

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 140**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2014 PCT/EP2014/053603**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO14128305**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2014 E 14706057 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2958587**

54 Título: **Estrategia de vacunación**

30 Prioridad:

**25.02.2013 EP 13156546**

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

**30.04.2019**

73 Titular/es:

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN (33.3%)  
Arcisstrasse 21  
80333 München, DE;  
HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN -  
DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR  
GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH) (33.3%) y  
KLINIKUM RECHTS DER ISAR DER  
TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN (33.3%)**

72 Inventor/es:

**KNOLLE, PERCY;  
HEIKENWÄLDER, MATHIAS;  
PROTZER, ULRIKE y  
HUANG, LI-RUNG**

74 Agente/Representante:

**LOZANO GANDIA, José**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 711 140 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

## ESTRATEGIA DE VACUNACIÓN

5 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica. Según la presente estrategia de vacunación, el ligando de TLR9 se adapta o diseña para su uso como agente de amplificación por multiplicación para potenciar los números y la funcionalidad de células T CD8 en una estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación para expansión de células T por amplificación. En particular, el ligando de TLR9 se usa como componente que va a administrarse después de la sensibilización del individuo que va a vacunarse. La estrategia de vacunación es particularmente útil contra infecciones agudas y crónicas con patógeno intracelular y contra cánceres de cualquier clase.

## Técnica anterior

15 Se conocen diversas estrategias para la vacunación de individuos. Normalmente, una estrategia de vacunación se basa en la administración repetitiva de la vacuna al individuo. Mediante administración consecutiva de la vacuna, el sistema inmunitario debe provocar una respuesta inmunitaria contra el antígeno o patógeno contra el que se va a vacunar.

20 Existen diversas estrategias. Por ejemplo, estrategias comunes se basan en la administración de componentes antigénicos en puntos de tiempo predeterminados. Normalmente, los componentes antigénicos se administran junto con adyuvantes para potenciar la respuesta inmunitaria en el individuo. La vacunación puede realizarse de manera bien terapéutica o bien profiláctica. Mientras que las estrategias de vacunación profiláctica tienen el objetivo de estimular el sistema inmunitario del individuo en el desarrollo de inmunidad adaptativa preventiva frente a un patógeno, el objetivo de la estrategia de vacunación terapéutica es combatir infecciones o enfermedades persistentes, como cáncer, presentes en el organismo del individuo.

25 La vacunación debe permitir la inmunización de dicho individuo desarrollando memoria inmunológica e inmunidad protectora contra el inmunógeno (antígeno) presente en la vacuna.

30 Normalmente, la inmunización permite el desarrollo de células B de memoria y células T de memoria que son responsables de una respuesta rápida durante un segundo encuentro con la estructura antigénica o el inmunógeno.

35 Diversas estrategias de vacuna se adaptan para permitir el desarrollo de respuestas de células B de memoria adecuadas así como de respuestas de células T de memoria, concretamente, estrategias de vacunación para reforzar la respuesta inmunitaria basada en anticuerpos, es decir la respuesta inmunitaria humoral. Estas estrategias de vacunación se han desarrollado para permitir la vacunación profiláctica.

40 Por ejemplo, se conoce una vacuna contra la hepatitis B relacionada con una vacuna desarrollada para la prevención de infección por el virus de la hepatitis B. Normalmente, se administra un ciclo de dos o tres inyecciones de vacuna, la segunda inyección al menos un mes después de la primera dosis y administrándose la tercera inyección seis meses después de la primera dosis. La vacunación tiene por objetivo establecer anticuerpos contra la hepatitis B, es decir, establecer una respuesta inmunitaria humoral eficaz en prevenir infección por hepatitis B. La hepatitis B es una enfermedad inflamatoria infecciosa del hígado provocada por la respuesta inmunitaria contra el virus de la hepatitis B que representa un ejemplo típico de un patógeno intracelular que infecta de forma crónica a los seres humanos.

45 Además, se han descrito estrategias de vacunación contra patógenos intracelulares o células cancerosas, es decir, estrategias de vacunación terapéutica. Muraoka, d., *et al.*, J. Immunol, 2010, 185(6), 3768-3776 notifican vacunas peptídicas que inducen crecimiento de tumor potenciado asociado con inducción de apoptosis en células T CD8. En el mismo, se describe el uso de un ligando de TLR9 o agonista de TLR9, CpG, como adyuvante administrado simultáneamente con el antígeno dando como resultado la reducción de apoptosis en inducción en células T CD8 efectoras. Melief. C.J.M., *et al.*, 2002 Immunol. Review, 177-182 revisan las vacunas contra el cáncer terapéuticas eficaces basándose en guiado de precisión de linfocitos T citotóxicos. En el mismo, se describe el uso de ligandos de TLR9 o agonistas de TLR9 así como de agonistas de TLR4 como adyuvantes que se administran conjuntamente junto con el antígeno.

50 El hígado es un órgano con funciones inmunitarias únicas que están determinadas por su microentorno particular y sus células presentadoras de antígeno residentes en el órgano. Debido a esta regulación distintiva de las respuestas de células T se considera que el hígado es un órgano linfoide. Aunque el sistema inmunitario en principio puede eliminar infecciones del hígado provocadas por virus, bacterias o parásitos, ciertas infecciones con patógenos hepatotrópicos tales como virus de la hepatitis B (VHB) o virus de la hepatitis C o parásitos de malaria pueden persistir y establecer una infección crónica, que afecta a cientos de millones de personas en todo el mundo. Se han notificado varios mecanismos moleculares en el hígado que limitan la función y expansión de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CTL), tales como expresión ubicua de moléculas inhibidoras como PDL1 y galectina 9, expresión de enzimas que metabolizan aminoácidos requeridos para expansión de células T tales como arginasa o liberación de

citocinas de regulación inmunitaria como IL-10 y TGF $\beta$  (Protzer, U., *et al.*, Nat Rev Immunol 12, 201-213 (2012)). Estas señalizaciones reguladoras limitan la función de CTL en el hígado, lo que puede servir para proteger el hígado infectado frente a una inmunopatología fulminante induciendo una función efectora de CTL oscilatoria (Isogawa, M., *et al.*, Immunity 23, 53-63 (2005)) pero puede también dar como resultado agotamiento funcional o eliminación clonal de CTL específicas de patógeno (Das, A. *et al.*, J Exp Med 205, 2111-2124 (2008)). Sin embargo, se mostró que grandes números de CTL específicas de parásitos pudieron erradicar hepatocitos infectados indicando que el número de CTL requeridas para hallar y eliminar hepatocitos infectados dentro del laberinto de sinusoides del hígado es crítico para el control inmunitario satisfactorio de la infección. Por tanto, la generación de grandes números de CTL parece ser un elemento importante para superar una infección crónica. En la actualidad, no existe ninguna inmunoterapia convincente para tratamiento de infección viral crónica del hígado o para tratamiento de patógenos intracelulares en el hígado u otros patógenos de un individuo así como estrategias para combatir tumores persistentes en un individuo. Aunque existen estrategias de vacunación basadas en adyuvante para la generación de respuestas inmunitarias celulares, no se describen en la técnica la expansión satisfactoria de CTL ni la erradicación de las dianas, como patógenos intracelulares o tumores.

La generación de números suficientes de CTL para defensa contra patógenos se regula mediante el grado de presentación de antígenos a través de células dendríticas maduras de forma apropiada en tejido linfático secundario. Además, las CTL pueden proliferar dentro de tejidos infectados después de la salida de los ganglios linfáticos tras activación restringida por MHC-I mediante el receptor de células T, pero las señalizaciones reguladoras locales en el microentorno hepático limitan o incluso impiden tal expansión local. Durante la inflamación crónica se notificó que la generación de tejido linfático terciario aumentaba la sensibilización de células T locales y por lo tanto aumentaba los números de CTL dentro de tejido inflamado de forma crónica (Neyt, K., *et al.*, Trends in immunology 33, 297-305 (2012)). La generación de tejido linfático terciario en el pulmón aumentó la inmunidad durante la infección por influenza. No existen hasta la fecha informes sobre la relevancia de tejido linfático terciario para infección crónica del hígado. También falta conocimiento sobre los mecanismos que permiten la expansión local de CTL en tejidos infectados, particularmente el hígado.

Por tanto, aún hay una demanda para nuevas estrategias de vacunas y nuevas vacunas que permitan una vacunación mejorada contra patógenos intracelulares, por ejemplo patógenos intracelulares que persisten en órganos y establecen una infección crónica, así como contra células tumorales, que den como resultado una expansión masiva de CTL.

### Sumario de la invención

Los inventores encontraron que el ligando de TLR9 es útil en una vacunación profiláctica o terapéutica mediante lo cual dicho ligando de TLR9 se adapta o diseña para su uso como agente de amplificación por multiplicación para potenciar números y funcionalidades de células T CD8 en una estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación para expansión de células T por amplificación según se define en la reivindicación 1.

Además, la presente divulgación se refiere a una estrategia de vacunación que incluye el uso de ligando de TLR9 como agente de amplificación por multiplicación para potenciar números y funcionalidad de células T CD8 en una estrategia de sensibilización-amplificación mediante lo cual el agente de sensibilización es un antígeno derivado del patógeno intracelular o la célula tumoral contra el que va a vacunarse mientras que el ligando de TLR9 es un agonista conocido para administrarse ocho días después de la administración del agente de sensibilización, preferiblemente dentro de un límite de tiempo de 10 a 20 días.

Se prefiere que el ligando de TLR9 se utilice en estrategias de vacunación profiláctica o terapéutica en entidades de la enfermedad en las que las respuestas de células T CD8 son de valor terapéutico, tales como infección viral crónica, como infección por hepatitis B, o cáncer.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Eliminación de infección crónica por VHB

(a) Ratones con infección crónica por AdvHB después de la infección por AdvHB a  $1 \times 10^8$  uif. Transcurso de tiempo de ALT en suero tras vacunación con ADN de Hbc (d0) y tratamiento con TLR9-L o CTRL (d12). Vacunación con ADN de OVA como control (n=5 por grupo). (b-f) En el d15 después de la vacunación, (b) inmunohistoquímica para CD11b y CD8 en el hígado según se describe en (a) en el d15 después de la vacunación; (c) aumento de CTL específicas de HBC<sub>93-100</sub> en bazo e hígado detectadas por tinción con dextrámero (n=3 por grupo), ND, no detectable; (d) CTL específicas de HBC<sub>93-100</sub> que producen IFN $\gamma$  aisladas de hígados de ratones después de re-estimulación *ex vivo* específica de péptido HBC; (e) números totales de CTL específicas de HBC<sub>93-100</sub> que producen IFN $\gamma$  después de re-estimulación *ex vivo* específica de péptido por gramo de hígado (n=3, por grupo); (f) niveles de expresión de PD-1 en CTL específicas de HBC<sub>93-100</sub> directamente *ex vivo*. (g) Niveles de HBeAg en suero de ratones según se describe en (a). (h) Detección inmunohistoquímica e (i) cuantificación de hepatocitos positivos para Ag de núcleo de HB en el d42 después de la vacunación. HPF, campo de gran aumento (amplificación, 100x). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  (prueba de la t de Student para datos emparejados). Los datos son representativos de tres

experimentos (a, c, d, e, f, g) o dos experimentos (b, h, i) (a, c, e, i; barras de error, d.e.).

Figura 2: proliferación de poblaciones de células T CD8 particulares en el hígado después de estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación. Las células T CD8<sup>+</sup> de memoria centrales (TCM) (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>hi</sup>) o las células T CD8<sup>+</sup> de memoria efectoras (TEM) (CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>low</sup>) se clasificaron mediante FAC a partir de animales CD45.1<sup>+</sup> 8 semanas después de la infección por VCML y se transfirieron de manera adoptiva a ratones receptores CD45.2<sup>+</sup>. Todas las células son negativas para KLRG1, es decir, que no son células efectoras de corta vida. Se logró la inducción de iMATE mediante inyección intravenosa de ligando de TLR9. Después de 3 días, se inyectó BrdU a los animales por vía intravenosa y después de una captura de 15 minutos, se sacrificaron los animales y se analizaron los hígados para determinar la presencia y proliferación de células T CD8<sup>+</sup>. Se muestra el análisis por citometría de flujo de la proliferación basándose en incorporación de BrdU y tinción con 7-AAD en células T CD8<sup>+</sup> aisladas a partir del hígado. Las TCM transferidas de manera adoptiva mostraron proliferación fuerte según se detectó por el gran porcentaje de células que estaban en fase S y G2-M. De manera importante, las TEM también mostraron proliferación marcada en presencia de iMATE, es decir después de la aplicación de CpG. También proliferaron células T CD45.2<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> endógenas dentro de iMATE; claramente, sólo proliferaron células T CD8<sup>+</sup> Cd44<sup>hi</sup> que habían tenido contacto con antígenos pero no las células T CD8<sup>+</sup> Cd44<sup>lo</sup> sin exposición previa. Además, tanto las células T CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>hi</sup> como las CD62L<sup>low</sup> proliferaron después de la aplicación de TLR9L. Estos resultados demostraron que la administración de ligando de TLR9 conduce a la proliferación de TEM y TCM en el hígado.

### Descripción detallada de la presente invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un ligando de TLR9 según se define en la reivindicación 1 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica mediante lo cual dicho agonista de TLR9 y/o agonista de TLR4 se adapta o diseña para su uso como agente de amplificación por multiplicación que potencia el número y la funcionalidad de células T CD8 en una estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación para expansión de células T por amplificación.

El término “agente de amplificación” según se usa en el presente documento se refiere a un agente que puede potenciar el número de células T CD8 también identificadas en el presente documento como células T efectoras citotóxicas, así como la funcionalidad de dichas células T CD8. La potenciación del número de las células T CD8 identifica que el número de células T CD8 después de la administración aumenta al menos 5 veces en órganos periféricos tales como el hígado. En particular, el agente de sensibilización no es un adyuvante para administración simultánea junto con el antígeno.

El término “funcionalidad de células T CD8” según se usa en el presente documento refiere a una expresión de citocina aumentada así como a una citotoxicidad aumentada de las células T CD8.

El término “agonista de TLR9” o “agonista de TLR4” se usa en el presente documento de forma intercambiable con los términos “ligando de TLR9” y “ligando de TLR4”.

El término “estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación” según se usa en el presente documento se refiere a una estrategia de vacunación para la expansión de células T CD8. Dicha estrategia difiere de otras estrategias de vacunación incluyendo la estrategia de vacunación de sensibilización-refuerzo. Mientras que la estrategia de sensibilización-refuerzo tiene por objetivo establecer una respuesta de células B y células T de memoria en el futuro, otras estrategias que también se denominan algunas veces estrategias de sensibilización-refuerzo tienen por objetivo potenciar o prolongar la respuesta inmunitaria actual administrando agentes “de refuerzo” poco después de la sensibilización. Las estrategias de vacunación de sensibilización-refuerzo tienen por objetivo aumentar la inmunidad aumentando el número de células T CD8 efectoras procedentes y maduras a partir de células T de memoria centrales que residen en tejido linfático. En cambio, la estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación según la presente invención tiene por objetivo expandir directamente células T CD8 efectoras, es decir aumentar el número de células T CD8 efectoras, a partir de la reserva de células T de memoria efectoras residentes en órganos y células efectoras citotóxicas presentes en el sujeto.

La etapa de sensibilización es normalmente una etapa de administración de antígeno o bien en forma de un compuesto individual (inmunógeno) o bien en forma de una mezcla, por ejemplo en forma de ARN o ADN aislado que codifica para el inmunógeno deseado, junto con un adyuvante, mientras que el agente de amplificación según se define en el presente documento expande células T CD8 activadas anteriormente de un modo independiente de antígeno.

El término “expansión de células T por amplificación” según se usa en el presente documento se refiere a la expansión de células T CD8 efectoras. Se aumenta el número de dichas células T CD8 y presentan una funcionalidad aumentada según se define en el presente documento.

Según se usa en el presente documento, los términos “que comprende”, “comprende” y “compuesto por” son sinónimos de “que incluye”, “incluye” o “que contiene”, “contiene” y son inclusivos o abiertos y no excluyen

miembros, elementos o etapas de método adicionales, no mencionados. Se apreciará que los términos “que comprende”, “comprende” y “compuesto por” así como “que incluye”, “incluye” o “que contiene”, “contiene” según se usan en el presente documento comprenden los términos “que consiste en”, “consiste” y “consiste en”.

5 Todas las referencias citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por el presente documento como referencia en su totalidad. En particular, las enseñanzas de todas las referencias en el presente documento específicamente mencionadas se incorporan como referencia.

10 A menos que se identifique otra cosa, todos los términos usados en la divulgación de la invención, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Por medio de guía adicional, las definiciones de términos se incluyen para apreciar mejor las enseñanzas de la presente invención.

15 Según se usa en el presente documento, las formas similares “un”, “una” y “el/la” incluyen tanto referencias en singular como en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

20 Se prefiere que el ligando de TLR9 según la presente invención sea un ligando de TLR9 adaptado o diseñado para su uso como agente de amplificación por multiplicación para potenciar números y funcionalidad de células T CD8 que va a administrarse al menos ocho días después de la administración del agente de sensibilización. Por ejemplo, el agente de amplificación por multiplicación según la presente invención que incluye el ligando de TLR9 se adapta o diseña para administrarse al menos 10 días después de la administración del agente de sensibilización, por ejemplo 12 días.

25 Según la presente invención, el agente de amplificación por multiplicación puede ser una composición de un ligando de TLR9 y un ligando de TLR4, es decir, el ligando de TLR9 y el ligando de TLR4 pueden administrarse en combinación.

30 Los ligandos de TLR9 están adaptados o diseñados para su uso como agente de amplificación por multiplicación para administrarse al menos 10 días, preferiblemente dentro de un intervalo de tiempo de 10 a 20 días después de la administración del agente de sensibilización. Según se usa en el presente documento, el término “adaptado o diseñado” se refiere a realizaciones en las que los compuestos se proporcionan en una forma que va a usarse según se define. Por ejemplo, los compuestos se proporcionan en un estado que permite la administración a un sujeto en una cantidad suficiente para provocar el efecto deseado.

35 El experto conoce bien ligandos de TLR9 adecuados. Por ejemplo, el ligando de TLR9 es un oligonucleótido de CpG, en particular, un oligodesoxinucleótido de CpG. El ligando de TLR4 puede ser un ligando de TLR4 conocido en la técnica, por ejemplo, un compuesto de monofosforil-lípido A.

40 Los presentes inventores reconocieron que el ligando de TLR9 permite expandir CTL activadas en el hígado mediante lo cual se realiza una etapa de sensibilización por adelantado.

45 En otra realización, la presente invención se refiere a un ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica contra la infección con un patógeno intracelular o para su uso en una vacuna antitumoral. En particular, los compuestos son para su uso en una vacuna terapéutica.

Se prefiere particularmente que el patógeno intracelular sea un patógeno viral, un patógeno bacteriano intracelular o un parásito intracelular. Por ejemplo, los patógenos virales son cualquier virus de la hepatitis incluyendo hepatitis B o C, que persiste en el hígado. Los ejemplos de parásitos incluyen *Shistosoma spp.* o *Plasmodia spp.*

50 Es decir, la utilidad del ligando de TLR9 según la presente invención es en particular cierta para infecciones en el hígado. Además, el ligando de TLR9 según la presente invención es útil en una vacuna profiláctica o terapéutica contra una infección crónica o aguda, en particular, una infección viral crónica o aguda, como infecciones crónicas del hígado, por ejemplo por hepatitis B o hepatitis C.

55 Se ha reconocido que el ligando de TLR9 según se usa según la presente invención permite potenciar localmente los números y la funcionalidad de células T CD8, en particular, es útil para la potenciación local de números y funcionalidad de células T CD8 en el hígado. Según se demuestra en el presente documento, aplicar la presente estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación según la presente invención permite expandir las CTL localmente, por ejemplo en el hígado. Por ejemplo, en una estructura terciaria, también denominada a continuación iMATE (agregados de células mieloides interhepáticas que permiten la expansión de células T) que permite la proliferación de CTL en el hígado. Es decir, sorprendentemente, puede observarse una proliferación sustancial de células T CD8 efectoras en las estructuras de iMATE recién formadas mediante lo cual la proliferación impulsada por iMATE no requiere antígeno y no requiere contacto previo con tejidos linfoides. Dado que la estructura de iMATE sólo tiene lugar temporalmente, la expansión de CTL deseada en estas estructuras requiere la administración retardada del agente de amplificación después de la sensibilización inicial de células T CD8<sup>+</sup>. En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de ligando de TLR9 y su vacuna terapéutica contra el cáncer, en

particular, carcinoma hepatocelular o colangiocarcinoma pero también otras neoplasias malignas hepáticas. En particular, pueden tratarse tipos metastásicos de carcinoma.

5 En una realización de la presente invención, el agente de amplificación por multiplicación para potenciación de números y funcionalidad de células T CD8 contiene como principio activo sólo el ligando de TLR9. En una realización alternativa, pueden estar presentes otros principios activos. Dichos principios activos incluyen componentes de activación dependientes de antígeno y/o independientes de antígeno.

10 El agente de sensibilización útil según la presente invención en la estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación identificado en el presente documento es normalmente un compuesto antigénico derivado de un patógeno intracelular o de células tumorales. Por ejemplo, en el caso de vacunación contra la hepatitis B, en particular, vacunación terapéutica contra hepatitis B, el compuesto antigénico presente en el agente de sensibilización para su uso en la estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación para la expansión de células T CD8 secundarias, en particular para la expansión de células T CD8 por amplificación local en un individuo, se deriva del virus de la hepatitis B contra el que va a vacunarse.

15 Se prefiere que el ligando de TLR9 usado según la presente invención se adapte o diseñe para administrarse por vía intravenosa, a una zona vascularizada o a una zona con hiperperfusión inducida que permite la administración rápida al hígado, como el lóbulo de la oreja. Por supuesto, la administración puede efectuarse mediante vías adecuadas, sin embargo, se prefiere administrar el agente de amplificación de un modo que se logre una potenciación local de CTL. El ligando de TLR9 puede prepararse de una forma adecuada para el modo deseado de administración. Normalmente, la composición incluye otros componentes, como diluyentes, excipientes o portador. Normalmente, el portador farmacéutica o terapéuticamente aceptable es un medio portador, que no dificulta la eficacia de la actividad biológica del principio activo y que no es tóxica para el huésped o paciente. El experto conoce muy bien los componentes farmacéuticamente aceptables útiles según la presente invención. Según se identifica, el ligando de TLR9 se adapta para administraciones intravenosas, por ejemplo a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son disoluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, otras composiciones también pueden incluir un agente que es un anestésico local, tal como lidocaína para calmar el dolor en el sitio de la inyección. Los compuestos según la presente invención, concretamente el ligando de TLR9, están en una cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz presente en la composición administrada al individuo. En este sentido, el término "cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz" según se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de composiciones para inducir el resultado biológico deseado. Es decir, para potenciar números y funcionalidades de células T CD8, en particular, potenciación local de números y funcionalidad de células T CD8 en la estrategia de vacunación de sensibilización-amplificación.

20 El experto es muy consciente del hecho de que la cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz puede variar dependiendo de diversos parámetros incluyendo la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, etc., que podrán determinarse por los expertos en la técnica.

25 Estas y otras realizaciones se dan a conocer y quedan abarcadas por la descripción y los ejemplos de la presente invención. La presente invención se detalla adicionalmente por medio de ejemplos sin limitarla a los mismos.

### Ejemplos:

#### 45 Material y métodos

##### Ratones

50 Se mantuvieron ratones C57BL/6j y C57BL/6N, ratones actina-EGFP, ratones CD11c.DOG, ratones CCR2-YFP-DTR (Hohl, T.M. *et al*, Cell host & microbe 2009, 6: 470-481), ratones OX40<sup>-/-</sup>, ratones TLR9<sup>-/-</sup>, TNFR1/2<sup>-/-</sup>, CCR2<sup>-/-</sup>, Rag2<sup>-/-</sup> y CD80/86<sup>-/-</sup> en condiciones de SPF en el animalario central de la universidad. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según la legislación alemana que rige los estudios con animales y las directrices de Principles of Laboratory Animal Care (publicación de National Institutes of Health 85-23, revisión de 1996).

#### 55 Reactivos

60 Se adquirieron los anticuerpos usados para citometría de flujo a partir de e-Bioscience si no se indica otra cosa: anticuerpo anti-CD8 $\alpha$  (53-6.7) conjugado con Per-Cp-Cy5.5, anticuerpo anti-CD45.1 (A20) conjugado con APC, anticuerpo anti-CD90.1 (HIS51) conjugado con APC, anticuerpo anti-CD11b (M1/70) conjugado con PerCp-Cy5.5 o PE, anticuerpo anti-NKp46 (29A1.4) conjugado con PE, anticuerpo anti-CD146 de ratón (ME-9F1) conjugado con Alexa Fluor 647 o Alexa-405, anticuerpo anti-MHC II (I-A/I-E) (M5/114.15.2) conjugado con APC-eFluor 780, anticuerpo anti-F4/80 (BM8) conjugado con eFluor 450 o PE-Cy5, anticuerpo anti-CD11c (N418) conjugado con APC o Alexa Fluor 488, anticuerpo anti-CD107b (Mac-3, M3/84) conjugado con PE, anticuerpo anti-CD19 (eBio1D3) conjugado con PE, anticuerpo anti-PD-1 (J43) conjugado con PE, anticuerpo anti-CD69 (H1.2F3) conjugado con FITC, anticuerpo anti-OX40 (OX-86) conjugado con PE y anticuerpo anti-CD28 (37.51) conjugado con PE; el anticuerpo anti-Ly6C (1G7.G10) conjugado con FITC fue de Miltenyi Biotec, el anticuerpo anti-Ly6G (1A8) conjugado

con PE y anticuerpo anti-CD64 (X54-5/7.1) conjugado con APC fueron de Biolegend.

5 TLR9L 1668 (ODN de CpG 1668: 5'-S-TCCAT**GAGCTT**CCTGATGCT-3' SEQ. ID. No. 1) o control distinto de ligando de TLR9 (ODN distinto de CpG 1720: 5'-S-TCCAT**GAGCTT**CCTGATGCT-3', SEQ. ID. No. 2) fueron de TIP MOLBIOL; TLR9-L marcado con Cy5 fue de Sigma-Aldrich, TLR3-L (Poly(I:C) VacchiGrade™), TLR4-L (MPLA VacchiGrade™) y TLR7-L (Imiquimod VacchiGrade™) fueron de InvivoGen.

10 Se llevó a cabo depleción específica de tipos de células un día antes y un día después de inyección de TLR9-L: células fagocíticas con liposomas de clodronato, neutrófilos Ly6G<sup>+</sup> con anticuerpo anti-Ly6G (100 µg/ratón, clon 1A8), células NK con anticuerpo anti-NK1.1 (300 µg/ratón, clon PK136), toxina diftérica (30 ng por gramo de peso corporal) i.p. en ratones transgénicos CCR2-YFP-DTR o CD11c.DOG. Se usó FTY720 a 1 mg/kg de peso corporal para bloquear la salida de linfocitos desde los tejidos linfáticos.

15 Se aplicó bromodesoxiuridina (0,8 mg/ml) en el agua potable y se detectó incorporación mediante kit de flujo de BrdU según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences).

#### Generación de células T CD8<sup>+</sup> activadas (CTL)

20 Se aislaron células T CD8<sup>+</sup> esplénicas mediante separación inmunomagnética usando microperlas de CD8 (Miltenyi Biotec). Se estimularon células T CD8<sup>+</sup> purificadas durante 3 días con Dynabeads® activadoras de T marcadas con anticuerpo anti-CD3/CD28 (Invitrogen) junto con 5 ng/ml de IL-12 p70 en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con FCS al 8%, ME 50 µM, glutamina y antibióticos. Después de la retirada magnética de Dynabeads se separaron las células vivas de las muertas con medio de separación de linfocitos LSM 1077 (PAA Laboratories). Para el seguimiento *in vivo* de CTL que no llevan marcadores congénicos, las células se marcaron con éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína 2 µM (CFSE, Invitrogen). Si no se establece otra cosa, se transfirieron de manera adoptiva  $2 \times 10^6$  CTL activadas en ratones receptores.

#### Citometría de flujo y clasificación mediante FAC

30 Se llevaron a cabo todas las tinciones para citometría de flujo en presencia de 10 µg/ml de Fc-block (2.4G2) en tampón de clasificación celular activada por fluorescencia [tampón de FACS, solución salina tamponada con fosfato/albumina sérica bovina al 1%/NaAz al 0,02%]. Se realizaron la adquisición y el análisis de datos en un dispositivo Cantoll o LSR Fortessa (BD Biosciences) y software FlowJo (Tree Star Inc.). Para excluir células muertas, se usaron Hoechst 33258 (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) o kit de tinción de células muertas que puede fijarse LIVE/DEAD (Invitrogen).

40 Para clasificación mediante FAC de células endoteliales sinusoidales de hígado, células de Kupffer, CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup>MHC II<sup>-</sup>, CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup>MHC-II<sup>+</sup> y CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>dim</sup> MHC-II<sup>+</sup> de los hígados de ratones en el d3 después de la aplicación de TLR9-L, se marcaron células no parenquimáticas de estos ratones con anticuerpo anti-CD146 (ME9-F1) conjugado con AlexaFluor 488, anticuerpo anti-I-A<sup>b</sup> conjugado con PE (AF6-120.1), anticuerpo anti-CD11b (M1/70) conjugado con PerCp-Cy5.5, anticuerpo anti-Ly6C (HK1.4) conjugado con APC y anticuerpo anti-F4/80 (BM8) conjugado con APC-eFluor780® en presencia de 10 µg/ml de Fc-block (2.4G2) en tampón de FACS durante 20 minutos en hielo y se lavaron dos veces. Se filtraron las células a través de una malla de 100 µm después de añadir Hoechst 33258 para excluir células muertas y se sometieron a clasificación celular usando un clasificador FACSDiva (BD Biosciences Pharmingen). Se redujeron las células NK y los neutrófilos de los ratones mediante inyección de anticuerpos de anti-NK1.1 y anti-Ly6G en el d-1 antes de extirpar los hígados. Para la clasificación mediante FAC de células T CD44<sup>lo</sup>CD127<sup>+</sup>KLRG1<sup>-</sup>CD8α<sup>+</sup> (sin exposición previa a antígenos) o CD44<sup>hi</sup>CD127<sup>+</sup>KLRG1<sup>-</sup>CD8α<sup>+</sup> (de memoria) esplénicas, se enriquecieron las células T CD8<sup>+</sup> esplénicas CD45.1<sup>+</sup> totales usando kit II de aislamiento de células T CD8α<sup>+</sup>, en ratón (Miltenyi Biotec) y se tiñeron con anticuerpo anti-KLRG1 (2F1) conjugado con FITC, anticuerpo anti-CD44 conjugado con PE (IM7), anticuerpo anti-CD8α (53-6.7) conjugado con PerCp-Cy5.5 y anticuerpo anti-CD127 (A7R34) conjugado con APC en la condición descrita anteriormente seguido por clasificación mediante FAC.

#### Modelos para infección aguda por VCML y adenovirus

55 Para infectar ratones C57BL/6J a  $1 \times 10^6$  uif/ratón se usaron adenovirus recombinante (AdLGO) que expresaba una proteína de fusión de luciferasa de elatrido (Promega), proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) (Promega) y epítipo OVA<sub>257-264</sub> restringido para H-2-K<sup>b</sup> (SIINFEKL, SEQ. ID. No. 3) o AdLG que expresa sólo luciferasa y EGFP. Dos días después de la infección, se transfirieron  $1 \times 10^4$  ó  $1 \times 10^5$  células T CD8<sup>+</sup> OT-I CD90.1<sup>+</sup> activadas por anticuerpo anti-CD3/28/IL-12 junto con 20 µg de TLR9-L o CTRL. Se llevó a cabo bioluminiscencia *in vivo* para medir la actividad luciferasa como indicador de actividad de CTL específica en el hígado según se notifica (Stabenow *et al.* Hepatology 2010; 51: 1430-37; Wohlleber *et al.* Cell Reports 2012; 2: 478-87).

65 Se indujo infección crónica por virus de coriomeningitis linfocítica (VCML) infectando ratones recién nacidos con  $1 \times 10^6$  uif de WE VCML. Diez semanas después de la infección, se usaron ratones para experimentos. Se obtuvieron

CTL específicas de VCML a partir de bazos de ratones en el d7 después de la infección aguda por VCML (2 x 10<sup>4</sup> uif).

Infección crónica por AdVHB e inmunización

Se infectaron ratones C57BL/6J con 1 x 10<sup>8</sup> uif de Ad-VHB por vía intravenosa conduciendo a infección crónica por AdVHB, según se notificó anteriormente (Huang *et al.* Gastroenterology 2012; 142: 1447-50). Se llevó a cabo inmunización con ADN según se describe (Huang *et al.* Gastroenterology 2012; 142: 1447-50). Después de la inmunización, se comprobó la actividad de HBeAg y ALT (alanina aminotransferasa) en suero medida usando tiras de GPT en un lector Reflovet® Plus (Roche) en puntos de tiempo indicados. Se recogieron hígados para análisis inmunohistoquímico. Se realizó un análisis del número de CTL y función *ex vivo* según se describió anteriormente (Huang *et al.* Gastroenterology 2012; 142: 1447-50).

Se aislaron TCM a partir del bazo y los ganglios linfáticos y TEM a partir de hígados de ratones CD45.1<sup>+</sup> 8 semanas después de la infección por VCML y se clasificaron mediante FAC según los niveles de expresión de CD62L en la población de células T CD8<sup>+</sup> CD44<sup>hi</sup>. Se transfirieron de manera adoptiva 10<sup>6</sup> CTL en ratones CD45.2<sup>+</sup> en los que también se inyectó TLR9-L.

Histología del hígado y microscopía electrónica

Anteriormente se describió la preparación de secciones de hígado para tinción inmunohistoquímica (Wolf *et al.* Cancer Cell 2012; 22, 91-105). Se realizó la detección de CD11b, MHC II, CCR2, GFP, Ki-67, CD90.1, NKp46, CD19, Ly6C/Ly6G, OX40L y BrdU usando M1/70 (BMA Biomedicals AG), M5/114.15.2 (Novus Biologicals), Ac policlonal de MC-21 anti-GFP (Fitzgerald Industries), SP6 (Lab Vision), Ac policlonal de anti-NKp46 (R&D), 1D3, HIS51, Gr-1 (todos de BD Pharmingen), 7D6 (Abcam) y B44 (BD), respectivamente. Se realizó la preparación de tejidos hepáticos para microscopía electrónica según se describió anteriormente (Wohlleber *et al.* Cell Reports 2012; 2:478-87).

Resultados

iMATE facilitan el aclaramiento mediado por CTL de infección viral en el hígado

La expansión de CTL eficaz dentro de iMATE condujo a los inventores a investigar si esto podía mejorar la inmunidad *in vitro* en ratones tratados con TLR9-L que se habían infectado con un adenovirus recombinante que expresaba OVA y luciferasa como proteína de fusión (AdLOG) (Stabenow, D. *et al.*, Hepatology, 51, 1430-1437 (2010)). El declive de la bioluminiscencia *in vivo* en este modelo cuantifica la actividad de CTL antiviral *in vivo* contra hepatocitos infectados de manera más sensible que la medición de ATL en suero. Se transfirieron números bajos de CTL OT-I (10<sup>4</sup>) en ratones que se infectaron con 10<sup>6</sup> unidades infecciosas (uif) de AdLOG. Esto no redujo significativamente la bioluminiscencia *in vivo*, ni tampoco lo hizo la aplicación de TLR9-L sola. Los números bajos de CTL transferidas y hepatocitos infectados se parecen a la situación durante la infección aguda. Sin embargo, la transferencia de CTL junto con la aplicación de TLR9-L controló eficazmente la expresión de luciferasa viral hepática en el plazo de 4d.

Esto planteó la cuestión de si los iMATE pueden potenciar las respuestas de CTL específicas de antígenos. Se transfirieron números bajos (1 x 10<sup>5</sup>) de CTL OT-I activadas en ratones que se infectaron con dosis baja (1 x 10<sup>6</sup> uif/ratón) de AdLGO o AdLG. Hubo un aumento en los números de CTL OT-I hepáticas en ratones infectados con AdLG que también recibieron TLR9-L. Sin embargo, en ratones en los que se inyectó TLR9-L infectados con AdLGO se observó una expansión 7 veces mayor de CTL OT-I; también en ausencia de exposición a TLR9-L hubo un aumento de CTL OT-I en comparación con ratones infectados con AdLG. De forma interesante, se observó la formación de iMATE tras infección con AdLG en ausencia de inyección de TLR9-L pero no se detectó ninguna CTL OT-I en iMATE. También se formaron iMATE en ratones infectados por AdLGO pero estos iMATE contenían ahora muchas CTL OT-I. Estos datos sugieren que la infección viral del hígado provocó la formación de iMATE y que los iMATE amplificaron respuestas de CTL específicas de antígeno localmente en el hígado. Tras la inyección de TLR9-L, se mejoró adicionalmente la formación de iMATE y se observaron más CTL OT-I en ratones infectados por AdLGO en comparación con los tratados con AdLg o de forma simulada, compatible con el control más rápido de la infección viral. De forma interesante, se encontraron CTL OT-I individuales en la vecindad de iMATE lo que implica que realizaron su función efectora contra hepatocitos infectados por virus después de haber abandonado los iMATE.

Para confirmar adicionalmente la relevancia fisiológica de iMATE durante la infección viral se investigó la formación de iMATE durante la infección con un virus competente para replicación, VCML. Durante la infección aguda con VCML se observó el desarrollo de iMATE formados por células CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> con un máximo en el d9 tras la infección que coincide con el máximo de la expansión de células T. Las células T CD8<sup>+</sup> eran abundantes en los iMATE durante la infección aguda por VCML sugiriendo que los iMATE contribuyeron a la defensa de CTL contra la infección por VCML. La prevención de la formación de iMATE en ratones CCR2-CFPDTR condujo a la generación reducida de CTL específicas de gp33 de VCML y a no lograr controlar la replicación de VCML, lo cual puede apuntar

a un papel para iMATE en la inmunidad de CTL específicas de VCML aunque no se pueda excluir que la depleción sistémica de células CCR2<sup>+</sup> influya adicionalmente en la inmunidad contra VCML. Estos resultados condujeron a investigar si los iMATE están ausentes en ratones que padecen infección crónica por VCML. De hecho, no se observaron iMATE en hígados de ratones infectados por VCML de forma crónica pero pueden inducirse por inyección de TLR9-L, sugiriendo que pueden emplearse los iMATE para superar el agotamiento de células T observado durante la infección viral crónica. Para someter a prueba esta hipótesis, se transfirieron de manera adoptiva CTL específicas de gp33 de VCML esplénicas sensibilizadas *in vivo* (10<sup>6</sup> CTL específicas de VCML/ratón) (aisladas de ratones en el d7 después de la infección aguda por VCML) junto con TLR9-L o CTRL en el d0, d7 y d10 en ratones con infección crónica por VCML. La transferencia de CTL específicas de VCML o la aplicación de TLR9-L sola no condujo a aumentos significativos en los números de CTL específicas de VCML en el d14 después de la primera transferencia. Después de la transferencia de CTL específicas de VCML junto con la inyección de TLR9-L se observó un aumento significativo en los números de CTL específicas de gp33 de VCML en el hígado. De manera más importante, los títulos de VCML en suero e hígado disminuyeron hasta niveles iniciales después del tratamiento combinatorio con transferencia de CTL específicas de VCML junto con inyección de TLR9-L. Estos resultados indican un papel para iMATE durante la infección viral aguda para facilitar la expansión de CTL inducida por TLR9-L para aumentar la inmunidad anti-viral y sugieren que la reconstitución de iMATE que faltan en la infección crónica, mejora el control mediado por CTL de la infección viral.

#### Inmunoterapia satisfactoria de la infección crónica por AdvHB

Para explorar adicionalmente si la expansión de CTL hepáticas también mejoró la defensa contra una infección crónica con un patógeno relevante para seres humanos, se empleó un modelo establecido recientemente para infección crónica por virus de la hepatitis B (VHB) en ratones inmunocompetentes a través de infección de dosis baja con AdvHB (Huang, L.R., véase anteriormente). En este modelo, la vacunación terapéutica con ADN conduce a un aumento débil de CTL específicas de VHB circulantes pero no logra controlar la infección crónica por AdvHB. Se sometieron ratones con infección crónica por AdvHB a vacunación con ADN con plásmidos que codifican para el antígeno del núcleo de VHB (HBc) u OVA y recibieron tratamiento con TLR9-L 12d más tarde. Esto condujo a un aumento transitorio de ALT en suero lo que indica un grado bajo de daño en el hígado, que fue más pronunciado en ratones vacunados con HBc que recibieron tratamiento con TLR9L (figura 1a). No se detectaron iMATE en ratones con infección crónica por AdvHB independientemente de si se vacunaron con ADN que codifica para OVA o núcleo de HB (figura 1b), lo cual indica que los números crecientes de CTL específicas de virus no fueron suficientes para provocar la formación de iMATE durante la infección crónica. Sin embargo, la inyección con TLR9-L indujo la formación de iMATE en ratones con infección crónica por AdvHB (figura 1b) planteando la cuestión de si esto puede facilitar la expansión de CTL específicas de VHB y el aclaramiento de la infección crónica por AdvHB.

La inyección de TLR9-L en el d12 después de la vacunación con ADN de núcleo de HB condujo a la expansión pronunciada de CTL específicas de HBc en hígados de ratones con infección crónica por AdvHB (figura 1c). Estas CTL específicas de núcleo de HB fueron funcionales y expresaron IFN $\gamma$  tras la re-estimulación específica de antígeno *ex vivo*, mientras que en ausencia de aplicación de TLR9L no se detectaron CTL específicas de HBc que expresasen IFN $\gamma$  (figuras 1d y e). Además, se observaron niveles de expresión más bajos del receptor PD1 co-inhibidor en CTL específicas de núcleo de HB CD69<sup>+</sup> activadas recientemente (figura 1f) sugiriendo que esta vacunación con ADN en combinación con inducción de iMATE superó los mecanismos inmunoreguladores que afectan al aclaramiento de la infección viral del hígado<sup>4</sup>. La vacunación con ADN de HBc en combinación con la aplicación de TLR9-L condujo a la regulación por disminución significativa de los niveles de HBeAg en suero después de 28d y a la eliminación de hepatocitos infectados por VHB en el d42 (figuras 1g-i). Estos hallazgos indican que la expansión hepática de CTL específicas de HBc erradica los hepatocitos infectados por VHB durante la infección crónica y de ese modo conduce al aclaramiento viral.

Para caracterizar si los iMATE sirven también como centros de expansión para CTL efectoras, se transfirieron de manera adoptiva células T de memoria centrales (TCM) y células T de memoria efectoras (TEM). Tras la inducción de iMATE se observó la proliferación TCM de según se muestra por la incorporación de BrdU, lo cual se esperaba dada la capacidad conocida de TCM para dar lugar a la progenie de células T efectoras (figura 2). De manera importante, las TEM también mostraron proliferación en el hígado después de la inducción de iMATE demostrando por primera vez que las células T efectoras pueden experimentar proliferación en un tejido periférico.

#### Discusión

Se descubrió que la activación de CTL por estimulación simultánea a través de los TCR, CD28 e IL-12 *in vitro*, junto con la aplicación sistémica de TLR9-L condujo a una expansión de 50 veces de las CTL localmente en el hígado. Los agregados de células mieloides, denominados en el presente documento iMATE, que se formaron en el hígado tras la señalización con TLR9, facilitan la expansión masiva de CTL, lo cual contribuye a la inmunidad antiviral y supera la infección viral crónica en ratones.

Los iMATE son distintos de las estructuras linfoides que surgen durante la inflamación crónica. El tejido linfoide terciario que se forma en órganos periféricos tras la señalización inflamatoria crónica es funcional y estructuralmente similar al tejido linfático secundario, es decir que tiene centros germinales y zonas de células T y se somete a

muestreo de antígenos para expansión de CTL mediada por DC (Neyt, Trends in Immunology 2012; 33: 297-305). Los granulomas generados durante la inflamación o infección crónica con bacterias intracelulares se caracterizan por acumulación densa de macrófagos rodeados por un anillo de células epiteliales (Ramakrishnan, Nat. Rev. Immunol. 2012; 12: 352-66). El tejido linfático terciario y el granuloma se consideran estructuras de larga vida pero dinámicas que se conforman constantemente por factores del entorno. En cambio, los iMATE surgen rápidamente después de una inyección individual de TLR9-L, están compuestos de células CD11b<sup>+</sup> derivadas de monocitos que no se distinguen del tejido de hígado circundante y se disuelven en el plazo de 6 a 8 días. Además, los mecanismos que impulsan la formación de iMATE son distintos de los que actúan en el desarrollo de tejidos linfáticos. Mientras que la señalización de LTβR es crucial para la formación de tejido secundario linfático, IL-17 genera tejido linfático terciario de una manera independiente de linfotocinas en el pulmón o el sistema nervioso central (Peters *et al.* Immunity 2011; 35:986-96). Se demuestra que la formación de iMATE no dependió de la señalización de LTβR sino que más bien requiere señalización de receptor de TNF. Las células dendríticas inflamatorias derivadas de monocitos que forman iMATE de manera independiente de la comunicación cruzada con linfocitos producen TNF, lo cual sugiere que el TNF actúa en un bucle de realimentación local para impulsar la generación eficaz de iMATE.

La inducción de iMATE a través de la señalización con TLR9 supera las señalizaciones reguladoras hepáticas locales creando una estructura similar a un capullo anatómica independiente dentro del hígado, en la que es probable que las CTL se refugien de las señales inhibitorias locales. Una obtención de imágenes intravital reveló que las células T permanecieron estacionarias o migraron dentro de los límites de los iMATE. Como no hay ninguna cápsula fibrosa o anillo de fibrocitos alrededor de los iMATE supuestamente señales quimiotácticas expresadas localmente mantienen las CTL dentro de los iMATE pero todavía quedan por definir los factores que determinan la retención o salida de CTL a partir de los iMATE. La reconstrucción tridimensional reveló que las CTL se incorporan dentro de los iMATE en una matriz de células dendríticas inflamatorias derivadas de monocitos que funcionan probablemente como células de Sertoli para fomentar la expansión de CTL proporcionando señales co-estimuladoras a través del eje OX40L-OX40. La expansión de CTL en iMATE se produce en ausencia de reconocimiento de antígenos restringido por MHCI, aunque no puede excluirse un papel para la señalización de TCR tónica inducida por MHCI en estas circunstancias que sea importante para mantener las células T en un estado en el que puedan responder a estimulación específica de antígeno posterior (Hochweller *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010; 107: 5931-36). Sin embargo, en presencia de su antígeno relacionado en hepatocitos infectados se mejora la expansión de CTL en iMATE, lo cual indica que las células dendríticas inflamatorias pueden presentar de forma cruzada antígenos en el MHCI a las CTL.

La generación de iMATE durante infecciones virales agudas sugiere fuertemente que los iMATE no representan un artefacto observado después de la exposición a TLR9-L. Los iMATE formados durante la infección viral aguda sirven como centros de expansión para CTL específicas de antígeno que más tarde contribuyen al aclaramiento de la infección viral. De forma interesante, no se detectaron iMATE en el hígado durante la infección viral crónica, lo cual indica que la generación de iMATE se correlaciona con el control de infección viral mediado por CTL eficaz y abre la posibilidad de usar inducción de iMATE para la vacunación terapéutica.

La expansión de CTL en iMATE inducida por una aplicación de TLR9-L individual no desencadenó autoinmunidad. Sólo provocó autoinmunidad la aplicación continua de TLR9-L a lo largo de semanas junto con grandes números de CTL autorreactivas y la expresión hepatocelular del auto-antígeno (Sacher *et al.* Eur. J. Immunol 2002; 32: 3628-37). La inflamación y señalización de CTL crónica también potencian la autoinmunidad mediante presentación de antígeno restringida por MHCI aumentada y la señalización de TLR-3 prolongada supera el microentorno hepático tolerogénico (Lang *et al.* J. Clin. Invest. 2006; 116: 2456-63). Por tanto, la expansión de CTL en iMATE puede mejorar la eficacia de las vacunas terapéuticas contra infección crónica sin provocar autoinmunidad.

La inducción de iMATE durante la infección viral crónica mediante la aplicación de TLR9-L provocó una fuerte expansión de CTL específicas de virus que se generaron inicialmente mediante vacunación genética *in vivo* en el mismo animal. Tal expansión de CTL controló la infección viral crónica en hepatocitos. La combinación de la vacunación convencional con la expansión de CTL inducida por TLR9-L en el hígado aumenta la eficacia de la vacunación terapéutica. La expansión de CTL hepáticas en iMATE se produce independientemente a partir de tejido linfático secundario y por tanto es mecanísticamente distinta de la expansión de células T inducida mediante esquemas de vacunación de sensibilización-refuerzo. Mientras que las estrategias de vacunación convencionales tienen por objetivo aumentar la inmunogenicidad de las células presentadoras de antígenos y prolongar la presentación de antígenos a células T de memoria central o sin exposición previa a antígenos en tejidos linfáticos, los iMATE expanden CTL activadas por IL12 pero no las células sin exposición previa a antígenos y sólo en un menor grado las células T de memoria a través de señales co-estimuladoras y presentación cruzada en el hígado.

Además, se demuestra que las células T CD8<sup>+</sup> efectoras y efectoras de memoria proliferan dentro de los iMATE. Dado que la proliferación de células T con función efectora citotóxica es muy limitada en órganos periféricos, el descubrimiento de que las TEM proliferan en hígados después de aplicación de CpG según la presente invención revela un mecanismo hasta ahora no reconocido para aumentar el número de células T con función efectora en un órgano periférico. Los números de células T efectoras presentes en el sitio de la infección o dentro de un tumor son el denominador clave de la inmunidad protectora. El descubrimiento de que las TCM así como las TEM emplean iMATE que pueden obtenerse mediante un método según la presente invención para la proliferación proporciona por

tanto una revelación importante sobre cómo pueden generarse números suficientes de células T efectoras en el hígado.

5 Tomados de manera conjunta, los presentes resultados revelan la existencia de una segunda fase de expansión de CTL en el hígado dentro de un compartimento anatómico distinto formado por células dendríticas inflamatorias derivadas de monocitos. La expansión de CTL en iMATE complementa la sensibilización de células T y la expansión dentro de tejido linfático secundario dando como resultado una expansión masiva de CTL específicas de antígeno en la periferia. Esta fase de expansión de CTL hasta ahora no reconocida puede emplearse para mejorar la vacunación terapéutica contra infección viral crónica del hígado.

10

**Lista de secuencias**

<110> Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universitaet Bonn Helmholtz Zentrum Muenchen Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) Technische Universitaet Muenchen

15

<120> Estrategia de vacunación

<130> 4464-003 PCT-1

20

<150> Documento ep13156546.7

<151> 25-02-2013

<160> 3

25

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

30

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

35

<220>

<223> oligonucleótido de ácido nucleico sintético

40

<400> 1

tccatgacgt tctgatgct 20

<210> 2

45

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

50

<220>

<223> oligonucleótido de ácido nucleico sintético

55

<400> 2

tccatgagct tctgatgct 20

60

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

65

<213> artificial

<220>

<223> péptido sintético

5 <400> 3

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu  
1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica mediante lo cual dicho ligando de TLR9 es un agente de amplificación por multiplicación que potencia el número y la funcionalidad de células T CD8 en una estrategia de vacunación para la expansión de células T CD8 efectoras en el que el ligando de TLR9 se administra al menos 8 días después de la administración del agente de sensibilización, en el que el agente de sensibilización es un compuesto antigénico de un patógeno intracelular o células cancerosas.
- 10 2. Ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica según la reivindicación 1, en el que dicho ligando de TLR9 se administra al menos 10 días después de la administración del agente de sensibilización.
- 15 3. Ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica según la reivindicación 2, en el que dicho ligando de TLR9 se administra dentro de un intervalo de tiempo de 10 a 20 días después de la administración del agente de sensibilización.
- 20 4. Ligando de TLR9 para su uso en vacunación profiláctica o terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, contra infección con un patógeno intracelular o en una vacuna contra el cáncer.
- 25 5. Ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica según la reivindicación 4, en el que dicho patógeno intracelular es un patógeno viral, un patógeno bacteriano intracelular o un parásito intracelular.
- 30 6. Ligando de TLR9 para su uso en vacunación profiláctica o terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, contra una infección crónica o aguda.
- 35 7. Ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica según la reivindicación 6, contra una infección viral crónica o aguda.
- 40 8. Ligando de TLR9 para su uso en vacunación terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, contra cáncer.
- 45 9. Ligando de TLR9 para su uso en una vacunación terapéutica según la reivindicación 8, contra carcinoma hepatocelular o colangiocarcinoma u otra enfermedad maligna del hígado.
10. Ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho ligando de TLR9 es un oligonucleótido de CpG.
11. Ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica según la reivindicación 10, en el que dicho ligando de TLR9 es un oligodesoxinucleótido de CpG.
12. Ligando de TLR9 para su uso en una vacunación profiláctica o terapéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, mediante lo cual dicho ligando de TLR9 se administra por vía intravenosa o a una zona vascularizada.

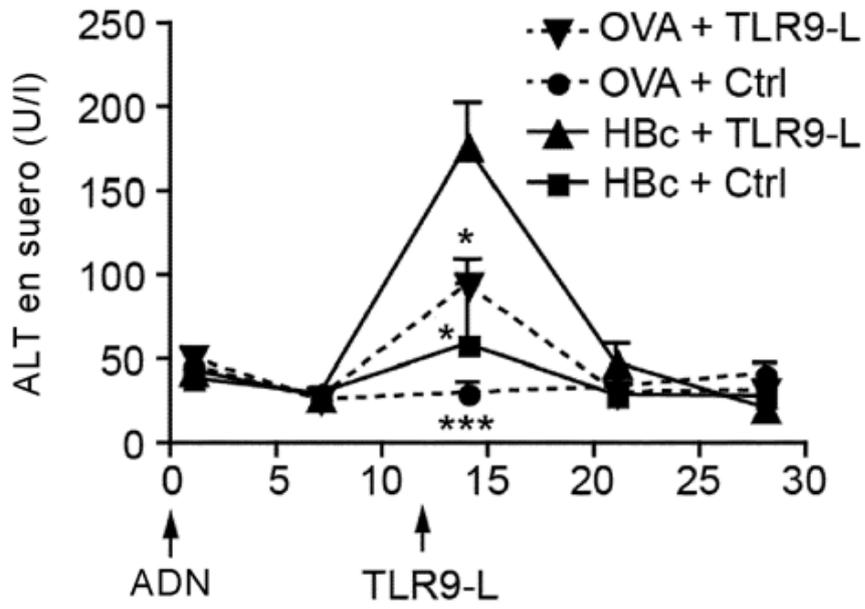


Figura 1a

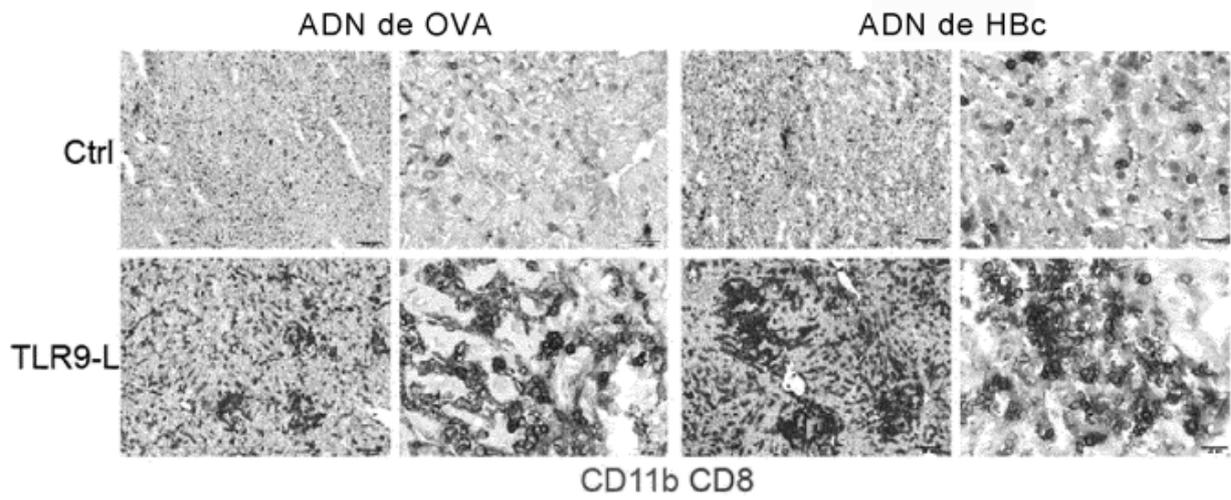


Figura 1b

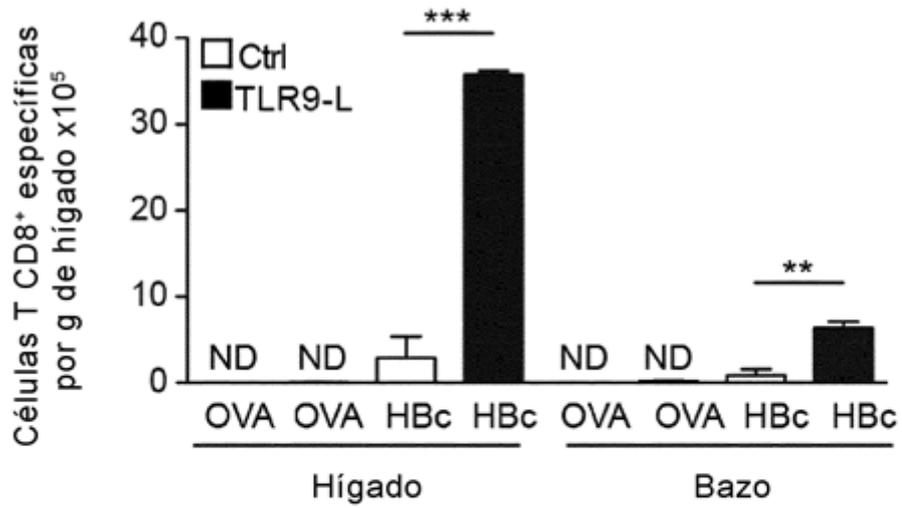


Figura 1c

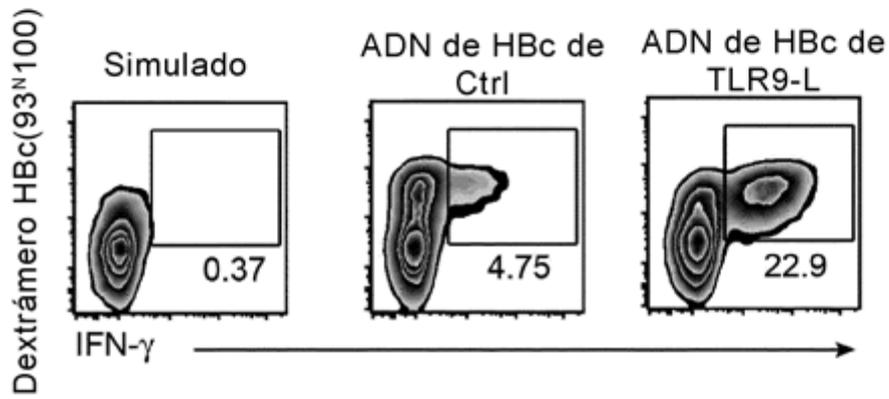


Figura 1d

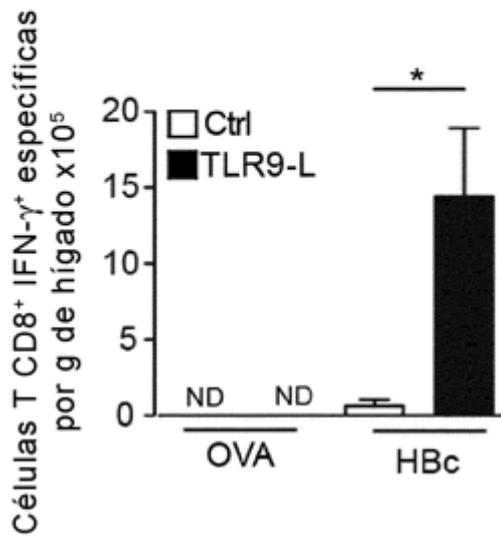


Figura 1e

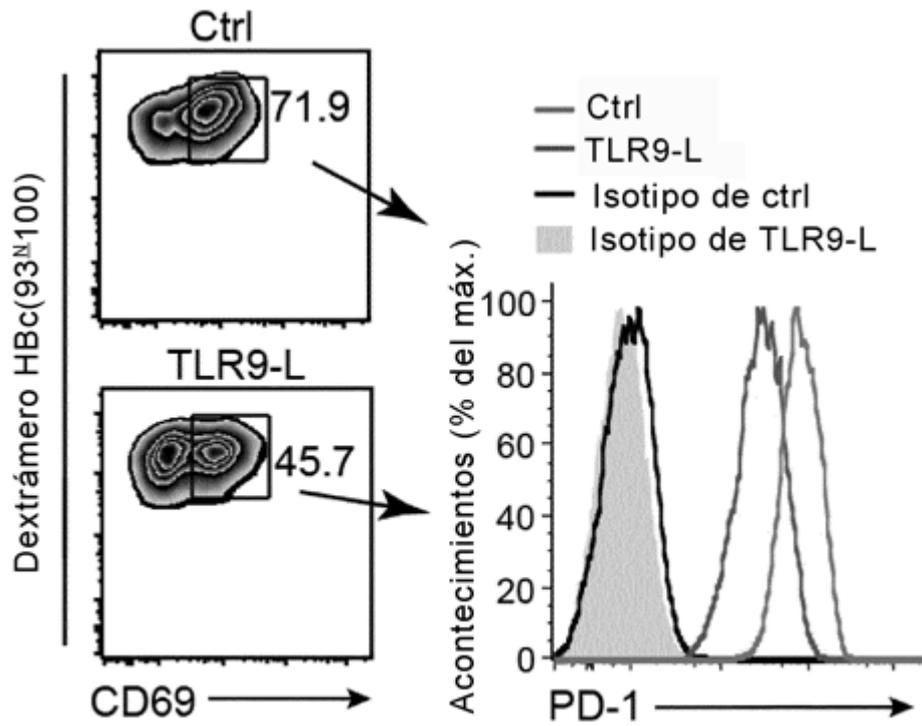


Figura 1f

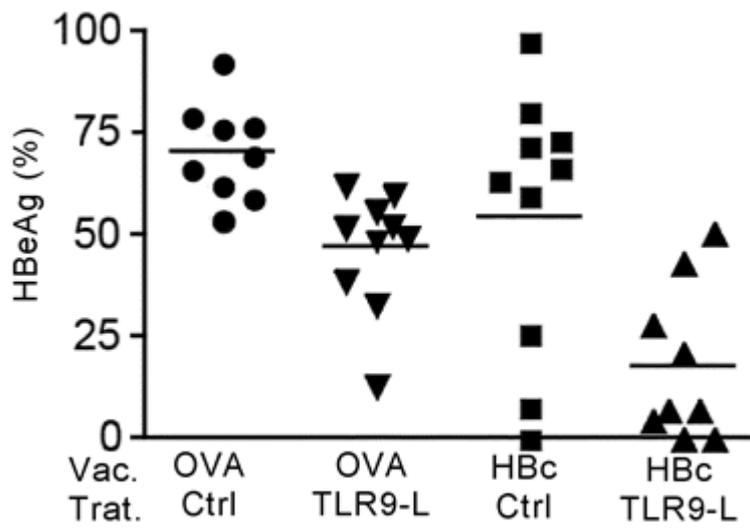


Figura 1g

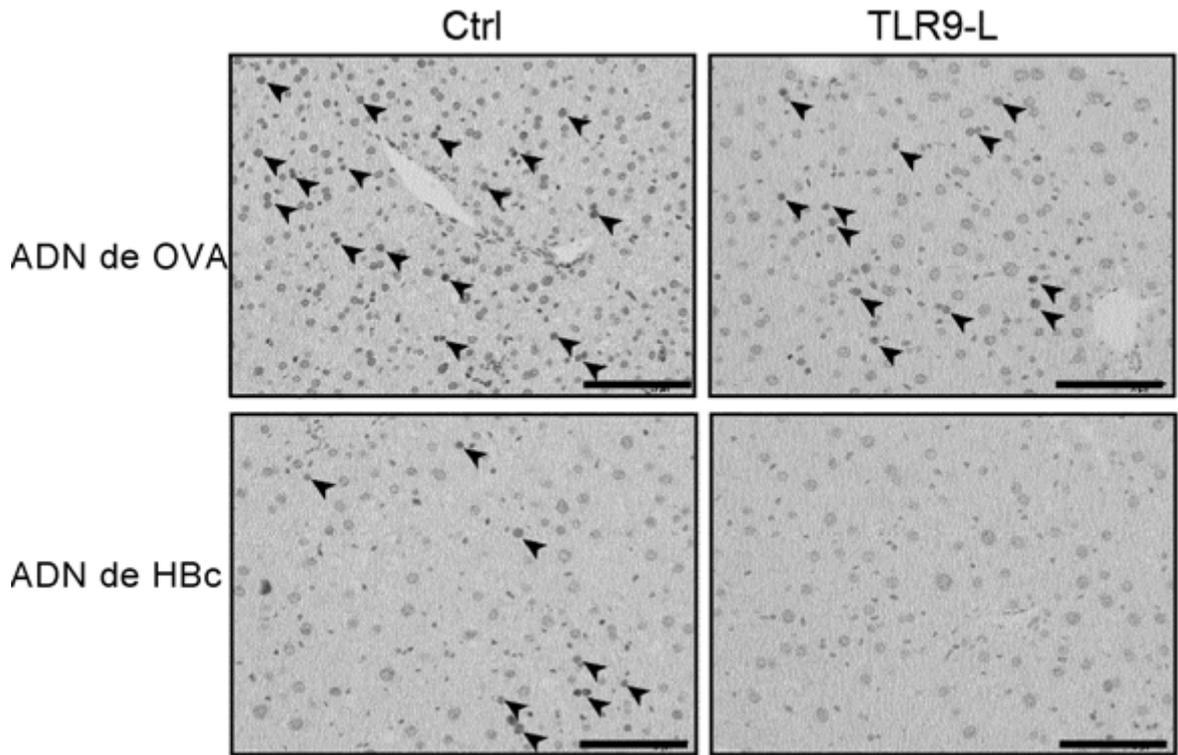


Figura 1h

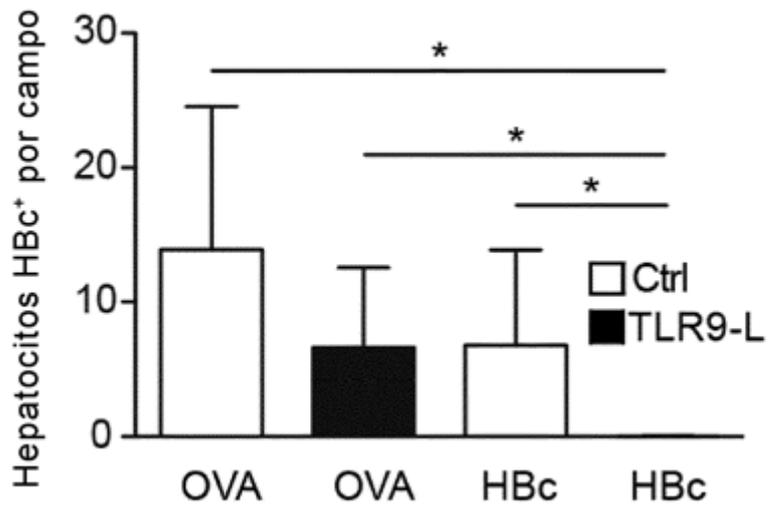


Figura 1i

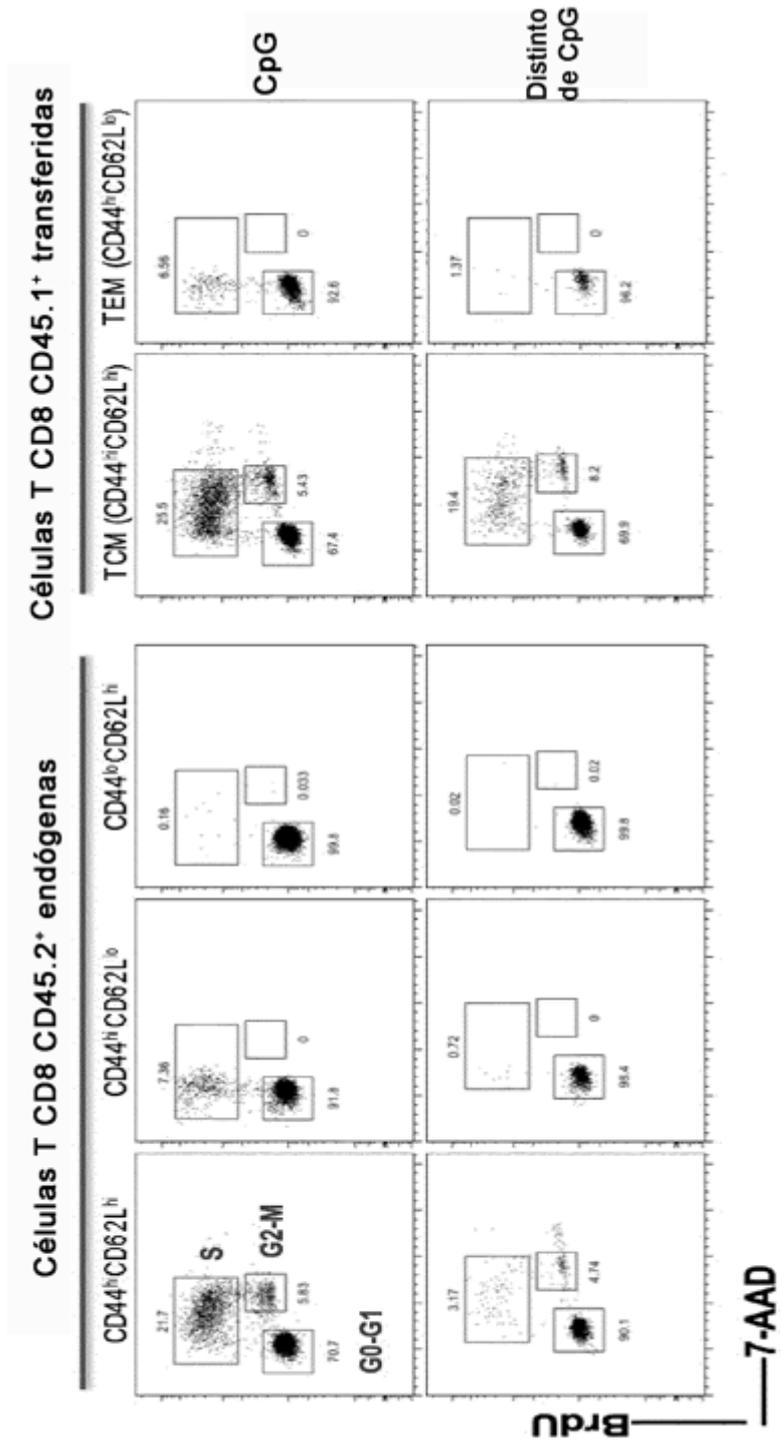


Figura 2