrollar una respuesta citotóxica basada en células presentadoras de antígeno (APC), en particular basadas en células dendríticas. El principio consiste en destruir específicamente las células cancerosas de un paciente mediante la estimulación de las defensas inmunes del propio paciente.
- 20 **[0004]** Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno (APC) que son muy eficaces en la generación de efectores citotóxicos específicos para las células tumorales. Son capaces de fagocitar células apoptóticas o cuerpos apoptóticos que se originan de células tumorales y, a continuación, de presentar los antígenos tumorales, en asociación con moléculas MHC de clase I y II, a los linfocitos T. Por lo tanto, la célula dendrítica es capaz de iniciar la proliferación y la generación de un clon de linfocitos T citolíticos específicos. Al final de esta reacción, los linfocitos destructores así diferenciados abandonan el compartimiento linfóide para circular en el organismo y se unen en el tumor. El reconocimiento de los antígenos expresados por un tumor induce entonces una señal lítica y provoca la destrucción de las células tumorales.
- 25 **[0005]** Se han estudiado varias estrategias de vacunas contra el cáncer dirigidas a las células dendríticas (Eymard JC, Bernard J, Cancer Bull 2003, 90 (8-9): 734-43). Algunas se basan en la manipulación de las células dendríticas in vitro, y otras se basan en la estimulación de las células dendríticas in vivo. En el primer caso, las células dendríticas se diferencian de células sanguíneas tomadas del paciente: se cultivan y maduran, "se pulsan", es decir, estimulan, ex vivo con péptidos tumorales, lisados tumorales, células tumorales apoptóticas, o proteínas de choque térmico extraídas de tumores autólogos, y finalmente se reinyectan en el paciente. En el segundo caso, la estimulación de las células dendríticas se lleva a cabo después de la inyección, en el paciente, de péptidos, proteínas, células tumorales irradiadas o bien los virus que contienen el péptido antigénico que reconoce las células dendríticas. Sin embargo, la respuesta citotóxica obtenida rara vez se acompaña de eficacia clínica. La activación de la célula dendrítica "condiciona" su capacidad para activar eficazmente el linfocito T citolítico. El nivel de activación de las células dendríticas parece ser un punto delicado en esta estrategia de vacunación.
- 30 **[0006]** El uso de células dendríticas ex vivo para la obtención de una vacuna antitumoral plantea un cierto número de cuestiones sobre: el estado de maduración de las células dendríticas, el número de células a inyectar, la ruta, el sitio y la frecuencia de la inyección para la producción de células dendríticas capaces de migrar a los órganos linfoides secundarios y de inducir una respuesta citotóxica T efectiva (Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G. [las células dendríticas como vectores para terapia] Cell. 2001, 10, 106 (3):. 271-4).
- 35 **[0007]** La activación de las células dendríticas in vivo está, por su parte, limitada por la capacidad inmunógena débil de antígenos tumorales y la dificultad en la activación de las células dendríticas a un nivel suficiente.
- 40 **[0008]** El uso de glóbulos rojos como portadores para transportar antígenos, encapsulados en los glóbulos rojos o unidos a su superficie, y liberados a las APC se ha previsto en varias publicaciones. Las respuestas inmunes desencadenadas han sido investigadas in vitro e in vivo.
- 45 **[0009]** Hamidi et al. han descrito recientemente la encapsulación de BSA (albúmina de suero bovino) como un modelo de un antígeno en glóbulos rojos humanos (Hamidi M et al, Drug Deliv, 2007; 14 (5): 295-300 y Int J Pharm, 2007, 29, 338 (1-2): 70-8). Los autores sugirieron el uso de glóbulos rojos como un vector para la presentación de antígenos a APC del sistema reticuloendotelial (RES). En otra revisión publicada por Hamidi et al. (Control J. Release, 2007, 118 (2): 145-60), los autores indicaron que se han estudiado un cierto número de estrategias para promover el reconocimiento de RES, siendo dicho reconocimiento promovido por el envejecimiento de los glóbulos rojos, lo que conduce a su absorción para la lisis. Se mencionaron otras rutas, tal como la exposición de los glóbulos rojos a agentes estabilizantes, en particular agentes de reticulación, recubrimiento de los glóbulos rojos con anticuerpos anti-Rh, de tipo IgG para dirigirse al bazo o de tipo IgM para dirigirse al hígado, choque térmico o la exposición a agentes oxidantes, enzimas o antibióticos.
- 50 **[0010]** Una respuesta inmunitaria humoral se puede obtener in vivo después de la inmunización con glóbulos rojos cargados con antígeno. El estudio llevado a cabo por Murray et al. hizo posible detectar, en ratones, inmunoglobulinas IgG después de la inyección intravenosa de glóbulos rojos murinos cargados con uno de los cuatro antígenos siguientes: KLH (hemocianina de lapa californiana), BSA (albúmina de suero bovino), CTB (subunidad B de toxina del cólera) y ADA (adenosina desaminasa bovina). La detección de IgG1 e IgG3, que son los isotipos de inmunoglobulinas predominantes durante una respuesta Th2, y de IgG2, isotipo de inmunoglobulina que
- 55
- 60
- 65

es un marcador para una respuesta Th1, sugerirían la implicación de ambos tipos de respuestas inmunitarias, la respuesta humoral y la respuesta celular (Murray AM et al, Vaccine, 2006 28, 24 (35-36): 6129-39).

5 [0011] Otra formulación de antígenos usada con glóbulos rojos ha sido probada por Dominici et al. La proteína Tat del virus VIH-1 se ancló a la superficie de glóbulos rojos de ratón por medio de acoplamiento de avidina/biotina. La inmunización de los ratones mediante inyección intraperitoneal con esta formulación de antígeno, internalizada por células dendríticas, desencadenó una respuesta inmune mediada por humoral in vivo. La caracterización de isotipo de las inmunoglobulinas detectadas indica la inducción de respuestas Th1 y Th2. La actividad citotóxica anti-Tat se demostró in vitro, mediante la técnica de liberación de cromo convencional, para los ratones tratados con glóbulos rojos acoplados a los antígenos (Dominici S et al., Vacunas., 2003 16, 21 (17-18): 2073-81).

15 [0012] Una respuesta celular ha sido demostrada in vitro por Corinti et al. con la misma formulación. Se demostró la fagocitosis de los glóbulos rojos conjugados con proteína Tat, por las células dendríticas derivadas de monocitos humanos, al igual que la inducción de respuestas de CD4+ y CD8+. Además, la maduración de las células dendríticas en presencia de interferón gamma promovió la respuesta inmune de tipo I (Corinti S. et al, Leukoc Biol 2002, 71 (4): 652-8).

20 [0013] Boberg et al. inyectaron ratones por vía intraperitoneal con una vacuna constituida de péptidos derivados de la proteasa de VIH-1 anclada en la superficie de los glóbulos rojos de ratón por medio del sistema avidina/biotina. Modificaron químicamente los glóbulos rojos con el objetivo de promover su reconocimiento por las APC, pero se obtuvo una reacción inmune débil. Llegaron a la conclusión de que la pequeña cantidad de antígenos liberada, debido a la carga limitada de glóbulos rojos con péptidos antigénicos y el volumen de sangre inyectada, no fue compensada por la modificación química de los portadores que supuestamente promovían el reconocimiento del antígeno por APC (Boberg A. et al., Infect Agents Cancer, 2007, 182: 9).

25 [0014] La presente invención se dirige a proporcionar composiciones y vacunas que pueden ser utilizadas en el tratamiento de cánceres, de acuerdo con un enfoque de inmunoterapia.

30 [0015] Un objetivo de la invención es por lo tanto una composición como se define en la reivindicación 1.

[0016] El término "huésped" se refiere preferentemente a los seres humanos, pero también a animales, en particular animales de compañía (especialmente perros o gatos) y animales para el deporte (especialmente caballos).

35 [0017] Según la invención, los glóbulos rojos contienen, es decir, encapsulan, el antígeno, lo que significa que el antígeno está o está esencialmente dentro de los glóbulos rojos.

40 [0018] Dichos glóbulos rojos preferiblemente se diseñan, seleccionan o modifican a fin de promover la fagocitosis de los mismos por las APC, y más particularmente por las células dendríticas. En particular, dichos glóbulos rojos se diseñan, seleccionan o modifican a fin de promover la fagocitosis de los mismos en el bazo y el hígado, siendo el objetivo esencial reconocer las APC del bazo.

45 [0019] En una realización preferida, las composiciones según la invención comprenden glóbulos rojos que contienen el antígeno y se dirigen al bazo. La composición promueve la fagocitosis de estos glóbulos rojos por las APC, en particular las células dendríticas, en el bazo.

50 [0020] De acuerdo con una primera realización, los glóbulos rojos contienen un antígeno tumoral y están en forma de un complejo inmune con una inmunoglobulina que reconoce un epítipo en la superficie de dichos glóbulos rojos para promover la fagocitosis de dichos glóbulos rojos, en particular, por las células dendríticas. La composición también hace que sea posible promover la fagocitosis por los macrófagos. Preferiblemente, la inmunoglobulina es una inmunoglobulina G.

55 [0021] La formación del complejo inmune implica glóbulos rojos y al menos un anticuerpo, preferiblemente del subtipo IgG. Las células dendríticas tienen, en su superficie, receptores para la región Fc constante de las inmunoglobulinas G (IgG). Estos receptores son capaces de desencadenar la fagocitosis o la internalización de los complejos inmunes antígeno-IgG así formados y de promover la presentación de antígenos por moléculas MHC clase I y II, lo que da lugar a la generación de linfocitos auxiliares CD4+ y especialmente linfocitos citotóxicos CD8+ (A. Regnault et al, J. Exp Med, Janvier 1999, 189 (2): 371-80).

60 [0022] Como anticuerpos que son adecuados, se puede hacer mención de anticuerpos anti-rhesus, anticuerpos anti-glicoforina A y anticuerpos anti-CD1 (CR1 = receptor de complemento tipo 1). Los anticuerpos anti-glicoforina A (A. Bigbee et al., Mol. Immunol., Diciembre 1983, 20(12): 1353-62) son una modalidad preferida.

65 [0023] Preferiblemente, los glóbulos rojos de origen humano que se utilizan para formar un complejo inmune son glóbulos rojos heterólogos procedentes de un donante.

[0024] De acuerdo con una segunda realización, los glóbulos rojos contienen un antígeno tumoral y se modifican por calor o químicamente a fin de promover la fagocitosis de dichos glóbulos rojos, en particular, por las células dendríticas. La composición también hace que sea posible promover la fagocitosis por los macrófagos.

5 [0025] El tratamiento térmico se lleva a cabo, en particular, en las siguientes condiciones: calentamiento de los glóbulos rojos durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 90 minutos, preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 minutos, a una temperatura de entre aproximadamente 42 y aproximadamente 55°C, preferiblemente entre aproximadamente 47 y aproximadamente 51°C. Típicamente, los glóbulos rojos se calientan durante aproximadamente 30 minutos a entre aproximadamente 48 y aproximadamente 10 50°C, por ejemplo a aproximadamente 48°C.

[0026] El tratamiento químico se lleva a cabo usando agentes que modifican la superficie de los glóbulos rojos, y en particular, agentes de puente o agentes de reticulación, tales como bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3 o BS<sup>3</sup>), glutaraldehído o neuraminidasa.

15 [0027] En una realización particular, se combinan al menos dos procedimientos de reconocimiento, y, por ejemplo, la composición comprende entonces los glóbulos rojos que contienen antígeno que están en forma de un complejo inmune y se tratan con calor o químicamente con el fin de promover su captación en el bazo y/o hígado, preferiblemente el bazo, y la fagocitosis por las APC, en particular por las células dendríticas.

20 [0028] En una tercera realización, los glóbulos rojos que contienen antígeno son xenogénicos. La inyección de glóbulos rojos xenogénicos en seres humanos da como resultado la unión de los anticuerpos naturales del paciente a los glóbulos rojos inyectados. El complejo inmune formado de este modo promueve la fagocitosis por las APC, en particular por las células dendríticas. Preferiblemente, dichos glóbulos rojos son de origen porcino.

25 [0029] En una realización particular, los glóbulos rojos xenogénicos se modifican térmica o químicamente a fin de promover la fagocitosis de los mismos.

30 [0030] La composición según la invención puede comprender uno o más antígenos tumorales. Cuando hay varios antígenos tumorales, dichos antígenos tumorales se seleccionan preferiblemente para inducir una respuesta inmune contra un tipo de tumor o de células tumorales.

35 [0031] La composición comprende preferiblemente al menos dos antígenos tumorales representativos del tumor a tratar. El objetivo es generar varios clones de linfocitos T citotóxicos que cada uno reconocen un péptido antigénico específico a fin de desarrollar una respuesta inmunitaria más eficaz.

[0032] En una realización particular, la composición comprende al menos dos poblaciones de glóbulos rojos, cada una encapsulando un antígeno diferente.

40 [0033] Los antígenos más conocidos que se pueden utilizar en el presente documento se indican en las tablas siguientes, en los que se clasifican por categoría.

Antígenos únicos:

<i>Gen/proteína</i>	<i>Tumor</i>
alfa-actinina-4	Carcinoma de pulmón
ARTC1	Melanoma
proteína de fusión BCR-ABL	Leucemia mieloide crónica
B-RAF	Melanoma
CASP-5	Carcinoma colorrectal, gástrico y endometrial
CASP-8	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
beta-catenina	Melanoma
Cdc27	Melanoma
CDK4	Melanoma
CDKN2A	Melanoma
COA-1	Carcinoma colorrectal
proteína de fusión dek-can	Leucemia mieloide
EFTUD2	Melanoma
Factor de elongación 2	Carcinoma de células escamosas del pulmón
Proteína de fusión ETV6-AML1	Leucemia linfoblástica aguda
FN1	Melanoma
GNPMB	Melanoma
proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS	Melanoma
HLA-A2d	Carcinoma de células renales
HLA-A11d	Melanoma
hsp70-2	Carcinoma de células renales

KIAAO205	Tumor de vejiga
MART2	Melanoma
ME1	Carcinoma de pulmón de "células no pequeñas"
MUM-1f	Melanoma
MUM-2	Melanoma
MUM-3	Melanoma
neo-PAP	Melanoma
Miosina clase I	Melanoma
NFYC	Carcinoma de células escamosas de pulmón
OGT	Carcinoma colorrectal
OS-9	Melanoma
proteína de fusión pml-RARalfa	Leucemia promielocítica
PRDX5	Melanoma
PTPRK	Melanoma
K-ras	Adenocarcinoma pancreático
N-ras	Melanoma
RBAF600	Melanoma
SIRT2	Melanoma
SNRPD1	Melanoma
proteína de fusión SYT-SSX1 o SYT-SSX2	Sarcoma
Triosafosfato isomerasa	Melanoma
FLT3-ITD	Leucemia mieloide aguda
p53	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello

**[0034]** Los antígenos comunes a varios tumores:

5

a) antígenos específicos de tumores

<i>Genes</i>
BAGE-1
GAGE-1,2,8
GAGE-3,4,5,6,7
GnTVf
HERV-K-MEL
KK-LC-1
KM-HN-1
LAGE-1
MAGE-A1
MAGE-A2
MAGE-A3
MAGE-A4
MAGE-A6
MAGE-A9
MAGE-A10
MAGE-A12
MAGE-C2
mucina k
NA-88
NY-ESO-1/LAGE-2
SAGE
Sp17
SSX-2
SSX-4
TRAG-3
TRP2-INT2g

b) antígenos de diferenciación

<i>Gen/proteína</i>	<i>Tumor</i>
CEA	Carcinoma intestinal
gp100/Pmel17	Melanoma
Calicreína 4	Próstata
Mammaglobina-A	Cáncer de mama

Melan-A/MART-1	Melanoma
NY-BR-1	Cáncer de mama
OA1	Melanoma
PSA	Carcinoma de próstata
RAB38/NY-MEL-1	Melanoma
TRP-1/gp75	Melanoma
TRP-2	Melanoma
tirosinasa	Melanoma

c) antígenos sobreexpresados

<i>Gen</i>	<i>Tejido de expresión</i>
adipofilina	adipocitos, macrófagos
AIM-2	extendido (bajo nivel)
BING-4	extendido (bajo nivel)
CPSF	extendido (bajo nivel)
ciclina D1	extendido (bajo nivel)
Ep-CAM	células epiteliales
EphA3	numerosos
FGF5	cerebro, riñones
G250/MN/CAIX	estómago, hígado, páncreas
HER-2/neu	extendido (bajo nivel)
IL13Ralfa2	
carboxil esterasa intestinal	hígado, intestino, riñones
alfa-fetoproteína	hígado
M-CSF	hígado, riñones
mdm-2	extendido (cerebro, músculo, pulmones)
MMP-2	extendido
MUC1	epitelio glandular
p53	extendido (bajo nivel)
PBF	ovarios, páncreas, bazo, hígado
PRAME	testículos, ovarios, endometrio, glándulas adrenales
PSMA	próstata, SNC, hígado
RAGE-1	retina
RNF43	
RU2AS	testículos, riñones, vejiga
secernina 1	extendido
SOX10	extendido (bajo nivel)
STEAP1	próstata
survivina	extendido
telomerasa	testículos, timo, médula ósea, nódulos linfáticos
WT1	testículos, ovarios, médula ósea, bazo
BCLX(L)	extendido (bajo nivel)
DKK1	testículos, próstata, células madre mesenquimales
ENAH (hMena)	mama, próstata, estroma y epitelio de colon y recto, páncreas, endometrio
MCSP	células endoteliales, condrocitos, células de músculos no estriados
RGS5	corazón, músculo esquelético, pericitos

5 **[0035]** Van der Bruggen et al. han producido una base de datos de referencia a todos los antígenos tumorales humanos reconocidos por los linfocitos T y que pueden utilizarse en estrategias de inmunoterapia del cáncer según la invención: <http://www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm>.

10 **[0036]** Se pueden utilizar otros antígenos en la invención, tales como: gastrina 17, gonadotropina coriónica humana, EGFRvIII, HER2, HER2/neu, P501, guanililciclasa C, PAP.

15 **[0037]** La palabra antígeno abarca antígenos de origen natural o sintético o artificial, antígenos procedentes del paciente a tratar, fragmentos antigénicos, derivados o variantes, siempre y cuando el antígeno sea capaz de iniciar la respuesta inmune apropiada. Los antígenos pueden, por ejemplo, extraerse, sintetizarse químicamente o producirse mediante modificación genética.

**[0038]** Con el fin de generar una respuesta inmune eficaz, las células dendríticas tienen que ser activas y maduras, tienen que producir citocinas y quimiocinas y expresar moléculas de coestimulación que son necesarias para el reclutamiento y la activación de linfocitos T.

5 **[0039]** Se pueden utilizar varios tipos de adyuvantes para estimular las APC, y en particular, las células dendríticas. El ARN o ADN bacteriano o viral, proteínas de choque térmico (HSP), azúcares, complejos inmunes y citoquinas son diversos factores que inducen la maduración de APC y, en particular, la maduración de células dendríticas mediada por la estimulación de los receptores específicos (receptor tipo Toll TLR, receptor de manosa). Los macrófagos y las células dendríticas no expresan todos los mismos receptores en su superficie. La  
10 elección del adyuvante, por tanto, se refiere a una molécula capaz de generar una respuesta inmune citotóxica en los seres humanos y para el cual el receptor se encuentra en la superficie de las células recogiendo los glóbulos rojos de la invención, y por lo tanto en particular en la superficie de células dendríticas.

15 **[0040]** Según una realización, el adyuvante es una molécula encapsulada dentro de los glóbulos rojos o unida a la superficie de los glóbulos rojos. Estos son preferentemente los glóbulos rojos que contienen el antígeno.

20 **[0041]** Alternativamente, el adyuvante está encapsulado en, o unido a la superficie de, otros glóbulos rojos tratados por separado. Estos glóbulos rojos también pueden ser modificados o seleccionados a fin de promover la fagocitosis de los mismos por las APC, en particular por las células dendríticas. De este modo, pueden estar, tal como se describe anteriormente, en forma de un complejo inmune, o modificarse térmicamente o químicamente, o bien ser xenogénicos.

25 **[0042]** Según otra realización, el adyuvante es una composición de adyuvante separado, que se puede administrar simultáneamente con o por separado de los glóbulos rojos que contienen el antígeno.

30 **[0043]** Huelga decir que, siempre que el adyuvante puede estar en una composición separada (composición de glóbulos rojos o composición de adyuvante), el adyuvante se puede administrar de forma concomitante con los glóbulos rojos que contienen el antígeno, como una administración separada o en forma de una mezcla, o se administran por separado, por ejemplo después de la administración de los glóbulos rojos que comprenden el antígeno, en particular, unas pocas horas o días de diferencia.

**[0044]** Entre los adyuvantes que se pueden utilizar, se pueden mencionar en primer lugar y principalmente los adyuvantes preferidos siguientes:

35 - ligandos TLR (receptores de tipo Toll), en particular imidazoquinolonas, tales como preferentemente: imidazoquinolina, por ejemplo, imidazoquinolina CL097, imiquimod, resiquimod; oligodesoxinucleótidos CpG; LPS (lipopolisacáridos); poli(ácido inosínico) - (ácido policitídílico poli(I:C));  
- citoquinas, en particular: interferón alfa, IL-2 (interleucina 2), IFN $\gamma$  (interferón gamma), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos), IL-12 (interleucina 12), TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa).

40 **[0045]** Entre los otros adyuvantes que se pueden utilizar, se pueden mencionar, en particular:

- componentes bacterianos, en particular BCG (Bacillus Calmette Guérin), MDP (dipéptido de muramilo), TDM (dimicolato de trehalosa), LPS (lipopolisacárido), MPL (monofosforil lípido A);  
- adyuvantes minerales, en particular: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato de potasio y fosfato de calcio;  
45 - toxinas bacterianas, en particular: CT (toxina del cólera de Vibrio cholera), CTB (toxina del cólera de Vibrio cholera), PT (toxina pertussis de Bordetella pertussis), LT (linfotóxina termolábil de Escherichia coli);  
- KLH, hemocianina de lapa californiana.

50 **[0046]** Las técnicas para la encapsulación de principios activos en los glóbulos rojos son conocidas y la técnica básica por lisis-resellado, que se prefiere en el presente documento, se describe en las patentes EP-A-101 341 y EP-A-679 101, a las que los expertos en la técnica se pueden referir. Según esta técnica, el compartimento principal de un elemento de diálisis (por ejemplo, tubo de diálisis o un cartucho de diálisis) se alimenta continuamente con una suspensión de glóbulos rojos, mientras que el compartimento secundario contiene una solución acuosa que es hipotónica con respecto a la suspensión de los glóbulos rojos, con el fin de lisar los glóbulos rojos; a continuación, en  
55 una unidad de resellado, se induce el resellado de los glóbulos rojos en presencia del antígeno tumoral mediante el aumento de la presión osmótica y/u oncótica y, a continuación, se recoge una suspensión de glóbulos rojos que contiene el antígeno tumoral.

60 **[0047]** Entre las variantes descritas hasta ahora, se da preferencia al procedimiento descrito en la solicitud de patente francesa No. 0.408.667, lo que hace posible encapsular de manera eficiente, de manera reproducible, con seguridad y de forma estable el antígeno tumoral. Este procedimiento comprende las siguientes etapas:

1 - suspensión de un sedimento de glóbulos rojos en una solución isotónica a un nivel de hematocrito superior o igual al 65%, refrigeración entre +1 y + 8°C,  
2 - medición de la fragilidad osmótica usando una muestra de glóbulos rojos de dicho sedimento de glóbulos rojos, siendo posible que las etapas 1 y 2 se lleven a cabo en cualquier orden (incluyendo en paralelo),  
65 3 - lisis y proceso de internalización del antígeno tumoral, dentro de la misma cámara, a una temperatura mantenida

constante entre +1 y + 8°C, que comprende pasar la suspensión de los glóbulos rojos a un nivel de hematocrito superior o igual al 65%, y una solución de lisis hipotónica enfriada entre +1 y 8°C, a través de un cartucho de diálisis; y ajustándose los parámetros de lisis de acuerdo con la fragilidad osmótica medida anteriormente; y  
 5 4 - proceso de resellado llevado a cabo en una segunda cámara, dentro de la cual la temperatura está entre +30 y + 40°C, y en presencia de una solución hipertónica.

**[0048]** La "internalización" pretende significar la penetración del antígeno tumoral dentro de los glóbulos rojos.

**[0049]** En particular, para la diálisis, el sedimento de glóbulos rojos se suspende en una solución isotónica a un nivel elevado de hematocrito, mayor que o igual al 65%, y preferiblemente mayor que o igual al 70%, y esta suspensión se enfría a entre + 1 y + 8°C, preferiblemente entre + 2 y 6°C, típicamente en la región de + 4°C. De acuerdo con una realización específica, el nivel de hematocrito está entre 65% y 80%, preferiblemente entre 70% y 80%.

**[0050]** La fragilidad osmótica se mide ventajosamente en los glóbulos rojos justo antes de la etapa de lisis. Los glóbulos rojos o la suspensión que los contiene son ventajosos a una temperatura próxima o idéntica a la temperatura seleccionada para la lisis. Según otra característica ventajosa de la invención, la medición de la fragilidad osmótica se explota rápidamente, es decir el proceso de lisis se lleva a cabo poco después de tomar la muestra. Preferiblemente, este período de tiempo entre la toma de la muestra y el inicio de la lisis es inferior o igual a 30 minutos, aún más preferiblemente inferior o igual a 25, e incluso inferior o igual a 20 minutos.

**[0051]** En cuanto a la manera en que el proceso de lisis-resellado se lleva a cabo, midiendo y teniendo en cuenta la fragilidad osmótica, los expertos en la técnica pueden referirse a la solicitud de patente francesa N° 0408667 para más detalles.

**[0052]** Según una característica de la invención, la composición según la invención comprende, al final, una suspensión de glóbulos rojos a un nivel de hematocrito de entre aproximadamente 40% y aproximadamente 70%, preferiblemente entre aproximadamente 45% y aproximadamente 55%, mejor aún aproximadamente del 50%. Se envasa preferiblemente en un volumen de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 ml. El envasado es preferiblemente en una bolsa de sangre del tipo adecuado para la transfusión de sangre. La cantidad de antígeno tumoral encapsulado correspondiente a la prescripción médica está preferiblemente totalmente contenido en la bolsa de sangre.

**[0053]** Un objetivo de la presente invención es también una vacuna antitumoral terapéutica que comprende una cantidad eficaz de una o más composiciones de acuerdo con la invención. Por lo tanto, la vacuna puede comprender una composición de acuerdo con la invención, que en sí contiene una población de glóbulos rojos que encapsulan uno o más antígenos tumorales, en presencia o ausencia de adyuvante encapsulado o no encapsulado, o al menos dos composiciones de acuerdo con la invención con diferentes poblaciones de glóbulos rojos que encapsulan uno o más antígenos tumorales, en presencia de adyuvante encapsulado o no encapsulado.

**[0054]** Las composiciones y vacunas de la invención pueden usarse en un procedimiento para inducir, en un paciente, una respuesta celular citotóxica contra células tumorales o un tumor. Este procedimiento comprende la administración a este paciente de una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con la invención, en particular por vía intravenosa, por inyección o infusión, preferiblemente por infusión. Este procedimiento está dirigido, en particular, a la inducción de la activación de las células dendríticas del paciente y una respuesta celular citotóxica de CD8<sup>+</sup>. Como se describió anteriormente, se obtiene una respuesta específica auxiliar de CD4<sup>+</sup> y citotóxica de CD8<sup>+</sup>.

**[0055]** Las composiciones y vacunas de la invención pueden usarse en un procedimiento de tratamiento contra el cáncer para inducir, en un paciente, una respuesta celular citotóxica, como se describe anteriormente, contra células tumorales o un tumor. Este procedimiento comprende la administración a este paciente de una cantidad eficaz de una vacuna antitumoral de acuerdo con la invención, en particular por vía intravenosa, por inyección o infusión, preferiblemente por infusión.

**[0056]** Se pueden administrar de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 ml de una suspensión de glóbulos rojos a un nivel de hematocrito de entre aproximadamente 40% y aproximadamente 70%, preferiblemente entre aproximadamente 45% y aproximadamente 55%, mejor aún aproximadamente del 50%.

**[0057]** Un objetivo de la invención es también el uso de una composición de acuerdo con la invención, para la fabricación de una vacuna antitumoral terapéutica.

**[0058]** Las composiciones y vacunas de la invención se pueden usar para inducir, en un huésped, una respuesta celular citotóxica mediada por las células dendríticas y dirigida contra células tumorales o un tumor.

**[0059]** Otro objetivo de la invención es una composición de acuerdo con la invención, para utilizar como una vacuna antitumoral terapéutica.

[0060] La presente invención se describirá a continuación con mayor detalle por medio de realizaciones tomadas a modo de ejemplos no limitantes, y que se refieren a los dibujos adjuntos.

Figura 1: Medición de la fagocitosis de glóbulos rojos "cargados con antígeno" tratados con el anticuerpo anti-TER119, por las células dendríticas del bazo in vitro.

5 Figura 2: Medición de la fagocitosis de glóbulos rojos "cargados con antígeno" tratados con el anticuerpo anti-TER119 o tratados térmicamente, por los macrófagos del bazo y las células dendríticas in vivo.

Figura 3: Gráfico que ilustra la proliferación y activación de células T CD4 específicas de ovoalbúmina 3 días después de la inyección en ratones.

10 (A) La división celular induce una reducción en la intensidad de fluorescencia de CFSE. Las células T CD4 específicas de OVA pierden la mitad de su material fluorescente en cada división. El pico observado para el lote 4 representa células no divididas que tienen un gran contenido de CFSE. Todos los otros picos representan células que han sufrido 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 divisiones celulares. Cuando las células se han dividido más de 8 veces, el contenido de CFSE de las células es prácticamente cero.

15 (B) La expresión del marcador de activación de células CD44 se representa en función del número de divisiones que se producen.

Ejemplo 1. Procedimiento para encapsular ovoalbúmina en glóbulos rojos murinos y humanos y en glóbulos rojos porcinos

20 Variante 1:

[0061] Se encapsula ovoalbúmina (proteína de 45 kDa, ovoalbúmina de huevo de gallina) en los glóbulos rojos murinos (ratones OF1 o ratones C57Bl/6) mediante el procedimiento de diálisis hipotónica en tubos de diálisis. La suspensión de glóbulos rojos se lava varias veces antes de llevarse a un hematocrito del 70% para la diálisis. La diálisis se lleva a cabo en un tubo de diálisis en un tampón de lisis de baja osmolaridad durante aproximadamente 1 hora o 30 min cuando la diálisis se produce después de un tratamiento térmico. Los glóbulos rojos se vuelven a sellar por medio de una solución de alta osmolaridad durante 30 minutos. Después de unos pocos lavados, el producto final se recoge en un tampón, Sag-manitol, y el hematocrito se lleva al 50%.

30 Variante 2 para el Ejemplo 1:

[0062] La ovoalbúmina en este documento se encapsula en los glóbulos rojos murinos mediante el procedimiento de diálisis hipotónica en una columna de diálisis. La suspensión de glóbulos rojos se lava varias veces antes de llevarse a un hematocrito del 70% para la diálisis. La diálisis se lleva a cabo en una columna de diálisis en un tampón de lisis de baja osmolaridad durante aproximadamente 10 min. Tan pronto como salen de la columna, los glóbulos rojos se vuelven sellar por medio de una solución de alta osmolaridad durante 30 minutos a 37°C. Después de unos lavados, el producto final se recoge en un tampón de glucosa y NaCl que contiene glucosa SAG manitol o plasma descomplementado, y el hematocrito se lleva de nuevo al 50%.

40 Ejemplo 2. Tratamiento térmico sobre los glóbulos rojos

[0063] Cuando la encapsulación se realiza según la variante 1 del ejemplo 1, el tratamiento térmico se realiza antes del proceso de diálisis. Cuando la encapsulación se realiza según la variante 2 del ejemplo 1, el tratamiento térmico se realiza después del proceso de diálisis y resellado y antes de las etapas de lavado y la adición de tampón de glucosa y NaCl.

[0064] Los glóbulos rojos se lavan varias veces antes de llevarse a un hematocrito del 10%. Se calientan a continuación durante 30 minutos a 48°C.

50 Ejemplo 3. Tratamiento con anticuerpo sobre los glóbulos rojos que contienen ovoalbúmina

[0065] La suspensión de glóbulos rojos que encapsulan la ovoalbúmina se lava varias veces antes de llevarse a  $10^9$  células/ml para la prueba in vivo y  $10^8$  células/ml para la prueba in vitro. Se incuba con el anticuerpo anti-TER119 (10 µg/ml para la prueba in vitro y 23 µg/ml o 5 µg/ml para la prueba in vivo) durante 30 minutos a 4°C. Después de unos lavados, el producto final se recogió en un tampón con cualidades inyectables, y el hematocrito se lleva al 50%.

Ejemplo 4. Tratamiento químico con bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3) sobre los glóbulos rojos que contienen ovoalbúmina

60 [0066] La suspensión de glóbulos rojos que encapsulan la ovoalbúmina se lava varias veces antes de llevarse a  $1,7 \times 10^6$  células/µl con PBS y se mezcla con un volumen de una solución tampón de BS3 2 mM (la solución BS3 contiene glucosa y tampón de fosfato, pH 7,4), a fin de obtener una concentración de BS3 final de 1 mM. Las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se interrumpe mediante la adición de un volumen de Tris-HCl 20 mM. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos, la mezcla se centrifuga a 800 g durante 5 min, 4°C. A continuación, las células se lavan dos veces con PBS que contiene glucosa

(centrifugación a 800 g) y una vez con SAG-manitol (centrifugación a 1000 g) durante 10 min, antes de constituir los productos finales.

Ejemplo 5. Medición de la fagocitosis de los glóbulos rojos que contienen ovoalbúmina por células dendríticas in vitro

[0067] El efecto de los diferentes tratamientos (térmico y con anticuerpos) sobre la eficiencia de la fagocitosis de los glóbulos rojos obtenidos según la variante 1 del ejemplo 1, por las células dendríticas, se mide in vitro. Los glóbulos rojos se marcan con un marcador fluorescente, CFSE (éster succinimidilo de carboxifluoresceína), durante 20 minutos a 4°C. El CFSE es un colorante no fluorescente que se difunde a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula, la molécula se vuelve fluorescente posteriormente a su escisión por esterasas intracelulares.

[0068] Las células dendríticas se aíslan del bazo de ratones C57Bl/6 utilizando microesferas magnéticas. Estas microesferas llevan anticuerpos que reconocen el marcador CD11c, lo que hace posible aislar la fracción de células dendríticas CD11c<sup>+</sup>.

[0069] Los glóbulos rojos marcados o no con CFSE se incuban a continuación con las células dendríticas (10X10<sup>6</sup> células/ml) a una proporción de 20:1 en un volumen final de 200 µl/pocillo de placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo durante 4 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de cultivar durante 4 horas, los glóbulos rojos no ingeridos por las células dendríticas se lisan con NH<sub>4</sub>Cl y se llevan a cabo varios lavados. La captura del fluorocromo CFSE por las células dendríticas se mide a continuación mediante citometría de flujo (R. Segura et al, J. Immunol, enero de 2006, 176 (1): 441-50).

[0070] Se ensayaron tres poblaciones de glóbulos rojos:  
 (A) glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina y no marcados con el fluorocromo CFSE,  
 (B) glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina y marcados con CFSE,  
 (C) glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina, tratados con el anticuerpo anti 119-TER y marcados con CFSE.

Resultados

[0071]

Tabla 1: Porcentaje de células dendríticas que han fagocitado glóbulos rojos fluorescentes:

Población de glóbulos rojos	% de células dendríticas
(A)	4%
(B)	27%
(C)	36%

[0072] Los glóbulos rojos murinos cargados con ovoalbúmina y tratados con el anticuerpo anti-TER 119 fueron fagocitados más eficientemente por las células dendríticas aisladas del bazo que los glóbulos rojos no tratados in vitro, después de 4 horas de cocultivo (Figura 1, respectivamente C y B). El 36% de las células dendríticas fagocitaron los glóbulos rojos que llevan el anticuerpo, frente a sólo un 27% en ausencia de anticuerpo. También se observó fagocitosis de los glóbulos rojos tratados con anticuerpo por una población que no expresaba el marcador de células dendríticas CD11c (10,9%; Figura 1, C).

Ejemplo 6. Medición de la fagocitosis de los glóbulos rojos que contienen ovalbúmina, por los macrófagos y las células dendríticas del bazo y el hígado in vivo en ratones

[0073] Este estudio es un estudio alogénico, ya que los glóbulos rojos de ratones OF1 que contienen ovoalbúmina se inyectan a ratones C57Bl/6 no consanguíneos.

[0074] Se preparan tres lotes de 74X10<sup>7</sup> glóbulos rojos, a partir de ratones OF1, cargados con ovoalbúmina (variante 1 del ejemplo 1) tratados térmicamente, tratados con el anticuerpo anti-TER 119 (tal como se describe en los ejemplos 2 y 3, respectivamente) o no tratados. Estos lotes se dividen de la siguiente manera:

Lote 1: sin tratamiento térmico o con anticuerpos (figura 2, A y D)

Lote 2: tratado térmicamente (figura 2, B y E)

Lote 3: tratado con el anticuerpo anti-TER119 (figura 2, C y F).

[0075] Cada lote se marca con CFSE y se inyecta por vía intravenosa en ratones C57Bl/6. Tres horas después de la inyección, se recogen sangre, el bazo y el hígado de los ratones. El porcentaje de glóbulos rojos fluorescentes que circulan en la sangre de los ratones se mide por citometría de flujo. La fluorescencia incorporada en los macrófagos del bazo que expresan el marcador F4/80 (Figura 2, A, B, C), en los macrófagos del hígado que expresan el marcador F4/80 y en las células dendríticas del bazo que expresan el marcador CD11c (Figura 2, D, E, F) se mide por citometría de flujo.

Resultados

[0076]

5 Tabla 2: Porcentaje de macrófagos o células dendríticas del bazo que han fagocitado glóbulos rojos fluorescentes 3 horas después de la inyección en el ratón:

Lotes	Macrófagos	Células dendríticas
1	28%	5%
2	68%	19%
3	81%	22%

10 [0077] 3 horas después de la inyección, los glóbulos rojos murinos cargados con ovoalbúmina y tratados térmicamente o tratados con el anticuerpo anti-TER 119 ya no están casi presentes en la sangre del ratón (1,6% y 1%), mientras que hay todavía glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina no tratados en la sangre del ratón (4,6%).

15 [0078] Los glóbulos rojos que han sido tratados térmicamente o con el anticuerpo anti-TER 119 son fagocitados por los macrófagos F4/80 y células dendríticas CD11c del bazo (Figura 2).

20 [0079] Los glóbulos rojos tratados con el anticuerpo anti-TER 119 fueron fagocitados de manera más eficiente por los macrófagos F4/80 del bazo que los glóbulos rojos tratados térmicamente o los glóbulos rojos sin tratar (Figura 2, A, B, C). El 81% de los macrófagos del bazo fagocitaron los glóbulos rojos tratados con anticuerpo, frente al 68% de los macrófagos que han fagocitado los glóbulos rojos tratados térmicamente y sólo el 28% en el lote no tratado (Tabla 2).

25 [0080] Los glóbulos rojos tratadas térmicamente o con anticuerpo también fueron fagocitados de manera más eficiente por las células dendríticas CD11c del bazo que los glóbulos rojos sin tratar (Figura 2). Respectivamente, el 22% y el 19% de las células dendríticas fagocitaron los glóbulos rojos tratados con anticuerpo y los glóbulos rojos tratados térmicamente, frente a sólo el 5% en el caso de los glóbulos rojos sin tratar (Tabla 2).

30 [0081] También se observó la fagocitosis de los los glóbulos rojos tratados con anticuerpo por una población del bazo que no expresa el marcador de células dendríticas CD11c o el marcador de macrófago F4/80 (11,9% y 12,8%, Figura 2).

Tabla 3: Porcentaje de macrófagos hepáticos que han fagocitado glóbulos rojos fluorescentes 3 horas después de la inyección en el ratón.

Lotes	Macrófagos
1	24%
2	40%
3	50%

35 [0082] Los glóbulos rojos tratados térmicamente o los glóbulos rojos tratados con el anticuerpo anti-TER 119 son fagocitados por los macrófagos F4/80 del hígado.

40 [0083] Los glóbulos rojos tratados con el anticuerpo anti-TER 119 fueron fagocitadas más eficientemente por los macrófagos F4/80 del hígado que los glóbulos rojos tratados térmicamente o que los glóbulos rojos sin tratar. El 50% de los macrófagos del hígado fagocitaron los glóbulos rojos tratados con anticuerpo, frente al 40% de los macrófagos que han fagocitado los glóbulos rojos tratados térmicamente y sólo el 24% en el lote no tratado (tabla 3).

45 [0084] En conclusión, la unión del anticuerpo a los glóbulos rojos y el tratamiento térmico permitieron el direccionamiento de los glóbulos rojos en el bazo y el hígado, y un aumento significativo en el porcentaje de células dendríticas y de macrófagos capaces de fagocitar estos glóbulos rojos.

Ejemplo 7. Medición de la fagocitosis de los glóbulos rojos de ratones que contienen ovoalbúmina fluorescente por los macrófagos de la médula ósea y células dendríticas in vivo

50 [0085] Este estudio es un estudio autólogo, ya que glóbulos rojos de ratón OF1 se inyectan en ratones OF1.

55 [0086] Se preparan cuatro lotes de  $132 \times 10^7$  de glóbulos rojos de ratón OF1 cargados con ovoalbúmina fluorescente (Serlabo Technologies, ref WO-LS003054) preparados usando la variante 2 del ejemplo 1 y tratados con el anticuerpo anti-TER119, térmicamente o con BS3 (tal como se describe en los Ejemplos 3, 2 y 4, respectivamente) o no tratados. Cada lote de glóbulos rojos se inyecta por vía intravenosa en dos ratones. Una hora y media después de la inyección, los ratones se sacrifican y se extraen los fémures de los ratones. La fluorescencia incorporada en los macrófagos que expresan el marcador de F4/80 o el marcador de CD11b, los granulocitos que expresan el marcador de Gr1, las células dendríticas mieloides que expresan los marcadores de CD11c y CD11b y en las células

dendríticas plasmacitoides que expresan los marcadores de CD11c y CD8 se mide por citometría de flujo.

Lote 1: glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina, tratados con BS3

Lote 2: glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina, tratados térmicamente

Lote 3: glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina, tratados con el anticuerpo anti-TER 119

5 Lote 4: glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina

Lote 5: glucosa y NaCl

Resultados

10 **[0087]**

Tabla 4: Porcentaje de macrófagos de médula ósea, granulocitos o células dendríticas que han fagocitado ovoalbúmina fluorescente 1 hora 30 min después de la inyección:

Lotes	Macrófagos F4/80	Macrófagos C11b	Granulocitos	Células dendríticas mieloides	Células dendríticas plasmacitoides
1	2,5	0,05	12,5	2,7	2,4
2	3,3	0	15,5	2,2	3,4
3	17,7	1,75	21	15,3	6
4	2,4	0	13	1,6	2,4
5	0,5	0,1	1,3	0,8	1,5

15 **[0088]** Una hora y media después de la inyección, los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con el anticuerpo anti-TER 119 fueron fagocitados de manera eficiente por los macrófagos F4/80, los granulocitos y las células dendríticas de la médula ósea. Las células dendríticas mieloides de la médula ósea son las células más involucradas en la fagocitosis de los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina con el anticuerpo anti-TER 119.

20 **[0089]** En conclusión, el uso de glóbulos rojos tratados con el anticuerpo anti-TER 119 permite el mejor direccionamiento y fagocitosis de los glóbulos rojos por las células inmunes en la médula ósea.

25 Ejemplo 8. Medición de la respuesta de células T CD4 específicas de ovoalbúmina después de una sola inyección de glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina y de adyuvante poli (I:C)

30 **[0090]** La evaluación de la respuesta específica de células T CD4 específicas de OVA (ovoalbúmina) consiste en medir el porcentaje de células T CD4 específicas de OVA, la proliferación de estas células, el nivel de activación de estas células y la producción de IFN $\gamma$  (g = gamma).

35 **[0091]** La evaluación de la respuesta de las células CD4 T se realiza mediante una adaptación de los procedimientos descritos en Russo V. et al. The Journal of Clinical Investigation, 2007, 117: 3087-3096; Stoitzner P. et al, The Journal of Immunology 2008, 180: 1991-1998. Las células T CD4 de ratones transgénicos OT-II (Charles River, ref C57BL/6-Tg(TcraTcrb425Cbn/Crl)) se utilizan para medir la respuesta de células CD4 T específicas de OVA. Los ratones OT-II son ratones que expresan sólo células T CD4 que reconocen el péptido de ovoalbúmina 323-339 asociado con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II.

40 **[0092]** Las células T CD4 transgénicas OT-II se aíslan del bazo de ratones OT-II y se marcan con CFSE, antes de inyectarse por vía intravenosa en ratones Ly5.1. Los ratones OT-II y los ratones Ly5.1 tienen la misma base genética, pero las células de ambos tipos de ratones se pueden identificar por medio del marcador de CD45. Esto es porque las células de los ratones OT-II expresan el marcador de CD45.2, mientras que los ratones Ly5.1 expresan el marcador de CD45.1.

45 **[0093]** 20 horas después de la inyección de las células T CD4 de ratón transgénico, los ratones Ly5.1 reciben una inyección intravenosa de los siguientes lotes. Tres ratones son inyectados con los lotes que contienen glóbulos rojos y dos ratones son inyectados con los lotes que contienen OVA libre o el control.

50 Se preparan dos lotes de  $183 \times 10^7$  glóbulos rojos de ratones C57BL/6 cargados con ovoalbúmina (Serlabo Technologies, ref WO-LS003054) preparados utilizando la variante 2 del ejemplo 1 y tratados o no con el anticuerpo anti-TER 119 (como se describe en el ejemplo 3). El adyuvante, poli (I:C) (Invivogen, ref tIrl-pic), se añade a estos lotes, así como al lote que contiene ovoalbúmina libre. La cantidad de poli (I:C) inyectada por ratón es de 25  $\mu$ g. La cantidad de OVA inyectada en los ratones se indica en la Tabla 5.

55 **[0094]** Este es un estudio autógeno, ya que los glóbulos rojos de ratones C57BL/6 cargados con ovoalbúmina se inyectan en ratones Ly5.1. Los ratones C57BL/6, Ly5.1 y OT-II tienen la misma base genética.

Lote 1: Poli (I:C) y los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con el anticuerpo anti-TER 119

Lote 2: Poli (I:C) y los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina

Lote 3: Poli (I:C) y ovoalbúmina libre  
Lote 4: Plasma

5 [0095] Tres días después de la inyección de los lotes, los ratones se sacrifican y se extraen los bazo de los ratones. El porcentaje de células T CD4 específicas de OVA en el bazo de los ratones se mide por citometría de flujo utilizando los marcadores de CD4 y CD45.2 (Tabla 5). El número de células T CD4 específicas de OVA se calcula a partir del porcentaje de células T CD4 específicas de OVA y el número de linfocitos totales contados con azul de tripano (Invitrogen, ref 15250061) (Tabla 5).

10 [0096] La proliferación y la activación de las células T CD4 específicas de OVA en el bazo de los ratones se mide por citometría de flujo usando los marcadores de CD4, CD44 y CD45.2 y usando CFSE (Tablas 6 y 7). En cada división celular, la cantidad de CFSE contenido en las células T CD4 específicas de OVA se divide por un factor de 2, lo que hace posible determinar el número de divisiones celulares por citometría de flujo (Figura 3).

15 [0097] La producción de IFN $\gamma$  por los esplenocitos de ratones se mide en los sobrenadantes de cultivo después de 3 días de estimulación in vitro en presencia de 10  $\mu$ g/ml de péptido de ovoalbúmina 323-339 (Neomps, ref) por medio de un ensayo ELISA.

Resultados

20 [0098]

Tabla 5: Porcentaje y número de células T CD4 específicas de OVA tres días después de la inyección de los lotes (media  $\pm$  desviación estándar):

25

Lotes	Cantidad de OVA inyectada en los ratones ( $\mu$ g)	% de células T CD4 específicas de OVA	Número de células T CD4 específicas de OVA (millones de células)
1	160	6,6 $\pm$ 1,4*	8 $\pm$ 2*
2	129	3,6 $\pm$ 0,9**	4,1 $\pm$ 2*
3	150	0,8 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,7
4	0	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1

30 [0099] Tres días después de la inyección de los lotes, los ratones inyectados con poli (I:C) y los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados o no con el anticuerpo anti-TER 119 tienen un porcentaje y número de células T CD4 específicas de OVA que los ratones inyectados con OVA libre y poli (I:C) (test de Student \*p = 0,01, \*\*p = 0,02) significativamente más altos.

[0100] Además, el lote que contiene glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con el anticuerpo anti-TER119 es más eficaz en la inducción de un aumento en el número de células T CD4 específicas de OVA que el lote que contiene glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina sin tratar (test de Student p = 0,04).

35 Tabla 6: Porcentaje de células T CD4 específicas de OVA que se han dividido 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces tres días después de la inyección de los lotes:

Lotes	% de células T CD4 específicas de OVA en cada ciclo de división celular (media $\pm$ desviación estándar)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0	0,3 $\pm$ 0	1,7 $\pm$ 0	9,4 $\pm$ 0,1	35,9 $\pm$ 0,3	52,5 $\pm$ 0,2
2	0,1 $\pm$ 0	0,1 $\pm$ 0	0,2 $\pm$ 0	0,8 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,8	19,2 $\pm$ 3,2	43,7 $\pm$ 2,2	31,5 $\pm$ 6,3
3	1,9 $\pm$ 1,4	6,9 $\pm$ 5,2	15,6 $\pm$ 9,5	18,7 $\pm$ 5,6	19,7 $\pm$ 0,4	16,4 $\pm$ 5,3	13,9 $\pm$ 10,1	6,8 $\pm$ 5,9
4	69,7 $\pm$ 4,9	1,3 $\pm$ 1	0,1 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,4	5,6 $\pm$ 3,7	3,7 $\pm$ 1,1	5,3 $\pm$ 2,8	13,6 $\pm$ 2,5

40 [0101] Estas observaciones son confirmadas por los resultados in vivo de proliferación celular (Tabla 6 y Figura 3). La división celular induce una disminución de la intensidad de fluorescencia CFSE: separación de la mitad del material fluorescente en cada división (Figura 3A.). Las células T CD4 específicas de OVA se dividen más rápidamente (Tabla 6 y Figura 3A) para los ratones inyectados con poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con el anticuerpo anti-TER 119 (6 a 7 divisiones) en comparación con los ratones inyectados con OVA libre y poli (I:C) (3 a 4 divisiones). Además, el lote que contiene glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con el anticuerpo anti-TER 119 parece ser más eficaz en la inducción de la proliferación celular que el lote que contiene glóbulos rojos cargados con albúmina sin tratar.

50 Tabla 7: Nivel de activación de células T CD4 específicas de OVA tres días después de la inyección de los lotes:

Lotes	Promedio de fluorescencia de activación de células T CD4 específicas de OVA (media ± desviación estándar)
1	32,6 ± 2,3
2	37,6 ± 3,5
3	34,6 ± 3,9
4	11,4 ± 0,5

[0102] Los resultados del nivel de activación celular (caracterizado por el nivel de expresión del marcador de CD44) muestran que todas las células T CD4 específicas de OVA divisorias tienen un nivel de activación celular alto (Tabla 7 y Figura 3). Además, el nivel de activación de las células T CD4 específicas de OVA puede correlacionarse con el número de divisiones de estas células: cuanto más se han dividido las células y han perdido su contenido de marcador de CFSE, más expresan un alto nivel de marcador de activación (Figura 3B).

Tabla 8: Producción de IFN $\gamma$  por esplenocitos estimulados in vitro con 10  $\mu$ g/ml de péptido de ovoalbúmina 323 a 339 durante 3 días:

Lotes	Producción de IFN $\gamma$ por esplenocitos en ng/ml (media ± desviación estándar)
1	56,3
2	60 ± 26,8
3	9,4 ± 1,6
4	6,7 ± 1

[0103] Los resultados de la producción de IFN $\gamma$  por esplenocitos muestran una fuerte producción de IFN $\gamma$  por los esplenocitos de los ratones inyectados con poli (I:C) y los glóbulos rojos cargados de ovoalbúmina tratados o no tratados con el anticuerpo anti-TER119.

[0104] En conclusión, estos resultados demuestran la superioridad de los glóbulos rojos cargados de ovoalbúmina tratados o no con el anticuerpo anti-119 TER, en la activación y proliferación de células T CD4 específicas de OVA capaces de producir IFN $\gamma$ .

Ejemplo 9. Medición de la respuesta de células T CD8 específicas de ovoalbúmina después de una sola inyección de glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina y adyuvante de poli (I:C)

[0105] La evaluación de la respuesta de las células T CD8 específicas de OVA consiste en medir el porcentaje de células T CD8 específicas de OVA, la producción de IFN $\gamma$  y la lisis de las células, in vivo, de las células que presentan el péptido de ovoalbúmina 257-264 asociado con las moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad de clase I. Este estudio es un estudio alogénico, ya que los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina de ratones OF1 se inyectan en ratones C57Bl/6 no consanguíneos.

[0106] Se preparan dos lotes de 167 X 10<sup>7</sup> glóbulos rojos de ratón OF1 cargados con ovoalbúmina utilizando la variante 2 del ejemplo 1 y se trataron o no con el anticuerpo anti-TER 119 (como se describe en el ejemplo 3). El adyuvante, poli (I:C), se añade a estos lotes, y también al lote que contiene ovoalbúmina libre. La cantidad de poli (I:C) inyectada por ratón es de 25  $\mu$ g. La cantidad de OVA inyectada en los ratones se indica en la Tabla 9.

[0107] Los lotes se inyectan por vía intravenosa en ratones C57Bl/6. Un mínimo de 4 ratones se inyectan con un lote determinado. In vivo, la lisis celular se mide usando una adaptación del procedimiento descrito por Hervas-Stubbs S. et al, Blood 2007, 109: 5.318-5.326. Las células que presentan el péptido de ovoalbúmina 257-264 asociado con moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad I se inyectan en los ratones inmunizados. Brevemente, seis días después de la inyección, los ratones reciben una inyección de 0,5 X 10<sup>6</sup> esplenocitos que presentan el péptido de ovoalbúmina 257-264 (NeoMPS, SC1302 de referencia) y que se marcaron con una concentración moderada de CFSE, y de 0,5x10<sup>6</sup> esplenocitos que no presentan el péptido y que se marcaron con altas concentraciones de CFSE (control de la lisis celular).

[0108] Se utilizan microesferas de látex acopladas a péptido de ovoalbúmina 257-264 (BOVAp) y poli (I:C) como control positivo para inducir una respuesta inmune de células T CD8 contra ovoalbúmina. Se ha demostrado que la inyección de BOVAp y de poli (I:C) induce un incremento del porcentaje de células T CD8 específicas de ovoalbúmina y la destrucción de las células que presentan el péptido OVA257-264 in vivo (Herva-Stubbs).

Lote 1: Poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con el anticuerpo anti-TER 119

Lote 2: Poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina

Lote 3: Microesferas de látex acopladas al péptido de ovoalbúmina 257-264

Lote 4: poli (I:C) y microesferas de látex acopladas al péptido de ovoalbúmina 257-264

Lote 5: poli (I:C) y ovoalbúmina libre

Lote 6: glucosa con NaCl + plasma

**[0109]** 16 horas después de la inyección de los esplenocitos, los ratones se sacrificaron por eutanasia y se extraen los bazo de los ratones. El porcentaje de células T CD8 específicas de OVA en el bazo de los ratones se mide por citometría de flujo utilizando tetrámero y el marcador de CD8 (Tabla 9). La producción de IFN $\gamma$  y la expresión del marcador asociado con la desgranulación (CD107) por las células CD8 T se midió por citometría de flujo después de la estimulación in vitro durante 4 horas en presencia de 0,1  $\mu$ g/ml del péptido de ovoalbúmina 257-264 (Tabla 10). In vivo, la lisis celular se midió por citometría de flujo utilizando CFSE (Tabla 11).  
Resultados

**[0110]**

Tabla 9: Porcentaje de células T CD8 específicas de OVA siete días después de la inyección de los lotes (media  $\pm$  desviación estándar):

Lote	Cantidad de OVA inyectada en ratones ( $\mu$ g)	% de células T CD8 específicas de OVA (media $\pm$ desviación estándar)	% de células T no específicas de OVA (media $\pm$ desviación estándar)
1	95	14 $\pm$ 3,2 *	2,4 $\pm$ 0,2
2	91	12,5 $\pm$ 5,2 **	1,2 $\pm$ 0,5
3	0	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1
4	0	2,5 $\pm$ 0,4 *	0,9 $\pm$ 0,1
5	130	2,4 $\pm$ 1,4	1 $\pm$ 0,2
6	0	0,7 $\pm$ 0,4	1 $\pm$ 0,1

**[0111]** Los ratones inyectados con poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina que habían sido tratados o no habían sido tratados con el anticuerpo anti-TER119 tienen un porcentaje significativamente mayor de células T CD8 específicas de OVA que los ratones inyectados con OVA libre y poli (I:C) o ratones inyectados con poli (I:C) y BOVAp (test de Student: \*p = 0,001 y \*\*p = 0,01).

Tabla 10: Producción de IFN $\gamma$  por células T CD8 estimuladas in vitro con 0,1  $\mu$ g/ml de péptido de ovoalbúmina 257-264 durante 4 horas:

Lote	% de células T CD8 productoras de IFN $\gamma$	% de células T CD8 productoras de IFN $\gamma$ y que expresan el marcador CD107
1	8,7 $\pm$ 1,8*	71 $\pm$ 4*
2	6,6 $\pm$ 1,7*	71 $\pm$ 4*
3	1,4 $\pm$ 0,1	33 $\pm$ 4,5
4	2,8 $\pm$ 0,5	57 $\pm$ 5,5
5	1,8 $\pm$ 0,5	46 $\pm$ 7
6	0,7 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 2

**[0112]** Las células T CD8 generadas son eficaces y citotóxicas, ya que producen IFN $\gamma$  y expresan el marcador de CD107 en respuesta a la estimulación con el péptido de ovoalbúmina (Tabla 10). El porcentaje de células T CD8 productoras de IFN $\gamma$  y que expresan CD107 es significativamente mayor para los ratones inyectados con poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina que habían sido tratados o no habían sido tratados con anticuerpo anti-TER119 que para los ratones inyectados con OVA libre y poli (I:C) o poli (I:C) y BOVAp (test de Student, p <0,008).

Tabla 11: Porcentaje de lisis celular específica anti-OVA in vivo (media  $\pm$  desviación estándar):

Lote	% de lisis celular,
1	82 $\pm$ 7
2	83 $\pm$ 4
5	53 $\pm$ 8
6	0

**[0113]** Los resultados de lisis celular se correlacionan con la expresión del marcador asociado con la desgranulación (Tablas 10 y 11). La inyección de poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina que habían sido tratados o no habían sido tratados con el anticuerpo anti-TER119 indujo la lisis de células que expresan el péptido de ovoalbúmina 257-264 de una manera que fue más eficaz que la inyección de poli (I:C) y ovoalbúmina libre (Tabla 10).

**[0114]** En conclusión, estos resultados demuestran la superioridad de los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina que han sido tratados o que no han sido tratados con el anticuerpo anti-TER119 en la activación y proliferación de las células T CD8 citotóxicas capaces de producir IFN $\gamma$ , desgranulando y lisando células que expresan el péptido de ovoalbúmina 257-264.

Ejemplo 10. Medición del mantenimiento de la respuesta de células T CD8 específicas de ovoalbúmina 30 días después de una sola inyección de glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina y adyuvante poli (I:C)

5 [0115] La evaluación del mantenimiento de la respuesta de células T CD8 específicas de OVA consistió en medir el porcentaje de células T CD8 específicas de OVA y la lisis celular in vivo 34 días después de una sola inyección.

[0116] Este estudio fue un estudio alogénico, ya que se inyectaron los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina de ratón OF1 en ratones C57Bl/6 no consanguíneos.

10 [0117] Se prepararon dos lotes de  $150 \times 10^7$  de glóbulos rojos de ratón OF1 cargados con ovoalbúmina obtenidos de acuerdo con la variante 2 del Ejemplo 1 que habían sido tratados o no habían sido tratados con el anticuerpo anti-TER119 (como se describe en el Ejemplo 3). El adyuvante, poli (I:C), se añadió a estos lotes, y también al lote que contiene ovoalbúmina libre o BOVAp. La cantidad de poli (I:C) inyectada por ratón fue de 25  $\mu\text{g}$ . La cantidad de OVA inyectada en los ratones se muestra en la Tabla 12.

15 [0118] Los lotes fueron inyectados por vía intravenosa en ratones C57BL/6. Tres ratones fueron inyectados con un lote determinado. Para medir la lisis celular in vivo, se inyectaron células que presentan el péptido de ovoalbúmina 257-264 asociado con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase en ratones inmunizados. 33 días después de la inyección, los ratones recibieron una inyección de  $0,5 \times 10^6$  esplenocitos que expresaban el péptido de ovoalbúmina 257-264 (NeoMPS, SC1302 de referencia) y se marcaron con una concentración moderada de CFSE y de  $0,5 \times 10^6$  esplenocitos que no expresaban el péptido y se marcaron con una alta concentración de CFSE (ensayo de lisis celular).

Lote 1: Poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina, tratados con anticuerpo anti-TER119

Lote 2: Poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina

25 Lote 3: microesferas de látex junto con el péptido de ovoalbúmina 257-264: BOVAp

Lote 4: poli (I:C) y BOVAp

Lote 5: poli (I:C) y ovoalbúmina libre

Lote 6: NaCl glucosada + plasma

30 [0119] 16 horas después de la inyección de los esplenocitos, los ratones fueron sacrificados y se extrajeron sus bazo. El porcentaje de células T CD8 específicas de OVA en los bazo de los ratones se midió mediante citometría de flujo utilizando tetrámero y el marcador de CD8 (Tabla 12). La lisis celular in vivo se midió por citometría de flujo utilizando CFSE (Tabla 13).

35 Tabla 12: Porcentaje de células T CD8 específicas de OVA 34 días después de la inyección de los lotes (media  $\pm$  desviación estándar)

Lote	Cantidad de OVA inyectada en ratones ( $\mu\text{g}$ )	% de células T CD8 específicas de OVA (media $\pm$ desviación estándar)
1	170	1,5 $\pm$ 0,2
2	138	1,7 $\pm$ 0,3
3	0	1,6 $\pm$ 0,1
4	0	1,4 $\pm$ 0,1
5	150	2,2 $\pm$ 0,2
6	0	1,8 $\pm$ 0,06

40 [0120] 34 días después de la inyección, el porcentaje de células T CD8 específicas de OVA fue equivalente para cada grupo (Tabla 12). Este resultado no es sorprendente dado que el pico de la proliferación de células T CD8 fue a aproximadamente el día 7 y fue seguido por una fase de contracción (Hervas-Stubbs S et al, Blood, 2007, 109: 5.318-5.326).

45 Tabla 13: Porcentaje de lisis celular específica anti-OVA in vivo (media  $\pm$  desviación estándar):

Lote	% de lisis celular in vivo (media $\pm$ desviación estándar)
1	49 $\pm$ 9*
2	54 $\pm$ 28
3	12 $\pm$ 5,4
4	21,6 $\pm$ 12
5	20,4 $\pm$ 19
6	0,9 $\pm$ 0,9

50 [0121] 34 días después de la inyección, las células T CD8 específicas de OVA eran todavía capaces de lisar células que expresaban péptido de ovoalbúmina 257-264 (Tabla 13). La inyección de poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con anticuerpo anti-TER119 indujeron la lisis celular de una manera que fue más eficaz que la inyección de poli (I:C) y BOVAp (\* test de Student,  $p < 0,04$ ).

[0122] En conclusión, estos resultados demuestran que los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina son superiores, no sólo en lo que respecta a la activación y proliferación de las células T CD8 citotóxicas, sino también en cuanto al mantenimiento/supervivencia de estas células T que son capaces de lisar células que expresan el péptido de ovoalbúmina 257-264.

Ejemplo 11. Medición de la respuesta de las células T CD8 específicas de ovoalbúmina después de una sola inyección de glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados químicamente y de adyuvante poli (I:C)

[0123] Este estudio es un estudio alogénico, ya que los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina de ratones OF1 se inyectan en ratones C57Bl/6 no consanguíneos.

[0124] Se prepara un lote de  $132 \times 10^7$  de glóbulos rojos de ratón OF1 cargados con ovoalbúmina preparados usando la variante 2 del ejemplo 1 y tratados químicamente con BS3 1 mM (como se describe en el ejemplo 4). El adyuvante poli(I:C) se añade a este lote, y al lote que contiene ovoalbúmina libre. La cantidad de poli (I:C) inyectada por ratón es de 25 µg. La cantidad de OVA inyectada en los ratones se indica en la Tabla 14.

Lote 1: Poli (I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con BS3 1 mM

Lote 2: Poli (I:C) y ovoalbúmina libre

Lote 3: Poli (I:C)

Lote 4: Glucosa que contiene NaCl

[0125] Los lotes se inyectan por vía intravenosa en ratones C57BL/6. Se inyectan un mínimo de 3 ratones se inyectan con un lote determinado. Siete días después de la inyección, los ratones se sacrifican y se extraen los bazo de los ratones. El porcentaje de células T CD8 específicas de OVA en el bazo de los ratones se mide por citometría de flujo utilizando tetrámero y el marcador de CD8 (Tabla 14).

#### Resultados

[0126]

Tabla 14: Porcentaje y número de células T CD8 específicas de OVA siete días después de la inyección de los lotes (media ± desviación estándar):

Lotes	Cantidad de OVA inyectada en los ratones (µg)	% de células T CD8 específicas de OVA (media ± desviación estándar)
1	38	1,8 ± 0,6
2	150	1,2 ± 0,3
3	0	1 ± 0
4	0	0,8 ± 0,1

[0127] Los ratones inyectados con poli(I:C) y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con BS3 tienen un mayor porcentaje de células T CD8 específicas de OVA que los ratones inyectados con OVA libre y poli (I:C) o que los ratones inyectados con poli (I:C). Estos resultados no son estadísticamente diferentes, pero hay que señalar que la cantidad de OVA libre inyectada es más de tres veces mayor que la cantidad de OVA inyectada en el lote que contenía glóbulos rojos cargados con OVA.

[0128] En conclusión, estos resultados muestran que los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con BS3 también son capaces de generar células T CD8 específicas de OVA.

Ejemplo 12. Medición de la respuesta de células T CD8 específicas de ovalbúmina después de una sola inyección de glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina y de adyuvante CL-097

[0129] Este estudio es un estudio alogénico, ya que los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina de ratones OF1 se inyectan en ratones C57Bl/6 no consanguíneos.

[0130] Se preparan lotes de  $119 \times 10^7$  glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina de ratones OF1 preparados utilizando la variante 1 del ejemplo 1 y tratados o no con el anticuerpo anti-TER 119 (como se describe en el ejemplo 3). El adyuvante, CL097 (Invivogen, ref tIrl-C97), se añade o no a estos lotes. La cantidad de CL097 inyectada por ratón es de 0,15 µg. La cantidad de OVA inyectada en los ratones se indica en la Tabla 15.

Lote 1: CL097 y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con el anticuerpo anti-TER 119

Lote 2: Glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados con el anticuerpo anti-TER 119

Lote 3: CL097 y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina

Lote 4: Glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina

Lote 5: glucosa que contiene NaCl

[0131] Los lotes se inyectan por vía intravenosa en ratones C57BL/6. Cuatro días después de la inyección, los ratones se sacrifican y se extraen los bazos de los ratones. La producción de IFNg por los esplenocitos de los ratones inyectados con los diversos lotes se mide en los sobrenadantes de cultivo después de tres días de estimulación in vitro en presencia de 0,1 µg/ml de péptido de ovoalbúmina 257-264 por medio del ensayo de ELISA.

Resultados

[0132]

Tabla 15: Producción de IFNg por esplenocitos estimulados in vitro con 0,1 µg/ml de péptido de ovoalbúmina 257-264 durante 3 días:

Lotes	Cantidad de OVA inyectada en los ratones (µg)	Producción de IFNg por esplenocitos en ng/ml
1	83	15,2
2	83	5,7
3	103	11,4
4	103	7,4
5	0	0,4

[0133] Los resultados de la producción de IFNg por los esplenocitos muestran una mayor producción de IFNg cuando los ratones recibieron una inyección del adyuvante CL097 y glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados o no con el anticuerpo anti-TER 119.

[0134] En conclusión, el adyuvante CL097 también potencia la respuesta de IFNg inducida por la inyección de los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina.

Ejemplo 13. Medición del crecimiento tumoral después de una inyección de adyuvante poli (I:C) y eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados o no tratados en ratones

[0135] El propósito de este estudio es medir el crecimiento tumoral de la línea celular EG.7 en ratones C57BI/6 después de la inyección de una dosis única de poli (I:C) y eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados o no tratados. Las células tumorales EG.7 se obtienen de la ATCC (ATCC-CRL-2113). Las células EG.7 se originan a partir de la línea celular EL.4, que sintetiza y secreta constitutivamente OVA.

[0136] Este es un estudio alogénico, ya que los eritrocitos cargados con ovoalbúmina de ratones OF1 se inyectan en ratones C57BL/6. El modelo en este experimento es un modelo profiláctico.

[0137] Se preparan dos lotes de  $165 \times 10^7$  eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados o no con anticuerpo de ratones OF1 de acuerdo con la variante 2 del ejemplo 1. El adyuvante, poli (I:C), se añade a los lotes. Se inyectan 25 µg de Poly (I:C). El control negativo es una suspensión de eritrocitos descargados. Las cantidades de OVA inyectadas a los ratones se indican en la Tabla 16.

Lote 1: Poli (I:C) y eritrocitos cargados con ovoalbúmina tratados con anticuerpo

Lote 2: Poli (I:C) y eritrocitos cargados con ovoalbúmina

Lote 3: Eritrocitos descargados

[0138] Los lotes se inyectan por vía intravenosa a ratones C57BI/6 (10 ratones por grupo). Siete días después de la inyección por lotes, se inyectan  $2,2 \times 10^6$  células EG.7 por ratón por vía subcutánea. A los ratones se les hace un seguimiento para el crecimiento tumoral. El crecimiento tumoral se evalúa midiendo el diámetro del tumor en centímetros (registrado como el promedio de dos mediciones del diámetro perpendicular). El tamaño del tumor se mide 3 veces por semana en intervalos de 2 días durante 14 días. Los ratones con tumores de más de 2,0 cm de diámetro se sacrifican.

Tabla 16: Cantidad de OVA inyectada por ratones

Lotes	Cantidad de OVA inyectada a ratones (µg)
1	134
2	134
3	0

Tabla 17: Crecimiento del tumor

Lotes	Crecimiento del tumor (mm <sup>3</sup> ), los días después de la inyección de células tumorales						
	0	3	5	7	10	12	14

1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	363 ± 200	756 ± 462	1009 ± 445	1198 ± 541

[0139] 7 días después de la inyección de EG.7, el tamaño de los tumores es medible en el flanco de los ratones previamente inyectados con eritrocitos descargados y los tumores continúan con el crecimiento hasta el final del estudio. Mientras, no se observan tumores en el flanco de los ratones inyectados con poli (I:C) y los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados o no con el anticuerpo anti-TER 119. La observación de los ratones todavía está en curso.

[0140] En conclusión, estos resultados demuestran que los glóbulos rojos cargados con ovoalbúmina tratados o no con el anticuerpo anti-TER 119 son eficientes para prevenir el crecimiento de células tumorales que expresan OVA.

Ejemplo 14. Medición de la fagocitosis de glóbulos rojos de cerdo por macrófagos y células dendríticas in vivo

[0141] Este estudio es un estudio xenogénico, ya que se inyectan glóbulos rojos de cerdo en ratones C57BL/6.

[0142] Los glóbulos rojos se lavan tres veces en glucosa que contiene NaCl antes de marcarse con CFSE, como se describe anteriormente. Los glóbulos rojos se lavan de nuevo tres veces en glucosa que contiene NaCl y a continuación se lleva de nuevo a un hematocrito de 50%. Se inyecta un lote de  $142 \times 10^7$  de glóbulos rojos de cerdo por vía intravenosa en tres ratones C57BL/6. Una hora después de la inyección, los ratones se sacrifican y los bazo, los hígados y los fémures de los ratones se extraen. La fluorescencia incorporada en los macrófagos que expresan el marcador de F4/80 o el marcador de CD11b, en las células dendríticas mieloides que expresan los marcadores de CD11c y de CD11b y en las células dendríticas plasmacitoides que expresan los marcadores de CD11c y CD8 se mide por citometría de flujo.

Lote 1: Glóbulos rojos de cerdo  
Lote 2: Glucosa que contiene NaCl

Resultados

[0143]

Tabla 18: Porcentaje de macrófagos o células dendríticas del bazo que han fagocitado glóbulos rojos fluorescentes 1 hora después de la inyección:

Lotes	Macrófagos F4/80	Macrófagos CD11b	Células dendríticas mieloides	Células dendríticas plasmacitoides
1	27 ± 6	4 ± 2	21 ± 5,5	45 ± 6
2	0	1	4	3

Tabla 19: Porcentaje de macrófagos o células dendríticas de la médula ósea que han fagocitado glóbulos rojos fluorescentes 1 hora después de la inyección:

Lotes	Macrófagos F4/80	Macrófagos CD11b	Células dendríticas mieloides	Células dendríticas plasmacitoides
1	5,3 ± 7,5	0,8 ± 1	5 ± 3	5 ± 7
2	6,3	0	6	12,9

Tabla 20: Porcentaje de macrófagos o células dendríticas del hígado que han fagocitado glóbulos rojos fluorescentes 1 hora después de la inyección:

Lotes	Macrófagos CD11b	Células dendríticas mieloides	Células dendríticas plasmacitoides
1	1,1 ± 1,1	3 ± 2,8	1,2 ± 1
2	1,7	3,4	0,7

[0144] Una hora después de la inyección, los glóbulos rojos de cerdo fueron fagocitados de manera eficiente por los macrófagos F4/80 y las células dendríticas del bazo (Tabla 18). Las células dendríticas plasmacitoides del bazo son las células más involucradas en la fagocitosis de los glóbulos rojos de cerdo. En la médula ósea y el hígado, los macrófagos y las células dendríticas no fagocitaron los glóbulos rojos fluorescentes (Tablas 19 y 20).

[0145] En conclusión, el uso de glóbulos rojos de cerdo permite el direccionamiento y la fagocitosis de los glóbulos rojos por las células del bazo implicadas en la generación de respuestas inmunes (Lou Y., 2007, J of Immunol, 178: 1534-1541).

Ejemplo 15. Características de los glóbulos rojos de cerdo que comprenden ovoalbúmina.

**[0146]** Se prepararon dos lotes de glóbulos rojos de cerdo que habían sido cargados con ovoalbúmina (obtenidos de acuerdo con la variante 2 del Ejemplo 1) o que no se habían cargado con la misma.

5 Lote 1: Glóbulos rojos de cerdo cargados con OVA

Lote 2: Glóbulos rojos de cerdo no cargados con OVA.

10 **[0147]** Los lotes del material de partida se caracterizaron al final de la producción y 18 horas después de la producción. El volumen globular promedio, la hemoglobina corpuscular promedio y la concentración de glóbulos rojos se midieron usando un contador de células ABX. La fragilidad osmótica, que corresponde a la concentración de NaCl que induce el 50% de hemólisis de glóbulos rojos, se midió utilizando un instrumento Osmocells (SD Médica). La hemoglobina extracelular se midió por espectrofotometría. La concentración corpuscular de ovoalbúmina, la concentración extracelular de ovoalbúmina y la cantidad globular promedio de ovoalbúmina se determinaron usando una prueba de ELISA.

15

Tabla 21: Características de glóbulos rojos de cerdo que comprenden ovoalbúmina:

Características	Día de producción			18 horas después de la producción		
	Material de partida	Lote 1	Lote 2	Material de partida	Lote 1	Lote 2
Volumen globular promedio (m <sup>3</sup> )	65	55	57	65	56,0	58
Hemoglobina corpuscular promedio (g/dl)	31,9	27,7	25,9	31,4	28,9	25,8
Fragilidad osmótica (salinidad que induce el 50% de hemólisis en g/l de NaCl)				3,98	2,51	3,33
Hematocrito de suspensión (%)	36,8	48,2	50	36,5	46,3	48
Concentración de glóbulos rojos (10 <sup>6</sup> /mm)	5,64	9,1	8,1	5,9	9	8,4
Hemoglobina extracelular (g/dl)	0,04	0,27	0,196	0,05	0,79	0,56
Concentración de ovoalbúmina corpuscular (mg/ml de glóbulos rojos)		0,66	0		0,71	0
Concentración de ovoalbúmina extracelular (mg/ml de producto final)		0,02	0		0,02	0
Cantidad globular promedio (mg/10 <sup>9</sup> GR)		0,03	0		0,04	0

20 **[0148]** Como se esperaba, el procedimiento de diálisis causó una reducción en el volumen globular y la hemoglobina corpuscular. Además, la fragilidad osmótica de los lotes fue menor que la de los glóbulos rojos de la sangre inicial (Tabla 21). No se observaron diferencias importantes entre el lote que comprendía la ovoalbúmina (lote 1) y el que no lo comprendía (lote 2).

**[0149]** Para el lote 1, la cantidad de ovoalbúmina extracelular fue relativamente baja en comparación con la cantidad de ovoalbúmina encapsulada y no había aumentado 18 horas después de la producción, lo que demuestra la estabilidad de los glóbulos rojos que encapsulan la ovoalbúmina.

5 **[0150]** Así, es posible encapsular ovoalbúmina en glóbulos rojos de cerdo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende una suspensión de glóbulos rojos que encapsulan un antígeno tumoral y un adyuvante para activar la maduración de células dendríticas, en la que el adyuvante está presente en los glóbulos rojos, en su superficie y/o fuera de los glóbulos rojos, para utilizar como vacuna antitumoral terapéutica que induce, en un huésped, una respuesta celular citotóxica contra las células tumorales.
- 10 2. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que los glóbulos rojos (1) contienen un antígeno y (2) están en forma de un complejo inmune con una inmunoglobulina que reconoce un epítipo en la superficie de los glóbulos rojos, a fin de promover la fagocitosis de dichos glóbulos rojos por las células dendríticas.
- 15 3. Composición para utilizar, según la reivindicación 2, en la que los glóbulos rojos forman un complejo inmune con un anticuerpo anti-rhesus o anti-glicoforina A o anti-CR1.
- 20 4. Composición para utilizar, según la reivindicación 2 o 3, en la que la inmunoglobulina es una IgG.
- 25 5. Composición para utilizar, según la reivindicación 1, en la que los glóbulos rojos (1) contienen un antígeno y (2) son tratados térmicamente o químicamente a fin de promover la fagocitosis de dichos glóbulos rojos por las células dendríticas.
- 30 6. Composición para utilizar, según la reivindicación 2, en la que los glóbulos rojos en forma de un complejo inmune son tratados térmicamente o químicamente.
- 35 7. Composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, en la que los glóbulos rojos son glóbulos rojos xenogénicos.
- 40 8. Composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el adyuvante es un ligando de TLR (receptor de tipo Toll) o una citoquina.
- 45 9. Composición para utilizar, según la reivindicación 8, en la que el ligando de TLR se selecciona de imidazoquinolinas pertenecientes al grupo que consiste en imidazoquinolina, imiquimod, resiquimod, oligodesoxinucleótidos CpG, LPS (lipopolisacáridos) o poli (ácido inosínico)-poli (ácido citidílico).
- 50 10. Composición para utilizar, según la reivindicación 8, en la que la citoquina se selecciona del grupo que consiste en interferón alfa, IL-2 (interleucina 2), IFN $\gamma$  (interferón gamma), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos), IL-12 (interleucina 12) o TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa).
- 55 11. Composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende al menos dos antígenos tumorales representativos del tumor a tratar.
- 60 12. Composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en los siguientes antígenos: alfa-actinina-4; ARTC1; proteína de fusión BCR-ABL (b3a2); B-RAF; CASP-5; CASP-8; beta-catenina; Cdc27; CDK4; CDKN2A; COA-1; proteína de fusión dek-can; EFTUD2; factor de elongación 2; proteína de fusión ETV6-AML1; FN1; GPNMB; proteína de fusión LDLR-fucosiltransferasaAS; HLA-A2d; HLA-A11d; hsp70-2; KIAAO205; MART2; ME1; MUM-1f; MUM-2; MUM-3; neo-PAP; miosina de clase I; NFYC; OGT; OS-9; proteína de fusión pml-RARalfa; PRDX5; PTPRK; K-ras; N-ras; RBAF600; SIRT2; SNRPD1; proteína de fusión SYT-SSX1 o SYT-SSX2; Triosafofato isomerasa; BAGE-1; GAGE-1,2,8; GAGE-3,4,5,6,7; GnTVf; HERV-K-MEL; KK-LC-1; KM-HN-1; LAGE-1; MAGE-A1; MAGE-A2; MAGE-A3; MAGE-A4; MAGE-A6; MAGE-A9; MAGE-A10; MAGE-A12; MAGE-C2; mucina k; NA-88; NY-ESO-1/LAGE-2; SAGE; Sp17; SSX-2; SSX-4; TRAG-3; TRP2-INT2g; CEA; gp100/Pmel17; Calicreína 4; mamaglobina-A; Melan-A/MART-1; NY-BR-1; OA1; PSA; RAB38/NY-MEL-1; TRP-1/gp75; TRP-2; tirosinasa; adipofilina; AIM-2; BING-4; CPSF; ciclina D1; Ep-CAM; EphA3; FGF5; G250/MN/CAIX; HER-2/neu; IL13Ralfa2; carboxil-esterasa intestinal; alfa-fetoproteína; M-CSF; mdm-2; MMP-2; MUC1; p53; PBF; PRAME; PSMA; RAGE-1; RNF43; RU2AS; secernina 1; SOX10; STEAP1; survivina; telomerasa; WT1; FLT3-ITD; BCLX(L); DKK1; ENAH (hMena); MCSP; RGS5; gastrina-17; Gonadotropina coriónica humana, EGFRvIII, HER2, HER2/neu, P501, guanililciclase C, PAP.
- 65 13. Composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que los glóbulos rojos que encapsulan un antígeno tumoral se han preparado por lisis-resellado.
14. Composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende los glóbulos rojos a un nivel de hematocrito de entre el 40 y el 70%.
15. Composición para utilizar, según la reivindicación 14, que comprende los glóbulos rojos a un nivel de hematocrito de entre el 45 y el 55%.

## ES 2 649 761 T3

16. Composición para utilizar, según la reivindicación 14, que comprende los glóbulos rojos a un nivel de hematocrito del 50%.
- 5 17. Composición para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que se envasa en un volumen de 10 a 250 ml.
18. Vacuna antitumoral terapéutica, que comprende una cantidad eficaz de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17.
- 10 19. Utilización de una composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para la fabricación de una vacuna antitumoral terapéutica.

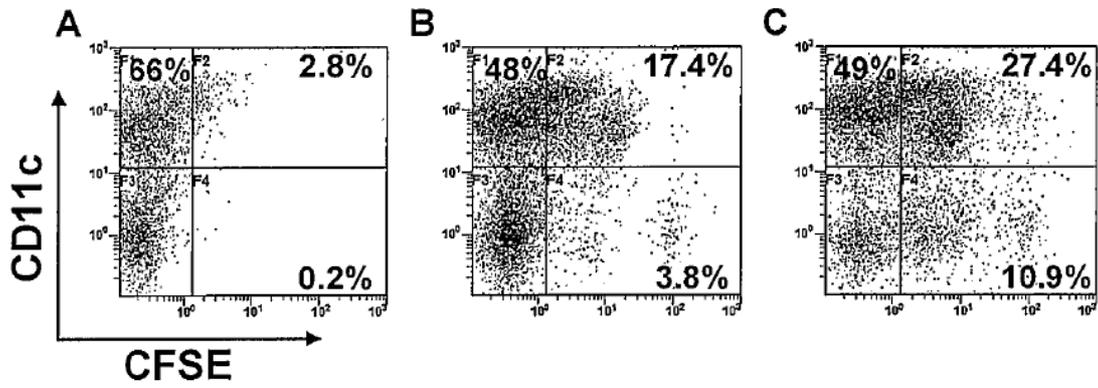


Figura 1

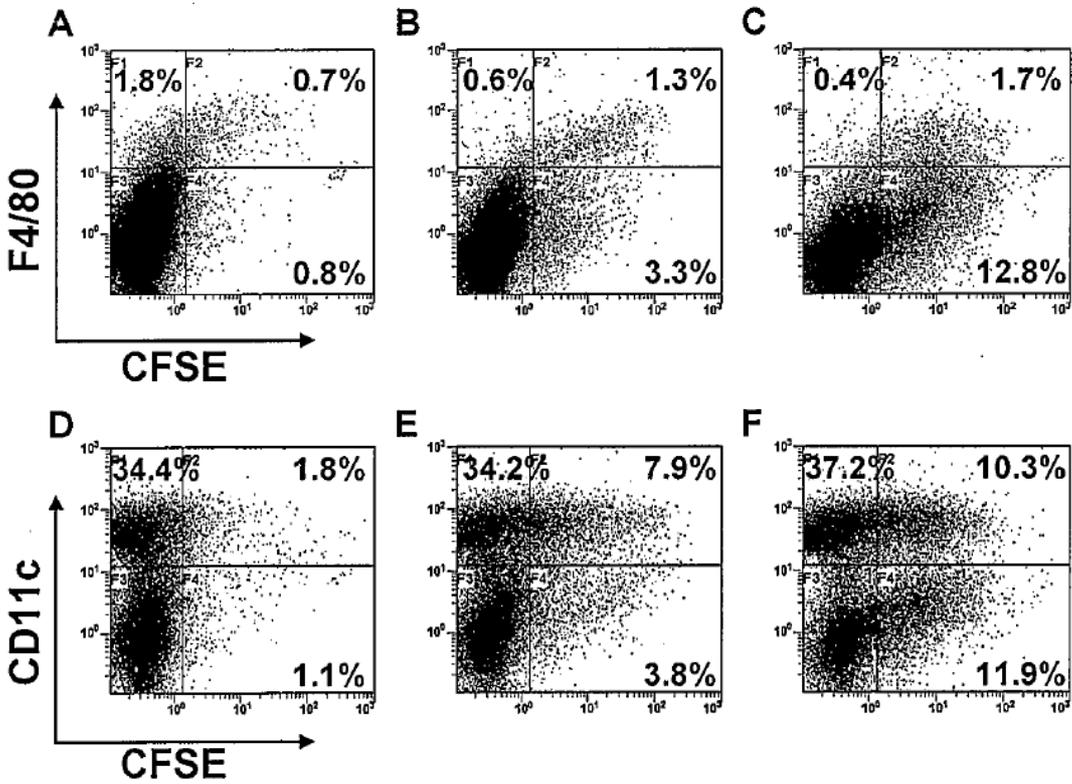


Figura 2

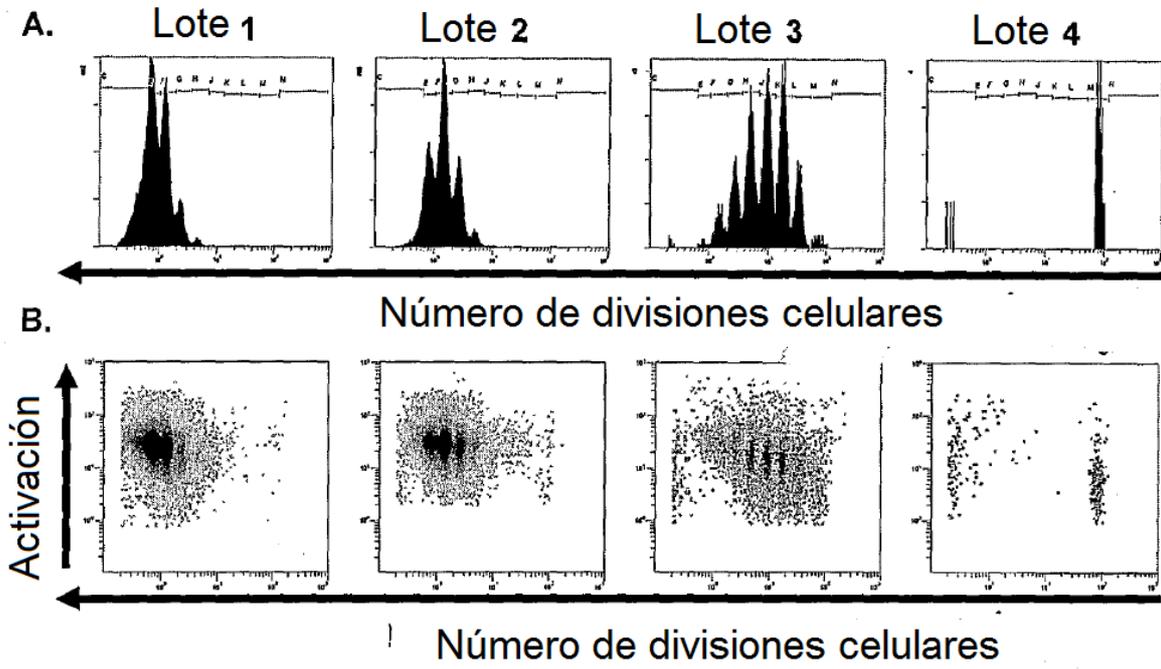


Figura 3