

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 128**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0784** (2010.01)

**A61K 35/15** (2015.01)

**C12N 15/861** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2017 E 17192226 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3460052**

54 Título: **Células dendríticas alogénicas mejoradas para uso en el tratamiento de cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**24.06.2020**

73 Titular/es:

**IMMUNICUM AB (100.0%)  
Östermalmstorg 5  
114 42 Stockholm , SE**

72 Inventor/es:

**KARLSSON-PARRA, ALEX**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 769 128 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

Células dendríticas alogénicas mejoradas para uso en el tratamiento de cáncer

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para proporcionar células dendríticas pro-inflamatorias con la capacidad de activar células t alogénicas a través de la trayectoria directa de alorreconocimiento, así como al uso de estas células dendríticas proinflamatorias en el tratamiento de cáncer.

**Antecedentes**

10 Las terapias tradicionales del cáncer, como la cirugía, radiación y quimioterapia, son frecuentemente insuficientes para tratar pacientes de cáncer y habitualmente provocan efectos secundarios graves. La inmunoterapia ha mostrado ser alentador como un método de tratamiento alternativo con menos efectos secundarios negativos.

15 La inmunoterapia del cáncer ha progresado enormemente recientemente gracias a la introducción de anticuerpos de bloqueo de control inmune, en particular anticuerpos que bloquean interacciones de PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) y ligando de PD-1 (PD-L1). Sin embargo, solo una parte de los pacientes de cáncer se aprovechan de este tipo de tratamiento. Además, solo es eficaz contra ciertas formas de cáncer. Como todavía hay lugar para mejoras en este campo, las inmunoterapias del cáncer evolucionan para ser más eficaces y enérgicas.

20 Actualmente está bien establecido que el sistema inmune tiene células, particularmente linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTLs), que reconocen y potencialmente destruyen células tumorales. No obstante, un problema principal es que la capacidad de destrucción de estas células T no es inducida o sólo débilmente inducida en pacientes de cáncer. Por tanto, es de interés desarrollar estrategias de inmunoterapia para "activar" el sistema inmune para que tenga reconocimiento y destrucción de células tumorales.

25 Las estrategias de inmunoterapia de cáncer existentes, que implican la activación de linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTLs) se han dirigido principalmente a DCs derivadas de pacientes autólogas, con contenido de antígenos, que han sido diferenciadas y cargadas con antígenos *ex vivo*. La premisa subyacente de esta propuesta es que la eficacia y el control proporcionados por la manipulación *ex vivo* de las DCs genera DCs con una fuerte capacidad de presentación de antígenos y coestimuladora. La calidad de la respuesta de las células T depende de la capacidad de estas DCs autólogas para presentar antígenos tumorales a células T de una manera restringida a MHC (las DCs y las células T tienen que ser del mismo individuo, es decir, autólogas) en nódulos linfáticos de drenaje y por tanto crear una respuesta de células T específica para tumores.

30 Las células dendríticas (DCs) modificadas *ex vivo* derivadas de pacientes se dirigen a inducir una inmunidad de células T específicas para tumores mediante educación directa de células T contra antígenos asociados a tumores o específicos de tumores. Aunque se ha observado la prueba de principio para vacunas de DCs autólogas en diversos estudios clínicos, las respuestas clínicas son todavía subóptimas (Anguille, S., et al. 2014. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *Lancet Oncol* 15: e257-267). Además, los resultados clínicos variables parece que se correlacionan con el estado de activación de las DCs de las vacunas, por tanto, el consenso en el campo en este momento conduce a procedimientos de optimización y estandarización para las producciones de mejoradores inmunes capaces de inducir respuestas inmunes polarizadas de tipo T-helper tipo 1 (Th1) mediadas por DC.

35 Sin embargo, de forma interesante, descubrimientos recientes indican que las DCs de vacunas modificadas *ex vivo* requieren la ayuda de DCs transeúntes endógenas para cebar la inmunidad específica de células T CD8+ (Yewdall, A. W., et al 2010. CD8+ T cell priming by dendritic cell vaccines requires antigen transfer to endogenous antigen presenting cells. *PLoS One* 5: e11144; Liu, C., et al 2008. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. *J Clin Invest* 118: 1165-1175). Este cebado indirecto de DCs transeúntes se ha encontrado por muchos que es dependiente de la secreción activa de factores pro-inflamatorios activadores de células inmunes por las DCs administradas.

45 Las DCs humanas derivadas de monocitos inmaduros pueden secretar cantidades sustanciales de citoquinas T-helper (Th-1) y quimiocinas cuando son estimuladas mediante un cóctel de estímulos, como ligandos de receptores de tipo Toll (TLR) y IFN- $\gamma$  (Napolitani, G., A. et al 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6: 769-776; Lovgren, T., D. et al 2017. Enhanced stimulation of human tumor-specific T cells by dendritic cells matured in the presence of interferon-gamma and multiple toll-like receptor agonists. *Cancer Immunol Immunother*). Además, la función del cebado indirecto de DCs transeúntes endógenas implica que la administración local de DCs alogénicas (aloDCs) puede crear un medio enriquecido en factores proinflamatorios a través de la denominada "trayectoria directa de alorreconocimiento", conduciendo posteriormente a una captación y activación mejoradas de DCs transeúntes

endógenas mediante factores proinflamatorios liberados por células T alorreactivas captadas y activadas (Wallgren, A. C et al. 2005. Direct allorecognition promotes activation of bystander dendritic cells and licenses them for Th1 priming: a functional link between direct and indirect allosensitization. *Scand J Immunol* 62: 234-242). Esta trayectoria directa de alorreconocimiento, un fenómeno en el que hasta un 10% de las células T del receptor trasplantado pueden resultar activadas por su reconocimiento directo de complejos de MHC/péptidos alógenicos intactos presentes en DCs alogénicas derivadas de injertos (véase Lombardi G, et al Allorecognition of DR1 by T cells from a DR4/DRw13 responder mimics selfrestricted recognition of endogenous peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:4190-4), es una respuesta vigorosa, que parece violar la regla de la restricción auto-MHC, y es accionada principalmente por mimetismo antigénico (véase Lechler R, et al Dendritic cells in transplantation - friend or foe? *Immunity* 2001;14:357-68).

El uso de DCs alogénicas (aloDCs) ha sido previamente descrito en la técnica (véanse los documentos EP 1.509.244 B1 y EP 2.534.242 B1). Además, la propuesta de aloDCs usando aloDCs proinflamatorias inyectadas por vía intratumoral ha sido ensayada satisfactoriamente en un ensayo clínico de fase I/II en pacientes con carcinoma de células renales metastático (mRCC) como se expone por Laurell, A et al. (véase Intratumorally injected pro-inflammatory allogeneic dendritic cells as immune enhancers: a first-in-human study in unfavourable risk patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 2017, 5: 52) y es actualmente objeto de estudios clínicos adicionales en un estudio de fase II multicentros aleatorio en pacientes diagnosticados con mRCC (NCT02432846). Los datos del ensayo clínico de fase I/II en pacientes de mRCC indicaron que la administración intratumoral de aloDCs indujo la activación de células T específicas de tumores con infiltración intratumoral fuerte/masiva de células T CD8+ en la mayoría de los pacientes tratados. Además, se observó un efecto sinérgico antitumoral en combinación con sunitinib. Se propuso que las aloDCs indujeron una respuesta de células T específicas del tumor y que la adición de sunitinib hace que el tumor sea más sensible a la respuesta de células T específicas del tumor, ya que el sunitinib se ha mostrado que afecta y reduce el número de células supresoras derivadas de mieloides y células T reguladoras.

Sin embargo, el uso de aloDCs en la técnica aparentemente proporciona una estrategia de inmunoterapia alentadora y sería todavía de interés hacer posible una mejora adicional de la capacidad de las aloDCs para mejorar el número y la función de linfocitos T citotóxicos CD8+ que afectan a las células tumorales.

### Sumario

Consecuentemente, la presente invención busca paliar, aliviar, eliminar o evitar una o más de las deficiencias potenciales anteriormente identificadas en la técnica y desventajas aisladamente o en cualquier combinación proporcionado, según un primer aspecto de la invención, un método para proporcionar una célula dendrítica proinflamatoria que tiene una capacidad mejorada para activar células T alogénicas a través de la trayectoria directa de alorreconocimiento y que está infectada con un adenovirus. Este método comprende las etapas de:

- proporcionar una célula dendrítica inmadura;

- infectar la célula dendrítica con un adenovirus; y

- madurar la célula dendrítica inmadura en forma de una célula dendrítica proinflamatoria, en que dicha maduración se realiza mediante la adición del ligando de receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C, un ligando TLR7/8, como Resiquimod y un interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) para inducir la maduración de la célula dendrítica inmadura.

Las células dendríticas proinflamatorias que están infectadas con un adenovirus y maduras mediante la adición del ligando de receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C, un ligando TLR7/8, como Resiquimod, y con interferón gamma (INF- $\gamma$ ) tienen, contrariamente a la opinión predominante, una capacidad mejorada para estimular la trayectoria directa o alorreconocimiento de células T alogénicas, como se determina in vitro durante una reacción de leucocitos mixtos (MLR). De forma importante, estas células dendríticas proinflamatorias por tanto tienen también una capacidad aumentada para aumentar, ocasionalmente, a través de la activación/maduración de DCs transeúntes con contenido de antígenos, el número y función de linfocitos T citotóxicos CD8+ autólogos (con respecto a las DCs transeúntes) que son capaces de reconocer específicamente células tumorales. Por tanto, estas células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus son útiles como un nuevo mejorador inmune alógeno basado en células mejorado en el tratamiento o prevención del cáncer.

Otras ventajas y características de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes. Además, se elaboran características ventajosas de la invención en las realizaciones descritas en la presente memoria descriptiva.

### Descripción detallada de realizaciones preferidas

En inmunoterapia basada en células dendríticas (DCs) derivadas del paciente, es decir, autólogas, estas son

modificadas normalmente *ex vivo* para expresar o comprimir antígenos tumorales (antígenos asociados a tumor o específicos del tumor). Como es reconocido en la técnica, están disponibles diversos medios para modificar DCs para expresar o comprometer antígenos tumorales. Estos medios incluyen una infección con vectores virales, por ejemplo, vectores de adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus y retrovirus, con genes que codifican antígenos tumorales.

5  
10 Como ya se describió con anterioridad en la presente memoria descriptiva, se pueden usar también DCs alogénicas proinflamatorias en inmunoterapia, ya que se ha encontrado que activan DCs transeúntes. Las DCs alogénicas administradas por vía intratumoral no es necesario que tenga contenido de antígenos (es decir, expresar o comprometer antígenos tumorales), ya que los antígenos tumorales para un tratamiento mediante DCs transeúntes endógenas activadas están presente de alguna manera en el sitio de administración. El uso de DCs alogénicas como mejoradores inmunes basados en células en la inmunoterapia del cáncer se basa en la estimulación de la trayectoria directa del alorreconocimiento mediante células T alogénicas en una reacción de leucocitos mixtos (MLR), dando lugar a una producción adicional de factores proinflamatorios (Wallgren et al, 2005, Scand J Immunol 62: 234-242).

15 Se ha mostrado previamente (véase el documento EP 2.534.242 B1) que las DCs alogénicas, maduras en DCs proinflamatorias mediante el uso de una combinación del receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C, Resiquimod (un ligando TLR7/8), e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) proporcionan una composición útil en el tratamiento intratumoral del cáncer, por ejemplo, carcinoma de células renales metastático.

20 En la evaluación de los diversos medios para proporcionar DCs que portan antígenos tumorales se confirmó, como era de esperar, que la infección de DCs inmaduras con un adenovirus no impide la capacidad de una mezcla que comprende del receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C, Resiquimod (un ligando TLR7/8), e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) para inducir la maduración de las DCs inmaduras en forma de DCs proinflamatorias infectadas con adenovirus. Las DCs proinflamatorias infectadas con adenovirus secretaron preferentemente factores inflamatorios en una cantidad correspondiente a la de las DCs proinflamatorias no infectadas, confirmado así los informes previos.

25 Sin embargo, se estimó que eran de ningún o de poco uso en un ajuste alogénico, dado que la infección con adenovirus es conocida en la técnica que dificulta la capacidad de DCs infectadas para activar células T alogénicas en una MLR.

30 Especialmente, ya en 2002 Jonleit et al (cf. Jonleit et al in Gene Therapy (2000) 7, 249-254) informaron que la infección de DCs con un adenovirus con E1 sustituido y E3 suprimido y la maduración con factores proinflamatorios dificultaba la capacidad de las DCs resultantes para estimular la proliferación de células T alogénicas (CD4+ y CD8+) en una relación elevada de DC respecto a células T. An, Tan et al. informaron (véase BLOOD, (2005), 105(10), 3824- 3832) que la infección de DCs derivadas de monocitos maduras (TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6, and PGE2) con un adenovirus suprimió la capacidad de las DCs para activar células T alogénicas en una MLR. Además, Neston et al. han informado (véase Immunology (2008), 125, 469-479) que las DCs infectadas con adenovirus maduraron con factores proinflamatorios (TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6 y PGE2) tienen una capacidad grandemente reducida de favorecer la proliferación de células T alogénicas. Según Newton, el efecto es específicos para una infección adenoviral, ya que no se observó el mismo efecto con DCs falsamente infectadas o infectadas con lentivirus.

40 No obstante, se evaluó la capacidad de DCs proinflamatorias infectadas con adenovirus para activar células T alogénicas en una MLR. Se encontró, muy sorprendentemente, en profundo contraste con la opinión predominante, que la infección adenoviral no dificultó la capacidad para activar células T alogénicas en una MLR, con la condición de que las DCs hubieran madurado mediante el uso de una combinación del receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C, un ligando TLR7/8, como Resiquimod y un interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

45 De hecho, incluso se encontró que las DCs proinflamatorias infectadas con adenovirus tenían una capacidad mejorada para estimular la trayectoria directa de alorreconocimiento según se determinó mediante la activación de células T alogénicas co-cultivadas en MLR y la producción aumentada de IFN-gamma. Además, las DCs proinflamatorias infectadas con adenovirus no solamente tenían una capacidad mejorada para estimular la trayectoria directa de alorreconocimiento, sino que también proporcionaron una maduración aumentada de DCs transeúntes alogénicas que condujeron posteriormente a una mejora de la capacidad de estas DCs transeúntes para activar células T específicas de antígenos autólogas (con respecto a las DCs transeúntes). Por tanto, las DCs proinflamatorias infectadas con adenovirus son útiles como un mejorador inmune alogénico basado en células mejoradas para ser usado en el tratamiento del cáncer, en cuyo modo de acción es dependiente de la trayectoria directa de alorreconocimiento.

55 Consecuentemente, una realización de la presente invención se refiere a una célula dendrítica proinflamatoria infectada con un adenovirus. La célula dendrítica proinflamatoria infectada con adenovirus tiene una capacidad mejorada para activar células T alogénicas a través de la trayectoria directa de alorreconocimiento. Además, la

célula dendrítica proinflamatoria infectada con adenovirus ha sido obtenida por medio de:

- proporcionar una célula dendrítica inmadura;
- transducir la célula dendrítica con un vector de adenovirus; y
- madurar la célula dendrítica inmadura en forma de una célula dendrítica proinflamatoria.

5 La maduración de la célula dendrítica inmadura en forma de una célula dendrítica proinflamatoria se realiza mediante la adición del receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C, un ligando TLR7/8, como Resiquimod y un interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) para inducir la maduración de la célula dendrítica inmadura.

10 El presente cóctel de maduración que comprende una combinación del receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C, un ligando TLR7/8, como Resiquimod y un interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) ha sido descrito en el documento WO 2011/098516. El receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C es un análogo sintético de dsRNA que comprende una cadena de poli(I) reasociada a una cadena de poli(C). El tamaño de la cadena puede variar. El tamaño puede ser de 200 pares de bases a 8.000 pares de bases, como de 200 a 1.500 o de 1.500 a 8.000 pares de bases. El ligando R848 de TLR7/8 es denominado también Resiquimod en la técnica. Como una alternativa a Resiquimod, se pueden usar Gardiquimod o Imiquimod como ligandos de TLR7/8. Normalmente, las DCs inmaduras son expuestas a los factores de activación durante 8 a 24 horas, como durante 18 horas.

Según una realización, los factores de maduración usados son receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C, un ligando TLR7/8, como Resiquimod y un interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

20 Aunque no es necesario, la activación puede incluir adicionalmente, según una realización alternativa, la adición de al menos una sustancia seleccionada entre el grupo que consiste en ligandos TLR2, ligandos TLR4, como lipopolisacárido bacteriano y monofosforil-lípido A, ligandos de TLR9, como secuencias de oligonucleótidos CpG (ODN) que distinguen DNA microbiano de DNA de mamífero, interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Además, la activación preferentemente no comprende la adición de prostaglandina E2 (PGE2) con el fin de evitar que las DCs maduras se conviertan en DCs migratorias que saldrán rápidamente del sitio de inyección (tumor), lo que sería desventajoso en el contexto de esta invención.

25 Con posterioridad a la activación, las DCs proinflamatorias infectadas con adenovirus pueden ser lavadas para separar esencialmente la totalidad de los factores de activación. Por tanto, los factores de activación normalmente son retirados por lavado antes del uso de las DCs proinflamatorias infectadas con adenovirus como mejorador inmune en la terapia inmune del cáncer. La supresión de los factores de activación evita la coadministración de factores de activación (añadidos para inducir DCs proinflamatorias *ex vivo*). La coadministración de factores de activación conducirá lo más probablemente a una activación fuerte y persistente también de DCs inmaduras captadas por vía intratumoral, conduciendo a su diferenciación en forma de DCs maduras proinflamatorias en lugar de la diferenciación deseada en forma de DCs maduras migratorias.

35 Con el fin de mejorar la capacidad para activar células T alogénicas a través de la trayectoria directa de alorreconocimiento, determinada mediante la reacción de leucocitos mixta (MLR), la DC es infectada con un adenovirus.

Son conocidos diversos adenovirus en la técnica. En el documento US 9.017.672, se describe un tipo preferido de adenovirus, que es un adenovirus modificado por hexón TAT (transactivador de transcripción)-PTD (dominio de transducción) mejorado con eficacia de suministro de genes. Este vector ha sido adicionalmente estudiado por Yu, D., como se recoge en 2013 en PLoS One 8: e54952.

40 Según una realización, el presente adenovirus es un serotipo 5 de adenovirus (Ad5). El serotipo 5 de adenovirus (Ad5) puede ser un serotipo 5 de adenovirus (Ad5) con eje y/o glóbulo de fibras a partir de serotipo 35 de adenovirus (Ad35) en lugar del eje y/o glóbulo de fibras de Ad5. Como es reconocido por el experto en la técnica, diversos serotipos de adenovirus, que incluyen el Ad5 y el Ad35, son conocidos en la técnica. Al sustituir el eje y/o glóbulo de fibras de Ad5 con un eje y/o glóbulo de fibras de Ad35, se mejora la eficacia de la transducción. Además, es preferido que la proteína de hexón del vector de adenovirus se modifique para que comprenda al menos un dominio de transducción de proteínas (PTD) del transactivador de transcripción (TAT) del virus de inmunodeficiencia humano (HIV). Al modificar la proteína del hexón del vector de adenovirus para que comprenda al menos un dominio de transducción de proteínas (PTD) del transactivador de transcripción (TT del virus de inmunodeficiencia humano (HIV), se mejora la eficacia de la transducción. La secuencia TAT-PTD puede ser introducido en la región 5 hipervariable (HV5R) de la proteína del hexón. Según una realización, la proteína del hexón del vector de adenovirus comprende por tanto una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N<sup>o</sup> 1 (YGRKKRRQRRR). Además, la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N<sup>o</sup> 1 puede estar flanqueada por conectores cortos y por tanto puede comprender una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID N<sup>o</sup> 2 (AGGGAGGGYGRKKRRQRRRGGGAGGGA). Un

ejemplo de un adenovirus preferido (Ad5PTDf35) se describe en PLoS One (2013) 8(1): e54952. Además, el adenovirus puede ser un adenovirus con delección de E1. Como es reconocido por un experto en la técnica, la delección de E1 implica que el adenovirus es deficiente en replicación. Con el fin de tener un mejor control del virus en el sujeto al que es administrado, se prefiere que el adenovirus sea deficiente en replicación. Según una  
 5 realización, el adenovirus es por tanto deficiente en replicación, por ejemplo, con delección de E1. El adenovirus puede ser también un adenovirus con delección de E3, como un adenovirus de delección de E1/E3.

Sin embargo, los adenovirus son usados en la técnica como vectores de suministro de genes, y los efectos que subyacen en la presente invención no son dependientes de la inclusión de cualquier gen que codifique un antígeno tumoral en el vector del adenovirus, sino de la infección con un adenovirus como tal. Por tanto, la DC proinflamatoria infectada con adenovirus, según una realización de la invención, no comprende ningún gen que codifique antígenos tumorales, es decir, las DCs están infectadas con el adenovirus, pero no transducidas con genes que codifican antígenos tumorales.  
 10

Aunque no es necesario que las DCs proinflamatorias alogénicas sean administradas por vía intratumoral, en algunas aplicaciones (cuando el tumor es difícil de alcanzar mediante inyección o es demasiado pequeño) puede ser todavía de interés proporcionar unas DCs proinflamatorias infectadas con un adenovirus que codifique antígenos tumorales, es decir, infectado y transducido con DCs y, por tanto, que expresa antígenos asociados a tumores o específicos de tumores. La DC proinflamatoria infectada con adenovirus, por tanto, según una realización, comprende al menos un gen que codifica un antígeno asociado al tumor o específico del tumor. al proporcionar DCs proinflamatorias infectadas con un adenovirus que comprende al menos un gen que codifica un antígeno asociado al tumor o específico del tumor, la célula dendrítica infectada es transducida para expresar un antígeno asociado al tumor o específico del tumor. Ejemplos de antígeno tumoral que es expresado por la DC proinflamatoria transducida incluyen antígenos oncovirales, como papilomavirus humano, virus de Epstein-Barr, virus de Sarcoma de Kaposi o virus de polioma de células de Merkel y neoantígenos derivados de mutaciones.  
 15  
 20

Al proporcionar las presentes DCs proinflamatorias infectadas con adenovirus, son infectadas DCs tanto inmaduras como maduras en forma de DCs proinflamatorias. Los aspectos de la infección, así como la maduración, han sido ya descritos en la presente memoria descriptiva. Según una realización, la infección y la maduración, respectivamente, se realizan de forma simultánea. Según una realización alternativa, la DC inmadura es infectada en primer lugar para proporcionar una DC infectada con adenovirus inmadura y, posteriormente, es madurada en forma de una CD proinflamatoria infectada con adenovirus.  
 25

La provisión de DCs inmaduras es bien conocida en la técnica. Normalmente, los monocitos son aislados en primer lugar a partir de leucocitos de sangre periférica, por ejemplo, mediante leucoferesis de sangre completa. Los monocitos aislados pueden ser seguidamente diferenciados en forma de células dendríticas inmaduras mediante el uso de interleucina 4 (IL-4) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). El monocito puede ser cultivado en medio de cultivo celular complementado con factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) en combinación con interleucina-4 (IL-4), durante 2 a 7 días, como aproximadamente 5 días, para diferencias los monocitos en forma de CDs inmaduras. Además, en el documento WO 2014/096033 se describe un procedimiento para proporcionar DCs inmaduras.  
 30  
 35

Si se congelan las células dendríticas proinflamatorias con posterioridad a la activación, pueden ser almacenadas. Normalmente, las células dendríticas proinflamatorias son congeladas en un medio que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) y suero o plasma. Antes de su uso, las células congeladas son descongeladas y el DMSO puede ser retirado por lavado. alternativamente, las células descongeladas son usadas directamente.  
 40

Para un uso en el tratamiento de cáncer, la célula dendrítica proinflamatoria infectada con adenovirus puede ser formulada en forma de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, como una solución salina tamponada con fosfato, agua o una emulsión, como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite. La composición farmacéutica puede comprender además un agente humectante. Además, la composición farmacéutica puede comprender adyuvantes, excipientes, estabilizadores, conservantes y/o otros componentes farmacéuticos conocidos en la técnica.  
 45

Como un ejemplo, el vehículo puede ser una solución salina que comprende albúmina de suero humano. Adicionalmente, el vehículo puede ser un medio que conserve células congeladas. Como ejemplo, la célula dendrítica proinflamatoria infectada con adenovirus, como ya se ha mencionado, puede ser congelada en plasma de donante universal inactivado con calor que comprende dimetilsulfóxido (DMSO) para permitir su almacenamiento. Este medio que comprende células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus puede ser usado directamente, por ejemplo, inyectado por vía intratumoral, una vez descongelado. Alternativamente, las células congeladas en este medio pueden ser descongeladas, lavadas y nuevamente puestas en suspensión en solución salina que comprende albúmina de suero humano antes de ser administradas, por ejemplo, infectadas por vía intratumoral.  
 50  
 55

La composición farmacéutica aceptable puede ser formulada para una administración parenteral, como intratumoral,

intradermal, subcutánea o intranodal. En una administración intratumoral, la composición farmacéutica aceptable es inyectada directamente en un tumor. Como ya se describió (véase el documento WO 2011/098516), las células dendríticas proinflamatorias son útiles en el tratamiento del cáncer, ya que pueden inducir una reacción proinflamatoria a través de una reacción de leucocitos mixtos (MLR) en el sitio de administración, captando y  
 5 activando unas DCs propias del paciente (denominadas en la presente memoria descriptiva DCs transeúntes) para desarrollar DCs migratorias con contenido tumoral.

Por tanto, una realización adicional se refiere a una célula dendrítica proinflamatoria infectada con adenovirus, o una composición que comprende estas células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus para ser usadas en el tratamiento o la prevención de cáncer. En este uso, las células dendríticas proinflamatorias infectadas con  
 10 adenovirus son alogénicas al sujeto, con el fin de hacer posible inducir una MLR que active las propias células T alorreactivas de los sujetos, que sean alogénicas a las células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus administradas. Ejemplos de cánceres para ser tratados mediante las células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus incluyen, pero sin limitación, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular, tumores estromales gastrointestinales, cáncer de conductos biliares, cánceres de cabeza y de cuello, cáncer de  
 15 pulmón de células no pequeñas, cáncer gástrico, cáncer cervical y melanoma maligno.

Cuando se usan en el tratamiento del cáncer, las células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus pueden ser combinadas con otras terapias existentes. Una alternativa preferida es combinar la administración de células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus con fármacos que disminuyen el interno del tumor inmunosupresor o activan el sistema inmune. Como un ejemplo, las presentes células dendríticas proinflamatorias  
 20 infectadas con adenovirus pueden ser combinadas con sunitinib o inhibidores de tirosina quinasa receptores similares o relacionados. Además, se pueden combinar también anticuerpos contra PD-1 (proteína 1 de muerte celular programada) o contra ligandos de PD-1 con las presentes células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus. La PD-1 es un receptor de superficie celular que se conoce que desempeña una función importante en la infra-regulación del sistema inmune y el favorecimiento de la auto-tolerancia suprimiendo la actividad inflamatoria  
 25 de células T. Los anticuerpos contra PD-1 incluyen, por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab, y pidilizumab. Además, los anticuerpos que dirigen a diana ligandos de PD-1, por ejemplo, atezolizumab y avelumab, pueden ser usados para complementar el tratamiento con las presentes células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus. Adicionalmente, las presentes células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus pueden ser combinadas también, por ejemplo, con gemcitabina o 5-fluorouracilo.

30 Análogamente, una realización se refiere al uso de estas células dendríticas proinflamatorias alogénicas infectadas con adenovirus para ser usadas en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.

Una realización adicional se refiere a un método para tratar cáncer, en el que es administrada una célula dendrítica proinflamatoria infectada con adenovirus a un paciente que necesita este tratamiento. La dosis administrada debe ser suficiente para activar las propias DCs del paciente en forma de DCs migratorias con contenido tumoral. Con el  
 35 fin de inducir una MLR, las células dendríticas proinflamatorias infectadas con adenovirus son alogénicas para el paciente.

La célula dendrítica proinflamatoria infectada con adenovirus normalmente no expresa ningún antígeno tumoral. Por tanto, es administrada preferentemente por vía intratumoral. Como es reconocido en la técnica (Laurell, A et al Intratumorally injected pro-inflammatory allogeneic dendritic cells as immune enhancers: a first-in-human study in  
 40 unfavourable risk patients with metastatic renal cell carcinoma. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2017, 5: 52), la administración de células dendríticas proinflamatorias alogénicas induce la activación de células T específicas del tumor y la infiltración intratumoral de células CD8+. Las células dendríticas proinflamatorias infectadas que han sido transducidas también con genes que codifican antígenos tumorales pueden ser administradas por vía intratumoral, pero preferentemente son administradas en tejidos dérmicos o subcutáneos normales o en nódulos linfáticos.

45 Otra realización se refiere a un método para proporcionar estas células dendríticas proinflamatorias como se describen en la presente memoria descriptiva, es decir, células dendríticas proinflamatorias que tienen una capacidad mejorada para activar células T alogénicas a través de la trayectoria directa de alorreconocimiento y que están infectadas con un adenovirus. Este método comprende las etapas de:

- proporcionar células dendríticas inmaduras;

50 - infectar células dendríticas con un adenovirus; y

- madurar las células dendríticas inmaduras en forma de una célula dendrítica proinflamatoria, en que dicha maduración se realiza mediante la adición del ligando de receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli-I:C, un ligando TLR7/8, como Resiquimod, e interferón gamma (IFN-γ) para inducir la maduración de la célula dendrítica inmadura.

Otros aspectos en relación con la provisión de células dendríticas infectadas con adenovirus han sido ya descritos  
 55 en la presente memoria descriptiva y son igualmente aplicables a esta realización.

- Sin una elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica, usando la descripción que antecede y la siguiente parte experimental, utiliza la presente invención en su alcance más completo. Las realizaciones específicas preferidas descritas en la presente memoria descriptiva, por tanto, están concebidas como meramente ilustrativas y no limitativas del resto de la descripción en modo alguno. Además, aunque la presente invención ha sido descrita anteriormente con referencia a realizaciones específicas, no está prevista que esté limitada a la forma específica expuesta en la presente memoria descriptiva. En lugar de ello, la invención está limitada solamente por las reivindicaciones que se acompañan y son igualmente posibles otras realizaciones distintas de las específicas anteriores dentro del alcance de estas reivindicaciones anejas, por ejemplo, diferentes de las anteriormente descritas
- 5
- 10 En las reivindicaciones, los términos "comprende/que comprende" no excluyen la presencia de otros elementos o etapas. Adicionalmente, aunque pueden estar incluidas características individuales en diferentes reivindicaciones, estas posiblemente pueden ser ventajosamente combinadas, y la inclusión en las diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea factible y/o ventajosa.
- 15 Además, las referencias en singular no excluyen una pluralidad. Los términos "uno", "una", "primero", "segundo", etc. no excluyen una pluralidad.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. DCs maduras con COMBIG/Ad5M expresan un fenotipo maduro y perfil de secreción de citoquinas polarizadas con Th1. (Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM (n.s.  $p \geq 0.05$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ).

- 20 (A) Se aislaron monocitos CD14<sup>+</sup> a partir de PBMCs de donantes sanos, diferenciados en imDCs mediante GM-CSF/IL-4 durante 5 días, se maduraron bajo condiciones diferentes durante 18 h, se lavaron y se volvieron a cultivar durante 24 h y se analizaron.
- 25 (B) Se caracterizaron DCs expresión de HLA-DR, CD40, CD80, CD86 y CD83 mediante citometría de flujo. Se muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada marcador en DCs (CD14-CD1a<sup>+</sup>) producida a partir de ocho donantes.
- (C) Se usó un ensayo ELISA para medir la secreción de IL-12p70, IL-6 y CXCL10 a partir de cada donante de PBMC.

Figura 2. Alo-COMBIG/Ad5M-DCs activan células inmunes innatas y adaptativas in vitro. (Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM (n.s.  $p \geq 0.05$ ; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ ).

- 30 (A) Después de una maduración durante 18 h y un lavado (muestras como se describe en la Figura 1A) las DCs, denominadas en la presente memoria descriptiva aloDCs, fueron conjuntamente cultivadas con PBMCs alogénicas (es decir, de un donante diferente). Después de un cocultivo de 24 h, se caracterizó la activación de células T en la PBMC mediante la expresión de CD69.
- 35 (B) Se muestran las intensidades medias de fluorescencia para CD69 en células T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) de dieciséis combinaciones individuales de ocho donantes no relacionados.
- (C) Se usaron las materias sobrenadantes de MLR (reacción de leucocitos mixtos) (alo-SN) de los cocultivos de aloDC-PBMC como estímulos de maduración para DCs inmaduras transeúntes (im) (DCs del mismo donante que las PBMCs) para emular un escenario para imCDs "transeúntes" hospedantes. Se valoró la maduración de DC transeúntes mediante la sobreexpresión de HLA-DR, CD40, CD80, CD86 y CD83 como se muestra en los gráficos de dispersión de la MFI para cada marcador en DCs transeúntes (CD14 CD1a<sup>+</sup>). Se evaluaron seis combinaciones individuales a partir de tres donantes no relacionados.
- 40

Figura 3. Activación y expansión de células T específicas de antígenos inducidas mediante presentación cruzada del antígeno mediante DCs transeúntes autólogas maduras mediante la materia sobrenadante en MLR (alo-SN) de cocultivos de PMBC alo-COMBIG/Ad5M-DC.

- 45 (A) Se pulsaron imDCs transeúntes de donantes de HLA-A2<sup>+</sup> (DCs transeúntes) durante 2 h con lisado de células tumorales que expresan el antígeno CMV-pp65 (A549 (pp65)) y se maduraron durante 38 h mediante alo-SN a partir de diversos cocultivos (Figura 2A). Las DCs transeúntes de presentación cruzada se mezclaron seguidamente durante 18 h con células T autólogas, se trataron por ingeniería genérica con una frente al péptido CMV-pp65<sub>495-503</sub> restringido por HLA-A2.

(B) Se usó un ensayo ELISA para medir la concentración de IFN- $\gamma$  liberado por las células T específicas de antígenos tratadas por ingeniería genética en las materias sobrenadantes. Se examinaron seis combinaciones individuales de tres donantes no relacionados.

5 (C) Se prepararon DCs transeúntes de un donante de HLA-A2<sup>+</sup> seropositivo a CMV como se mencionó con anterioridad y se usaron para estimular células T no tratadas por ingeniería genética autólogas (con respecto a DCs transeúntes) durante 12 días en presencia de una dosis baja de IL-2 (20 IU/ml).

10 (D) Se cuantificó la expansión específica de DMV-pp65 de células T no tratadas por ingeniería genética mediante citometría de flujo usando tetrámero HLA-A\*0201/pp65<sub>495-503</sub> conjugado a PE. Se muestran gráficos de FACS de una combinación individual representativa entre cuatro usando la alo-SN de cocultivos de PBMC alo-COMBIG/Ad5M-DC como estímulos de maduración.

15 (E) Las células T no tratadas por ingeniería genética expandida fueron seguidamente re-estimuladas mediante exposición a células T2 con contenido de péptido CMV-pp65<sub>495-503</sub> (diana relevante) o péptido TARP<sub>4-13</sub> (diana irrelevante). Se usó el ensayo ELISA para medir la concentración de IFN- $\gamma$  en las materias sobrenadantes recolectadas 18 h después de la re-estimulación. La línea de puntos indica la liberación de IFN- $\gamma$  de fondo a partir de células T estimuladas mediante DCs transeúntes inmaduras. Los datos se muestran como medias  $\pm$  SEM (\* P<0.05; \*\* P<0.01; \*\*\*\* P<0.0001).

Figura 4. Vacunación profiláctica con COMBIG-DC transducida con el vector Ad5M que codifica gp-100 indirectamente células T específicas de gp-100

20 (A) Se valoró la capacidad de COMBIG DCs (aloDCs) transducidas con el vector Ad5M que codifica gp100 de antígeno tumoral (Ad5M(gp100)-aloDCs) para estimular indirectamente células T específicas de gp100 en ratones que no portan tumor combinando una inyección s.c. de Ad5M(gp100)-aloDCs (día 0) con transferencia de células adoptivas intravenosa (i.v.) de esplenocitos Thy1.1<sup>+</sup> pmel-1 específicos de pg100 (día 2). La lectura de células T se realizó cinco días después mediante tinción con Thy1.1 (día 7).

25 (B) Se muestran gráficos de dispersión representativos de la proliferación específica de células T Thy1.1<sup>+</sup> pmel-1 (Thy1.1<sup>+</sup>) en respuesta a aloDCs o Ad5M(gp100)-aloDCs a partir de dos ratones.

Figura 5. Vacunación terapéutica con COMBIG-DC transducida con el vector Ad5M que codifica gp-100 disminuye el crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia

30 (A) En un ajuste terapéutico, se inyectaron en primer lugar ratones C57BL/6NRj s.c. en la parte lateral trasera con  $1 \times 10^5$  células B16-F10 (día 0) y recibieron  $1 \times 10^7$  esplenocitos pmel-1 i.v. (día 8). El tratamiento se combinó con inyecciones i.t. de  $1 \times 10^6$  Ad5M(gp100)-aloDCs (día 8 y 14) o PBS como testigo negativo. El crecimiento tumoral se verificó mediante medición del calibre.

(B) Se presenta el crecimiento tumoral medio para cada tratamiento (n=8 por grupo).

(C) La supervivencia de los ratones se muestra mediante la curva de supervivencia de Kaplan-Meier y se comparó mediante un ensayo de rango logarítmico (n=8 por grupo) (\*P<0,05).

35 Parte experimental

Los siguientes ejemplos son meros ejemplos y no implican que se deban interpretar para limitar el alcance de la invención. En lugar de ello, la invención está limitada solamente por las reivindicaciones que se acompañan.

Ejemplo 1 - COMBIG-DCs transducidas con un vector de adenovirus sin ningún transgen

40 En el ejemplo 1, se evaluó el impacto de infectar DCs inmaduras con un vector adenoviral vacío (Ad5M) sobre la activación/maduración inducida mediante el cóctel Combig (poli-I:C, R848 y IFN gamma) solo (por ejemplo, maduración fenotípica y secreción de factores inflamatorios, por ejemplo, se estudiaron IL-6, IL-12 y CXCL10). Brevemente, se observó que la inyección con Ad5M no perjudica la capacidad del cóctel Combig para inducir la maduración de DCs proinflamatorias (véase la Fig. 1). Estos datos están en línea con la opinión predominante. Sin embargo, contrariamente a la opinión predominante, se encontró que la infección con Ad5M mejora, y no perjudica, como se suponía (véase, por ejemplo, Jonuleit et al in Gene Therapy (2000) 7, 249-254; Tan et al in BLOOD, (2005), 105(10), 3824- 3832; y Newton et al in Immunology, 125, 469-479), la capacidad de Combig-DCs para estimular la trayectoria directa de alorreconocimiento, medida mediante la activación (expresión de CD69) de células T alogénicas durante una reacción de leucocitos mixtos (MLR) (véase la Fig. 2B).

Además, el descubrimiento de que la activación/maduración de DCs transeúntes con materias sobrenadantes de MLR a partir de cocultivos de DCs de alo-COMBIG Ad5M fue aumentado (Fig 2C) y proporciona a su vez una capacidad mejorada de DCs transeúntes para activar células T específicas de antígenos autólogos produciendo el IFN-gamma de citoquinas asociado a Th1 (véase la Fig. 3B y 3D) implica que las COMBIG-DCs transducidas con el vector Ad5M son útiles como un mejorador inmune alogénico basado en células mejorado en el que el modo de acción es crucialmente dependiente de la trayectoria directa de alorreconocimiento.

## Materiales y métodos

### Líneas celulares

Se cultivaron células K562(Luc), A549(pp65) y T2 (ATCC) en RPMI-1640 complementado con 10% de FBS inactivado con calor, 1% de PeSt y 1% de HEPES. Todos los componentes y medios de cultivo eran de la entidad Thermo Fisher Scientific. Se trataron por ingeniería genética células K562(Luc) con un vector de lentivirus para expresar luciferasa de luciérnaga y células A549 (pp65) para expresar el antígeno de citomegalovirus (CMV)-pp65. Todas las células fueron cultivadas en un incubador humidificado con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

### Producción del virus recombinante

El vector Ad5M fue construido y producido como se describió anteriormente (Yu, D., C. Jin, J. Leja, N. Majdalani, B. Nilsson, F. Eriksson, and M. Essand. 2011. Adenovirus with hexon Tat-protein transduction domain modification exhibits increased therapeutic effect in experimental neuroblastoma and neuroendocrine tumors. *J Virol* 85:13114-13123). El Ad5M es un vector de serotipo 5 de adenovirus humano con delección de E1 (Ad5) con eje y glóbulo de fibras de derotipo 35 y una modificación de hexones para mejorar la eficacia de transducción (Yu, D. et al 2013. Adenovirus serotype 5 vectors with Tat-PTD modified hexon and serotype 35 fiber show greatly enhanced transduction capacity of primary cell cultures. *PLoS One* 8: e54952). El Ad5M no codifica ningún transgen. Los títulos se determinaron mediante PCR cuantitativa como genomas de virus encapsulados (evg) por ml (Yu, D. et al 2013. Adenovirus serotype 5 vectors with Tat-PTD modified hexon and serotype 35 fiber show greatly enhanced transduction capacity of primary cell cultures. *PLoS One* 8: e54952).

### 25 Aislamiento de PBMCs humanas y generación de DCs

Se obtuvieron capas leucocitarias de donantes sanos a partir del banco de sangre del Uppsala University Hospital, Uppsala, Suecia. Se aislaron PBMCs mediante separación Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare Life Science) y se cultivaron en RPMI-1640 complementado con 10% de FBS inactivado con calor, 1% de PeSt, 0,5% de L-glutamina, 1% de HEPES y β-mercaptoetanol 20 mM (medio DC).

### 30 Generación y tratamiento de DCs

Monocitos aislados a partir de PBMCs mediante selección magnética positiva de CD14<sup>+</sup> (Miltenyi Biotec) fueron diferenciados a DCs inmaduras (imDCs) usando 20 ng/ml de IL-4 humana y 100 ng/ml de GM-CSF (Gentaur) durante 5 días. El medio fue sustituido cada 2 días. En el día 5, las células se dejaron sin tatar (imDCs) o bien fueron maduras durante 18 h con un cóctel de estímulos de maduración (Napolitani, G. et al. 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 6: 769-776; Lovgren, T. et al 2017. Enhanced stimulation of human tumor-specific T cells by dendritic cells matured in the presence of interferon-gamma and multiple toll-like receptor agonists. *Cancer Immunol Immunother*) que consistía en 2,5 mg/ml de R848 (iINVIVIGEN), 20 mg/ml de ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C) (Sigma-Aldrich) y 1000 IU/ml de IFN-γ (Shenandoah Biotechnology). Este cóctel de maduración se denominó "Combined Toll-like receptor ligands with IFN-γ" (COMBIG). Las DCs maduras con COMBIG usadas como estímulos alogénicos se denominan alo-COMBIG-DCs. Las DCs inmaduras tratadas con Ad5M (2000 evg/célula) durante 18 h se denominan alo-Ad5M-DCs mientras que las alo-COMBIG/Ad5M-DCs fueron tratadas con COMBIG y Ad5M durante 18 h. Después de lavar, las células fueron adicionalmente cultivados en medio de DC de nueva aportación.

### Conjunto de citoquinas humanas y ensayo de liberación de citoquinas

Se recogieron materias sobrenadantes de cultivos de DC (2,5-5x10<sup>5</sup> células/pocillo en placas de 48 pocillos). Se usaron estuches de ensayo ELISA para estudiar la producción de IL<sub>12</sub>p70 (Mabtech), IL-6 (BioLegend) y CXCL10 (BioLegend).

### Citometría de flujo

Fenotipado de DC humanas. Se usaron Anti-CD1a-BV510 (BD Biosciences), anti-CD14-APC/Cy7, anti-HLA-DR-perCP (MHC class II), anti-CD40-FITC, anti-CD80-PE, anti-CD83-APC y anti-CD86-BV421 para evaluar las DCs.

Activación de células T en reacción de leucocitos mixtos alogénicos

Se cocultivaron aloDCs con PBMCs de donantes no relacionados (MLR) a una relación de 1:5 (aloDCs:PBMCs). La activación se valoró 24 h después mediante citometría de flujo con anti-CD3-FITC y anti-CD69-BV510. Se usó ensayo ELISA para la detección de IFN- $\gamma$  (Mabtech) en la materia sobrenadante de cocultivo alogénico (alo-SN).

5 Activación de DCs inmaduras transeúntes

Se cocultivaron aloDCs con PBMCs a una relación de 1:5 (aloDCs:PBMCs) durante 24 h y se usaron como estímulos de maduración para DCs transeúntes inmaduras. La maduración de DCs transeúntes se valoró 48 h después mediante citometría de flujo como anteriormente.

10 Todos los anticuerpos fueron adquiridos de la entidad BioLegend, salvo que se especifique de otra forma. La adquisición de datos se realizó usando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences), y el análisis se realizó usando un software FlowJo (version 7.6.5; Tree Star).

Presentación cruzada de antígeno de DC y ensayos de estimulación de células T

Presentación cruzada de CMV-pp65 mediante DCs para la estimulación específica de células T modificadas por TCR de CMV-pp65<sub>495-503</sub>

15 Se cocultivaron DCs inmaduras (HLA-A2<sup>+</sup>) durante 2 h a 37°C con lisado celular congelado/descongelado de células tumorales A549(pp65) como un medio para proporcionar proteína MV-pp65 a DCs por vía exógena. Las DCs fueron posteriormente maduras en materia sobrenadante de aloDC/PBMCs (alo-SNs) durante 38 h. Seguidamente, células T tratadas por ingeniería genética para expresar un receptor de células T (TCR) restringido por HLA-A\*0201 para el epítipo CMV-pp65<sub>495-503</sub> (Hillerdal, V., et al 2016. Avidity characterization of genetically engineered T-cells with novel and established approaches. BMC Immunol 17: 23) se mezclaron con DCs de presentación cruzada CMV-pp65 a una relación de 5:1 (células T:DCs) y se cultivaron en medio de nueva aportación durante 18 h. La activación de células T específicas de TCR se valoró mediante la secreción de IFN- $\gamma$ .

20 Expansión y reestimulación de células T mediante presentación cruzada de DCs

25 Se mezclaron células T (no modificadas) de donantes de HLA-A2<sup>+</sup> seropositivos para CV con DCs de presentación cruzada CMV-pp65 autólogas preparadas como en lo que antecede a una relación de 20:1 (células T:DCs) y se cultivaron en medio de nueva aportación durante un total de 12 días. Se sustituyó el medio con 30 IU/ml de IL-2 (Proleukin, Novartis) y 20 ng/ml IL-7 (Nordic Biosite) después de 7 días. Se detectó la expansión de células T específicas de CMV-pp65 con tetrámero de HLA-A\*0201/pp65<sub>495-503</sub> (Beckman Coulter).

30 Se pulsaron células T2 (HLA-A2<sup>+</sup>) con 5 mg/ml de péptido CMV-pp65<sub>495-503</sub> o el péptido TARP(P5L)<sub>4-13</sub> irrelevante de unión a HLA-A2. Las células T2 pulsadas se usaron para reestimular las células T específicas de CMV-pp65 durante 18 h. Se midió la liberación de IFN- $\gamma$  como un indicador de la activación de células T.

Estadísticas

35 Los datos se expresan como media  $\pm$ SEM. El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad prism versión 6.01 (La Jolla). Los análisis estadísticos se realizaron usando la norma ANOVA One-way paramétrica con ensayo de para una corrección por comparación múltiple. Se usó el ensayo t de Student cuando solamente se evaluaron dos grupos. Los valores con P<0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados y análisis

Las DCs maduras con COMBIG y maduras con COMBIG/Ad5M exhiben un perfil de fenotipo y secreción de citoquinas asociado con la polarización de células T-helper-T (Th1)

40 El estado de maduración de DCs es muy crucial para la inducción de respuestas efectoras óptimas en vacunación de cáncer de DCs autólogas (Sabado, R. L., and N. Bhardwaj. 2010. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. Immunotherapy 2: 37-56). De forma interesante, se encontró también de importancia para la activación de células T alogénicas (Jonuleit, H. et al 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med 192: 1213-1222). En los presentes experimentos, se dejaron sin tratar o madurar DCs inmaduras (imDCs) durante 18 h mediante COMBIG, Ad5M o su combinación. El uso del vector adenoviral Ad5M mejorado para infección puede facilitar la inclusión en DCs de antígenos tumorales, una práctica *ex vivo* estándar para modificar DCs derivadas del paciente (Tacke, P. J., and C. G. Figdor. 2011. Targeted antigen delivery and

- activation of dendritic cells *in vivo*: steps towards cost effective vaccines. *Semin Immunol* 23: 12-20). Con el fin de tener un sistema simple para valorar el efecto de maduración de Ad5M sobre DCs, este Ad5M de estudio fue usado con un transgen. Las células se lavaron y se cultivaron otras 24 h en medio de DCs de nueva aportación sin adición de citoquinas. Los cambios fenotípicos de DCs se valoraron mediante citometría de flujo y las materias sobrenadantes (SN) se recogieron para trazar los perfiles de secreción (Fig. 1A).
- 5 La maduración COMBIG, sola o combinada con Ad5M, indujo una sobreexpresión de HLA-DR, CD40, CD80, CD86 y CD83, que implica un fenotipo maduro y activado (Fig. 1B). Las DCs maduras con COMBIG y maduras con COMBIG/Ad5M demostraron también una secreción elevada de citoquinas o quimiocinas proinflamatorias. Por tanto, confirmando que la transducción no dificultó la maduración de imDCs en forma de DCs proinflamatorias.
- 10 Considerados conjuntamente, los presentes datos indican que la maduración Ad5M/COMBIG es bien tolerada por DCs derivadas de monocitos humanos y dio lugar a la generación de un fenotipo de DCs maduras y proinflamatorias.
- Las DCs maduras con el cóctel COMBIG combinado con infección de Ad5M aumenta su capacidad para activar células T alogénicas
- 15 Se valoró la activación de células T en un conjunto de PBMC alogénicas co-cultivando DCs Combig o DCs COMBIG/Ad5M mediante la sobreexpresión de la proteína de acción temprana CD69. De forma interesante, en contraste considerable con la opinión predominante, la activación de células T fue mayor en cocultivos con alo-COMBIG infectado con el vector de virus Ad5M en comparación con la de alo-COMBIG-DCs no infectadas.
- 20 Las materias sobrenadantes de cocultivos de alo-COMBIG/Ad5M-DCs y PBMCs inducen unas DCs transeúntes de maduración eficiente
- Las materias sobrenadantes de MLR (alo-SN) de cocultivos de PBMCs con alo-COMBIG-DCs o alo-COMBIG/Ad5M-DCs se encontró que inducía significativamente la sobreexpresión de CD40 sobre DCs transeúntes inmaduras. En línea con la capacidad aumentada de las COMBIG/Ad5 DCs para activar células T alogénicas, las materias sobrenadantes en MLR de cocultivos de PBMC alo-COMBIG/Ad5M-DC, pero no las materias sobrenadantes en MLR de cocultivos de alo-COMBIG-DCs no infectadas con PBMC, condujo adicionalmente a una sobreexpresión significativa de los marcadores de maduración CD80 y CD86 en las DCs transeúntes (Fig. 2E).
- 25 Las DCs transeúntes maduras mediante la materia sobrenadante en MLR de cocultivos de PBMC alo-COMBIG/Ad5M-DC, hace una presentación cruzada eficiente para la expansión de células T
- 30 Aparte de la maduración de DCs, la absorción de antígenos y la presentación de antígenos desempeñan funciones importantes en la inducción de la inmunidad de tumores adaptativos (Vandenberk, L. et al 2015. Exploiting the Immunogenic Potential of Cancer Cells for Improved Dendritic Cell Vaccines. *Front Immunol* 6: 663).
- Con el fin de ensayar la absorción de antígenos y la presentación de antígenos se usó un sistema de modelo *in vitro* en el que se incubaron DCs de donantes de HLA-A2+ (DCs transeúntes) con lisado celular de células tumorales (A549(pp65)) que expresan la proteína CMV-pp65 de longitud completa, emulando la condición de células tumorales lisadas (Fig. 3A, C). Estas DCs transeúntes inmaduras fueron seguidamente maduras con materias sobrenadantes de MLR de cocultivos PBMC-aloDC. El antígeno pp65 exógeno necesita ser procesado por las DCs transeúntes en el péptido pp65<sub>495-503</sub> y ser sometido a presentación cruzada en HLA-A2 (clase I de MHC) con el fin de estimular células T autólogas, tratadas por ingeniería genética con un TCR específico para CMV- pp65<sub>495-503</sub>. Se encontró que las DCs transeúntes con contenido de antígeno maduras con materias sobrenadantes de MLR podían hacer eficazmente una presentación cruzada del antígeno y células T específicas de CMV-pp65<sub>495-503</sub> TCR (Fig. 3A) para secretar cantidades elevadas de IFN- $\gamma$ , con materias sobrenadantes de MLR de cocultivos de PBMC alo-COMBIG/Ad5M-DC que producían una activación significativamente mejor en comparación con las materias sobrenadantes de MRL de PB-MCs cocultivadas con alo-COMBI-DC sin transducir (Fig. 3B).
- 35 Seguidamente se quiso ensayar si las células T específicas de CMV-pp65 endógenas (no tratadas por ingeniería genética) podrían ser activadas y expandidas. En este caso, se comenzó con DCs transeúntes de donantes seropositivos a HLA-A2+ CMV, con contenido de lisado de células tumorales que contenía pp65 y maduras con alo-SN de cocultivos de PBMC alo-COMBIG/Ad5M-DC (Fig. 3C). Estas DCs transeúntes produjeron una expansión de 5 veces de células T específicas de CMV-pp65 de donantes seropositivos CMV (Fig. 3D). La capacidad de esas células T para reconocer su diana y ejercer funciones efectoras se ensayó en un ensayo de reestimulación. Las células T expandidas fueron expuestas a células T2 pulsadas con péptido pp65<sub>495-503</sub> restringido a HLA-A2 o un péptido restringido de HLA-A2 irrelevante y se midió la liberación de IFN- $\gamma$ . Tras una reestimulación con las células dianas positivas a pp65, puede ser detectada la liberación de IFN- $\gamma$  a partir de las células T expandidas mediante DCs transeúntes que presentan pp65 maduras con alo-SN de cocultivos de PBMC alo-COMBIG/Ad5M-DCs (Fig. 3E). Las células T expandidas fueron confirmadas también como específicas para antígeno ya que la exposición a
- 45
- 50

células T2 pulsadas con un péptido irrelevante condujo solamente a cantidades de segundo plano de liberación de IFN- $\gamma$  (Fig. 3E).

5 En resumen, se propone una forma de uso racional de COMBIG DCs infectadas con el adenovirus Ad5M (alo COMBIG/Ad5M DCs) como un mejorador inmune que induce la maduración de DCs transeúntes y el posterior  
 10 cebado de células T específicas de antígenos. Al comparar COMBIG-DCs no infectadas, COMBIG-DCs infectadas con el virus Ad5M (COMBIG/Ad5M DCs) se encontró sorprendentemente que se creaba un medio proinflamatorio con capacidad mejorada para inducir la maduración de DCs transeúntes cuando se cocultivaban con PBMCs alogénicas. Cuando se proporcionó exógenamente un antígeno modelo, emulando un lisado de células tumorales, las DCs transeúntes maduraron con materias sobrenadantes de MLR a partir de cocultivos de alo COMBIG/Ad5M DCs y las PBMCs pudieron digerir eficazmente y hacer una presentación cruzada del antígeno modelo y provocar la expansión y activación de células T citotóxicas específicas del antígeno.

Ejemplo 2 - DCs COMBIG infectadas y transducidas con vector de adenovirus que codifica un antígeno asociado a tumor (glicoproteína 100)

15 En el ejemplo 2, se evaluaron aloDCs infectadas con el virus Ad5M con genes que codifican el antígeno tumoral gp100. Se encontró que la administración subcutánea de Ad5M(gp100)-aloDCs estimulaba la proliferación de células T CD8+ pmel-1 adoptivamente transferidas (dirigidas a gp-100) en el ajuste profiláctico. Además, la administración intratumoral de Ad5M(gp100)-aloDCs en el ajuste terapéutico dio lugar a un crecimiento tumoral retrasado y una supervivencia prolongada.

#### Materiales y métodos

##### 20 Producción del virus recombinante

Se construyeron los vectores Ad5M(MOCK) y Ad5M(gp100) y se produjeron como se describió anteriormente (Yu D, et al. Adenovirus with hexon Tat-protein transduction domain modification exhibits increased therapeutic effect in experimental neuroblastoma and neuroendocrine tumors. *J Virol* 2011;85(24):13114-23 doi 10.1128/JVI.05759-11). Son vectores serotipo 5 de adenovirus (Ad5) con delección de E1 que tienen el eje y glóbulo sustituidos con el correspondiente serotipo 35. Contienen también un péptido de penetración celular de HIV Tat en el bucle hipervariable de sus proteínas de hexones (proteína cápside principal). Son vectores de infección aumentada con una capacidad mejorada para transducir la mayoría de células hematopoyéticas que incluyen DCs (Yu D, et al. Adenovirus serotype 5 vectors with Tat-PTD modified hexon and serotype 35 fiber show greatly enhanced transduction capacity of primary cell cultures. *PLoS One* 2013;8(1):e54952 doi 10.1371/journal.pone.0054952). El  
 25 Ad5M(MOCK) no codifica ningún transgen, mientras que el Ad5M(gp100) codifica la glicoproteína 100 de antígeno de melanoma humano (gp100, aminoácidos 25-33). Los títulos se determinaron mediante reacción de cadena de polimerasa cuantitativa como genomas de virus encapsulados (evg) por ml (Yu D, et al. Adenovirus serotype 5 vectors with Tat-PTD modified hexon and serotype 35 fiber show greatly enhanced transduction capacity of primary cell cultures. *PLoS One* 2013;8(1):e54952 doi 10.1371/journal.pone.0054952).  
 30

##### 35 Líneas celulares

La línea celular 911 (Crucell, Leiden, Países Bajos) usada para la producción del adenovirus fue cultivada en DMEM complementado con 10% de FBS inactivado con calor, 1% de penicilina/estrepomicina (PeSt) y 1% de pivurato de sodio. La línea celular de melanoma de ratón B16-F10 (ATCC, Rockville, MD) se cultivó en DMEM complementado con 10% de FBS inactivado con calor, 1% de PeSt y 1% de pivurato de sodio. Las líneas celulares de melanoma de ratón Hcmel3 y Hcmel12 son derivadas de un modelo de melanoma HGF-CDK4<sup>(R24C)</sup> primario (Bald T, et al. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature* 2014;507(7490):109-13; Landsberg J, et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 2012;490(7420):412-6) y son una amable donación del Prof. Thomas Tüting, University Hospital Magdeburg. Tanto Hcmel3 and Hcmel12 se cultivaron en RPMI-1640 complementado con 10% de FBS inactivado con calor. Todos los componentes y medios de cultivo eran de la entidad Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA). Todas las células fueron cultivadas en un incubador humidificado con 5% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37°C.  
 40  
 45

#### Aislamiento y maduración de DCs alogénicas derivadas de médula ósea de ratón

50 Se generaron DCs derivados de médula ósea a partir del fémur y tibia de ratones BALB/c tipo salvaje (wt) de 7-8 semanas de edad hembras (H-2D<sup>d</sup>) (The Janvier Labs, Francia) exponiendo la médula ósea y arrastrando las células con una jeringuilla esterilizada. Las células recolectadas se cultivaron en IMDM complementado con 10% de FBS inactivado con calor, 1% de PeSt, 1% de HEPES y  $\beta$ -marcaptoetanol 50 mM. El medio de cultivo se complementó con 20 ng/ml de IL-4 de murino recombinante y 20 ng/ml de GM-CSF de murino recombinante (Nordic BioSite, Estocolmo, Suecia). Se dispusieron en placas células de médula ósea sobre platos de Petri no tratados (Sarstedt,

Nümbrecht, Alemania). El medio se sustituyó cada 3 días. En el día 7 se recolectaron imDCs no adherentes y se trataron durante 18 h con un cóctel de ligandos de receptor de tipo Toll combinado con IFN- $\gamma$  (COMBIG), que consistía en 2,5 mg/ml de R848 (InvivoGen, San Diego, CA), 20 mg/ml de ácido poliinosínico:policitidílico (poli I:C) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 1000 IU/ml de IFN- $\gamma$  (Nordic Biosite) (Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6(8):769-76 doi 10.1038/ni1223) con el fin de obtener aloDCs maduras. Se obtuvieron d5M(gp100)-aloDCs transduciendo imDCs granuladas durante 2 h a 37°C con 2000 evg/célula de Ad5M(gp100) y se maduraron como anteriormente. Las células se cultivaron en un incubador humidificado con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

10 Fenotipado de células inmunes de múridos

Se usó citometría de flujo para fenotipar células T de múridos usando anti-CD3-PB, anti-CD8a-APC, anti-Thy1.1-PE, anti-V $\beta$ -13-FITC, tetrámero H-2Db/hgp10025-33-PE (Beckman Coulter, San Diego, CA). Todos los anticuerpos fueron adquiridos de la entidad BioLegend (San Diego, CA). La adquisición de datos se realizó usando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) y el análisis se realizó usando un software FlowJo (version 7.6.5; Tree Star, Ashland, OR).

Experimentos con animales

Las entidades The Uppsala Research Animal Ethics Committee (C215/12) y the Northern Stockholm Research Animal Ethics Committee (N170/13, N164/15) han aprobado los estudios con animales. Todos los experimentos *in vivo* se realizaron con ratones C57BL/6NRj (H-2D<sup>b</sup>) de 6-7 semanas de edad hembras que recibieron vacunas con DCs alogénicas tratadas (células vacuna) generadas a partir de la médula ósea de ratones BALB/c (H-2D<sup>d</sup>) hembras de 7-8 semanas de edad, como se describió anteriormente. Todos los ratones fueron obtenidos de la entidad Janvier Labs.

25 Transferencia adoptiva de esplenocitos pmel-1 (específicos de gp100). Los ratones fueron inyectados s.c. con 1x10<sup>6</sup> células vacuna. Se inyectaron por vía intravenosa (i.v.) esplenocitos pmel-1 (10x10<sup>6</sup> por ratón) 48 horas después. Los ratones pmel-1 transgénicos tienen un fondo de C57BL/6NRj (H-2Db) y aproximadamente un 20% de sus esplenocitos son células T Thy1.1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> que portan un TCR específico de gp100<sup>25-33</sup>. Los ratones pmel-1 fueron obtenidos originalmente de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) y se mantuvieron en crianza por el presente grupo. Los nódulos linfáticos de drenaje (inguinales) fueron recolectados 7 días después de la transferencia de esplenocitos adoptivos de pmel-1 y fueron digeridos en forma de suspensiones de células únicas.

30 Valoración *in vivo* de la eficacia terapéutica en un modelo de melanoma B16 después de una inyección intratumoral con aloDCs

35 Los ratones fueron inyectados s.c. en el lado izquierdo con 1 x 10<sup>5</sup> células tumorales B16-F10. Para el experimento de transferencia de células T pmel-1, los ratones recibieron una inyección i.v. de 1 x 10<sup>8</sup> esplenocitos pmel-1 en el día 8 e inyecciones i.t. de 10<sup>6</sup> aloDCs en los días 8 y 14 posteriores a la inoculación con células tumorales B16-F10. Los tumores fueron medidos con un calibrador y se calculó el tamaño del tumor mediante la fórmula: Volumen = longitud x anchura<sup>2</sup> x  $\pi/6$ . Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen tumoral sobrepasó 1 cm<sup>3</sup> o si se desarrollaron úlceras sangrantes. Las células fueron obtenidas del bazo, sangre y nódulos linfáticos de los ratones sacrificados en el día 15 posterior a la inoculación de B16-F10 y se tiñeron para la expresión de los marcadores de células T Thy1.1 y V $\beta$ 13 pmel-1.

40 Estadísticas

45 Los datos se expresaron como media y SEM. Se realizaron análisis estadísticos mediante el software GraphPad prism version 6.01 (La Jolla, CA, USA). Los análisis estadísticos se realizaron usando el ensayo paramétrico One way ANOVA (> 2 grupos experimentales) con el ensayo Holm-Sidak para la corrección de comparación múltiple y el ensayo Mann-Whitney U (solo 2 grupos experimentales). La asociación de células T gp100-TCR<sup>+</sup> y de carga tumoral se evaluó mediante un modelo de regresión lineal que contabilizaba la correlación de Spearman. Se realizó una comparación estadística de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier usando un ensayo de rango logarítmico. Los valores con P < 0,05 se consideró que eran estadísticamente significativos.

Resultados

50 La vacunación de Ad5M(gp100)-aloDCs en un modelo de melanoma de ratón aumenta la proliferación y la persistencia de células T pmel-1 adoptivamente transferidas, retrasa el crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia

Se buscó examinar si las Ad5M(gp100)-aloDCs en combinación con la transferencia de células T adoptivas de



ES 2 769 128 T3

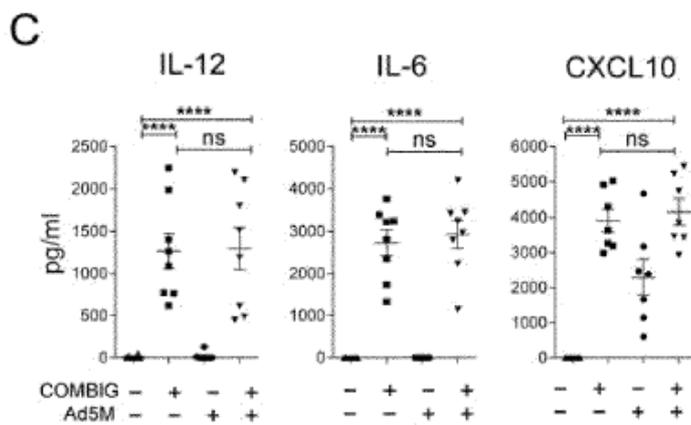
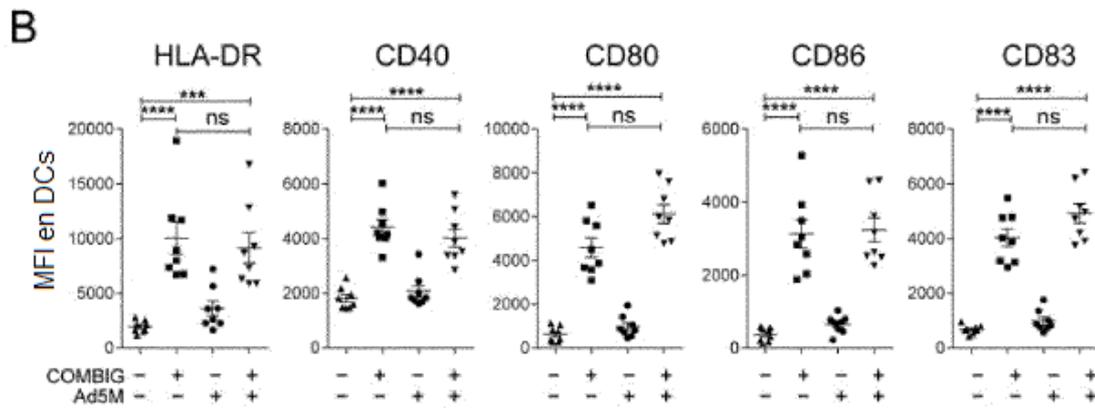
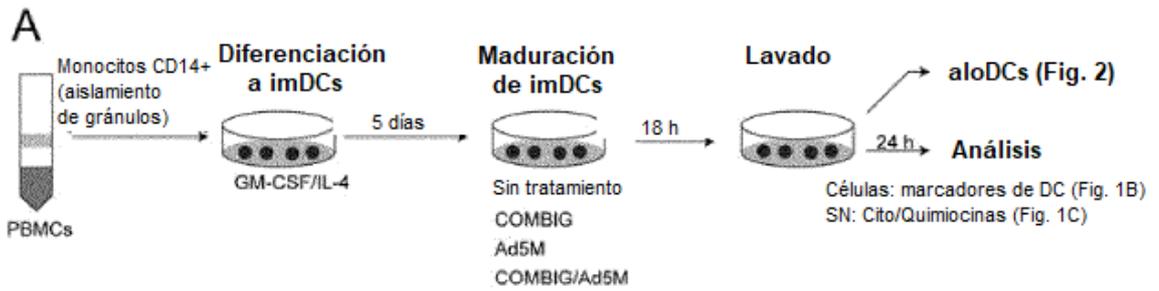
<400> 2

Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln  
1 5 10 15  
Arg Arg Arg Gly Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala  
20 25

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para proporcionar células dendríticas proinflamatorias, teniendo dichas células dendríticas proinflamatorias una capacidad mejorada para activar células T alogénicas a través de la trayectoria directa de alorreconocimiento, y siendo infectadas dichas células dendríticas con un adenovirus, en que dicho método  
5 comprende las etapas de:
- infectar las células dendríticas proporcionadas con un adenovirus; y
  - madurar las células dendríticas inmaduras proporcionadas en forma de células dendríticas proinflamatorias,
- en que dicha maduración se realiza mediante la adición de ligando de receptor 3 de tipo Toll (TLR3) poli I:C, un  
10 ligando TLR7/8 e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) para inducir la maduración de la célula dendrítica inmadura, en que dichas células dendríticas infectadas con adenovirus proinflamatorio tienen una capacidad mejorada para activar células T alogénicas a través de la trayectoria directa de alorreconocimiento en comparación con células dendríticas proinflamatorias no infectadas con un adenovirus.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el ligando TLR7/8 es Resiquimod.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que el adenovirus es un serotipo 5 de adenovirus (Ad5) con eje y/o  
15 glóbulo de fibras procedente de serotipo 35 de adenovirus (Ad35) en lugar del Ad5 con eje y/o glóbulo de fibras.
4. El método según la reivindicación 1 o 3, en el que la proteína de hexón en el adenovirus es modificada para que comprenda al menos un dominio de transducción de proteínas (PTD) del transactivador de transcripción (TAT) del virus de inmunodeficiencia humano (HIV).
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el adenovirus es un adenovirus con  
20 delección de E1.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el adenovirus no comprende ningún gen que codifique un antígeno tumoral, por lo que la célula dendrítica proinflamatoria es infectada pero no transducida.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el adenovirus comprende al menos un  
25 gen que codifica un antígeno asociado al tumor o específico del tumor, con lo que la célula dendrítica infectada es transducida para expresar el antígeno asociado o específico al tumor.
8. El método según la reivindicación 7, en el que el antígeno tumoral se selecciona entre el grupo que consiste en  
antígenos oncorivales, como papilomavirus humano, virus de Epstein-Barr, virus de Sarcoma de Kaposi y virus de poliooma de células de Merkel y neoantígenos derivados de mutaciones.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la maduración y la infección con el  
30 adenovirus, respectivamente, se realizan de forma simultánea.
10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual
- dicha etapa de madurar la célula dendrítica inmadura en forma de la célula dendrítica proinflamatoria comprende  
35 adicionalmente la adición de al menos una sustancia seleccionada entre el grupo que consiste en ligandos TLR2, ligandos TLR4, ligandos TLR9, interferón alfa (IFN- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) para inducir la activación, y/o
  - dicha etapa de madurar la célula dendrítica inmadura en forma de la célula dendrítica proinflamatoria no comprende la adición de prostaglandina E2 (PEG2).
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las células dendríticas inmaduras son  
40 proporcionadas diferenciando monocitos en forma de células dendríticas inmaduras mediante el uso de interleucina 4 (IL-4) y factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), habiendo sido aislados los monocitos a partir de leucocitos de sangre periférica.

Figura 1



- ▲ alo-imDCs + PBMCs
- alo-COMBIG-DCs + PBMCs
- alo-Ad5M-DCs + PBMCs
- ▼ alo-COMBIG/Ad5M-DCs + PBMCs

Figura 2

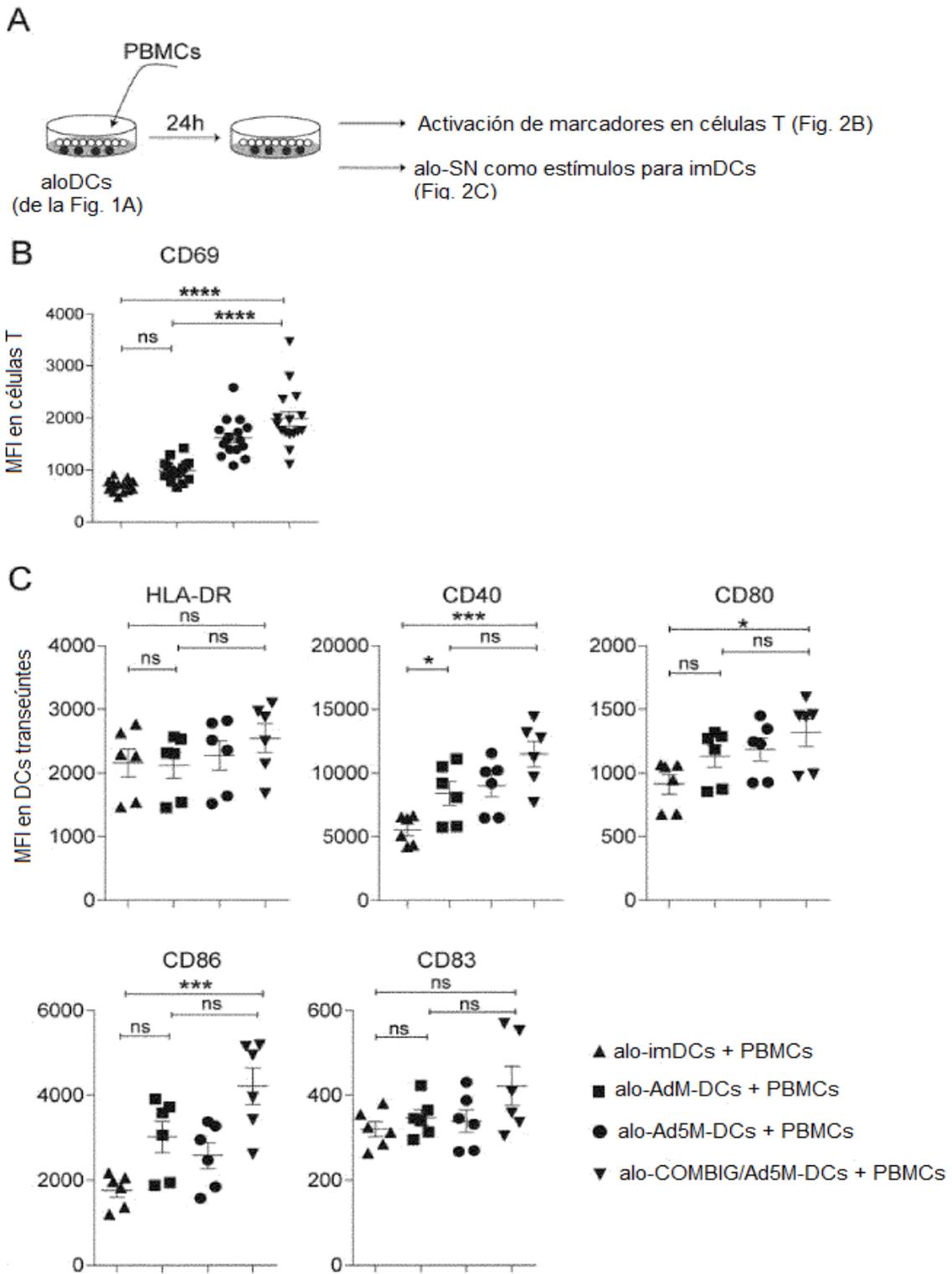


Figura 3

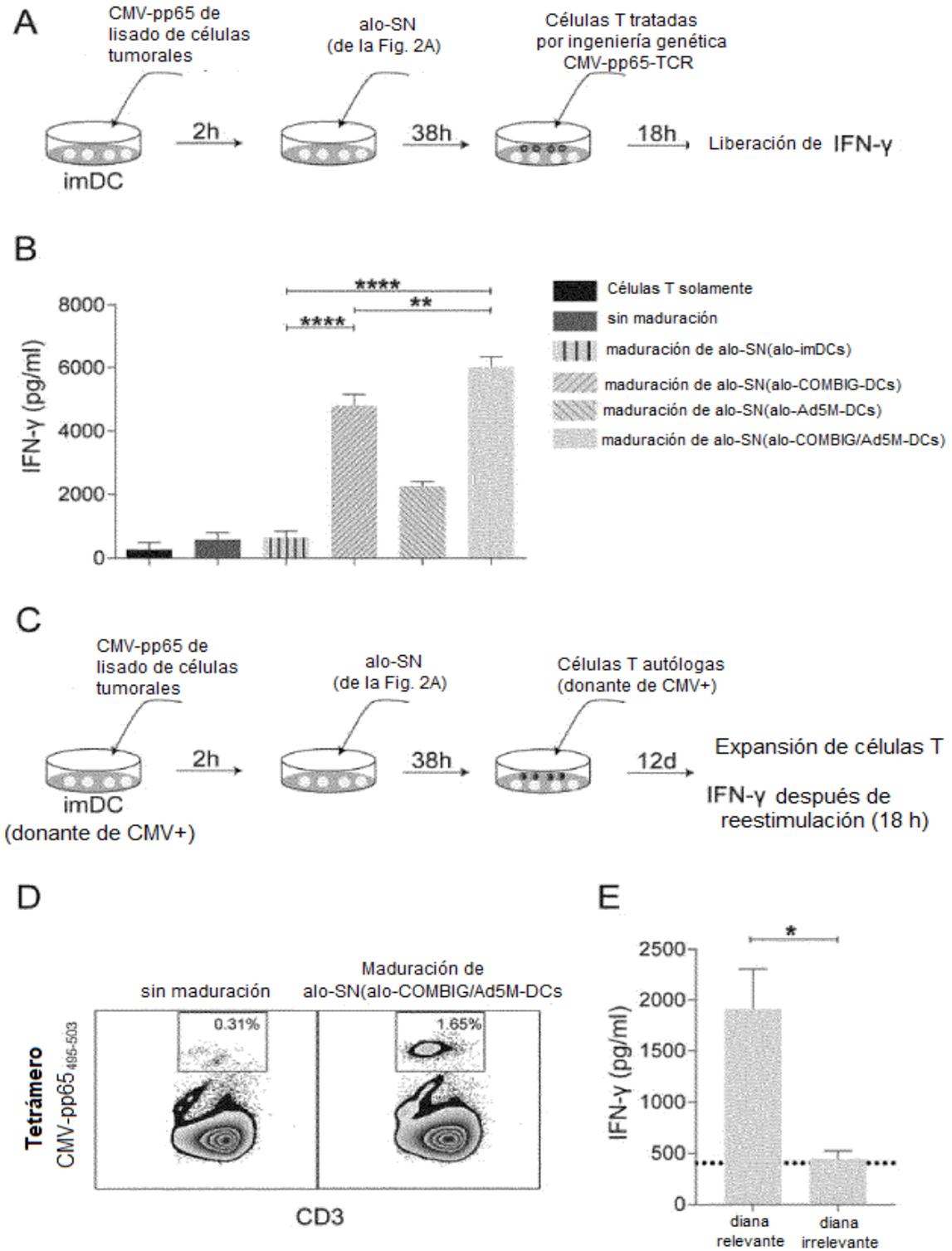
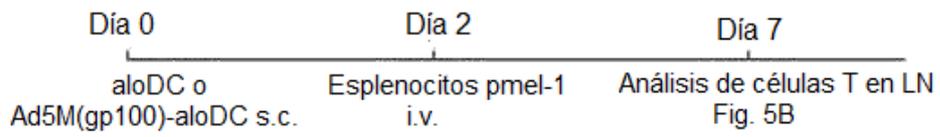


Figura 4

A



B

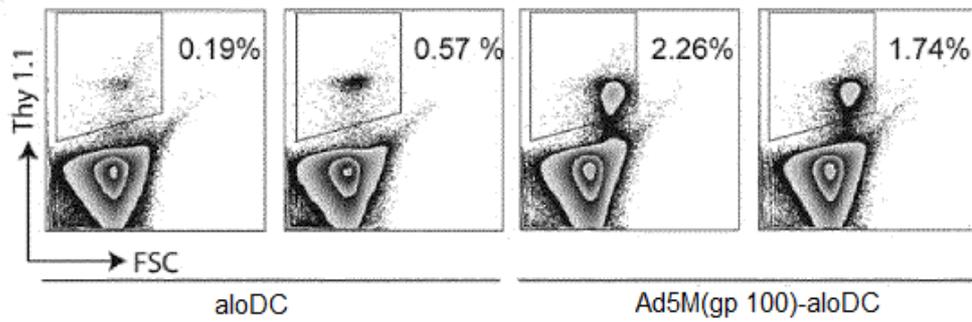
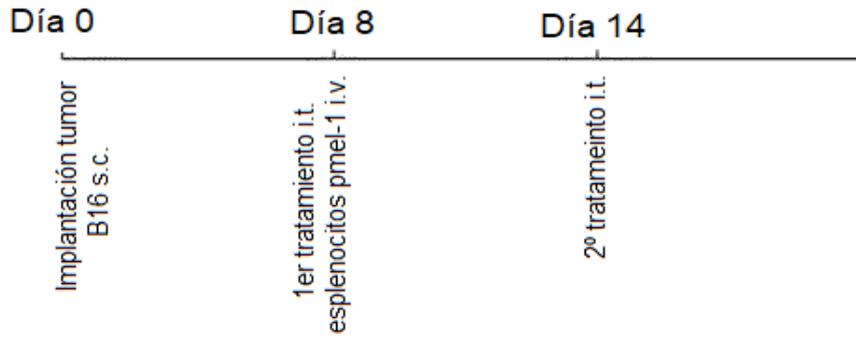
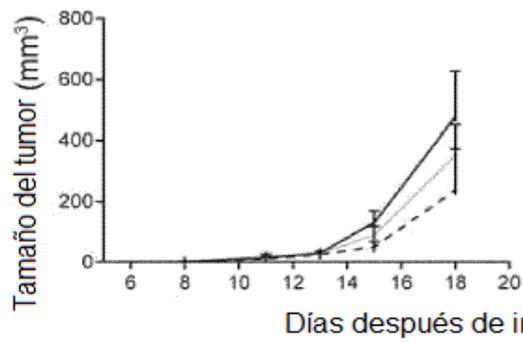


Figura 5

**A**



**B**



**C**

