

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 326**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 35/15 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2011 PCT/US2011/023919**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11097573**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2011 E 11740492 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 2531207**

54 Título: **Métodos y composiciones para la inmunoterapia contra el cáncer usando células tumorales que expresan la proteína de fusión de flagelina y antígeno asociado al tumor**

30 Prioridad:

22.02.2010 US 306618 P
05.02.2010 US 302052 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2020

73 Titular/es:

CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Center for Technology Licensing at Cornell University, 395 Pine Tree Road, Suite 310 Ithaca, NY 14850, US

72 Inventor/es:

MAGARIAN BLANDER, JULIE y GARAUDE, JOHAN

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones:

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

ES 2 769 326 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

Métodos y composiciones para la inmunoterapia contra el cáncer usando células tumorales que expresan la proteína de fusión de flagelina y antígeno asociado al tumor

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral mediante la inmunización de un mamífero con una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión de flagelina y antígeno asociado al tumor (Tumor Associated Antigen, TAA) o con una CD activada que ha interiorizado una célula tumoral que expresa la proteína de fusión de flagelina y TAA.

10

Antecedentes de la invención

Los organismos multicelulares han desarrollado dos sistemas generales de inmunidad contra los agentes infecciosos. Los dos sistemas son la inmunidad innata o natural (generalmente denominada "inmunidad innata") y la inmunidad adaptativa (adquirida) o específica. La principal diferencia entre los dos sistemas es el mecanismo mediante el que reconocen a los agentes infecciosos. Estudios recientes han demostrado que el sistema inmunitario innato desempeña un papel crucial en el control del inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa y en la inducción de respuestas efectoras celulares apropiadas (Fearon *et al. Science* 1996;272:50-53 y Medzhitov *et al. Cell* 1997;91:295-298).

El sistema inmunitario innato usa un conjunto de receptores codificados por la línea germinal para el reconocimiento de los patrones moleculares conservados presentes en los microorganismos. Estos patrones moleculares se dan en ciertos componentes de microorganismos, que incluyen: lipopolisacáridos, peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, fosfatidilcolinas, proteínas bacterianas (por ejemplo, flagelina), incluyendo lipoproteínas, ADN bacterianos, ARN víricos monocatenarios y bicatenarios, ADN de CpG no metilados, mananos, y una variedad de otros componentes bacterianos y fúngicos de la pared celular. Dichos patrones moleculares también pueden darse en otras moléculas, tales como los alcaloides vegetales. Dichas dianas de reconocimiento inmunitario innato se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), ya que son producidos por microorganismos y no por el organismo hospedador infectado (Janeway *et al. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1989;54:1-13 y Medzhitov *et al. Curr. Opin. Immunol.* 1997;94:4-9), Los PAMP son estructuras moleculares diferenciadas que son compartidas por un gran grupo de microorganismos. Son productos conservados del metabolismo microbiano, que no están sujetos a variabilidad antigénica (Medzhitov *et al. Cur Op Immun* 1997;9:4).

25

Los receptores del sistema inmunitario innato que reconocen a los PAMP se denominan receptores de reconocimiento de patrones (Pattern Recognition Receptors, PRR) (Janeway *et al. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1989;54:1-13 y Medzhitov *et al. Curr. Opin. Immunol.* 1997;94:4-9). La estructura de estos receptores varía y pertenece a varias familias de proteínas diferentes. Algunos de estos receptores reconocen a los PAMP directamente (por ejemplo, TLR3, colectinas), mientras que otros (por ejemplo, los receptores del complemento) reconocen a los productos generados por el reconocimiento de los PAMP.

30

Los PRR celulares se expresan en células efectoras del sistema inmunitario innato, incluyendo las células que funcionan como células presentadoras de antígeno (Antigen-Presenting Cells, APC) profesionales en la inmunidad adaptativa. Dichas células efectoras incluyen, pero sin limitación, macrófagos, células dendríticas, linfocitos B y epitelios superficiales. Este perfil de expresión permite a los PRR inducir directamente mecanismos efectoros innatos, y también alertar al organismo hospedador de la presencia de agentes infecciosos mediante la inducción de la expresión de un conjunto de señales endógenas, tales como citocinas y quimiocinas inflamatorias. Esta última función permite la movilización eficaz de las fuerzas efectoras para combatir a los invasores. Los ejemplos de PRR incluyen receptores de tipo Nod (Nod-like Receptors, NLR) y receptores de tipo Toll (Toll-Like Receptors, TLR).

45

Los NLR son proteínas citoplasmáticas que pueden tener una variedad de funciones en la regulación de las respuestas inflamatorias y apoptóticas. Los NLR se componen de "módulos" conservados que incluyen un dominio central de oligomerización de unión a nucleótidos y una serie de repeticiones ricas en leucina en tándem. Los NLR están codificados por genes de una gran familia de genes presente en muchas especies de animales diferentes; Hay más de 20 genes de NLR en seres humanos. Se cree que muchos sirven como PRR que detectan productos microbianos en el citoplasma de las células, aunque algunos miembros tienen diferentes funciones. Los ligandos son actualmente conocidos por los NLR, NLRC1 (NOD1) y NLRC2 (NOD2). NLRC1 reconoce una molécula denominada ácido meso-diaminopimélico (meso-DAP), que es un componente de peptidoglicano solo de las bacterias Gram negativas. Las proteínas NLRC2 reconocen al MDP intracelular (muramil dipéptido), que es un componente de peptidoglicano de las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estas proteínas transducen señales en la vía de NF- κ B y MAP quinasas. Para ello, interactúan con la serina-treonina quinasa denominada R1PK2 a través de un dominio CARD N-terminal e interactúan con moléculas microbianas por medio de una región de repetición rica en leucina C-terminal (LRR) [Strober *et al.*, "Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2". *Nat Rev Immunol.* 2006, Volumen 6(1):9-20.] También se ha demostrado que NLRC4 (IPAF) activa la caspasa-1 en respuesta a las bacterias. Además, la toxina del carbunco activa NLRP1 (anteriormente denominada NALP1) y las

60

65

toxinas de *Staphylococcus aureus* tales como la alfa-hemolisina (n.º de acceso del GenBank AAA26598) (SEQ ID NO: 1) activan a NLRP3. También se ha demostrado que otros NLR tales como NAIP activan a la caspasa-1 en respuesta a *Salmonella* y *Legionella*. [VÉASE, Inohara *et al.*, "NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease". *Annu Rev Biochem.* 2005, Volumen 74:355-83; Strober *et al.*, "Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2". *Nat Rev Immunol.* 2006, Volumen 6(1):9-20; Chen G., Shaw M. H., Kim Y. G., Nunez G. *Annu Rev Pathol.* 2009, 4:365-98; Martinon F., Mayor A., Tschopp J. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:229-65].

La clase mejor caracterizada de PRR celulares son miembros de la familia de los receptores de tipo Toll (TLR), así denominados porque son homólogos de la proteína Toll de *Drosophila* que participa tanto en el patrón dorsoventral en embriones de *Drosophila* como en la respuesta inmunitaria en moscas adultas (Lemaitre *et al.* *Cell* 1996; 86: 973-83). Al menos 12 TLR de mamíferos, TLR 1 a 11 y TLR13, se han identificado hasta la fecha (véase, por ejemplo, Medzhitov *et al.* *Nature* 1997;388:394-397; Rock *et al.* *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1998;95:588-593; Takeuchi *et al.* *Gene* 1999;231:59-65; y Chuang y Ulevitch. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1518:157-61). La activación de las vías de transducción de señales por TLR conduce a la inducción de varios genes, incluyendo las citocinas inflamatorias, quimiocinas, complejo principal de histocompatibilidad y moléculas coestimulantes (por ejemplo, B7). Por ejemplo, la activación de TLR4 puede inducir la secreción del factor de necrosis tumoral (TNF) y de las interleucinas IL-1 e IL-6 como parte de una respuesta antibacteriana, y puede inducir la secreción de los interferones INF α e INF β como parte de una respuesta antivírica.

La señalización de TLR consiste en al menos dos vías distintas: una vía dependiente de MyD88 que conduce a la producción de citocinas inflamatorias, y una vía independiente de MyD88 asociada con la estimulación de IFN- β y la maduración de las células dendríticas. La vía dependiente de MyD88 es común para todos los TLR, a excepción de TLR3 [Adachi O. *et al.*, 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity.* 9(1): 143-50.]. Tras la activación por antígenos microbianos, los TLR inducen el reclutamiento de MyD88 a través de su dominio TIR, que, a su vez, recluta a IRAK1 e IRAK4 y conduce a cascadas de señalización complejas cadena abajo, que conducen a la fosforilación de I κ B y a la posterior localización nuclear de NF- κ B. La activación de NF- κ B genera la producción de citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 e IL-12.

En organismos de mamíferos, se ha demostrado que los TLR reconocen a PAMP tales como los productos bacterianos LPS (Schwandner *et al.* *J. Biol. Chem.* 1999;274:17406-9 y Hoshino *et al.* *J. Immunol* 1999;162:3749-3752), ácido lipoteicoico (Schwandner *et al.* *J. Biol. Chem.* 1999;274:17406-9), peptidoglicano (Yoshimura *et al.* *J. Immunol.* 1999;163:1-5), lipoproteína (Aliprantis *et al.* *Science* 1999;285:736-9), ADN de CpG (Hemmi *et al.* *Nature* 2000;408:740-745), y flagelina (Hayashi *et al.* *Nature* 2001; 410: 1099-1103), así como el producto vírico ARN bicatenario (Alexopoulou *et al.* *Nature* 2001; 413: 732-738) y el producto de levadura zimosan (Underhill. *J Endotoxin Res.* 2003;9:176-80). Por ejemplo, TLR2 es esencial para el reconocimiento de una variedad de PAMP, incluyendo lipoproteínas bacterianas, peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos. TLR3 participa en el ARN bicatenario derivado de virus. TLR4 es activado predominantemente por lipopolisacárido. Se requiere TLR9 para la respuesta al ADN de CpG no metilado. Recientemente, se ha demostrado que TLR7 y TLR8 reconocen moléculas de ARN monocatenarias (Hornung V. *et al. Handb Exp Pharmacol.* 2008; (183): 71-86), y pequeñas moléculas antivíricas sintéticas (Jurk M. *et al. Nat Immunol* 2002;3:499). TLR11 detecta la proteína similar a la profilina (Profilin-Like Protein, PLP). Además, TLR5 detecta la flagelina bacteriana.

La flagelina es una proteína expresada por una variedad de bacterias flageladas (*Salmonella typhimurium*, por ejemplo), así como bacterias no flageladas (tales como *Escherichia coli*). La detección de la flagelina por las células del sistema inmunitario innato (células dendríticas, macrófagos, etc.) está mediada por el receptor 5 de tipo Toll (TLR5), así como por los receptores de tipo Nod (NLR) Ipaf y Naip5 (Franchi *et al.*, (2006) *Nat Immunol* 7 (6): 576-582; Miao *et al.*, (2006) *Nat Immunol* 7(6):569-575; y Ren *et al.*, (2006) *PLoS Pathog* 2(3):e18). Varios informes han descrito el papel de los TLR y NLR en la activación de la respuesta inmunitaria innata y la respuesta inmunitaria adaptativa. Por lo tanto, se ha sugerido que la flagelina, como otros ligandos de TLR, podría ser un adyuvante relevante en las inmunoterapias.

Bacillus anthracis es la bacteria que causa el carbunco. La bacteria secreta una toxina denominada toxina letal de carbunco, que es la causa principal de la patogénesis, y que se compone de un antígeno protector y un factor letal (Stephen, J. *Anthrax toxin.* 1981. *Pharmacol. Ther.* 12, 501-513). Recientemente, se demostró que el componente del factor letal de la toxina del carbunco entra en el citosol de los macrófagos y otros tipos de células, y es reconocido por la proteína NLR Nalp1 o NLRP1, y media la muerte celular (Boyden *et al.* 2006 *Nat Genet* 38:240-244).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva responsable de una amplia variedad de infecciones superficiales y graves potencialmente mortales (Lowy *et al.* 1998. *N. Engl. J. Med.* 339: 520-525). *S. aureus* secreta muchas toxinas entre las que la α -hemolisina se ha implicado en la patogénesis de la neumonía necrotizante de *S. aureus* y otros síntomas en modelos animales. La α -hemolisina se secreta como un monómero de 33 kDa y se oligomeriza, formando poros transmembrana heptaméricos (Song *et al.* 1996 *Science* 274: 1859-1866). Recientemente, se demostró que la α -hemolisina es reconocida por la proteína NLR NLRP3 y que inicia la muerte celular (Craven *et al.* 2009 *PLoS One* 4:e7446; Munoz-Planillo *et al.* 2009 183:3942-3948).

Los ligandos de TLR han sido utilizados como adyuvantes en numerosos regímenes terapéuticos [Koski, G. K. *et al.*, "Reengineering dendritic cell-based anti-cancer vaccines". *Immunol Rev* 222, 256 (2008)]. Por ejemplo, administración local de bacilos vivos Calmette-Guerin (BCG), que estimulan a TLR2 y TLR4, se ha demostrado que es beneficioso en el tratamiento de tumores tales como el cáncer de vejiga [Herr, H. W. *et al.*, "Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial". *J Clin Oncol* 13 (6), 1404 (1995)]. El Imiquimod, un agonista de TLR7, está aprobado para el tratamiento del carcinoma basocelular y la lesión precursora del carcinoma cutáneo de células escamosas [Herr, H. W. *et al.*, "Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial". *J Clin Oncol* 13 (6), 1404 (1995)]. De forma similar, el ligando de TLR9 CpG también se ha usado en diferentes mono-terapias, terapias combinadas y ensayos de fase I/II [Dougan, M. y Dranoff, G., *Immune Therapy for Cancer. Annu Rev Immunol* (2008)].

En las vacunas basadas en péptidos, el uso de ligandos de TLR junto con péptidos largos que contienen epítomos de linfocitos T citotóxicos (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL) y auxiliares, ha demostrado ser eficaz en la potenciación de los linfocitos T CD4+ auxiliares [Melief, C. J. *et al.*, "Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes". *Immunol Rev* 188, 177 (2002); Jackson, D. C. *et al.*, "A totally synthetic vaccine of generic structure that targets Toll-like receptor 2 on dendritic cells and promotes antibody or cytotoxic T cell responses". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 101 (43), 15440 (2004)]. De manera similar a los ligandos de TLR, muchos adyuvantes usados en la vacuna humana también incluyen ligandos para los NLR y pueden activar a las CD [Martinon, F., Mayor, A., y Tschopp, J., "The inflammasomes: guardians of the body". *Annu Rev Immunol* 27, 229 (2009)]. Además, recientemente se ha descubierto que los ligandos de TLR potencian la presentación de los antígenos fagocitados dentro de las principales moléculas de MHC de histocompatibilidad de clase II [Blander, J. M. y Medzhitov, R., *Nature* (2006), Vol. 440, pág. 808].

Las recientes evidencias demuestran que la fusión de un ligando polipeptídico específico de un receptor de tipo Toll (TLR) con un antígeno de interés genera una vacuna que es más potente y selectiva que el antígeno solo. Se ha demostrado previamente que la inmunización con proteína de fusión de antígeno:ligando de TLR recombinante: a) induce respuestas de linfocitos T y linfocitos B específicas del antígeno comparables a las inducidas por el uso de adyuvante convencional; b) produce una inflamación no específica significativamente reducida; y c) produce una protección mediada por linfocitos T CD8+ que es específica de los epítomos de antígeno fusionados (véase, por ejemplo, las solicitudes de patente publicadas en EE.UU. 2002/0061312 y 2003/0232055, de Medzhitov, y la solicitud de patente publicada en EE.UU. 2003/0175287, de Medzhitov y Kopp). Por ejemplo, los ratones inmunizados con una proteína de fusión que consiste en el polipéptido BLP PAMP unido a antígenos de *Leishmania major* generaron una respuesta inmunitaria de tipo 1 caracterizada por la producción inducida por antígeno de interferón γ e IgG2a específica del antígeno [Cote-Sierra *et al.* *Infect Immun* 2002;70:240-248]. La respuesta fue protectora, como se demostró en experimentos en los que los ratones inmunizados desarrollaron lesiones menores que los ratones de control tras la exposición a *L. major* vivo. Además, La fusión de la flagelina con antígenos bien definidos potencia la inmunidad protectora en ratones [Huleatt, J. W. *et al.*, en *Vaccine* (2007), Vol. 25, pág. 763; Huleatt, J. W. *et al.*, en *Vaccine* (2008), Vol. 26, pág. 201.] y activa las CD humanas [Arimilli, S. *et al.*, "Engineered Expression of the TLR5 Ligand Flagellin Enhances Paramyxovirus Activation of Human Dendritic Cell Function". *J Virol* (2008)].

Si bien las proteínas de fusión anteriores son muy prometedoras en función de sus datos *in vitro*, hasta la fecha, ha resultado difícil lograr una inmunidad eficaz y duradera, incluyendo la generación de respuestas de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+, hacia el antígeno deseado en ensayos clínicos usando dichas proteínas de fusión. Los linfocitos T CD8+ (tales como los linfocitos T citotóxicos (CTL)) destruyen directamente las células tumorales y son importantes para el rechazo tumoral. Las respuestas de los linfocitos T CD4 auxiliares (Th) también pueden contribuir a la actividad antitumoral mediante la muerte directa de los tumores, apoyando tanto la activación como el mantenimiento a largo plazo de los linfocitos T CD8+, y a través de la producción de citocinas. Los linfocitos Th también pueden soportar la respuesta inmunitaria humoral mediada por los linfocitos B [Koski *et al.* (2008) *supra*].

La inmunoterapia, si tuviera éxito, sería particularmente atractiva para su uso como tratamiento contra el cáncer, por lo que se necesitan con urgencia nuevos y mejores tratamientos. La última década ha sido testigo de reducciones constantes en las tasas de mortalidad para muchos tipos de cáncer. Estas reducciones se deben en gran medida a las mejoras en la detección temprana, a las técnicas quirúrgicas avanzadas, a los perfeccionamientos en la administración de radioterapia y al descubrimiento de nuevos agentes quimioterapéuticos dirigidos a moléculas. Sin embargo, se dan innumerables casos en los que bien los tumores no son susceptibles a ninguna terapia existente o solo responden inicialmente para recurrir en formas resistentes a las terapias de primera línea, dejando opciones de tratamiento limitadas. Además, las inmunoterapias serían adecuadas para prevenir la recaída.

El desarrollo de nuevas modalidades de tratamiento beneficiará enormemente a los pacientes con cáncer. Una de dichas modalidades es la inmunoterapia, que postula que el sistema inmunitario puede alistarse en la lucha contra el cáncer. Durante algún tiempo, han existido evidencias convincentes de que los agentes celulares y moleculares del sistema inmunitario son capaces de atacar a los tumores, y las intervenciones inmunoterapéuticas experimentales han tratado de aprovechar cada uno de ellos. Aunque la mayoría de los ensayos de inmunoterapia han arrojado resultados algo decepcionantes, hay algunos ejemplos satisfactorios, tales como los ensayos recientes de terapia

adoptiva de linfocitos T. Estos tratamientos han demostrado que la inmunoterapia puede inducir regresiones tumorales pronunciadas que están asociadas con una supervivencia prolongada para el melanoma avanzado [Koski *et al.* (2008) *Immunological Reviews* 222:256-276]. Al menos para el melanoma relativamente avanzado, dichos resultados son actualmente superiores a cualquier otra modalidad terapéutica disponible. Sin embargo, este tipo de terapia implica el cultivo de un gran número de linfocitos de los pacientes, lo que requiere experiencia técnica poco común e instalaciones especializadas. Por lo tanto, se desean formas menos intensivas de mano de obra de inmunoterapia, tales como las modalidades vacunales, para una implementación más generalizada. Tosch *et al.* (*Cancer Gene Therapy* 16(4), 2009, pág. 310-9) divulgan vectores adenovíricos que expresan flagelina y su uso como inmunoadyuvantes o como adyuvantes de vacuna combinados con vectores que expresan antígeno tumoral en terapia tumoral.

Desafortunadamente, las estrategias de vacunación han tenido un rendimiento inferior al de estos enfoques de inmunoterapia adoptiva más laboriosos. Se necesitan avances en la comprensión de la inmunología tumoral para avanzar en la inmunoterapia basada en vacunas hasta este siguiente nivel. Una esperanza esencial para el desarrollo de vacunas contra el cáncer llegó con el desarrollo de métodos para cultivar las células dendríticas (CD) humanas y de ratón [Koski *et al.* (2008) *supra*]. Debido a que las CD eran consideradas las células conocidas más eficaces para la presentación del antígeno a los linfocitos T, por tanto, se suponía (basándose en algunos trabajos iniciales con modelos murinos) que podría ser relativamente fácil enviar antígenos tumorales a las CD y usar estas células para vacunar con éxito contra tumores [Zitvogel L., *et al.* "Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependencia de los linfocitos T, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines". *J Exp Med* 1996;183:87-97]. La fuente principal de precursores de CD humanos era la sangre y la médula ósea, pero los primeros métodos solo produjeron CD inmaduras. Más tarde, se encontraron formas de madurar estas células, que generalmente implicaban una segunda etapa de cultivo con citocinas adicionales [Zhou L. F., Tedder T. F., "CD141 blood monocytes can differentiate into functionally mature CD831 dendritic cells". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1996;93:2588-2592]. Se han probado células tanto inmaduras como maduras en ensayos clínicos de tratamiento de diversos tumores malignos. Aunque se observaron ocasionales respuestas clínicamente relevantes, los resultados generales han sido decepcionantes [Koski *et al.*, (2008) *supra*].

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar mejores composiciones y medios para la inmunoterapia contra el cáncer. La presente invención proporciona dichos medios.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una célula dendrítica (CD), donde dicha CD ha interiorizado una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, dicha proteína de fusión comprende una flagelina y un antígeno asociado al tumor (TAA) como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En una realización, la presente invención proporciona medios de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero que comprenden administrar a dicho mamífero que lo necesita una cantidad inmunogénicamente eficaz de una composición que comprende una célula dendrítica (CD), donde dicha CD ha interiorizado una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión una flagelina y un antígeno asociado al tumor (TAA),

En una realización específica, la presente invención proporciona medios de tratamiento de un cáncer en un paciente que comprenden administrar a dicho paciente que necesita dicho tratamiento una composición que comprende una célula dendrítica (CD), donde dicha CD ha interiorizado una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión un ligando de receptor de tipo Toll (TLR) y un antígeno asociado al tumor (TAA), donde dicha composición se administra en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria antitumoral. En otra realización específica, la presente invención proporciona medios de tratamiento de un cáncer en un paciente que comprenden administrar a dicho paciente que necesita dicho tratamiento una composición que comprende una célula dendrítica (CD), donde dicha CD ha interiorizado una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión un ligando de receptor de tipo Nod (NLR) y un antígeno asociado al tumor (TAA), donde dicha composición se administra en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria antitumoral.

En otra realización, la presente invención proporciona medios de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero que comprenden administrar a dicho mamífero que lo necesita una cantidad inmunogénicamente eficaz de una composición que comprende una célula dendrítica (CD), donde dicha CD ha interiorizado una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión una flagelina y un antígeno asociado al tumor (TAA).

En una realización específica, la presente invención proporciona medios de tratamiento de un cáncer en un paciente que comprenden administrar a dicho paciente que necesita dicho tratamiento una composición que comprende una célula dendrítica (CD), donde dicha CD ha interiorizado una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión flagelina y un antígeno asociado al tumor (TAA), donde dicha composición se administra en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria antitumoral.

En un aspecto, la invención proporciona medios de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero que comprenden administrar a dicho mamífero que lo necesita una cantidad inmunogénicamente eficaz de una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende un ligando de TLR y un antígeno asociado al tumor (TAA).

En otro aspecto, la invención proporciona medios de tratamiento de un cáncer en un paciente que comprenden administrar a dicho paciente que necesita dicho tratamiento una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende un ligando de receptor de tipo Toll (TLR) y un antígeno asociado al tumor (TAA), en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria antitumoral.

En una realización, la invención proporciona medios de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero que comprenden administrar a dicho mamífero que lo necesita una cantidad inmunogénicamente eficaz de una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende un ligando de receptor de tipo Nod (NLR) y un antígeno asociado al tumor (TAA).

En otra realización más, la invención proporciona medios de tratamiento de un cáncer en un paciente que comprenden administrar a dicho paciente que necesita dicho tratamiento una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria antitumoral, donde dicha proteína de fusión comprende un ligando de receptor de tipo Nod (NLR) y un antígeno asociado al tumor (TAA).

En un aspecto, la invención proporciona medios de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero que comprenden administrar a dicho mamífero que lo necesita una cantidad inmunogénicamente eficaz de una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende una dicha proteína de fusión que comprende un ligando de receptor de tipo Nod (NLR), un ligando de receptor de tipo Toll (TLR) y un antígeno asociado al tumor (TAA).

En otro aspecto, la invención proporciona medios de tratamiento de un cáncer en un paciente que comprenden administrar a dicho paciente que necesita dicho tratamiento una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende una dicha proteína de fusión que comprende un ligando de receptor de tipo Nod (NLR), un ligando de receptor de tipo Toll (TLR) y un antígeno asociado al tumor (TAA), en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria antitumoral.

El ligando de TLR es un polipéptido. El ligando de TLR es una flagelina o un fragmento de la misma.

En algunas de las realizaciones anteriores, la célula tumoral ha sido transfectada con un vector que expresa dicha proteína de fusión. En otras realizaciones, la CD es una célula autóloga. En algunas de las realizaciones anteriores, la célula tumoral es una célula autóloga.

En ciertos aspectos anteriores, la célula tumoral se irradia letalmente antes de ser interiorizada por dicha CD. En aún otros aspectos, la CD ha fagocitado a dicha célula tumoral.

En algunas de las realizaciones anteriores, la respuesta inmunitaria antitumoral comprende una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4 o GD8. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el mamífero o paciente es un ser humano.

En los aspectos anteriores, el ligando de NLR es una flagelina o un fragmento de la misma.

En las realizaciones anteriores, el ligando de TLR también es un ligando de NLR. En algunos aspectos, la proteína de fusión que comprende un TAA y un ligando de TLR comprende además un ligando de NLR distinto. En otros aspectos, la proteína de fusión que comprende un TAA y un ligando de NLR comprende además un ligando de TLR distinto.

Breve descripción de los dibujos

La **Fig. 1A** es un gráfico que muestra un curso de tiempo (días después de la inyección) del volumen tumoral (mm^3) en ratones de tipo silvestre (wt) inyectados con 1×10^5 células de timoma EL4 diseñadas por ingeniería genética para expresar una construcción de ovoalbúmina (OVA) o una proteína de fusión de OVA y flagellina de *S. typhimurium* (STFOVA) usando transducción retroviral con pMIG-IRES-GFP. En un grupo, se inyectaron células de timoma EL4-OVA a ratones junto con flagelina recombinante (RecFLA), donde las células tumorales y la flagelina se administraron juntas, pero como entidades separadas.

La **Fig. 1B** es un gráfico que muestra un curso de tiempo (días después de la inyección) del volumen tumoral (mm^3) en ratones con desactivación de MyD88 ($\text{Myd88}^{-/-}$) inyectados con 1×10^5 células de timoma EL4 diseñadas por

ingeniería genética para expresar una construcción de ovoalbúmina (OVA) o una proteína de fusión de OVA y flagelina de *S. typhimurium* (STFOVA) usando transducción retrovímica con pMIG-IRES-GFP.

5 La **Fig. 2** es un gráfico que muestra un curso temporal (días después del trasplante) del volumen tumoral (mm^3) en ratones de tipo silvestre (wt) o $\text{Rag}^{-/-}$ trasplantados con 1×10^5 células tumorales de EL4-OVA o EL4-STFOVA.

10 La **Fig. 3A** muestra dos paneles de gráficos de puntos de citometría de flujo que muestran células peritoneales sometidas a inmunotinción a las 16 horas para CD45, F4/80 y CD11b en los grupos de ratones indicados, inmunizados con PBS, EL4-STFOVA o EL4-OVA, y tratados con PBS o clodronato/liposoma. El panel superior muestra las células teñidas para CD45. Las células tumorales son células $\text{CD45}^+ \text{GFP}^+$. El panel inferior de gráficos de puntos muestra células teñidas con CD11b y F4/80. Los macrófagos son células $\text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+$.

15 La **Fig. 3B** es un gráfico que cuantifica el número absoluto de células de macrófagos peritoneales en los grupos indicados (ratones inmunizados con PBS, EL4-OVA y EL4-STFOVA) que contienen células tumorales, 16 h después de inyectarse las células tumorales. Se indica significación estadística ($p = 0,0364$).

20 La **Fig. 4** es un diagrama de puntos que muestra la proliferación de los linfocitos T CD4^+ transgénicos OT-II específicos de OVA marcados con CFSE en los ganglios linfáticos que drenan el tumor el día 5 después del trasplante tumoral. Las células se tiñeron con Thy1.2 y CD4 para su análisis. Se muestra el porcentaje de células proliferantes, demostrado como las células con menor intensidad de fluorescencia de CFSE, en cada uno de los grupos indicados.

25 La **Fig. 5A** es un panel de diagramas de puntos de citometría de flujo que muestran la proliferación de linfocitos T OT-I CD8^+ específicos de OVA en el ganglio linfático que drena el tumor el día 3 después del trasplante tumoral. Las células se tiñeron con Thy1.1 para su análisis. Se muestra el porcentaje de células proliferantes (células en el recuadro) de cada uno de los grupos indicados. En el grupo de EL4-OVA + RecFLA, en el momento de la inyección del tumor, los ratones recibieron una inyección concomitante de 1 ng de flagelina recombinante (RecFLA).

30 La **Fig. 5B** es un gráfico que muestra el porcentaje (%) de linfocitos T OT-I CD8^+ productores de IFN- γ y granzima-B (de la Fig. 5A) medido mediante tinción intracelular de citocinas. En el gráfico, se indica la significación estadística (valor de p).

35 La **Fig. 5C** es un panel de histogramas de citometría de flujo que muestra la proliferación de los linfocitos T OT-I CD8^+ específicos de OVA en el ganglio linfático que drena el tumor el día 3 después del trasplante de tumor en ratones de tipo silvestre (wt) o ratones CD11c-DTR tratados (+) o no (-) con 2 inyecciones de 100 ng de toxina diftérica (TD) para agotar las CD. Los ratones CD11c-DTR expresan DTR, una abreviatura para el receptor de la toxina diftérica, impulsado por el promotor de CD11c . Las células se tiñeron con Thy 1.1 y CD8 para su análisis. Se trasplantaron 1×10^5 células de timoma EL4 que expresaban OVA o STFOVA.

40 La **Fig. 6A** es un gráfico que muestra un curso temporal del porcentaje (%) de ratones portadores de tumor vacunados en el costado con las composiciones indicadas (PBS (control), células tumorales EL4-OVA irradiadas, células tumorales EL4-STFOVA irradiadas, células tumorales EL4-OVA irradiadas + 2 ng de RecFLA, o células EL4-STFOVA vivas) 30 días después de la exposición a 50.000 células EL4-OVA vivas en el costado opuesto. "Vivas" significa células tumorales no irradiadas). Los grupos están se componen de 10 ratones.

45 La **Fig. 6B** es un panel de gráficos de puntos de citometría de flujo que muestran los porcentajes (células del recuadro) de linfocitos T CD4^+ endógenos específicos de OVA en ganglios linfáticos que drenan tumores de ratones de tipo silvestre vacunados (descritos en la Fig. 6A). Las células se tiñeron con un tetrámero $\text{I-A}^b\text{-OVA}$ y CD4.

50 La **Fig. 7A** muestra las mutaciones introducidas dentro de la secuencia de flagelina. Representación esquemática del plásmido retrovímico que codifica STFOVA. Se muestra la secuencia de nucleótidos del dominio C-terminal de la flagelina y los restos clave para la activación de TLR5 (Ile 411) y para la activación de Ipaf/Naip5 (Leu470, 472, 473) están en negrita. Estos restos fueron mutados a Alanina (subrayados) para perjudicar a la activación de TLR5 e Ipaf/Naip5 , tanto solos como en combinación. El efecto esperado sobre la activación de TLR5 y NLR se muestra a la derecha.

60 La **Fig. 7B** es un gráfico que muestra el volumen tumoral (mm^3) en ratones de tipo silvestre individuales inyectados por vía subcutánea en el costado con células EL4 que expresan STFOVA o formas mutadas de flagelina dentro de la fusión STFOVA (STFOVA- ΔTLR5 , STFOVA- $\Delta\text{Naip5 A}$, STFOVA- $\Delta\text{Naip5 B}$ o STFOVA- 2Δ) 20 días después de la inyección. En el gráfico, se indica la significación estadística (valor de p) ($***p < 0,001$). Cada símbolo representa un ratón.

65 La **Fig. 7C** muestra dos paneles de gráficos de citometría de flujo que muestran la proliferación de linfocitos T OT-I CD8^+ específicos de OVA (paneles superiores) en el ganglio linfático que drena el tumor el día 3 después del trasplante tumoral de timoma EL4 que expresan OVA, STFOVA o formas mutadas de flagelina dentro de la proteína de fusión STFOVA (STFOVA- ΔNLR , que carece de los restos de activación de Naip5 NLR , o STFOVA- 2Δ que

carece de los restos de activación de Naip5 de TLR5 y NLR). Los paneles inferiores muestran gráficos de puntos de citometría de flujo que muestran la secreción de IFN- γ y granzima B por las células OT-I de cada grupo indicado. Las células se tiñeron con Thy1.1 para su análisis.

5 La **Fig. 8A** muestra histogramas de expresión de CD40 en células dendríticas esplénicas después de la fagocitosis de células tumorales apoptóticas EL4 o A20 que expresan STFOVA (proteína de fusión de flagelina-OVA) u OVA (control).

10 La **Fig. 8B** es un gráfico que cuantifica la secreción de IL-12 (ng/ml) por las células dendríticas esplénicas de tipo silvestre (wt) y MyD88^{-/-} en respuesta a las células tumorales apoptóticas que expresan EL4-STFOVA o EL4-OVA y en células dendríticas en reposo.

15 La **Fig. 9** muestra imágenes de pulmones (3 ratones por grupo) aisladas el día 28 de ratones wt inyectados con 100.000 células de melanoma B16 que expresaban E α o E α fusionadas a flagelina (Stf.E α). En otro grupo, se inyectaron linfocitos B16 que expresaban E α junto con 2 ng de flagelina recombinante (RecFLA). Las metástasis de B16 se visualizan como focos negros.

Descripción detallada de la invención

20 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden una célula tumoral que expresa una proteína de fusión de ligando de TLR y antígeno asociado al tumor (TAA), y a composiciones inmunogénicas que comprenden una célula tumoral que expresa una proteína de fusión de ligando de receptor de tipo Nod (NLR) y TAA. La proteína de fusión de la invención comprende un TAA y un ligando que es tanto un ligando de TLR como un ligando de NLR.

25 En determinados aspectos, la invención también proporciona medios de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral mediante la inmunización de un mamífero con una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión de ligando de TLR y TAA y una proteína de fusión ligando de NLR y TAA. En algunos aspectos, la célula tumoral también puede expresar una proteína de fusión que comprende un TAA, un ligando de TLR y un ligando de NLR. En otros aspectos, se proporcionan métodos de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral mediante la inmunización de un mamífero con una composición que comprende una célula dendrítica (CD) que ha interiorizado (por ejemplo, fagocitado) una célula tumoral que expresa una proteína de fusión de ligando de TLR y TAA, y que expresa una proteína de fusión de NLR y TAA.

35 En una realización específica, el ligando de TLR de una proteína de fusión de la invención es una flagelina o un fragmento de la misma. En otro aspecto, un ligando de NLR de la invención es un fragmento C-terminal de flagelina que participa en la activación de Ipaf y Naip5. La divulgación contempla el uso de cualquier polipéptido con la capacidad de estimular a un NLR. En determinadas realizaciones, la proteína flagelina de longitud completa es un ligando de TLR y un ligando de NLR.

40 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las composiciones que comprenden células tumorales autólogas modificadas *ex vivo* para expresar una proteína de fusión de ligando de NLR y/o ligando de TLR y TAA producen una respuesta inmunitaria mucho mejor *in vivo* en comparación con las células tumorales autólogas que expresan TAA administradas junto (pero no unidas físicamente a) con un ligando de TLR o de NLR. De manera específica, los presentes ejemplos demuestran que los ratones de tipo silvestre trasplantados con células tumorales que expresan flagelina (que es tanto un ligando de TLR como un ligando de NLR) y ovoalbúmina ((OVA) (que es un TAA modelo)) no logran desarrollar tumores, mientras que los ratones trasplantados con células tumorales que solo expresan OVA o los ratones trasplantados con células tumorales que solo expresan OVA y tratados con flagelina recombinante (RecFLA) desarrollan tumores.

50 Las composiciones de la presente invención son particularmente eficaces para generar la activación innata de las células inmunitarias (por ejemplo, macrófagos, células dendríticas).

55 Las composiciones de la presente invención son particularmente eficaces para generar respuestas inmunitarias impulsadas por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

Definiciones

60 Una "célula tumoral", también conocida como "célula neoplásica", se refiere a una célula que prolifera a una velocidad anormalmente alta. Un nuevo crecimiento que comprende células tumorales es un tumor, también conocido como neoplasia. Un tumor es un crecimiento anormal de tejido, que, en general, forma una masa distinta, que brilla por la proliferación celular más rápidamente que el crecimiento tisular normal. Un tumor puede mostrar una falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Como se usa en el presente documento, un tumor pretende abarcar tumores hematopoyéticos, así como tumores sólidos. Un tumor puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (tumor maligno o cáncer). Un tumor o tejido tumoral también puede comprender células no tumorales, por ejemplo, células vasculares que forman vasos sanguíneos para abastecer al

tumor o tejido tumoral o células del estroma. Como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta inmunitaria antitumoral" significa una respuesta inmunitaria, que puede ser innata, humoral (por ejemplo, mediada por anticuerpos) o celular (por ejemplo, mediada por linfocitos T CD4 o CD8), o cualquier combinación de las mismas, dirigida contra un tumor, una célula tumoral, una célula cancerosa y/o antígenos expresados por una célula tumoral/cancerosa.

Un "antígeno" es una sustancia que puede ser reconocida por un anticuerpo, linfocito B o linfocito T. Como se usa en el presente documento, la expresión "antígeno asociado al tumor (TAA)" se refiere a un antígeno de proteína o polipéptido que es expresado por una célula tumoral. Por ejemplo, un TAA puede ser una o más proteínas o polipéptidos de superficie, proteínas nucleares o glicoproteínas, o fragmentos de las mismas, de una célula tumoral.

Las definiciones de proteína, péptido y polipéptido son bien conocidos en la técnica. El término "proteína", como se usa en el presente documento, es sinónimo del término "péptido" o "polipéptido", y se entiende que significa una cadena de aminoácidos dispuestos linealmente y unidos por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de restos de aminoácidos adyacentes. Por lo tanto, el término polipéptido puede referirse a una secuencia de aminoácidos de longitud completa de una proteína, o a un fragmento de la misma.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunogénico" significa que un agente es capaz de generar una respuesta inmunitaria humoral o celular, y preferentemente ambas. Una composición inmunogénica es una composición que genera una respuesta inmunitaria humoral o celular, o ambas, dirigida contra uno o más componentes de la composición, cuando se administra a un animal que tiene un sistema inmunitario.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula autóloga" es sinónimo de "célula singénica", y significa una célula propia o célula que es idéntica o esencialmente idéntica a la propia célula de un individuo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula no autóloga" es sinónimo de "célula alogénica", y significa una célula no propia (no idéntica) o una célula xenogénica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una proteína de fusión de la invención" incluye cualquiera de las proteínas de fusión descritas en el presente documento, tales como la proteína de fusión de ligando de TLR y TAA o una proteína de fusión de ligando de NLR y TAA, o una proteína de fusión que expresa un TAA, un ligando de TLR y un ligando de NLR. Los ejemplos de una proteína de fusión de ligando de TLR5 y TAA es una proteína de fusión de flagelina y MUC1 o una proteína de fusión de PLP y MUC1. Los ejemplos no limitantes de proteínas de fusión de ligando de NLR y TAA incluyen proteína de fusión de flagelina y MUC1 o proteína de fusión de toxina de carbunco y MUC1, donde MUC-1 es un TAA. Preferentemente, solo se incluyen en la proteína de fusión los restos de unión a NLR relevantes de la toxina del carbunco, para evitar los efectos tóxicos de la toxina de carbunco de longitud completa. Otro ejemplo es una proteína de fusión que comprende un TAA y un fragmento de flagelina C-terminal de 20 aminoácidos (un ligando de NLR).

Como se usa en el presente documento, la expresión "ligando de TLR distinto", en el contexto de una proteína de fusión que comprende un ligando de TLR y un ligando de NLR, significa que el ligando de TLR es un ligando diferente al ligando de NLR de la proteína de fusión. De forma similar, como se usa en el presente documento, la expresión "ligando de NLR distinto" en el contexto de una proteína de fusión que comprende un ligando de TLR y un ligando de NLR, significa que el ligando de NLR es un ligando diferente al ligando de TLR de la proteína de fusión.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una composición de la invención" incluye cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento, tal como una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión de la invención o una composición que comprende una célula dendrítica cargada con una proteína de fusión de la invención.

El término "sujeto" o "individuo" como se usa en el presente documento se refiere a un animal que tiene un sistema inmunitario, preferentemente, un mamífero (por ejemplo, roedor, tal como ratón). En particular, el término abarca a los seres humanos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "alrededor de" o el término "aproximadamente" significa, en general, dentro de un intervalo de error aceptable para el tipo de valor y método de medición. Por ejemplo, puede significar más/menos el 20 %, más preferentemente más/menos el 10 % y, lo aún más preferentemente, más/menos el 5 % de un valor o intervalo dado. Como alternativa, en especial, en los sistemas biológicos, el término "aproximadamente" significa más/menos aproximadamente un logaritmo (es decir, un orden de magnitud) preferentemente más/menos un factor de dos de un valor dado.

La expresión "esencialmente idéntico/a", al nivel de la secuencia de aminoácidos, significa que la identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos es al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %. La "identidad de secuencia" es el porcentaje de restos de una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico que son idénticos después de alinear la secuencia con una secuencia de referencia e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr la identidad de secuencia máxima. Los métodos y programas informáticos

para la alineación, tales como BLAST, son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, si un polipéptido es esencialmente idéntico a los 170 restos del extremo N y 90 restos del extremo C de una flagelina bacteriana natural, entonces, cuando el polipéptido y la secuencia de referencia (170 restos del extremo N y 90 restos del extremo C de la flagelina bacteriana natural) se alinean al máximo, al menos el 30 % de los aminoácidos de la secuencia de referencia se encuentran en las posiciones correspondientes del polipéptido. La expresión "esencialmente idéntico/a", a nivel celular, significa que una célula es suficientemente similar a una célula de un hospedador, de modo que el sistema inmunitario del hospedador no genere una respuesta inmunitaria contra la célula esencialmente similar (es decir, el sistema inmunitario reconozca a la célula como una célula propia).

"Tratar" o "tratamiento" de un estado, trastorno o afección incluye: (1) prevenir o retrasar la aparición de síntomas clínicos del estado, trastorno o afección que se desarrolla en un ser humano u otro mamífero que puede estar afectado o predispuesto al estado, trastorno o afección, pero aún no experimenta ni muestra síntomas clínicos o subclínicos del estado, trastorno o afección; (2) inhibir el estado, trastorno o afección; es decir, detener, reducir o retrasar el desarrollo de la enfermedad o una recaída de la misma (en caso de tratamiento de mantenimiento) o al menos un sintoma clínico o subclínico de la misma; o (3) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión del estado, trastorno o afección, o de al menos uno de sus síntomas clínicos o subclínicos.

El beneficio para un individuo que se vaya a tratar es estadísticamente significativo o al menos perceptible para el paciente o para el médico. En una realización específica de la invención, "tratar un cáncer" significa aliviar o eliminar los síntomas de un tumor, o ralentizar el progreso del tumor. El efecto de alivio o eliminación puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como medir el tamaño del tumor y observar los indicadores bioquímicos del tumor en particular. Por ejemplo, un sujeto se trata si muestra uno o más de los siguientes: reducción del número de células cancerosas; reducción del tamaño del tumor; inhibición o eliminación de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo la propagación del cáncer a tejidos blandos y huesos; inhibición o eliminación de metástasis tumorales; inhibición del crecimiento tumoral; reducción de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; y reducción de la morbilidad y mortalidad. El alivio es preferentemente al menos aproximadamente del 10 %, más preferentemente al menos aproximadamente del 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

Como se usa en el presente documento, una "flagelina" puede ser cualquier polipéptido que se una a un TLR5 natural y active al menos una de las funciones biológicas del TLR5 en las células presentadoras del antígeno tras dicha unión. Por lo tanto, una flagelina puede ser un polipéptido que comprenda cualquiera de las proteínas flagelina bacterianas naturales. Una flagelina también puede ser un polipéptido que sea esencialmente idéntico a cualquiera de las proteínas flagelina bacterianas naturales a nivel de secuencia de aminoácidos, donde el polipéptido es capaz de unirse a un TLR5 natural. Además, una flagelina puede ser un polipéptido que sea esencialmente idéntico a los 170 restos del extremo N y 90 restos del extremo C de cualquiera de las proteínas flagelina bacterianas naturales a nivel de secuencia de aminoácidos, donde el polipéptido es capaz de unirse a un TLR5 natural. La flagelina de la presente invención también puede comprender una modificación, tal como glicosilación o fosforilación. La flagelina también puede ser una variante mutante o proteica de la flagelina.

Los flagelos se encuentran principalmente, aunque no exclusivamente, en la superficie de las bacterias en forma de vara y espiral, incluyendo los miembros de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Treponema*, *Legionella*, *Clostridia* y *Caulobacter*. Las secuencias de flagelina se pueden obtener fácilmente basándose en el conocimiento en la técnica. De hecho, se han publicado las secuencias de flagelina de numerosas especies bacterianas, así como los análisis estructurales. Cualquier análogo, derivados de flagelina o fragmentos de la misma con función de flagelina, es decir, aquel que se une a un TLR5 y/o NLR de origen natural (Naip5 y/o Ipaf) y activa al menos una de las funciones biológicas de TLR5 y/o Naip5 y/o Ipaf en las células presentadoras de antígeno tras dicha unión, se pueden usar en la presente invención. Estos incluyen polipéptidos que comprenden cualquiera de las proteínas y polipéptidos de flagelina bacterianas naturales que son esencialmente idénticos a cualquiera de las proteínas flagelina bacterianas naturales a nivel de secuencia de aminoácidos, donde los polipéptidos son capaces de unirse a un TLR5 y/o Naip5 y/o Ipaf de origen natural.

En la técnica, se dispone de las secuencias de flagelina de numerosas bacterias, tales como, entre otras, los números de acceso del GenBank D13689 (secuencia de ácido nucleico) (SEQ ID NO: 2), YP_275549 (SEQ ID NO: 3), YP_275550 (SEQ ID NO: 4), AAU18718 (SEQ ID NO: 5), AAU18717 (SEQ ID NO: 6), ZP_00743095 (SEQ ID NO: 7), EA052626 (SEQ ID NO: 8), YP_315348 (SEQ ID NO: 9), AAT28337 (SEQ ID NO: 10), AAT28336 (SEQ ID NO: 11), AAT28335 (SEQ ID NO: 12), AAT28334 (SEQ ID NO: 13), AAT28333 (SEQ ID NO: 14), AAZ36356 (SEQ ID NO: 15), AAZ33167 (SEQ ID NO: 16), AAZ94424 (SEQ ID NO: 17), AAZ91670 (SEQ ID NO: 18), BAD18052 (SEQ ID NO: 19) y BAD18051 (SEQ ID NO: 20). Cualquier secuencia de ácido nucleico o aminoácidos de flagelina adecuada, o fragmento adecuado de la misma, ahora conocido o por descubrir en el futuro se contempla para su uso en las proteínas de fusión de la presente invención.

Las proteínas flagelina de diferentes especies presentan un alto grado de homología de secuencia proteica en los extremos amino y carboxi (aproximadamente 170 restos del extremo N y aproximadamente 90 restos del término C), y la presencia de una región central polimórfica que es responsable de la diversidad antigénica entre los diferentes flagelos. Las regiones conservadas son importantes para la unión a TLR5, mientras que la región central polimórfica

- se puede eliminar sin afectar a la unión a TLR5. Se han publicado análisis de la función estructural de las proteínas flagelina (véase, por ejemplo, Smith K. D. *et al.*, "Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility", *Nat Immunol.* diciembre de 2003; 4(12): 1247-53; Murthy K. G. *et al.*, "dentification of conserved domains in Salmonella muenchen flagelina that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response *in vitro*", *J Biol Chem.* Febrero de 2004. 13; 279(7):5667-75; patente de EE.UU. n.º 6.130.082; y publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0044429). Por lo tanto, los mutantes o variantes de flagelina, que mantienen la capacidad de activación de TLR4 y/o NLR también se contemplan para su uso en la presente invención.
- 10 En una realización específica, una proteína de fusión de la invención comprende un TAA y un fragmento de flagelina. En una realización, el fragmento de flagelina es capaz de unirse a TLR5, pero no a Naip5 o Ipaf. Por ejemplo, al fragmento de flagelina puede faltarle la parte C-terminal requerida para la activación de NLR y contener una secuencia conservada reconocida por TLR5 [véase Smith, K. D. *et al.* *Nat Immunol* 2003 vol. 4 (12) pág. 1247-53].
- 15 En una realización preferida, el fragmento de flagelina es capaz de unirse a NLR (por ejemplo, Naip5 e Ipaf) pero no a TLR5. Por ejemplo, la secuencia C-terminal de flagelina de *S. Typhimurium*: VLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 31) o la secuencia TSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 32) puede estar comprendida en una proteína de fusión de la invención. Se ha de entender que esta secuencia puede diferir de una bacteria a otra, pero los restos clave para la activación de Ipaf y Naip5 se conservan [Karla L. Lightfield, *et al.* *Nat Immunol* 2008 vol. 9 (10) pág. 1171- 1178]. Por lo tanto, las variantes de esta secuencia que contienen los restos conservados requeridos por la
- 20 unión y activación de NLR también se contemplan para su uso en la presente invención.
- En otra realización, una proteína de fusión de la invención comprende la secuencia C-terminal de flagelina de *S. typhimurium*: VLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 31) o la secuencia TSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 32), (ambas pueden activar a Naip5 o Ipaf, pero no a TLR5) y el ligando de TLR PLP. Por lo tanto, esta proteína de fusión contiene al menos un ligando de TLR y al menos un ligando de NLR. Otro ejemplo de dicha proteína de fusión es una proteína de fusión que comprende PLP y un fragmento de toxina de carbunco (la secuencia de aminoácidos requerida para unirse al NLR NLRP1) o una proteína de fusión que comprende PLP y un fragmento de la alfa-hemolisina de *Staphylococcus aureus* (la secuencia de aminoácidos necesaria para la unión al NLR NLRP3).
- 25 En determinadas realizaciones, un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de flagelina que activa a TLR5 y NLR es una flagelina de longitud completa. En determinadas realizaciones, un ejemplo de una secuencia de aminoácidos de flagelina que activa a NLR, pero no a TLR5 es TSVLAQANQVPQNVLSLLR (SEQ ID NO: 32). Una secuencia que activa a TLR5, pero no a NLR es una secuencia de aminoácidos de flagelina en la que se eliminan los últimos 20 restos en el extremo C-terminal.
- 30 Si bien los presentes ejemplos usan proteínas de fusión de flagelina y TAA, la divulgación no se limitará a las mismas. También se divulgan proteínas de fusión que comprenden otros ligandos de TLR y/o de NLR y un TAA. Preferentemente, el ligando de TLR o de NLR es un ligando polipeptídico, para facilitar su expresión como proteína de fusión, por ejemplo, en células tumorales. Por ejemplo, el ligando de la proteína TLR11, proteína similar a la profilina (PLP), o un fragmento de la misma, para el que se conocen las secuencias de aminoácidos de muchos organismos diferentes, también se puede usar como un ligando de TLR en una proteína de fusión de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos de PLP, que pueden usarse para generar una
- 35 proteína de fusión de la invención incluyen los números de acceso del GenBank ABB43118 (SEQ ID NO: 21), BAB09877 (SEQ ID NO: 22), ABZ80128 (SEQ ID NO: 23), YP_717473 (SEQ ID NO: 24), ABD97732 (SEQ ID NO: 25), ABC61055 (SEQ ID NO: 26), ABB16985 (SEQ ID NO: 27) y AAY97753 (SEQ ID NO: 28). La toxina del carbunco y las toxinas de *Staphylococcus aureus* tales como la alfa-hemolisina (n.º de acceso del GenBank AAA26598) (SEQ ID NO: 1) activan a NLRP3, y son ejemplos no limitantes de ligandos de proteínas NLR contemplados para su uso en las proteínas de fusión de la presente invención.
- 40 La flagelina es única, porque representa tanto un ligando de TLR (TLR5) como un ligando de NLR (Ipaf y Naip5). Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, una proteína de fusión de la invención comprende un TAA y un ligando que estimula tanto a un TLR como a un NLR. En otra realización preferida de la invención, una proteína de fusión comprende un TAA y dos o más ligandos de TLR, o dos o más ligandos de NLR, o al menos un ligando de TLR y al menos un ligando de NLR. También se divulga una proteína de fusión que comprende un TAA (por ejemplo, MUC-1), PLP (un ligando de TLR) y toxina del carbunco (un ligando de NLR). Si bien no se pretende quedar ligados a ninguna teoría o mecanismo específico, se cree que dicha proteína de fusión expresada en una célula tumoral es especialmente eficaz para la activación de las CD, porque puede generar la señalización tanto de TLR como de NLR. En otro aspecto, se puede diseñar por ingeniería genética una célula tumoral para expresar dos o más proteínas de fusión, donde al menos una proteína de fusión comprende un TAA y un ligando de TLR (por ejemplo, PLP) y al menos otra proteína de fusión comprende un TAA y un ligando de NLR (por ejemplo, toxina de carbunco).
- 50 El TAA de cada construcción expresada en el tumor puede ser el mismo TAA o un TAA diferente.
- 55 En determinadas realizaciones de la invención, una célula de mamífero, preferentemente, una célula tumoral, y aún más preferentemente, una célula tumoral autóloga, se diseñan mediante ingeniería genética para expresar una proteína de fusión de ligando de NLR o de TLR y TAA.
- 60
- 65

Los antígenos asociados a tumores son bien conocidos y se describen en la técnica. Cualquier antígeno proteico expresado por una célula tumoral se contempla para su uso en la presente invención. Los TAA preferidos son aquellos que se sabe que son altamente inmunogénicos (es decir, que comprenden epítomos inmunodominantes que estimularán una potente respuesta inmunitaria antitumoral). Los ejemplos no limitantes de TAA contemplados para su uso en las proteínas de fusión de la presente invención incluyen receptores de ErbB, Melan A. [MARTI], gp100, tirosinasa, TRP-1/gp 75 y TRP-2 (en melanoma; para más ejemplos, véase también una lista de antígenos proporcionada en Storkus y Zarour, Forum (Génova), julio-septiembre de 2000, 10(3):256-270); MAGE-1 y MAGE-3 (en carcinoma de vejiga, cabeza y cuello, y no microcítico); proteínas del VPH E6 y E7 (en cáncer cervical); mucina [MUC-1] (en cánceres de mama, páncreas, colon y próstata); antígeno prostático específico [PSA] (en cáncer de próstata); antígeno carcinoembrionario [CEA] (en cánceres de colon, mama y gastrointestinales), antígeno tumoral P1A (por ejemplo, epítopo CTL LPYLGWLVF (SEQ ID NO: 29) según lo divulgado en el documento WO 98/56919), y antígenos específicos del tumor compartidos como MAGE-2, MAGE-4, MAGE-6, MAGE-10, MAGE-12, BAGE-1, CAGE-1,2,8, CAGE-3 to 7, LAGE-1, NY-ESO-1/IAGE-2, NA-88, GnTV y TRP2-INT2, una cadena de epítopo CTL de tumor quimérico tal como MLPYLGWLVF-AQHPNAELL-KHYLFRNL-SPSYVYHQF-IPNPLLGLD (SEQ ID NO: 30) (véase, por ejemplo, solicitud PCT n.º WO 98/56919). (Robson N.C., Hoves S., Maraskovsky E., Schnurr M., *Curr Opin Immunol.* 28 de enero de 2010, Epub antes de impresión).

Las células tumorales pueden aislarse de un sujeto o paciente mamífero. Por ejemplo, se puede extraer un tumor de un paciente durante una biopsia o cirugía, y se pueden obtener y cultivar células tumorales de la muestra de biopsia [Liangping Li, "Establishment of tumor cell lines by transient expression of immortalizing genes", *Gene Ther Mol Biol* Vol 4, 261-274. Diciembre de 1999]. Las células tumorales pueden ser autólogas o no autólogas. Las células tumorales para su uso en la presente invención también pueden derivarse de cualquier línea celular tumoral adecuada. Los ejemplos no limitantes de líneas celulares tumorales contempladas para su uso en la presente invención incluyen DU145 (cáncer de próstata), Lncap (cáncer de próstata), MCF-7 (cáncer de mama), MDA-MB-438 (cáncer de mama), PC3 (cáncer de próstata), T47D (cáncer de mama), THP-1 (leucemia mieloide aguda), BN1 (melanoma), U87 (glioblastoma), células de neuroblastoma humano SHSY5Y, clonado de un mieloma y células Saos-2 (cáncer de hueso). Se contempla cualquier línea celular tumoral adecuada para su uso en la presente invención.

Una o más proteínas de fusión de la invención se expresan en células tumorales de la invención. Los métodos para expresar proteínas exógenas o recombinantes en una célula son bien conocidos en la técnica. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, transfección, microinyección, carga por raspado y captación mediada por receptor por parte de la célula. La transfección puede ser transitoria o estable. Los ejemplos de métodos actuales de transfección incluyen precipitación en fosfato de calcio, electroporación, lipofección y transfección mediada por péptidos. También se puede emplear la administración y transducción balística de ADN (es decir, la introducción de ADN foráneo mediante infección por virus o vector vírico).

Por ejemplo, una flagelina u otro ligando de TLR o NLR puede administrarse a las células por medio de un vector de expresión. Los vectores de expresión adecuados comprenden un promotor que es activo en las células en las que se va a expresar el ligando. Los vectores de expresión útiles para poner en práctica la invención también pueden incluir marcadores seleccionables, potenciadores o represores específicos del tipo de célula o del ciclo celular, polienlazadores, codones de inicio, sitios de unión a ribosomas, sitios internos de entrada al ribosoma, intrones, codones de parada, señales de poliadenilación u otras características que facilitan la clonación y la estabilidad del vector, la estabilidad y localización del ARNm en la célula, y la eficacia de la traducción, o combinaciones de los mismos. Los vectores de expresión incluyen vectores de expresión vírica. La selección de estas características se basa en gran medida en las células que se vayan a transfectar y en las características de expresión deseadas. En el mercado hay una gran cantidad de vectores disponibles para expresar polipéptidos en células.

La presente invención también contempla proteínas de fusión modificadas, tales como proteínas de fusión glicosiladas o fosforiladas. También se contemplan motivos de dirección subcelular (*subcellular targeting*).

Los métodos para clonar vectores de expresión (construcciones de proteínas de fusión), y los métodos para expresar y purificar proteínas de fusión recombinantes de la invención se describen en detalle en Juleatt J. W. *et al* (2007) *Vaccine* (25) 763-775. Por ejemplo, los vectores también pueden expresarse en células tumorales usando vectores retrovíricos, adenovíricos o lentivíricos.

Las células tumorales para su uso en la presente invención pueden ser células apoptóticas o vivas (no apoptóticas). Preferentemente, la apoptosis se induce en las células tumorales justo antes de la incubación con las CD o antes de la administración a un sujeto. Esto puede hacerse para prevenir la proliferación de las células tumorales en el receptor. Además, sin pretender quedar ligados a ninguna teoría o mecanismo en particular, las células apoptóticas son fácilmente reconocidas por las CD y e interiorizadas. La interiorización administra la célula apoptótica y todas las proteínas derivadas de la misma a compartimentos endo-lisosómicos que generan los ligandos necesarios para la activación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Cuando una CD interioriza una célula apoptótica que se creó para expresar una proteína de fusión de ligando de TLR y TAA o de ligando de NLR y TAA, esta CD además se activará e inducirá una potente respuesta inmunitaria adaptativa. Dicha activación no se produce si una CD interioriza una célula apoptótica que carezca de la expresión del ligando de TLR o de NLR. La expresión de un TAA solo por una

célula apoptótica y en ausencia del ligando de TLR o de NLR no activará la CD [Blander, J. M. y Medzhitov, R., *Nature* (2006), Vol. 440, pág. 808].

5 La apoptosis puede inducirse usando agentes quimioterapéuticos (tales como, por ejemplo, oxaliplatino, cisplatino, carboplatino u otros fármacos a base de platino), agentes alquilantes (por ejemplo, mitomicina C), antraciclinas inhibidoras de la topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido) (por ejemplo, mitoxantrona), inductores del estrés del retículo endoplasmático (por ejemplo, taspigargina), o las células pueden irradiarse letalmente. Una célula es "irradiada letalmente" si la célula, después de la irradiación, no es capaz de replicarse (es decir, dividirse en dos o más células). Se pueden usar métodos reconocidos en la técnica para determinar la dosis de radiación y si las
10 células irradiadas pueden replicarse. Por ejemplo, las células que crecen a una densidad de 5×10^5 células/ml pueden irradiarse con 10.000 Rad, y luego se pueden determinar los números de células viables con el tiempo, por ejemplo, exclusión de azul tripano. Para ser útil en la presente invención, la célula irradiada letalmente debería poder seguir expresando proteínas durante un período de tiempo (véase, por ejemplo, Borrello I. *et al.*, "A universal granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing bystander cell line for use in the formulation of autologous tumor cell-based vaccines", *Hum Gene Ther.* Agosto de 1999. 10; 10(12): 1983-1991). La expresión de
15 proteínas por las células irradiadas letalmente se puede analizar mediante métodos conocidos en la técnica, tales como la electroforesis en gel y la tinción de proteínas para la síntesis de proteínas en general, o el análisis de Western para proteínas específicas.

20 En determinadas realizaciones de la invención, se proporcionan métodos de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero o de tratamiento de un cáncer, métodos que comprenden administrar a un mamífero o paciente una cantidad inmunogénicamente eficaz de una composición que comprende una CD, donde la CD ha interiorizado una célula tumoral que expresa una proteína de fusión de la invención. Se sabe que las CD son potentes estimuladores de la respuesta inmunitaria adaptativa (por ejemplo, respuestas inmunitarias mediadas por
25 linfocitos T y/o B).

Son varios los ensayos clínicos para la inmunoterapia antitumoral que se basan en el uso de células dendríticas (CD) cargadas con extractos de células tumorales [revisado en Koski *et al.* (2008), *supra*]. En dichos protocolos, se podrían usar ligandos de TLR para garantizar la maduración adecuada de las CD antes de la inyección en los
30 pacientes. Si bien dichas estrategias son prometedoras, su eficacia sigue siendo baja. En combinación con el presente descubrimiento de que las células tumorales que expresan la proteína de fusión de ligando de TLR y/o de NLR y TAA son superiormente inmunogénicas y facilitan la adaptación de una respuesta inmunitaria altamente específica del antígeno hacia el TAA deseado, la presente invención proporciona métodos para lograr una eficacia superior de las inmunoterapias basadas en las CD.

35 De manera específica, la presente invención se basa, en parte, en los resultados de la inmunización de ratones con células dendríticas cargadas con células tumorales que expresan la proteína de fusión de ligando de TLR o de NLR y TAA en comparación con la inmunización de ratones con CD cargadas con células tumorales y ligando de TLR y TAA por separado. Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría o mecanismo en particular, se cree que la superioridad de los métodos y de las composiciones de la presente invención se logra porque el enlace físico en una
40 proteína de fusión del TAA con el ligando de TLR o de NLR (PAMP) facilita la administración tanto de la señal de activación (PAMP) como del antígeno (TAA) al mismo compartimento endo/lisosómico dentro de la CD, aumentando así la activación de la CD y la capacidad de inducir una potente respuesta inmunitaria específica del antígeno hacia el TAA. Es más, además de inducir una respuesta inmunitaria específica hacia el TAA, la célula tumoral proporciona
45 antígenos adicionales que también contribuyen al desarrollo de una potente respuesta inmunitaria antitumoral de calidad superior a la de los métodos disponibles actualmente.

En otras realizaciones, las células tumorales para la inmunización directa de pacientes pueden ser células tumorales muertas que expresan una proteína de fusión de la invención. Las células tumorales pueden convertirse en células
50 muertas por diversos medios, tales como la irradiación o como se ha indicado anteriormente. Se puede confirmar que las células tumorales están muertas mediante la incorporación de yoduro de propidio, ensayo de TUNEL, Anexina-V y 7-Aminoactinomicina D (7AAD) o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Las células tumorales también pueden ser necróticas.

55 De acuerdo con la presente invención, se pueden aislar precursores de CD humanos (es decir, monocitos circulantes), preferentemente, obtenido del paciente portador del tumor que se vaya a tratar (es decir, células autólogas), y diferenciarse durante la noche *ex vivo* en CD usando un protocolo bien definido que implique el cultivo en las citocinas IL-4 y GM-CSF [(Gilliet, M. F. y F. O. *Nestle Methods in Mol Med* 2001, 10.1385/1-59259-150-7:297; Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. (1994). *J. Exp. Med.* 179,1109-1118; Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. y Schuler, G. (1994) *J. Exp. Med*
60 180, 83-93). Posteriormente, la CD se puede pulsar durante, por ejemplo, 6 horas con extractos de células tumorales (por ejemplo, células tumorales irradiadas con γ) que haya sido previamente diseñadas por ingeniería genética para expresar el ligando de TLR5 y/o Ipaf y/o Naip5 flagelina fusionado a un antígeno de elección asociado al tumor (se evaluarán diferentes estrategias: transferencia de genes basada en retrovirus, transferencia o transfección de genes
65 adenovíricos). También es posible pulsar las CD con suspensiones tumorales completas que hayan sido o no irradiadas o inducidas a volverse apoptóticas o necróticas. Opcionalmente, se añade IFN- γ u otra citocina

inflamatoria tal como TNF- α , o anticuerpos contra la molécula coestimuladora CD40 (anti-CD40), al cultivo para aumentar la maduración (por ejemplo, regulación positiva de moléculas coestimuladoras) de CD antes de la inyección.

5 Las CD "cargadas" de la proteína de fusión de flagelina y TAA (es decir, CD que tienen células tumorales o extracto de células tumorales interiorizadas) pueden inyectarse en el paciente a través de diferentes vías, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea o directamente en el ganglio linfático que drena el tumor. La presente invención contempla cualquier vía de inyección adecuada. La inyección directa en un ganglio linfático que drena el tumor puede garantizar la proximidad de la CD a los linfocitos T para inducir una respuesta inmunitaria dirigida por linfocitos T específicos del antígeno. El número de CD cargadas que se inyectarán inyectar, así como la frecuencia de inyección, se pueden determinar experimentalmente. Los criterios clínicos para evaluar la eficacia de las inmunoterapias están bien definidos, en particular, para los tumores sólidos (J. D. Wolchok, A. Hoos, S. O'day, J. S. Weber, O. Hamid, C. Lebbe, M. Maio, M. Binder, O. Bohnsack, G. Nichol, R. Humphrey, F. S. Hodi. *Clinical Cancer Research*, 2009 vol. 15 (23) pág. 7412-7420). Por lo tanto, la eficacia de las terapias basadas en CD de la invención puede seguir estos criterios.

Una ventaja de la presente invención es que las composiciones para su uso en los presentes métodos pueden adaptarse específicamente a un paciente. Por ejemplo, en una realización específica, las células tumorales para preparar una composición de la invención pueden obtenerse del mismo paciente a quien se va a administrar la composición (es decir, las células tumorales pueden ser autólogas a las células del paciente). Se prefieren las células tumorales autólogas, ya que expresan los mismos antígenos expresados por las células tumorales del paciente y, por lo tanto, ayudarán a impulsar una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz dirigida contra el tumor del paciente, permitiendo la generación de respuesta inmunitaria contra antígenos adicionales (además del TAA). Sin embargo, también se pueden usar células tumorales no autólogas, ya que están diseñadas para expresar una proteína de fusión que contenga el TAA, donde el TAA es expresado preferentemente por las células tumorales del paciente.

De forma similar, las CD pueden ser células autólogas. Esto se prefiere, dado que las CD propias (*self DCs*) no estimularán una respuesta aloinmunitaria y, por lo tanto, evitarán ser eliminadas por el sistema inmunitario del hospedador antes de inducir la respuesta inmunitaria antitumoral.

Composiciones y usos

En una realización específica de la invención, una composición comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende un ligando de TLR y un ligando de NLR y un TAA. En una realización preferida, una composición de la invención comprende una CD, donde la CD ha interiorizado una célula tumoral que expresa una proteína de fusión que comprende un ligando de TLR y un ligando de NLR y un antígeno asociado al tumor (TAA). En otras palabras, la CD está "cargada" con una célula tumoral que expresa la proteína de fusión. Opcionalmente, la CD cargada ha sido tratada con IFN- γ antes de la administración al paciente. Además, la célula tumoral con la que se carga la CD puede irradiarse letalmente y/o ser apoptótica o necrótica. En algunas realizaciones, la CD se carga con extractos de una célula tumoral que expresa una proteína de fusión de la invención.

Las composiciones y los usos de la presente invención son útiles para la inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral y para los cánceres. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más concretos de cánceres incluyen: cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón (incluyendo el cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o estomacal (incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático), glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello. Un cáncer incluye células malignas primarias (por ejemplo, aquellas que no han migrado a sitios del cuerpo del sujeto que no sean el sitio de la neoplasia maligna original) y células malignas secundarias (por ejemplo, las que surgen de metástasis, la migración de células malignas a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

Composiciones farmacéuticas y administración

Si bien es posible usar una composición proporcionada por la presente invención para terapia como tal, puede ser preferible administrarla en una formulación farmacéutica, por ejemplo, en mezcla con un excipiente, diluyente o portador farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y a la práctica farmacéutica convencional. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una composición o formulación farmacéutica que comprende al menos una composición de la invención, o un derivado farmacéuticamente aceptable de la misma, en asociación con un excipiente, diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable. El excipiente, diluyente y/o portador debe ser "aceptable" en el sentido de ser

compatible con el resto de ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor de la misma.

Las composiciones de la invención pueden formularse para la administración de cualquier manera conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria.

5

Portador farmacéutico

El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua o las soluciones salinas acuosas y las soluciones de dextrosa y glicerol acuosas se emplean preferentemente como portadores, particularmente para soluciones inyectables. Como alternativa, el portador puede ser un portador de forma de dosificación sólida, incluyendo, pero sin limitación, uno o más de entre un aglutinante (para píldoras comprimidas), un deslizante, un agente encapsulante, un saborizante y un colorante. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042).

10

15

Vacunas

El término "vacuna" se refiere a una composición que puede usarse para generar inmunidad protectora en un receptor. Cabe señalar que para ser eficaz, una vacuna de la invención puede generar inmunidad en una parte de la población inmunizada, ya que algunas personas pueden no generar una respuesta inmunitaria potente o protectora, o, en algunos casos, no pueden generar respuesta inmunitaria alguna. Esta incapacidad puede proceder del origen genético del individuo o deberse a un estado de inmunodeficiencia (ya sea adquirida o congénita) o inmunosupresión (por ejemplo, debido al tratamiento con quimioterapia o al uso de fármacos inmunosupresores). La eficacia de la vacuna se puede establecer en modelos animales.

20

25

Formulaciones

Las composiciones y formulaciones de la presente invención pueden comprender diluyentes farmacéuticamente aceptables, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores. Dichas composiciones incluyen diluyentes de diversos contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias de carga (por ejemplo, lactosa, manitol); la incorporación del material en preparados en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o en liposomas. También se puede usar ácido hialurónico. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18ª Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435 1712.

35

40

45

Los preparados de acuerdo con la presente invención para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes o vehículos no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como el aceite de oliva y el aceite de maíz, gelatina y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Dichas formas de dosificación también pueden contener agentes adyuvantes, conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de bacterias, incorporando agentes esterilizantes a las composiciones, mediante la irradiación de las composiciones o el calentamiento de las composiciones. También se pueden fabricar usando agua estéril o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes de su uso.

50

Administración y dosis

Las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas o de vacuna) y las formulaciones de la presente invención pueden administrarse por vía parenteral, por inhalación o por otros métodos adecuados conocidos en la técnica. El término "parenteral" incluye inyección (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, epidural, intratecal, intramuscular, intraluminal, intratraqueal o subcutánea). También se contemplan inyecciones directamente en el sitio primario del tumor. Las vías de administración preferidas son la inyección subcutánea e intravenosa y directa en un ganglio linfático que drena el tumor.

55

60

Las composiciones y formulaciones de la presente invención pueden administrarse a un animal, Preferentemente, a un mamífero, y lo más preferentemente, a un ser humano.

65

La dosificación de las composiciones o formulaciones de la presente invención variará ampliamente, dependiendo de la naturaleza de la enfermedad, del historial médico del paciente, de la edad, del peso corporal, del sexo, de la sensibilidad, de la frecuencia de administración, de la forma y vía de administración, de la eliminación del agente del hospedador, del período de dosificación, de los fármacos usados en combinación, y similares. La dosis inicial puede ser mayor, seguida de dosis de mantenimiento menores.

Para cualquier composición o formulación usada en los métodos de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de modelos animales. Las curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas animales se usan luego para determinar las dosis de prueba para los estudios clínicos iniciales en seres humanos.

5 En las determinaciones de seguridad para cada composición, la dosis y la frecuencia de administración deben cumplir o superar las previstas para su uso en los estudios clínicos.

Los datos obtenidos de los estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosis para uso en seres humanos. Las dosis terapéuticamente eficaces en seres humanos se encuentran preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Idealmente, se debe usar una sola dosis de cada fármaco diariamente.

10

Las composiciones de la invención normalmente contendrán una cantidad eficaz de las composiciones para lograr el efecto deseado. La expresión "cantidad/dosis terapéuticamente eficaz" se usa indistintamente con las expresiones "cantidad/dosis inmunogénicamente eficaz" y "cantidad/dosis eficaz", y se refiere a una cantidad de la sustancia que es suficiente para lograr el efecto deseado. Una cantidad inmunogénicamente eficaz de una célula tumoral que expresa flagelina y TAA de la invención es una cantidad de la célula que es suficiente para la inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral. Una cantidad eficaz de una composición (por ejemplo, vacuna) para la inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral es una cantidad de la composición suficiente para aliviar o eliminar los síntomas del tumor, para ralentizar el progreso del tumor, para eliminar o reducir el tamaño del tumor, o para prevenir el desarrollo de un tumor y metástasis. La cantidad eficaz variará con factores tales como la naturaleza de la sustancia, la vía de administración, la formulación que comprende la sustancia y el tamaño, la especie y el estado de salud del receptor de la sustancia. Los métodos para determinar la cantidad eficaz son conocidos en la técnica.

15

20

La administración de las composiciones o formulaciones de la invención puede ser una vez al día, dos veces al día, o más a menudo, pero la frecuencia puede disminuir durante una fase de mantenimiento de la enfermedad o trastorno, por ejemplo, una vez cada dos o tres días en lugar de cada día o dos veces al día. La dosis y la frecuencia de administración dependerán de los signos clínicos, que confirman el mantenimiento de la fase de remisión, con la reducción o ausencia de al menos uno o más, preferentemente más de un signo clínico de la fase aguda conocida por el experto en la materia. Más generalmente, la dosis y la frecuencia dependerán en parte de la recesión de los signos patológicos, y de los síntomas clínicos y subclínicos de una enfermedad, afección o trastorno contemplado para el tratamiento con los presentes compuestos.

25

30

La dosis y los tiempos de dosificación apropiados en ciertas condiciones pueden determinarse mediante la prueba basada en los índices descritos anteriormente, pero pueden perfeccionarse y finalmente decidirse de acuerdo con el criterio del profesional y las circunstancias de cada paciente (edad, estado general, gravedad de los síntomas, sexo, etc.) según técnicas clínicas convencionales.

35

Teniendo en cuenta la descripción anterior, las dosis típicas de CD en una composición de la invención varían de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 10×10^7 células. Sin embargo, se pueden usar más o menos CD.

40

Teniendo en cuenta la descripción anterior, las dosis típicas de células tumorales en una composición de la invención varían de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 10×10^7 células. Sin embargo, también se pueden usar más o menos células tumorales con resultados similares.

45

En determinadas realizaciones, la presente invención contempla terapias combinadas. Por ejemplo, además del tratamiento con una composición de la presente invención, un sujeto o paciente que tenga un tumor (tal como un tumor maligno) también puede ser sometido simultánea, inmediatamente antes o inmediatamente después, a otra medida terapéutica, tal como, por ejemplo, radioterapia, quimioterapia o cirugía. Otra combinación posible es administrar una composición de la presente invención en combinación con un anticuerpo anti-CD25 humanizado (Daclizumab) que agote los linfocitos T reguladores. Se ha demostrado que los linfocitos T reguladores aumentan en número en la sangre periférica, así como en los tumores de pacientes con cáncer, y pueden suprimir las funciones de los linfocitos T efectores antitumorales CD4 y CD8. Existen muchos otros tipos de terapias con anticuerpos monoclonales que podrían usarse en combinación (véase, Dougan, M. y Dranoff, G. *Ann Rev Immunol* 2009, 27:4.1). Estas terapias incluyen anticuerpos contra EGFR (cetuximab y panitumumab), la proteína relacionada HER2/neu (trastuzumab), VEGF (Bevacizumab) o anticuerpos dirigidos contra proteínas de superficie que se expresan a un alto nivel en las células tumorales, tales como rituximab, alemtuzumab, gentuzumab, etc. Además, otros ligandos de TLR como diversos derivados de CpG o agonistas de TLR7/TLR8 tales como Imiquimod, pueden administrarse simultáneamente dentro de la formulación para mejorar la adyuvancia de los preparados.

50

55

60

De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante, inmunología, biología celular y otras técnicas relacionadas pertenecientes a la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N. Y.; Sambrook *et al.*, (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N. Y.; Ausubel *et al.*, eds. (2005) "Current

65

Protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Bonifacino *et al.*, eds. (2005) "Current Protocols in Cell Biology". John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Coligan *et al.*, eds. (2005) "Current Protocols in Immunology", John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Coico *et al.*, eds. (2005) "Current Protocols in Microbiology", John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Coligan *et al.*, eds. (2005) "Current Protocols in Protein Science", John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Enna *et al.*, eds. (2005) "Current Protocols in Pharmacology", John Wiley and Sons, Inc.: Hoboken, N. J.; Hames *et al.*, eds. (1999) "Protein Expression: A Practical Approach". Oxford University Press: Oxford; Freshney (2000) "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique". 4^a ed. Wiley-Liss; entre otros. Los protocolos actuales enumerados anteriormente se actualizan varias veces al año.

10 Ejemplos

La presente invención se describe más adelante en ejemplos de trabajo que están destinados a describir mejor la invención.

15 EJEMPLO 1:

Las células tumorales que expresan un ligando de TLR5/lpaf/Naip5 no lograron formar un tumor *in vivo*

20 Se inyectaron por vía subcutánea células de timoma EL4 diseñadas mediante ingeniería genética para expresar una construcción de ovoalbúmina (OVA) o una proteína de fusión de OVA y flagelina de *S. typhimurium* (STFOVA) mediante transducción retroviral con pMIG-IRES-GFP en el costado de ratones C57BL/6 singénicos de la misma edad y sexo (Fig. 1A) o MyD88^{-/-} (Fig. 1B) en presencia o no de flagelina recombinante (RecFLA, InvivoGen, San Diego, CA) (solo para el tipo silvestre). Se controló la progresión del tumor mediante una medición quincenal del volumen tumoral.

25 Los datos muestran que las líneas celulares tumorales murinas EL4 (línea celular de timoma) modificadas para expresar una proteína de fusión de flagelina y OVA no lograron establecer tumores mientras que las células EL4 que expresaban OVA crecieron con normalidad (Fig. 1A). Curiosamente, la inyección concomitante de flagelina recombinante (RecFLA) no previno el crecimiento de EL4-OVA *in vivo*, lo que demuestra que la introducción de flagelina en los tumores es fundamental para el rechazo tumoral. Se obtuvieron resultados similares usando células de melanoma B16 que expresaban Eα como antígeno asociado al tumor (Fig. 9). La señalización de TLR5 depende completamente de la proteína adaptadora MyD88. De hecho, EL4-STFOVA trasplantado en ratones Myd88^{-/-} se desarrolló con éxito en tumores palpables (Fig. 1B). Debido a que no se observó diferencia *in vitro* entre la proliferación de células modificadas con TLR y las células de control, se concluyó que el sistema inmunitario era responsable de la eliminación eficaz de los tumores modificados con el ligando de TLR *in vivo*.

35 EJEMPLO 2:

La inmunidad antitumoral inducida por flagelina requiere linfocitos.

40 Se inyectaron por vía subcutánea 1 x 10⁵ células EL4 que expresaban construcciones de OVA en el costado de ratones de control Rag^{-/-} o de tipo silvestre. Se monitoreó la progresión del tumor mediante una medición quincenal del volumen tumoral.

45 Se evaluó el papel del sistema inmunitario adaptativo en el rechazo de EL4-STFOVA cuando se trasplanta por vía subcutánea. Ratones Rag^{-/-}, que carecen de linfocitos T y B, inyectados con células EL4-STFOVA, permitieron la progresión tumoral mientras que los ratones de control de tipo silvestre (wt) rechazaron eficazmente el tumor de flagelina⁺ (Fig. 2). Estos resultados, junto con el hecho de que las células EL4-STFOVA pudieron formar tumores en ratones con depleción de CD CD11c⁺, sugirieron que el sistema inmunitario innato podría iniciar eficazmente una respuesta inmunitaria adaptativa específica del TAA cuando las células tumorales se interiorizaran junto con un ligando de TLR en el mismo fagosoma.

50 EJEMPLO 3:

Las células tumorales que expresan un ligando de TLR5/lpaf/Naip5 son dirigidas eficazmente por el sistema inmunitario innato

55 Se inyectaron a ratones singénicos de tipo silvestre (wt) por vía intraperitoneal 3 x 10⁶ células EL4 que expresan OVA o STFOVA. En la Figura 3A, los gráficos de puntos de citometría de flujo muestran células peritoneales sometidas a inmunotinción a las 16 horas para F4/80, CD11b (los anticuerpos son de eBioscience, San Diego, CA). Las células tumorales eran células GFP⁺ CD45⁺. Las inyecciones de PBS sirvieron como control negativo. En la Figura 3B, el número de células absoluto de los macrófagos que contienen células tumorales medido por las células GFP⁺ F4/80⁺ en la cavidad peritoneal 16 h después de la inyección de las células tumorales.

65 Mediante la inyección de células tumorales que expresan STFOVA en la cavidad peritoneal, un sitio donde se detecta una gran cantidad de células inmunitarias innatas (por ejemplo, macrófagos CD11b⁺ F4/80⁺), se evaluó el

papel del sistema inmunitario innato en respuesta a una célula tumoral portadora de ligando de TLR5/Ipaf/Naip5. La importancia de los fagocitos fue revelada por el uso de clodronato/liposoma (la fundación 'Clodronate Liposomes', Países Bajos), un reactivo que permite el depleción específica de estas células. En ausencia de macrófagos, se detectaron células que expresan STFOVA en el peritoneo de ratones tratados con clodronato/liposomas, mientras que se eliminaron de manera eficaz en ratones de control. De acuerdo con este hallazgo, se encontró un mayor número de macrófagos (células F4/80⁺) que habían engullido las células tumorales en la cavidad peritoneal de los ratones wt cuando las células tumorales expresaban la flagelina (Figura 3B).

EJEMPLO 4:

La flagelina induce la sensibilización *in vivo* de linfocitos T CD4⁺ específicos del antígeno asociado al tumor.

Para probar si la flagelina induce la sensibilización *in vivo* de los linfocitos T CD4⁺ específicos del antígeno asociado al tumor directamente, se controló la proliferación de linfocitos T CD4⁺ OT-II sin succinimidil-éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) en los ganglios linfáticos que drenan el tumor cinco días después de la inyección subcutánea de células EL4-STFOVA se monitoreó (Fig. 4).

Se investigó si la presencia de la flagelina ligando de TLR5 dentro de los tumores que expresan OVA podría inducir linfocitos T CD4⁺ OT-II específicos de OVA *in vivo*. Se encontró que la expresión de flagelina dentro de las células tumorales potenciaba enormemente la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ específicos del TAA *in vivo* (Fig. 4). Este hallazgo coincide con las observaciones previas que demuestran que los ligandos de TLR mejoran la presentación de antígenos fagocitados dentro de moléculas de histocompatibilidad principal de clase II MHC de clase II [Blander, J. M. y Medzhitov, R., *Nature* (2006), Vol. 440, pág. 808]. Estos datos también demuestran que, a diferencia de las células tumorales EL4-OVA, las células tumorales EL4-STFOVA son capaces de generar una respuesta de linfocitos T CD4 antitumoral auxiliar.

EJEMPLO 5:

La flagelina induce la sensibilización cruzada *in vivo* de linfocitos T CD8⁺ específicos del antígeno asociado al tumor

Para probar si la flagelina induce la sensibilización cruzada *in vivo* de los linfocitos T CD8⁺ específicos del antígeno asociado al tumor directamente, se controló la proliferación de linfocitos T CD8⁺ OT-I con succinimidil-éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE)⁺ en los ganglios linfáticos que drenaban el tumor tres días después de la inyección subcutánea de células EL4-STFOVA. Se indujo una proliferación masiva de linfocitos T OT-1 en respuesta a células tumorales que expresaban EL4-STFOVA, pero no en células tumorales que expresaban OVA (EL4-OVA) o en flagelina recombinante EL4-OVA⁺ (RecFLA), mostrando que la presencia de proteína de fusión revistiendo físicamente el ligando de TLR y el antígeno dentro de las células tumorales facilitó la presentación cruzada del TAA (Fig. 5A). Además, la secreción de interferón- γ y granzima B por los linfocitos T CD8⁺ específicos del TAA se mejoró en respuesta a las células tumorales que expresaban STFOVA en comparación con los otros grupos (Fig. 5B). También se obtuvieron resultados similares *in vitro*. Además, se observó un papel crucial para las CD en la activación de los linfocitos T CD8⁺, porque el depleción de las CD CD11c⁺ de los ratones portadores de tumores deterioró la capacidad de proliferación de los linfocitos T CD8⁺ (Fig. 5C).

Tomados en conjunto, los resultados de los Ejemplos 4 y 5 muestran que la fagocitosis de las células tumorales que expresan la proteína de fusión flagelina⁺ por parte de las CD solo condujo a una mejor activación de los linfocitos T CD8⁺, pero también proporcionó una señal fundamental para la activación de los linfocitos T CD4⁺. Curiosamente, este efecto no se observó cuando se inyectó la flagelina recombinante (no como una proteína de fusión) junto con las células EL4-OVA (Fig. 4) apoyando la noción de que la proteína de fusión que contiene el ligando para TLR5/Ipaf/Naip5 debería ser expresada por las células tumorales a fin de inducir una fuerte activación del sistema inmunitario adaptativo.

EJEMPLO 6:

Las células tumorales que expresan un ligando de TLR5/Ipaf/Naip5 inducen una respuesta antitumoral de memoria

Para probar si la inyección de células tumorales flagelina⁺ que expresan la proteína de fusión STFOVA podría conferir inmunidad protectora antitumoral específica del antígeno, se vacunaron ratones de tipo silvestre en el costado con las composiciones indicadas (PBS (control), 100.000 células tumorales EL4-OVA irradiadas con γ , células tumorales EL4-STFOVA irradiadas con γ , células tumorales EL4-OVA irradiadas con γ + 2 ng de RecFLA, o células EL4-STFOVA vivas). 30 días después de la vacunación, los ratones se expusieron a 50.000 células EL4-OVA vivas en el costado opuesto ("vivas" significa células tumorales no irradiadas), y se midió la progresión tumoral como se ha descrito anteriormente. Los ratones tratados con células tumorales que expresaban la proteína de fusión de flagelina irradiadas o vivas (EL4-STFOVA o EL4-STFOVA (vivas), respectivamente) se protegieron de una exposición posterior con EL4-OVA. Solo el veinte por ciento de los ratones "vacunados" con EL4-STFOVA irradiadas

y ninguno de los ratones tratados con EL4-STFOVA vivas desarrollaron un tumor cuando fueron expuestos a EL4-OVA en comparación con el ochenta por ciento de los grupos de control (vacunados con PBS o EL4-OVA) (Figura 6A).

5 Notablemente, esta estrategia fue más eficaz que la inyección de células tumorales junto con flagelina recombinante (RecFLA) (Figura 6A), demostrando nuevamente la eficacia superior de unir el ligando de TLR/NLR con los antígenos (por ejemplo, antígenos asociados a tumores) frente a la administración conjunta (es decir, no unidos físicamente, pero administrados al mismo tiempo o casi al mismo tiempo). Además, se pudo observar una población endógena de linfocitos T CD4⁺ específicos del antígeno asociado al tumor mediante citometría de flujo en ratones
10 vacunados con EL4-STFOVA irradiadas (Figura 6B). Curiosamente, esta población no se detectó en ratones vacunados con EL4-OVA irradiadas junto con RecFLA, subrayando importancia de la presencia de las construcciones de proteína de fusión de flagelina y TAA en las células tumorales para una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz específica de un TAA.

15 EJEMPLO 7:

El dominio de activación de NLR de la flagelina se requiere para su potencial antitumoral *in vivo*

Se inyectaron diferentes líneas celulares EL4-STFOVA portadoras de mutaciones en restos clave dentro de flagelina para el reconocimiento por TLR5, Ipaf y Naip5 por vía subcutánea en ratones singéicos. Como era de esperar, la mutación de Isoleucina 411 a Alanina (STFOVA-ΔTLR5) (Fig. 7A) restableció la capacidad de las células flagelina⁺ (que expresan proteínas de fusión) para formar tumores, demostrando la necesidad de la señalización de TLR5 en la inmunidad antitumoral mediada por la flagelina (Fig. 7B). La mutación única de Leucina L470 (STFOVA-ΔNaip5 A) o la mutación doble de Leucina 472/leucina 473 (STFOVA-ΔNaip5 B) (Fig. 7A), que se ha demostrado que anula la activación de Naip5 [Lightfield, K. L. *et al.*, "Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin". *Nat Immunol* 9 (10), 1171 (2008).], También permitió el crecimiento de EL4 flagelina⁺ *in vivo*. El crecimiento de las células tumorales flagelina⁺ (que expresaban la proteína de fusión) fue similar al de las células de control cuando la flagelina fue mutada tanto en Leucina 470 como en Isoleucina 411 (STFOVA-2Δ) para prevenir la activación de TLR5 y Naip5, respectivamente (Fig. 7B). Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que el efecto antitumoral de la proteína de fusión de flagelina no solo se basa en la activación de TLR5, sino que también requiere el reconocimiento de NLR (es decir, Ipaf y Naip5). Tomados en conjunto, estos resultados demostraron que el efecto antitumoral de la flagelina no solo depende de la activación de TLR5, sino que también requiere el reconocimiento de NLR (es decir, Naip5 e Ipaf). De hecho, la incapacidad de la flagelina mutada para activar los NLR impidió la sensibilización cruzada de los linfocitos T CD8⁺ específicos del TAA como se representa en la Fig. 7C que muestra que la activación de NLR mediada por flagelina es importante para una respuesta inmunitaria antitumoral eficaz.

EJEMPLO 8:

Las células tumorales que expresan un ligando de TLR5/Ipaf/Naip5 inducen la activación de las células dendríticas.

Los estudios *in vitro* que usan células dendríticas (CD) aisladas de ratones de tipo silvestre (wt) muestran que la fagocitosis de las células tumorales apoptóticas que expresan la proteína de fusión de flagelina inducen la maduración de las CD medida por citometría de flujo usando un anticuerpo específico para el marcador de activación CD40 (Fig. 8A). Además, las CD que tienen células tumorales apoptóticas que expresan STFOVA fagocitadas produjeron la citocina inflamatoria IL-12 de una manera dependiente de Myd88 (Fig. 8B) confirmando que las CD se activan adecuadamente después de la fagocitosis de las células tumorales que contienen el ligando de TLR5/Ipaf/Naip5.

50 EJEMPLO 9

Las células de melanoma que expresan un ligando de TLR5/Ipaf/Naip5 no lograron la metástasis *in vivo*

55 Las células de timoma EL4 expresan la molécula MHC de clase I y, por tanto, pueden ser la diana de los linfocitos T CD8⁺. Para demostrar que las células tumorales que expresan un bajo nivel de moléculas MHC también pueden rechazarse *in vivo*, se generaron líneas celulares de melanoma B16 que expresaban el antígeno Eα (la cadena α de la molécula MHC de clase II I-E, que no se expresa en los ratones C57BL/6) fusionado o no con la flagelina. Se inyectaron 100.000 células solas o en combinación con 2 ng de RecFla (solo para B16-Eα; Invivogen, San Diego, CA) en la vena de la cola de ratones receptores C57BL/6 de tipo silvestre (wt). 28 días después, se aislaron los pulmones, y se observaron y numeraron las metástasis bajo un microscopio de tejido. Como se muestra en la Fig. 9, B16-STF.Eα no pudo formar metástasis en el pulmón. Además, la administración conjunta de RecFLA con células B16-Eα no perjudicó al desarrollo tumoral. Tomados en conjunto, estos resultados muestran que las células tumorales que expresan un bajo nivel de moléculas MHC también se erradicaron de manera eficaz cuando se expresaban una proteína de fusión de flagelina y antígeno.

EJEMPLO 10**La inmunización con células dendríticas cargadas con células tumorales diseñadas mediante ingeniería genética para expresar un TLR5/Ipaf/Naip5 induce una respuesta inmunitaria antitumoral superior.**

5 Son varios los ensayos clínicos para la inmunoterapia antitumoral que se basan en el uso de células dendríticas (CD) cargadas con extractos de células tumorales. En el presente ejemplo, se aíslan precursores de CD humanos (es decir, monocitos circulantes) de pacientes con tumores, y se diferencian durante la noche en CD usando un
10 protocolo bien definido que implica el cultivo en las citocinas IL-4 y GM-CSF. [Gilliet, M. F. y F. O. *Nestle Methods in Mol Med* 2001, 10.1385/1-59259-150-7:297; Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. (1994). *J. Exp. Med.* 179,1109-1118; Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. y Schuler, G. (1994) *J. Exp. Med* 180, 83- 93]. Posteriormente, se pulsan las CD durante 6 horas con extractos de células tumorales (por ejemplo, células tumorales irradiadas con γ) que se han diseñado
15 previamente mediante ingeniería genética para expresar el ligando flagelina de TLR5/Ipaf/Naip5 fusionada con un antígeno asociado a un tumor (por ejemplo, MUC1). Opcionalmente, se añade IFN- γ al cultivo para aumentar la maduración de la CD antes de la inyección en el paciente. Se inyecta la CD cargada de tumor que expresa la proteína de fusión de flagelina y TAA en el paciente por vía intravenosa o directamente en los ganglios linfáticos que drenan el tumor para garantizar la proximidad de la CD a los linfocitos T en los ganglios linfáticos que drenan el tumor. Varios ensayos clínicos evalúan el número de CD cargadas que se deben inyectar, así como la frecuencia de
20 inyección. Sin embargo, el número adecuado de CD puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 1×10^6 a 10×10^7 células. Los criterios clínicos para evaluar la eficacia de las inmunoterapias están bien definidos, en particular, para los tumores sólidos (J. D. Wolchok, A. Hoos, S. O'day, J. S. Weber, O. Hamid, C. Lebbe, M. Maio, M. Binder, O. Bohnsack, G. Nichol, R. Humphrey, F. S. Hodi. *Clinical Cancer Research*, 2009 vol. 15 (23) pág. 7412-7420). La evaluación de la eficacia de esta terapia basada en las CD puede seguir estos criterios.

25

Además, debe entenderse que todos los valores son aproximados y que se proporcionan con fines descriptivos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una célula dendrítica (CD), donde dicha CD ha interiorizado una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión:
- 5 una flagelina o un fragmento de la misma y un antígeno asociado al tumor (TAA), donde la flagelina o el fragmento de la misma es un ligando de uno o más de entre receptor 5 de tipo Toll (TLR5), Naip5 o Ipaf.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1 para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero, donde el método comprende administrar a dicho mamífero que lo necesita una cantidad inmunogénicamente eficaz de dicha composición
- 15 o para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un paciente, donde el método comprende administrar a dicho paciente que necesita dicho tratamiento dicha composición en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria antitumoral.
- 20 3. Una composición que comprende una célula tumoral que expresa una proteína de fusión, donde dicha proteína de fusión comprende:
- 25 una flagelina o un fragmento de la misma y un antígeno asociado al tumor (TAA), donde la flagelina o el fragmento de la misma es capaz de unirse a uno o más de entre el receptor 5 de tipo Toll (TLR5), Naip5 o Ipaf, en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria antitumoral para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero, donde el método comprende administrar a dicho mamífero que lo necesita una cantidad inmunogénicamente eficaz de dicha composición
- 30 o para su uso en un método de tratamiento de un cáncer en un paciente, donde el método comprende administrar a dicho paciente que necesita dicho tratamiento dicha composición en una cantidad eficaz para generar una respuesta inmunitaria antitumoral.
- 35 4. La composición de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde dicha célula tumoral ha sido transfectada con un vector que expresa dicha proteína de fusión.
- 40 5. La composición de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha CD es una célula autóloga, o donde dicha célula tumoral es una célula autóloga.
- 45 6. La composición de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha célula tumoral se irradia letalmente antes de ser interiorizada por dicha CD.
- 50 7. La composición de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicha CD ha fagocitado a dicha célula tumoral.
- 55 8. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria antitumoral en un mamífero, donde el método comprende administrar a dicho mamífero que lo necesita una cantidad inmunogénicamente eficaz de dicha composición y donde dicha respuesta inmunitaria antitumoral comprende una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T CD4 o CD8.
- 60 9. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, donde dicho mamífero o dicho paciente es un ser humano.
- 65 10. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, donde dicha célula tumoral se irradia letalmente.
11. La composición de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde la flagelina comprende una secuencia de aminoácidos esencialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20, o un fragmento de la misma.
12. La composición de la reivindicación 1 o la composición para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde el fragmento de flagelina comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32.

Figura 1A

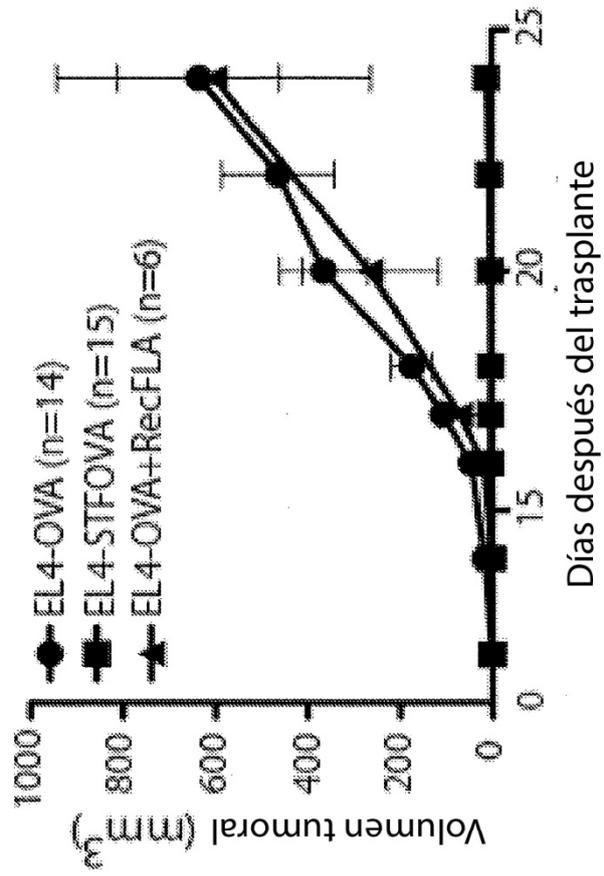


Figura 1B

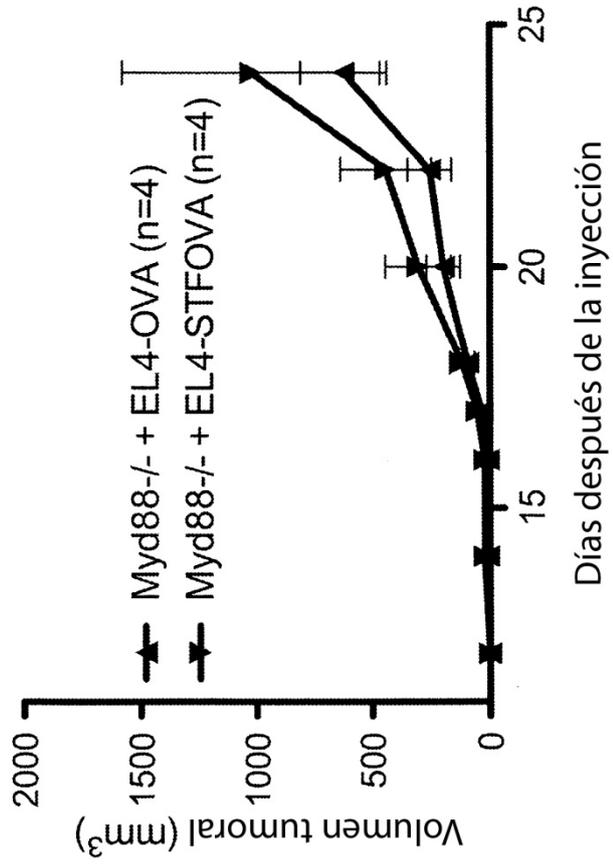


Figura 2

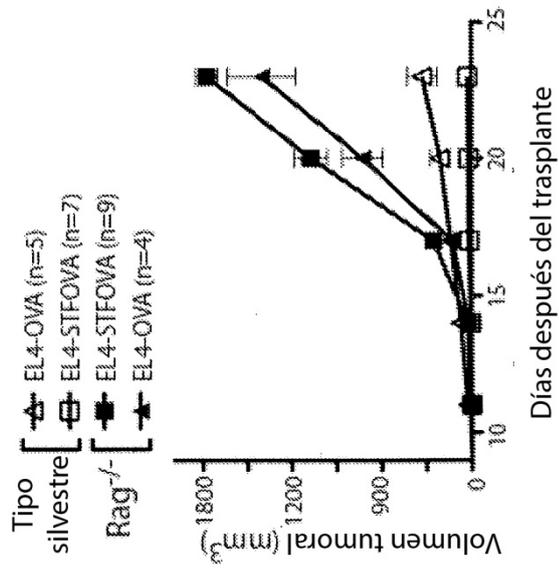


Figura 3A

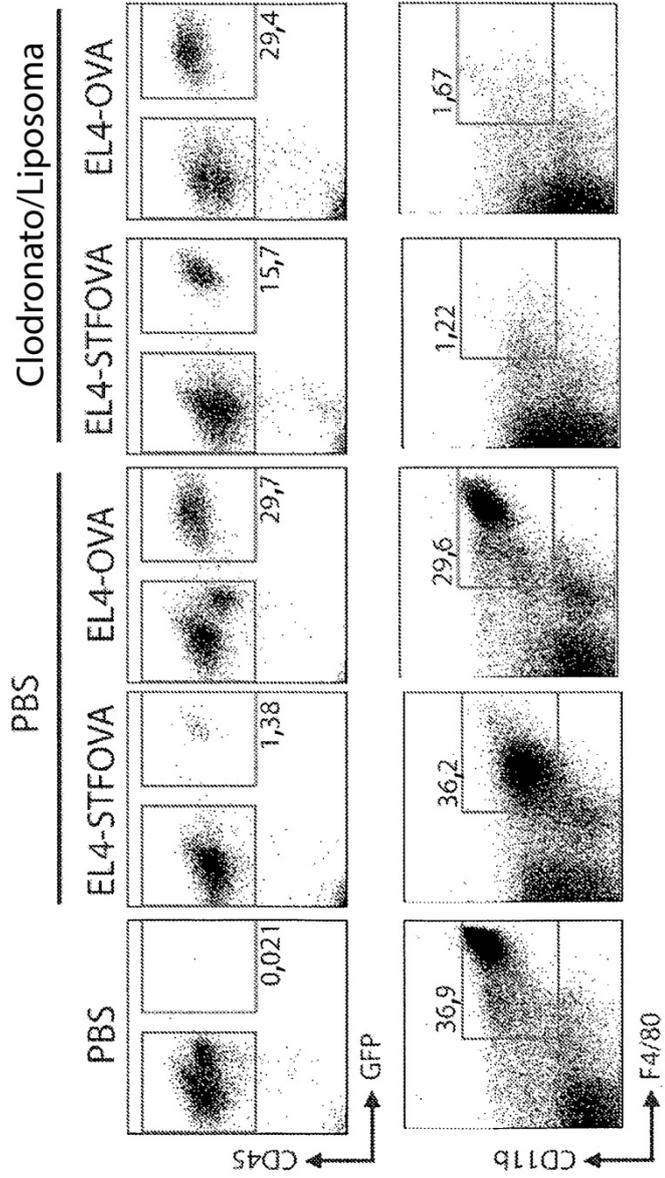


Figura 3B

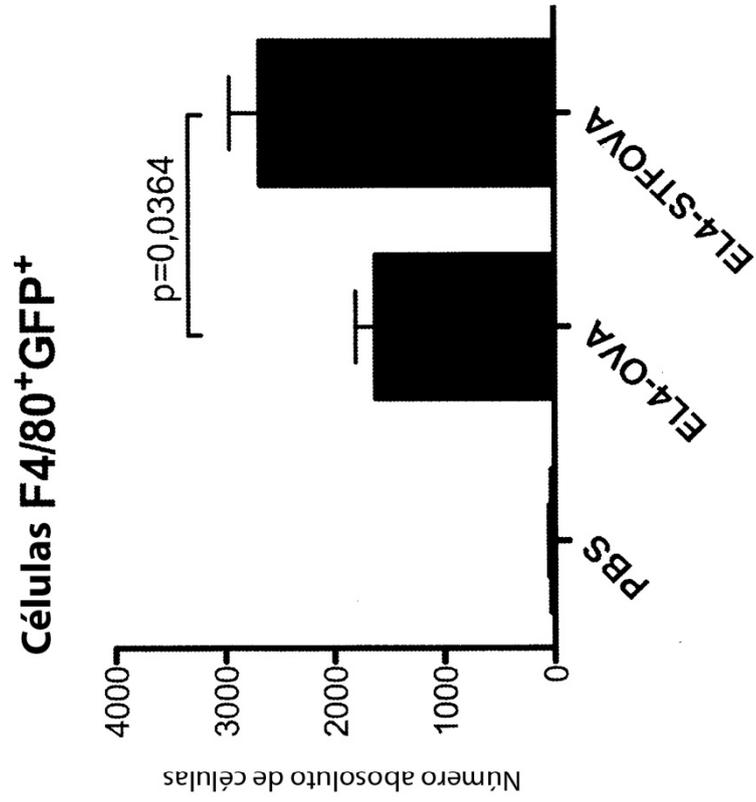


Figura 4

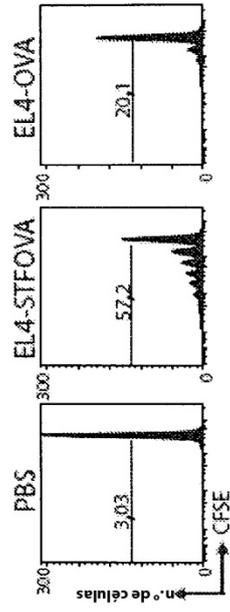


Figura 5A

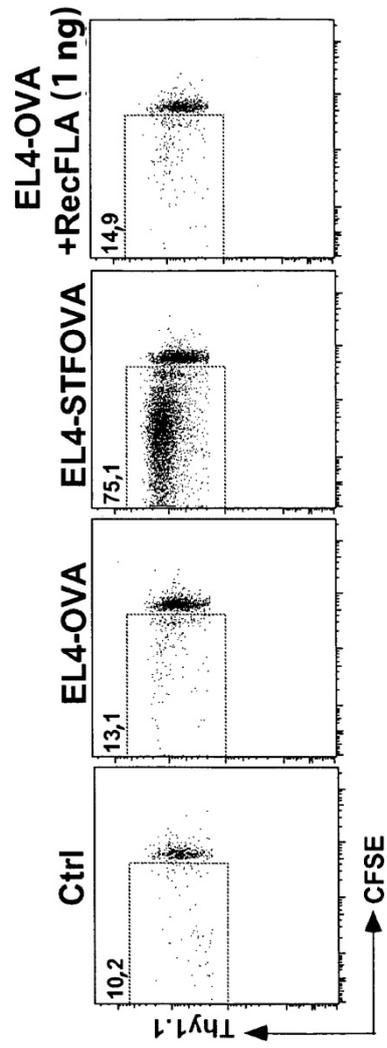


Figura 5B

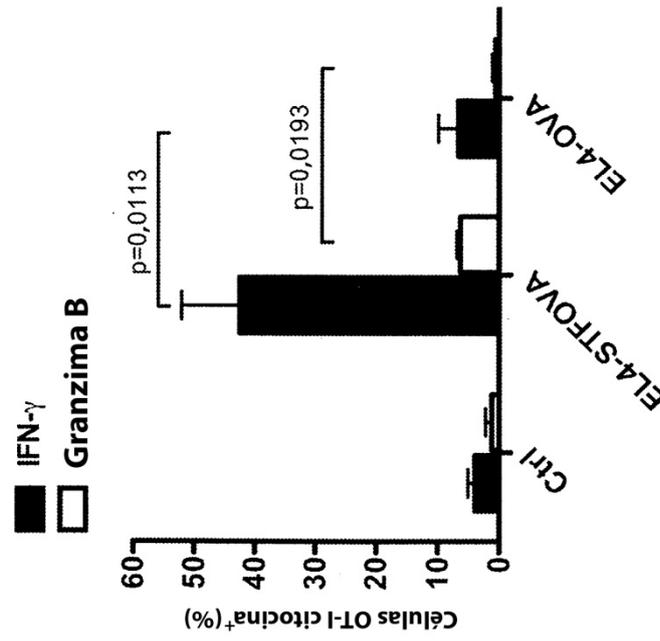


Figura 5C

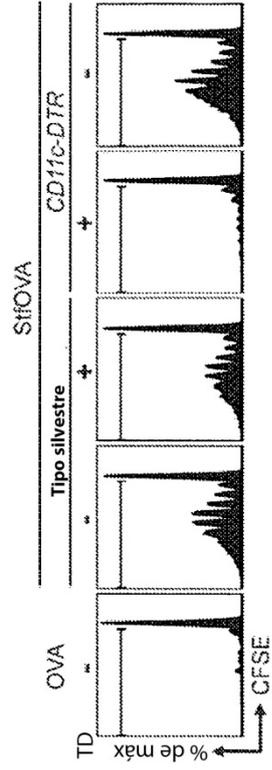


Figura 6A

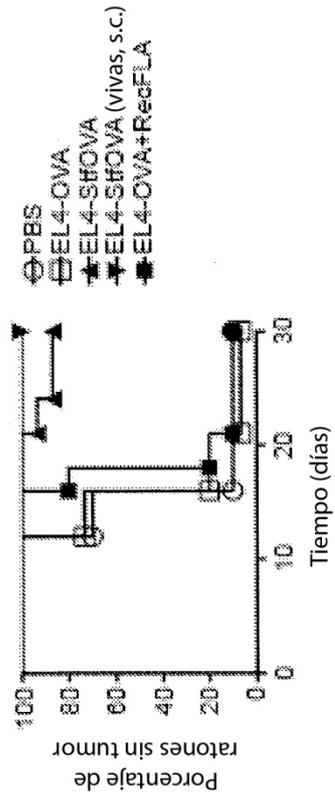


Figura 6B

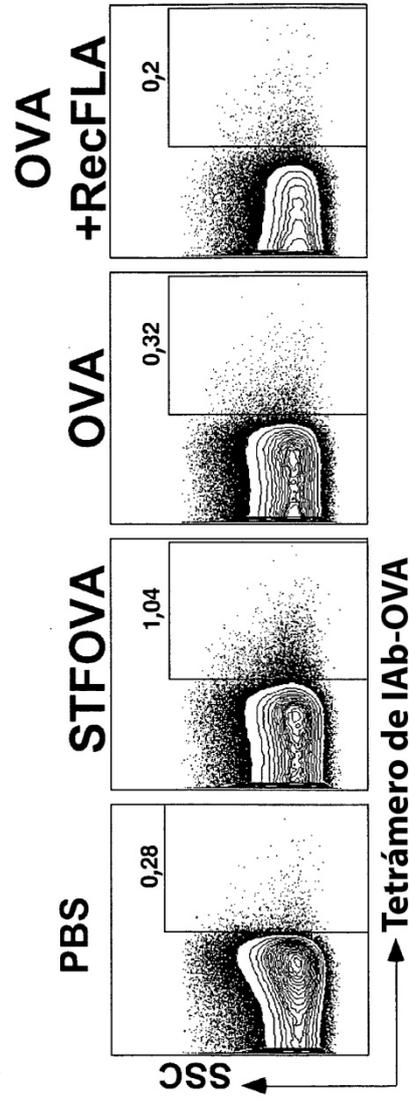


Figura 7A

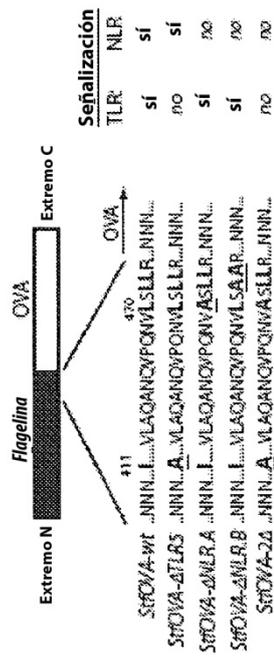


Figura 7B

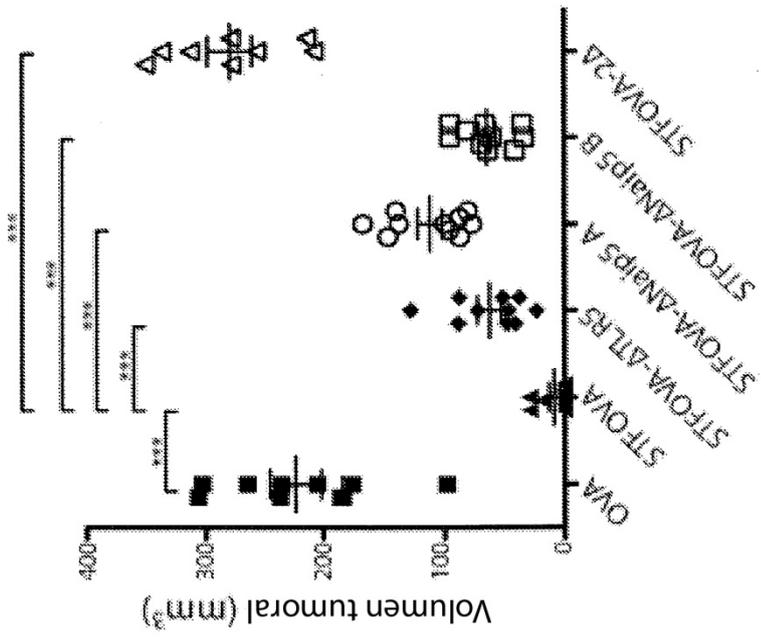


Figura 7C

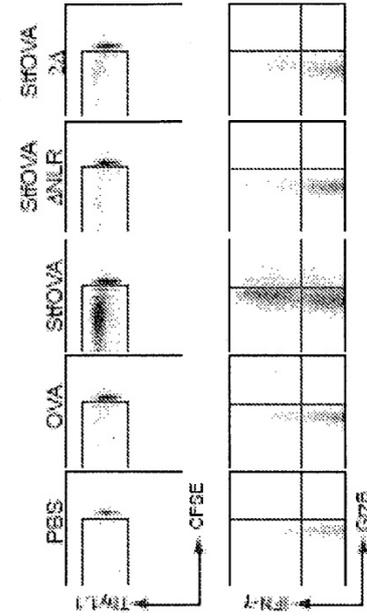
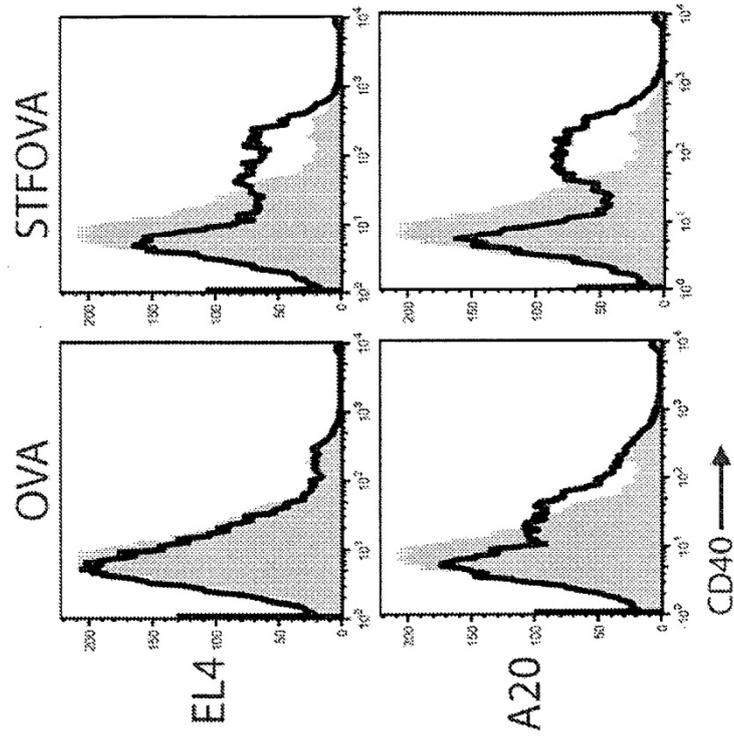


Figura 8A



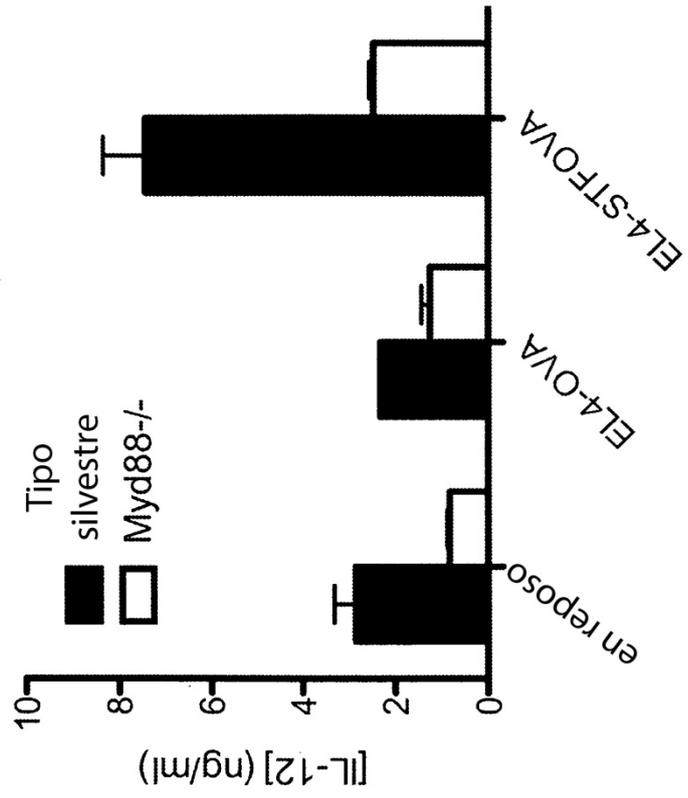


Figura 8B

Figura 9

