

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 212**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2017 PCT/IT2017/000223**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2018 WO18069947**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2017 E 17826320 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3389701**

54 Título: **Secuencia de nucleótidos que expresa una proteína de anclaje al exosoma para usar como vacuna**

30 Prioridad:

11.10.2016 IT 201600101794

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

03.03.2021

73 Titular/es:

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' (100.0%)
Viale Regina Elena 299
00161 Roma (RM), IT**

72 Inventor/es:

FEDERICO, MAURIZIO PAOLO MARIA

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 809 212 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

Secuencia de nucleótidos que expresa una proteína de anclaje al exosoma para usar como vacuna

- 5 La presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica una proteína de anclaje al exosoma para usar como vacuna. En particular, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica una proteína de fusión, dicha proteína de fusión que comprende o que consiste en una proteína de anclaje al exosoma fusionada en su terminal C con un antígeno, o un vector de expresión de ADN que comprende dicho polinucleótido, para usar como vacuna.
- 10 Se sabe que la respuesta inmune protege de las amenazas a la salud tanto externas como internas. En muchos casos, cuando la inmunidad natural no puede contener el desarrollo de la patología, la respuesta inmune provocada por la inoculación de inmunógenos puede bloquear el proceso patológico, como ocurre, por ejemplo, mediante la inducción de anticuerpos neutralizantes contra varios patógenos infecciosos.
- 15 De manera diferente, la identificación, producción y comercialización de vacunas basadas en CTL está mucho más restringida, aunque existe un amplio consenso sobre su potencial utilidad contra el desarrollo de infecciones crónicas y enfermedades tumorales.
- 20 Se espera que provocar una respuesta inmune de CTL fuerte y amplia sea de importancia terapéutica para el tratamiento de varias patologías. Por ejemplo, varias líneas de evidencia sugieren que las respuestas inmunes mediadas por células son importantes para controlar la infección por HPV y, en consecuencia, la neoplasia asociada al virus. De hecho, la inmunosupresión general o la respuesta deficiente de CTL anti-HPV se asocian con la persistencia viral y la progresión de la enfermedad.
- 25 Las técnicas experimentales más comúnmente utilizadas para la inducción de inmunidad de CTL específica de antígeno se basan en el uso de vectores virales, péptidos y patógenos inactivados. Hasta la fecha, sin embargo, no hay ningún medicamento inmunogénico de CTL disponible en el mercado.
- 30 La vacunación con ADN para la producción de proteínas inmunogénicas reconoció éxitos. Por ejemplo, una vacuna de ADN contra la encefalitis japonesa se lanzó en 2010 para uso humano (1). Además, se aprobó una vacuna veterinaria de ADN para proteger a los caballos del virus del Nilo Occidental (2, 3). Además, se informó que un estudio preliminar en la vacunación con ADN contra la esclerosis múltiple fue efectivo (4). En conjunto, estas evidencias respaldan la idea de que, en principio, la vacunación con ADN puede tener una perspectiva de aplicabilidad en humanos. Entre las ventajas de la vacunación con ADN, se debe mencionar la facilidad de desarrollo y producción, la estabilidad durante el almacenamiento, la rentabilidad y la persistencia del inmunógeno. Las desventajas teóricas estarían representadas por la posible producción de anticuerpos anti-ADN y la interferencia en los mecanismos de crecimiento celular controlados genéticamente. Sin embargo, la principal limitación está representada por la potencia inadecuada de la respuesta inmune evocada. Por esta razón, muchos protocolos de vacunación, incluido el uso de ADN para cebar la respuesta inmune, son seguidos por la inoculación del inmunógeno bajo formulaciones alternativas para reforzar la inmunidad.
- 35 40
- 45 Los exosomas son vesículas de 50-100 nanómetros liberadas constitutivamente por todos los tipos de células. Se generan por la invaginación interna de las membranas endosómicas. Estas vesículas intraluminales forman los cuerpos multivesiculares (MVB) que pueden transitar a la membrana plasmática, a la cual se fusionan liberando así sus contenidos vesiculares en el medio extracelular. Las nanovesículas que muestran características físicas y bioquímicas que se asemejan a los exosomas pero generadas a través de la extrusión directa de la membrana plasmática se han descrito en las células musculares (5, 6). Mientras que anteriormente se pensaba que los exosomas se dedicaban exclusivamente a la secreción de material celular de desecho, ahora se acepta que los exosomas son parte de la red de comunicación intercelular. Incorporan ARN mensajeros, microARN, ADN y proteínas que pueden ser funcionales en las células objetivo.
- 50
- 55 Su inmunogenicidad es básicamente una consecuencia de las cantidades y la calidad de los antígenos que incorporan. Los exosomas se investigaron en términos de agentes inmunoestimulantes antitumorales y, en algunos casos, alcanzaron la aprobación para ensayos clínicos (7-9). Se ha encontrado que los exosomas que cargan espontáneamente antígenos tumorales, principalmente proteínas de transmembrana como gp100, TRP-1, Her2/neu y CEA, inducen la activación de inmunidad específica de células T antitumorales (10, 11). Los ensayos clínicos demostraron tanto la viabilidad como la buena tolerancia de los exosomas como vacunas libres de material celular en pacientes con tumores. Sin embargo, su eficacia terapéutica parecía bastante limitada, lo que plantea la necesidad de nuevos métodos para aumentar su inmunogenicidad. Este problema ha sido enfrentado por la modificación de antígenos foráneos para aumentar su visualización en la membrana del exosoma. En este sentido, se han descrito dos estrategias hasta ahora. La primera explota la unión de los dominios C1C2 de lactadherina a los lípidos del exosoma, lo que resulta en la asociación del antígeno heterólogo con el lado externo de las membranas del exosoma. La otra se basa en recubrir exosomas con enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* con un dominio transmembrana altamente hidrófobo.
- 60 65

La gemación del VIH requiere la interacción con una serie de factores celulares que también participan en la biogénesis del exosoma, es decir, Alix, Tsg101 y varios otros componentes del complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT). Además, las membranas de la envoltura del VIH y los exosomas comparten muchos componentes, incluidas las balsas lipídicas, es decir, microdominios de la membrana celular enriquecidos en colesterol, fosfolípidos con cadenas laterales saturadas y esfingolípidos. La convergencia de la biogénesis del exosoma y el VIH implica la posibilidad de que los productos virales se incorporen en los exosomas. Es el caso de Nef del VIH-1 que se asocia mediante el anclaje de su miristoilación del terminal N a microdominios de balsas lipídicas en la membrana limitante de MVB. Nef es una proteína de 27 kilodaltons (kDa) que carece de actividad enzimática, sin embargo, actúa como un elemento de andamio/adaptador para desencadenar la activación de las moléculas de transducción de señales, en la mayoría de los casos tras la asociación con microdominios de balsas lipídicas.

Un mutante de Nef ^{V153^LE177^G} que se incorpora a niveles bastante altos en partículas de VIH-1, partículas tipo virus (VLP) basadas en VIH-1 (12) y exosomas (13) han sido previamente identificados. La eficiencia de la incorporación de exosomas todavía aumenta cuando este mutante se modificó con una palmitoilación del terminal N a través de la mutación ^{G3C}, como consecuencia esperada de una asociación mejorada con balsas lipídicas. Este mutante de Nef (denominado Nef^{mut}) es defectuoso para básicamente todas las funciones de Nef, y su eficacia de incorporación en nanovesículas no cambia significativamente cuando se fusiona en su terminal C con las proteínas foráneas. La manipulación de Nef^{mut} permite la incorporación de altas cantidades de antígenos de elección en los exosomas que, por lo tanto, permanecen protegidos de los factores externos de neutralización/degradación. Recientemente se informó que los exosomas modificados de Nef^{mut} producidos *in vitro* inducen una respuesta efectiva de CTL específica de antígeno (14). En particular, ya se han obtenido resultados bastante prometedores utilizando exosomas producidos *in vitro* que portan la proteína HPV-E7 como inmunógeno (14).

Sin embargo, en vista de una posible aplicación clínica de estos hallazgos, esta estrategia enfrentaría posibles dificultades técnicas que incluyen la estandarización de la fabricación industrial, la alta rentabilidad y el almacenamiento del inmunógeno. Además, se espera que los exosomas producidos *in vitro* tengan una semivida limitada tras la inyección, siendo también propensos a la eliminación del sistema retículo-endotelial del huésped a través del reconocimiento de las moléculas "no propias" asociadas a la membrana del exosoma. Sobre este tema, se ha documentado que la vida media de exosomas *ex vivo* aislados o producidos *in vitro* dura aproximadamente 2 minutos después de la inyección, mostrando una rápida acumulación en el hígado y el bazo, y solo pequeñas cantidades de exosomas permanecen detectables después de 4 horas.

Por lo tanto, a la luz de lo anterior, es evidente la necesidad de proporcionar nuevas inmunoterapias capaces de superar las desventajas de las terapias conocidas.

La presente invención proporciona un polinucleótido que codifica una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión o que consiste en la proteína de anclaje al exosoma de la secuencia SEQ ID NO: 1 fusionada en su terminal C con un antígeno, o un vector de expresión de ADN que comprende dicho polinucleótido, para uso en vacunación preventiva o terapéutica, en la que la SEQ ID NO: 1 es la siguiente secuencia:

```

MGCKWSKSSV VGWPAVRERM RRAEPAADGV GAASRDLEKH
GAITSSNTAA TNADCAWLEA QEEEEVGFVP TPQVPLRPMT
YKAAVDLSHF LKEKGGLEGL IHSQRRQDIL DLWIYHTQGY
FPDWQNYPTG PGIRYPLTFG WCYKLVPEP EKLEEANKGE
NTSLLHPVSL HGMDDPGREV LEWRFDSRLA FHHVARELHP
EYFKNC
    
```

en la que dicho vector de expresión del polinucleótido o ADN se administra por administración intramuscular.

El antígeno se puede elegir del grupo que consiste en el antígeno del virus del papiloma humano tal como E6 y E7, el antígeno del VIH tal como Gag y Tat, el antígeno del virus del Ébola tal como VP24, VP40, NP y GP, el antígeno del virus del Nilo Occidental tal como como NS3, antígeno de HBV tal como Core, antígeno del HCV tal como Core, NS3, E1 y E2, antígeno del virus de Crimea-Congo tal como GP y NP, antígeno del virus de la influenza A tal como NP y M1, antígeno de melanoma humano tal como MAGE-A3 y MART-1, antígenos asociados a tumores humanos tales como Her2/Neu, Hox B7.

El polinucleótido que codifica la proteína de anclaje al exosoma de la secuencia SEQ ID NO: 1 puede ser de la siguiente secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2 (secuencia de nucleótidos Nef^{mut}):

atg ggt tgc aag tgg tca aaa agt agt gtg gtt gga tgg cct gct gta agg gaa aga
atg aga cga gct gag cca gca gca gat ggg gtg gga gca gca tct cga gac cta
gaa aaa cat gga gca atc aca agt agc aat aca gca gct acc aat gct gat tgt
gcc tgg cta gaa gca caa gag gag gag gag gtg ggt ttt cca gtc aca cct cag
gta cct tta aga cca atg act tac aag gca gct gta gat ctt agc cac ttt tta aaa
gaa aag ggg gga ctg gaa ggg cta att cac tcc caa cga aga caa gat atc ctt
gat ctg tgg atc tac cac aca caa ggc tac ttc cct gat tgg cag aac tac aca cca
gga cca ggg gtt aga tat cca ctg acc ttt gga tgg tgc tac aag cta gta cca gtt
gag cca gag aag tta gaa gaa gcc aac aaa gga gag aac acc agc ttg tta cac
cct gtg agc ctg cat gga atg gat gac ccg gcg aga gaa gtg tta gag tgg agg ttt
gac agc cgc cta gca ttt cat cac gtg gcc cga gag ctg cat ccg gag tac ttc aag
aac tgc tga

5 El vector de expresión de polinucleótidos o ADN para usar de acuerdo con la presente invención puede usarse para la prevención y el tratamiento de enfermedades elegidas del grupo que consiste en enfermedades infecciosas crónicas tales como HBV, HCV y VIH, tuberculosis y malaria, enfermedades infecciosas agudas tales como las enfermedades de la influenza, virus del Nilo Occidental, fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y virus del Ébola, tumores tales como tumor de mama, pulmonar, próstata o vejiga.

10 El vector de expresión de polinucleótidos o ADN puede estar asociado con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, tales como un adyuvante de respuesta de células T CD8⁺ (por ejemplo, adyuvante Iscomatrix^{MR}).

15 En este contexto técnico, la presente invención proporciona una nueva estrategia de vacuna basada en la producción de exosomas endógenos modificados que puede superar las desventajas de las estrategias terapéuticas conocidas que inducen la respuesta inmune de CTL para el tratamiento de enfermedades infecciosas y tumorales.

20 De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que la administración de vectores de ADN que expresan proteínas de fusión basadas en Nef^{mut} en el animal huésped mediante inoculación intramuscular (i.m.) provoca una potente respuesta inmune de CTL que inhibe fuertemente el crecimiento de células tumorales ya implantadas. Varias líneas de evidencia indican que la producción de exosomas endógenos modificados se basó en el efecto antitumoral observado.

25 En particular, los resultados de acuerdo con la presente invención muestran: i) la capacidad de las células musculares para producir exosomas modificados después de la transfección de ADN; ii) la inducción reproducible de inmunidad de CTL específica de antígeno después de la inoculación de un vector que expresa Nef^{mut}/E7 que muestra un fuerte efecto antitumoral en un entorno terapéutico, y iii) la inmunogenicidad de exosomas aislados del plasma de ratones inoculados con ADN reinfundidos en ratones receptores.

30 Además, se ha investigado si y con qué eficacia la expresión ectópica de Nef^{mut} conduce a la liberación de exosomas modificados. Los datos obtenidos con células C₂C₁₂ respaldaron la idea de que Nef^{mut} se acumula en nanovesículas similares a exosomas liberadas por las células musculares murinas a niveles similares a los detectables en las células humanas. Las investigaciones no incluyeron células musculares diferenciadas terminalmente, es decir, el tipo de célula probablemente dirigido por inoculación i.m. en ratones. Se ha asumido que en estas células los mecanismos subyacentes al tráfico intracelular de vesículas no cambian, al menos cualitativamente.

35 A este respecto, la detección de exosomas modificados en plasma de ratones inoculados i.m. con vectores de ADN basados en Nef^{mut} respaldaron la idea de que Nef^{mut} también puede acumularse en exosomas liberados por células musculares diferenciadas. Teóricamente, no se puede excluir que al menos parte del ADN inyectado podría apuntar a otros tipos de células por medio, por ejemplo, de la difusión del ADN en los ganglios linfáticos drenantes en los que puede ser capturado e internalizado por las células dendríticas (DC). Sin embargo, es plausible que la absorción de ADN por parte de las DC no fuera parte relevante del mecanismo de los eventos de activación de células T CD8⁺ descritos en el presente documento, considerando que la inoculación subcutánea del ADN que expresa Nef^{mut}/E7, que se espera que se dirija preferiblemente a DC, dio lugar a una respuesta inmune de células T CD8⁺ específicas de E7 significativamente más débil (no mostrada).

45

Las extensiones de activación de células T CD8⁺ detectadas en ratones inoculados con ADN parecían mucho más fuertes que las que se han observado en ratones inyectados con exosomas modificados producidos *in vitro* (14). Aunque los experimentos comparativos directos no pueden realizarse en vista de la imposibilidad de comparar las cantidades de los dos inmunógenos diferentes, la inoculación de ADN provocó una activación de células T CD8⁺ específica de E7 lo suficientemente fuerte como para ser detectada claramente sin la estimulación/expansión *in vitro* de los esplenocitos necesaria cuando los ratones fueron inoculados con exosomas producidos *in vitro* por células humanas (14). Los resultados aparentemente superiores obtenidos con la inyección de ADN probablemente fueron la consecuencia del hecho de que las células que expresan el ADN inoculado pueden establecer una fuente continua de exosomas inmunogénicos listos para ser internalizados tanto por APC locales como distales.

De acuerdo con la presente invención, se han proporcionado varias pruebas experimentales con respecto al mecanismo subyacente a la respuesta inmune de CTL observada después de la inyección de ADN. En particular, la detección de exosomas fluorescentes en plasma de ratones inoculados con un vector que expresa GFP fusionado con Nef^{mut} demostró que los exosomas modificados se produjeron realmente tras la inyección del vector de ADN. Además, las actividades de Nef^{mut} distintas de su acumulación en exosomas no parecían importantes para la activación de las células T CD8⁺ ya que se detectó en ratones inyectados con el vector que expresa Nef^{mut} pero no con Nef de tipo silvestre. Consistentemente, se ha observado que la respuesta de CTL no se basó en la liberación de antígenos libres de las células dirigidas al ADN, como lo indica la falta de respuesta de células T CD8⁺ específicas de E7 en ratones inyectados con vectores que expresan E7 en los que el desprendimiento extracelular de E7 fue presenciado por la respuesta del anticuerpo anti-E7. Además, se ha demostrado que los exosomas aislados del plasma de ratones inyectados con el vector que expresa Nef^{mut}/E7, pero no E7 solo, eran inmunogénicos cuando se inyectaban en ratones receptores no modificados.

En conjunto, estas evidencias experimentales fueron consistentes con la idea de que la producción de exosomas inmunogénicos modificados en forma endógena se basó en la activación de las células T CD8⁺. En particular, esta respuesta inmune apareció de forma tanto lo suficientemente rápida como fuerte para contrarrestar eficientemente el crecimiento de células tumorales singénicas implantadas antes de las inmunizaciones.

Con base en las evidencias experimentales presentadas en el presente documento, el mecanismo más probable que subyace a la activación de las células T CD8⁺ inducida por la inoculación de vectores de ADN que expresan vectores basados en Nef^{mut} se puede resumir como se informa en la Figura 1. Las células musculares que expresan el vector de ADN inyectado liberan los exosomas modificados que son internalizados por las APC. Como se demostró anteriormente, la internalización de los exosomas basados en Nef^{mut} conduce a la presentación cruzada de los antígenos asociados y, en consecuencia, al cebado de las células T CD8⁺ específicas de antígeno. El refuerzo de la respuesta inmune asegurada por la segunda inyección de ADN se vería fortalecida por la producción continua de exosomas a partir de células dirigidas por el ADN inoculado. De acuerdo con lo que se observó previamente en ratones inoculados con exosomas producidos *in vitro* (14), no se detectaron anticuerpos anti-E7 ni anti-Nef en plasma de ratones inoculados, lo que sugiere fuertemente que los antígenos cargados con exosomas básicamente provocan una respuesta inmune sesgada por TH-1.

Finalmente, en vista de una posible aplicación de estos hallazgos al cáncer de mama humano, también se investigaron los siguientes aspectos: i) si el estímulo inmunogénico inducido por los exosomas modificados puede romper la tolerancia inmune, y ii) su efectividad cuando se aplica en un sistema humano. En particular, para probar si la activación inmune inducida por exosomas modificados *in vivo* puede ser lo suficientemente fuerte como para romper la tolerancia, se ha considerado el modelo ampliamente investigado de ratones transgénicos HER2/neu (15). En el presente documento, el transgén rHER2/neu se expresa en el timo, lo que conduce a una tolerancia que afecta gravemente la rama T CD8⁺, como lo demuestra el hecho de que los linfocitos T CD8⁺ que escapan de la tolerancia están muy poco representados (16). A través del ensayo Elispot para IFN- γ , se evaluó de forma reproducible que dos inyecciones de vector de ADN que expresa Nef^{mut} fusionado con el dominio extracelular de HER2 (ECD de HER2) fueran suficientes para romper la tolerancia de T CD8⁺ hacia HER2/neu. Estos resultados fueron relevantes ya que nunca se encontró una respuesta significativa de CTL específica de HER2/neu en estos ratones transgénicos tras la inyección de vectores de ADN que expresan HER2/neu (17-19).

Curiosamente, se descubrió que esta activación inmune se correlacionaba con un retraso en el desarrollo del tumor. Esta es la primera vez que se observa una inhibición del desarrollo tumoral relacionada con CTL pero independiente de anticuerpos en ratones transgénicos HER2/neu. Por otro lado, el hecho de que la presión inmunológica generada por la respuesta inmune de CTL específica de ECD de HER2 no fuera suficiente para curar la enfermedad tumoral no fue sorprendente por al menos dos razones. Primero, en ratones transgénicos HER2/neu todas las células epiteliales mamarias expresan simultáneamente el oncogén, lo que resulta en un desarrollo sincrónico de múltiples lesiones neoplásicas. Por lo tanto, la inmunidad antitumoral puede verse abrumada por la multiplicidad de eventos de transformación. Además, la inestabilidad genética intrínseca de las células tumorales puede conducir a escapar de la presión inmune a través del llamado mecanismo de edición inmune resumido por las tres "E", es decir, eliminación, equilibrio y escape (20). De esta manera, la respuesta inmune antitumoral selecciona alteraciones en las células cancerosas capaces de evadir el control inmune. Por supuesto, se espera que la efectividad de dicho mecanismo aumente con el número de lesiones tumorales concurrentes.

Para abrir la posibilidad de explotar la herramienta de la presente invención en clínica, también se demostró su eficacia en el sistema humano. Con este fin, se establecieron experimentos utilizando condiciones que reproducen el mecanismo subyacente a la inducción de la respuesta inmune de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno descrita previamente en ratones (21). El resultado de un análisis con microscopio confocal fue consistente con la idea de que el producto del vector de ADN transfectado en células musculares primarias humanas puede ser internalizado por DC a través de la formación de exosomas modificados. Además, los datos de los ensayos de cebado cruzado indican que la producción de células musculares transfectadas de exosomas modificados para la incorporación de Nef^{mut} o sus derivados es suficiente para generar una actividad de CTL específica de antígeno bien detectable. El hecho de que el cebado cruzado específico de antígeno se vio gravemente afectado cuando se usaron inhibidores de la biosíntesis de exosomas fue coherente con la idea de que el suministro de exosomas modificados a DC fue una etapa clave para la generación de la activación de CTL específica de antígeno. En general, los resultados obtenidos con células *ex vivo* indican la ausencia de restricciones obvias en el uso de la plataforma de vacuna de CTL basada en Nef^{mut} en humanos.

Con base en lo anterior, la plataforma de vacuna de CTL de acuerdo con la presente invención representa una nueva terapia contra tumores sólidos. Romper la tolerancia hacia los autoantígenos asociados a tumores, así como mejorar la respuesta contra los antígenos asociados a tumores, representan la próxima frontera en términos de inmunoterapia antitumoral (22). La plataforma de vacuna de CTL basada en la modificación de exosomas endógenos de acuerdo con la presente invención tiene el potencial de cumplir con ambos puntos finales, por lo que representa un concepto verdaderamente nuevo en términos de inmunización con CTL.

La estrategia en el presente documento propuesta para inducir la inmunidad con CTL basada en exosomas endógenos modificados explota la facilidad de producción, almacenamiento y administración típica de las vacunas de ADN combinadas con la potente inmunogenicidad de los antígenos cargados en exosomas tras la fusión con Nef^{mut} así como su gran flexibilidad intrínseca en términos de la elección del inmunógeno.

Se ha proporcionado un vector de ADN llamado "lanzadera de Nef^{mut}" concebido para insertar y expresar fácilmente las secuencias del antígeno de elección.

Desde el punto de vista estructural, el vector de ADN puede experimentar mejoras tanto en términos de eficiencia transcripcional, por ejemplo, reemplazando el promotor IE del CMV con otros promotores aún más potentes, o insertando secuencias estabilizadoras de la transcripción (por ejemplo, elementos reguladores postranscripcionales del virus de la hepatitis de Woodchuck, WPRE), y reduciendo al mínimo la "proteína de anclaje al exosoma", favoreciendo así la incorporación del antígeno fusionado a ella.

Ya que de acuerdo con la presente invención, los exosomas/nanovesículas se pueden modificar "*in vivo*" para incorporar grandes cantidades de cualquier antígeno, la presente plataforma de biotecnología puede ser de beneficio terapéutico contra cualquier enfermedad susceptible al ataque de CTL específicos.

El uso con fines terapéuticos de vacunación basada en vectores de ADN que expresan productos de fusión con la "proteína de anclaje al exosoma" Nef^{mut} de acuerdo con la presente invención es aplicable a todas las patologías que pueden beneficiarse de una respuesta inmune efectiva de CTL. Claramente, el número y el origen de los antígenos que se pueden modificar pueden expandirse en relación con las estrategias terapéuticas a tratar.

El polinucleótido o el vector de expresión de ADN para usar de acuerdo con la presente invención se puede usar en el campo médico así como en el campo veterinario.

La presente invención se describirá ahora de una manera ilustrativa, pero no limitativa, de acuerdo con realizaciones preferidas de la misma, con referencia particular a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra el esquema del mecanismo subyacente a la activación de CTL inducida por la inoculación de vectores de ADN basados en Nef^{mut}. Después de la inyección con el vector de ADN que expresa un antígeno fusionado a Nef^{mut}, las células musculares transfectadas liberan tanto exosomas modificados como no modificados. Los contenidos de estos últimos, una vez internalizados por APC y presentados de forma cruzada, inducen el cebado/activación de linfocitos T CD8⁺ específicos para los antígenos cargados en exosomas endógenos modificados. La Figura 2 muestra la detección de exosomas modificados en sobrenadantes de células musculares murinas transfectadas. A. Análisis por FACS de células musculares tanto de 293T humanas como de C₂C₁₂ murinas dos días después de la transfección con vectores que expresan Nef^{mut}/GFP o Nef_{G2A}/GFP. M1 marca el intervalo de positividad como se estableció por el análisis de células transfectadas en forma simulada. Se informan los porcentajes de células positivas. B. Cuantificación en términos de actividad de AchE de exosomas recuperados por centrifugación diferencial de sobrenadantes del mismo número (es decir, 5 × 10⁶) de células transfectadas 293T y C₂C₁₂. C. Análisis de transferencia Western de exosomas de células transfectadas 293T y C₂C₁₂. Los productos a base de Nef se detectaron tanto en los lisados celulares como en los exosomas, mientras que la β-actina y Alix sirvieron como marcadores para los lisados celulares y los exosomas, respectivamente. Las flechas muestran los productos proteicos relevantes. Los marcadores moleculares se dan en kDa. D. Análisis por FACS de exosomas de células transfectadas C₂C₁₂. 10 mU de exosomas de células C₂C₁₂ transfectadas con vectores que expresan Nef^{mut}-GFP o Nef_{G2A}-GFP fueron analizados por FACS en términos de dispersión frontal/lateral (paneles superiores) y fluorescencia de GFP (paneles inferiores).

Los cuadrantes indican la dimensión de las partículas detectadas (paneles superiores) o el intervalo de positividad calculado mediante el análisis de exosomas de células transfectadas en forma simulada. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

La Figura 3 muestra la detección de nanovesículas fluorescentes en plasma de ratones inoculados con un vector de ADN que expresa Nef^{mut}-GFP. A. Análisis de la expresión de productos relacionados con GFP en tejidos musculares de ratones inoculados con los vectores de ADN indicados. Amplificación: 40x. B. Se inocularon ratones C57 Bl/6 i.m. con vectores de ADN que expresan los productos indicados, y después de 3 y 9 días se aislaron los exosomas del plasma mediante centrifugación diferencial. Luego, se unieron cantidades equivalentes (es decir, 1 mU) de exosomas a perlas de látex de aléhidro/sulfato blanco sin tensioactivo, y finalmente se analizó su fluorescencia. Como control, se usaron 10 µU de exosomas aislados de los sobrenadantes de células 293T transfectadas en forma transitoria con el vector Nef^{mut}-GFP (Ctrl+). Los cuadrantes se establecieron con base en la fluorescencia de las perlas no tratadas. Se indican los porcentajes de eventos positivos. Los resultados son representativos de dos ensayos.

La Figura 4 muestra la inoculación del vector de ADN Nef^{mut}/E7 que induce una respuesta inmune de células T CD8⁺ específicas de E7 en ausencia de producción de anticuerpos. Respuesta inmune de células T CD8⁺ en ratones inoculados con vectores de ADN que expresan ya sea E7 o Nef^{mut}/E7, o con un vector vacío. Los ratones C57 Bl/6 (seis por grupo) se inocularon dos veces con los diferentes vectores de ADN. Los esplenocitos recuperados de los ratones se incubaron con o sin 5 µg/mL ya sea de nonámeros específicos no relacionados (no mostrados), E7 o Nef. Las extensiones de activación celular se evaluaron mediante el ensayo Elispot para IFN-γ realizado por triplicado con 10⁵ células/pozo. Como control, las células no tratadas también se incubaron con 5 ng/mL de PMA y 500 ng/mL de ionomicina. Se muestra el número de células formadoras de manchas de IFN-γ (SFU)/10⁵ células de los pozos por triplicado sembradas con esplenocitos de cada ratón inoculado. También se informaron medias intergrupales + DE de SFU. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. * p < 0,05. B. Ensayo de CTL llevado a cabo con células T CD8⁺ de ratones inoculados con los vectores indicados. Las células T CD8⁺ aisladas de esplenocitos de diferentes ratones inoculados se agruparon y cultivaron durante 6 horas con diferentes proporciones de células (es decir, de 20:1 a 5:1) con células EL-4 previamente marcadas con CFSE y pretratadas con péptidos no relacionados o E7 durante 16 horas. Seis horas después, se midieron los niveles de mortalidad de las células EL-4 mediante análisis por FACS tras la marcación con 7-AAD. Se muestran los resultados representativos de cuatro experimentos independientes. C. Detección de anticuerpos anti-E7 en plasma de ratones inoculados con los vectores de ADN indicados. Como estándar de control positivo interno (Ctrl+), se usaron diluciones 1:10.000 de plasma de ratones inyectados con 10 µg de proteínas recombinantes E7 o Nef más adyuvante. Se muestran los valores medios de absorbancia + DE de triplicados de plasma agrupados de seis ratones por grupo.

La Figura 5 muestra que la inyección del vector de ADN que expresa Nef de tipo silvestre no consigue provocar una respuesta inmune de células T CD8⁺ específica de Nef en ratones. Respuesta inmune de células T CD8⁺ específica de Nef en ratones inoculados con vectores de ADN que expresan Nef de tipo silvestre, Nef^{mut}, o con un vector vacío. Se inocularon ratones C57 Bl/6 (cuatro por grupo) i.m. dos veces con los vectores de ADN, y diez días después de la última inmunización, se sacrificaron los ratones y se cultivaron esplenocitos en micropozos Elispot para IFN-γ durante 16 horas en ausencia o en presencia de nonámeros no relacionados o específicos de Nef. Como control, las células no tratadas también se incubaron con 5 ng/mL de PMA y 500 ng/mL de ionomicina. Se muestran la media + DE del número de SFU/10⁵ células. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. * p < 0,05.

La Figura 6 muestra la inmunidad de células T CD8⁺ específica de E7 inducida en ratones inyectados con exosomas de ratones inoculados con el vector de ADN Nef^{mut}/E7. Respuesta inmune de células T CD8⁺ en ratones inoculados con exosomas aislados del plasma de ratones singénicos previamente inyectados con vectores que expresan E7, Nef^{mut}/E7 o un vector vacío. Los ratones C57 Bl/6 (8 por grupo, ratones donantes) se inocularon dos veces con los vectores de ADN indicados, y diez días después de la última inoculación, las PBMC se recuperaron del sangrado retro orbital y se analizaron en el ensayo Elispot para IFN-γ para detectar la presencia de respuesta de células T CD8⁺ específicas para E7 (paneles superiores). Dos días después, se sacrificaron los ratones y se aislaron los exosomas del plasma por centrifugación diferencial. Luego se usaron cantidades equivalentes de estos exosomas para inocular ratones singénicos (3 por grupo) tres veces. Diez días después de la última inoculación, se recuperaron los esplenocitos y se evaluaron las extensiones de activación de células T CD8⁺ mediante el ensayo Elispot para IFN-γ llevado a cabo por triplicado (panel inferior).

En todos los ensayos Elispot para IFN-γ, las células también se incubaron con 5 ng/mL de PMA y 500 ng/mL de ionomicina. Se muestran la media + DE del número de SFU/10⁵ células. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. * p < 0,05.

La Figura 7 muestra el efecto antitumoral terapéutico inducido por inoculación i.m. del vector de ADN Nef^{mut}/E7. Los ratones C57 Bl/6 fueron desafiados con 2 × 10⁵ células TC-1 y 4 días después, cuando las masas tumorales fueron detectables por palpación, se inocularon con el vector de ADN que expresa Nef^{mut}/E7 (siete ratones) o, como control, Nef^{mut}, vector vacío o vehículo (cuatro ratones por grupo). Las inoculaciones de ADN se repitieron el día 11 después de la implantación de las células tumorales, y el crecimiento de la masa tumoral se siguió con el tiempo. A. Respuesta de células T CD8⁺ específica de E7 mediante el ensayo Elispot para IFN-γ en las PBMC recuperadas de sangrado retro orbital 7 días después de la última inmunización, y cultivadas durante 16 horas en presencia de péptidos no relacionados o E7. Como control, las PBMC también se incubaron con 5 ng/mL de PMA y 500 ng/mL de ionomicina. Se muestra el número de SFU/10⁵ células de pozos por triplicado sembradas con esplenocitos de cada ratón inoculado. B. Determinación del tamaño del tumor durante el tiempo de observación de 30 días. C. Medición del peso de los tumores de ratones inyectados con vectores de ADN Nef^{mut} o Nef^{mut}/E7 en el momento del sacrificio.

Se muestran los valores detectados para cada ratón inoculado. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

- La Figura 8 muestra la detección de exosomas modificados con ECD HER2/neu en sobrenadantes de células transfectadas. Análisis de transferencia Western de lisados de células y exosomas de cultivos de células 293T transfectadas con vector que expresa ya sea Nef^{mut}, Nef^{mut}/ECD de HER2, o el vector vacío. Se detectaron productos a base de Nef tanto en células como en exosomas, mientras que la β -actina y Alix sirvieron como marcadores para lisados celulares y exosomas, respectivamente. Las flechas muestran los productos proteicos relevantes. Los marcadores moleculares se dan en kDa. Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes.
- La Figura 9 muestra la detección de anticuerpos anti-HER2/neu en plasma de ratones inoculados. El plasma para ratones inyectados con vectores que expresan ya sea Nef^{mut} o Nef^{mut}/ECD de HER2 se incubaron con células 293T transfectadas dos días antes con un vector que expresa HER2/neu. Después de la incubación con Ab secundarios, las células se fijaron y se analizaron por FACS. Como controles positivos, se utilizaron tanto plasma de ratones inyectados con lisados de células tumorales 676-1-25 que sobreexpresan constitutivamente HER2/neu (células HER2/neu), y un mAb anti-HER2/neu (Ctrl+). Los resultados se presentan como valores medios + DE de las intensidades de fluorescencia medias (MFI) detectadas por FACS usando plasma de cada ratón inyectado, y son representativas de dos ensayos.
- La Figura 10 muestra la detección de inmunidad de células T CD8⁺ específicas de HER2/neu inducida en ratones tras la inyección del vector de ADN que expresa Nef^{mut}/ECD de HER2. Respuesta inmune de células T CD8⁺ en ratones inoculados con vectores de ADN que expresan Nef^{mut} o Nef^{mut}/ECD de HER2, o con vector vacío (vacío). Los ratones 129Sv-Neu T (cinco por grupo) se inocularon i.m. dos veces con los diferentes vectores de ADN. En el momento del sacrificio, se incubaron durante la noche 10⁵ esplenocitos con o sin 5 μ g/mL ya sea de péptidos no relacionados, específicos de Nef o específicos de ECD de HER2 en micropozos Elispot para IFN- γ por duplicado o triplicado. Como control, las células también se incubaron en ausencia de péptidos (nulo). Se muestra la media del número de unidades formadoras de manchas de IFN- γ (SFU)/10⁵ + DE. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. * p < 0,05. En la parte inferior, se muestra una placa Elispot para IFN- γ desarrollada a partir de un ensayo representativo.
- La Figura 11 muestra la detección de la inmunidad de células T CD8⁺ específicas de HER2/neu inducida en parejas de ratones inyectados con ADN con una actividad de CTL específica de antígeno. Ensayo de CTL llevado a cabo con células T CD8⁺ de ratones inoculados con los vectores indicados. Las células T CD8⁺ se aislaron de esplenocitos agrupados, se cultivaron por duplicado durante 6 horas con una proporción de células 10:1 con células TC-1 previamente marcadas con CFSE, y se trataron durante 16 horas con péptidos no relacionados específicos de Nef o específicos de ECD de HER2. Seis horas más tarde, la mortalidad de células TC-1 se calificó mediante análisis por FACS tras marcación con 7-AAD. Se muestran los valores medios + DE calculados a partir de tres experimentos independientes. * p < 0,05. Valor medio de las condiciones de fondo (es decir, cocultivo de linfocitos T CD8⁺ de ratones no modificados con células TC-1 no tratadas): 8,1 \pm 3,5. En la parte inferior, se muestran gráficos de puntos representativos del análisis por FACS de los cocultivos. Se indican los porcentajes de doble fluorescencia sobre el total de células positivas para CFSE.
- La Figura 12 muestra el efecto antitumoral inducido por la inoculación del vector de ADN de Nef^{mut}/ECD de HER2. Los ratones 129Sv-NeuT (5 por grupo) se inocularon dos veces con los vectores de ADN indicados o con el vehículo (nulo) a las 15 y 17 semanas de edad. A. Incidencia tumoral, expresada como el número de ratones con al menos un tumor > 1 mm de diámetro. B. Multiplicidad tumoral, calculada como el número acumulado de tumores/número total de ratones + DE. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.
- La Figura 13 muestra la internalización en iDC de exosomas liberados por las células del músculo esquelético primario humano. A. Análisis por FACS de SKMC 2 días después de la transfección con vectores que expresan GFP, Nef^{mut}/GFP o vector vacío. Se muestran los niveles de fluorescencia de GFP detectados en un representante de cinco experimentos independientes. Se indican los porcentajes de células positivas para GFP. M1: intervalo de positividad. B. Análisis con microscopio confocal de cocultivos que comprenden iDC y SKMC transfectadas con vectores de ADN que expresan GFP o Nef^{mut}/GFP, este último realizado en presencia o no tanto de GW4869 como de espiroepóxido. Los portaobjetos se tiñeron con DAPI (fluorescencia azul) y mAb anti-CD45 (fluorescencia roja) antes del análisis. Para cocultivos que comprenden SKMC transfectadas con Nef^{mut}/GFP, se informan dos secciones del mismo campo, la primera destaca las células positivas para CD45 (panel superior, flechas negras), mientras que en la imagen en la parte inferior, tanto SKMC que expresan tanto Nef^{mut}/GFP (flecha verde-negra) como regiones de acumulación de fluorescencia en iDC (flechas blancas).
- La Figura 14 muestra la actividad de CTL específica de Nef provocada por DC humanas cocultivadas con células musculares que expresan vectores de ADN basados en Nef^{mut}. A. Esquema de los ensayos de cebado cruzado. Las SKMC se transfectaron y, 48 horas después, se pusieron en cocultivo con iDC que, después de 24 horas adicionales, se aislaron y maduraron. Luego se agregaron PBL autólogos a mDC, y el cocultivo se llevó a cabo durante 7 días. Posteriormente, se repitió la estimulación de PBL, y después de 7 días adicionales, los linfocitos T CD8⁺ se aislaron y se analizaron en ensayos de CTL mediante cocultivo con células objetivo singénicas. B. Análisis de transferencia Western de lisados celulares de células MCF-7 parental o transfectadas de manera estable con Nef^{mut}. Los filtros se incubaron con Ab anti-Nef o anti- β -actina. La flecha muestra el producto proteico relevante. Los marcadores moleculares se dan en kDa. C. Ensayo de CTL llevado a cabo mediante el cocultivo de linfocitos T CD8⁺ cebados con células MCF-7 que expresan o no Nef^{mut} en una proporción de células 10:1. Los resultados se presentaron como valores medios + DE calculados a partir de condiciones por triplicado de tres experimentos independientes. * p < 0,05. Valor medio de las condiciones de fondo (es decir, cocultivo de linfocitos T CD8⁺ no modificados con MCF-7): 11,9 \pm 5.
- La Figura 15 muestra que el tratamiento con inhibidores de la síntesis de exosomas bloquea el cebado cruzado inducido por DC aisladas de cocultivos con SKMC transfectadas. Las SKMC se transfectaron con un vector de ADN

que expresaba el producto de fusión Nef^{mut}/MART-1 y, después de 2 días, se cultivaron conjuntamente con iDC en presencia o no de GW4869 y espiroepóxido. Después de 16 horas, las iDC se aislaron, maduraron y se pusieron en cocultivo con PBL autólogos. Después de dos ciclos de estimulación, los linfocitos T CD8⁺ se aislaron y se desafiaron en un ensayo de CTL mediante cocultivos 10:1 con B-LCL singénicos marcados con CFSE previamente tratados con péptidos no relacionados o específicos de MART-1. Se muestran los porcentajes medios de mortalidad células objetivo + DE calculados a partir de condiciones por triplicado de tres experimentos independientes. Valor medio de las condiciones de fondo (es decir, cocultivo de linfocitos T CD8⁺ no modificados con B-LCL singénicos no tratados): 7,3 ± 2,1

10 Ejemplo 1: Estudio de actividad de CTL específica del HPV E7 antitumoral provocada por exosomas modificados *in vivo* producidos por inoculación de ADN

Materiales y métodos

15 Constructos moleculares y cultivos celulares.

Todos los constructos moleculares se basaron en vectores promovidos por IE-CMV. Ya se han descrito los constructos de vectores que expresan Nef^{mut} (13), Nef^{mut}-GFP (13), Nef_{G2A}-GFP (23), Nef de tipo silvestre (24) y HPV-E7 (25). Las células 293T, y tumorales TC-1 que expresan C₂C₁₂ de músculo murino y HPV-E7 se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco más suero de ternera fetal (FCS) al 10% inactivado por calor. Los ensayos de transfección se llevaron a cabo utilizando el método basado en Lipofectamine 2000, que en el caso de las células C₂C₁₂ se modificó mediante la adición de liposomas en células recién tripsinizadas. Tanto los esplenocitos de ratón como las células EL-4, es decir, las células T CD4⁺ de linfoma tímico murino obtenidas originalmente de ratones C57 Bl/6 tras el tratamiento con 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno, se cultivaron en medio RPMI suplementado con FCS al 10%.

25 Aislamiento, detección y caracterización de exosomas.

Los exosomas se aislaron de los sobrenadantes celulares mediante centrifugaciones diferenciales. En detalle, los sobrenadantes se centrifugaron a 500 xg durante 10 min. Luego, los sobrenadantes se sometieron a centrifugaciones diferenciales que consisten en una primera ultracentrifugación a 10.000 xg durante 30 min. Luego se recogieron los sobrenadantes, se filtraron con un tamaño de poro de 0,22 µm y se ultracentrifugaron a 70.000 X g durante 1 hora. Las vesículas sedimentadas se resuspendieron en PBS 1x, y se ultracentrifugaron nuevamente a 70.000 xg durante 1 hora. Posteriormente, los sedimentos se resuspendieron en 1:100 del volumen inicial de PBS 1x. La recuperación de exosomas del plasma de ratones inoculados se realizó de manera similar, excepto que las muestras se diluyeron 5 veces antes de comenzar las centrifugaciones cuyos tiempos de ejecución se duplicaron. Las cantidades de exosomas recuperados se evaluaron midiendo la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE), es decir, un marcador de exosoma clásico, a través del kit Amplex Red (Molecular Probes) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La actividad de AChE se midió como mU/mL, en la que 1 mU se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 pmol de acetilcolina a colina y acetato por minuto a un pH de 8,0 a 37 °C.

Los exosomas fluorescentes de los cultivos celulares transfectados se detectaron directamente por FACS (Gallios, Beckman Coulter) o, en el caso de los exosomas aislados del plasma, se analizaron al unirse con perlas de látex de aldehído/sulfato (Invitrogen Molecular Probes). Para este fin, las muestras se incubaron con 5 µL de perlas durante la noche a temperatura ambiente en una placa giratoria, y luego se lavó, se resuspendió en PBS 1X - formaldehído al 2% v/v, y se analizó por FACS.

Para el análisis de transferencia Western de exosomas, se lisaron cantidades equivalentes de nanovesículas en PBS, Triton X-100 al 1% en presencia de agentes antiproteolíticos, y luego se separaron mediante SDS-PAGE al 10%. Mientras tanto, el análisis de transferencia Western se llevó a cabo también en lisados de células transfectadas lavando las células dos veces con PBS 1x (pH 7,4) y lisándolas durante 20 minutos en hielo con tampón de lisis (HEPES 20 mM pH 7,9, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM, EGTA 2 mM, detergente no iónico al 0,5%, IGEPAL CA-630, suplementado con agentes antiproteolíticos. Los lisados de células enteras se centrifugaron a 6.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó mediante el ensayo de cuantificación de proteínas de Lowry. Alícuotas de 30 a 50 µg de proteínas totales se resolvieron mediante SDS-PAGE al 10%. Las proteínas se transfirieron mediante electrotransferencia en una membrana de nitrocelulosa de con tamaño de poro de 0,45 µm (Amersham) durante la noche utilizando un Trans-Blot Bio-Rad. Se revelaron los filtros utilizando antisuero ARP 444 de oveja anti-Nef diluido 1:1000 (un generoso obsequio de M. Harris, Universidad de Leeds, Leeds, Reino Unido), y ambos mAb AC-74 anti-β actina diluido 1:250 de Sigma, y Ab policlonales anti-Alix H-270 de Santa Cruz.

60 Inmunización de ratones y detección de linfocitos T CD8⁺ productores de IFN-γ

Todos los estudios con animales descritos en el presente documento han sido aprobados por el Comité de Ética del Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia (protocolo No. 555/SA/2012) de acuerdo con el Decreto Legislativo 116/92 que ha implementado en Italia la Directiva Europea 86/609/EEC sobre protección de animales de laboratorio. Los animales utilizados en la investigación han sido alojados y tratados de acuerdo con las pautas insertadas en el Decreto Legislativo mencionado anteriormente. Se adquirieron ratones C57 Bl/6 de Charles River Laboratories, y se inocularon

i.m. dos veces a intervalos de diez días con 50 µg en cada pata trasera con ADN plasmídico purificado con el kit Qiagen sin endotoxina. Los ratones también se inocularon por vía subcutánea (s.c.) con 6 mU equivalentes de actividad AchE de exosomas purificados del plasma de ratones inyectados con vectores de ADN tres veces a intervalos de diez días, y se sacrificaron diez días después de la última inmunización. Para detectar respuestas inmunes de células T CD8⁺ específicas de E7 y Nef, los esplenocitos se pusieron en cultivo en micropozos Elispot para IFN-γ (Millipore) en presencia de 5 µg/mL de HPV-E7 o péptidos Nef de 8 o 9 mer de VIH-1 ya identificados para unirse eficientemente al complejo H-2 K^b de ratones C57 Bl/6, es decir, DLYCYEQL (aa 21-28) (SEQ ID NO: 3) y RAHYNIVTF (aa 49- 57) (SEQ ID NO: 4) para E7 (HPV-16 GeneBank Acceso No. AAD33252.1) y TAATNADCA (aa 48-56) (SEQ ID NO: 5) para Nef (VIH-1, cepa F12, Acceso No. EMBL Z11530). Los péptidos KLPQLCTEL (aa. 18-26) (SEQ ID NO: 6) y YDFAFRDL (aa 50-57) (SEQ ID NO: 7) específicos de HPV E6de unión a H-2 K^b (HPV-16 Gene Bank n. AAD33253.1) se usaron como péptidos no relacionados. Después de incubación durante la noche, se desarrollaron placas Elispot para IFN-γ (Mabtech AB), y las células formadoras de manchas se analizaron y contaron usando un lector Elispot (Lector Elispot A.EL.VIS. y Analysis software GmbH). (0042)

15 Análisis con microscopio de fluorescencia.

Para el análisis con microscopio de fluorescencia, se prepararon mediante criostato (Leika CM 3050) cortes de 7 µm de cuádriceps de ratones inoculados seccionados y se colocaron en portaobjetos. Los cortes se incubaron luego con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories) junto con un medio de montaje antidecoloración. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos que luego se observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop 2 Plus.

Ensayo de CTL

25 Las células T CD8⁺ se aislaron de esplenocitos de ratones inoculados mediante selección inmunomagnética positiva (Miltenyi Biotec). Se colocaron en cocultivo durante 6 horas en RPMI con FCS al 10% con células EL-4 previamente marcadas con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE, Invitrogen), y se trataron durante la noche con E7 o péptidos no relacionados. Los cocultivos se realizaron a diferentes proporciones de células (es decir, células efectoras/objetivo en proporción 20:1 a 5:1) en 200 µL de RPMI al 20% en placas de 96 pozos con fondo en U. 30 Posteriormente, la mortalidad de células EL-4 se evaluó mediante análisis por FACS poco después de la adición de 7-AAD a una concentración final de 1 µg/mL.

Detección de anticuerpos anti-E7 y anti-Nef en plasma

35 Los plasmas de ratones inoculados se agruparon, y las diluciones seriales dobles a partir de 1:10 se analizaron para detectar la presencia de Ab anti-E7. La dilución del punto final correspondió a una OD con absorbancia a 450 nm <0,1. Cada plasma se analizó por triplicado, y la media del valor de absorbancia se tomó como lectura final. Tanto E7 recombinante como Nef se usaron para el ensayo. Las proteínas se adsorbieron durante la noche a 4 °C en tampón de carbonato (pH 9,4) en placas de microtitulación Maxisorp (NUNC) a las concentraciones de 0,25 µg/pozo. Después 40 de una etapa de bloqueo de 2 horas a 37 °C en PBS que contiene leche en polvo desgrasada al 3% (NFDm), las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora con 100 µL de plasma diluido en serie en NFDm-PBS al 1%. Se detectaron complejos antígeno-anticuerpo específicos mediante un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (GE Healthcare Ltd) usando tetrametilbencidina como sustrato. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la reacción enzimática se detuvo mediante la adición de 50 µL de ácido sulfúrico 1 M/pozo. Las etapas de 45 lavado se realizaron con 200 µL/pozo de PBS que contenía Tween-20 al 0,05% en una lavadora automática.

Efectos antitumorales de los exosomas Nef^{mut}/E7

50 La actividad antitumoral inducida por la inoculación del vector que expresa Nef^{mut}/E7 se evaluó en ratones previamente desafiados con 2 x 10⁵ células TC-1. Las inoculaciones de ADN se realizaron 4 y 11 días después del desafío con células tumorales siguiendo el protocolo descrito anteriormente, y solo en ratones que desarrollaron tumores palpables. El crecimiento tumoral se controló mediante inspección visual, palpación y medición del diámetro del nódulo tumoral calculado como (largo × ancho²)/2. Al final del tiempo de observación, los tumores fueron transferidos y pesados.

55 Análisis estadístico

60 Cuando es apropiado, los datos se presentan como la media + desviación estándar (DE). En algunos casos, se usó la prueba t de Student pareada y se confirmó usando la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon no paramétrica. p <0,05 se consideró significativa.

Resultados

65 Detección de exosomas modificados liberados por células musculares murinas transfectadas con ADN

Las células musculares representan el objetivo ideal para una expresión eficiente y estable de ADN ectópico tras la administración *in vivo*. El objetivo era expresar los vectores de ADN basados en Nef^{mut} *in vivo* para modificar los exosomas liberados constitutivamente por las células que expresan el ADN inoculado. Se esperaba que estos exosomas endógenos mostraran características al menos similares a las producidas en cultivos de tejidos en términos de inducción de respuestas inmunes de CTL específicas de antígeno.

Como ya se evaluó en tipos de células humanas de diferente origen, se ha investigado preliminarmente si la internalización de un vector de ADN que expresa Nef^{mut} en células musculares murinas fue suficiente para la producción de exosomas modificados. En particular, las células musculares murinas liberan nanovesículas con características de tipo exosoma cuya biogénesis, sin embargo, difiere de la de los exosomas generados por MVB. En aras de la claridad, las nanovesículas similares a un exosoma liberadas por las células musculares murinas se definen en el presente documento como exosomas.

Las células musculares murinas C₂C₁₂ y, como control, las células 293T humanas se transfectaron con el vector que expresa GFP fusionado en el terminal C de Nef^{mut} o un isotipo de Nef (es decir, Nef_{G2A}) ya caracterizado por su ineficacia para asociarse con exosomas (26). Los cultivos celulares transfectados se controlaron para determinar la eficacia respectiva de la transfección (Figura 2A) que en las células musculares parecía ser superior al 50% de la detectada en las células 293T. Se recogieron los sobrenadantes y se aislaron los exosomas mediante centrifugaciones diferenciales. Las preparaciones de exosomas se valoraron luego en términos de actividad de AchE (Figura 2B). Los dos tipos de células produjeron niveles aparentemente similares de nanovesículas positivas para AchE, independientemente de las condiciones de transfección. El análisis de transferencia Western de cantidades iguales de exosomas mostró la presencia de moléculas derivadas de Nef en exosomas de células 293T y C₂C₁₂ transfectadas con vectores Nef^{mut}-GFP pero no Nef_{G2A}-GFP (Figura 2C). El análisis por FACS de las preparaciones de exosomas confirmó la asociación de fluorescencia con las nanovesículas recuperadas de las células C₂C₁₂ transfectadas con Nef^{mut}-GFP pero no con Nef_{G2A}-GFP (Figura 2D).

En resumen, se ha demostrado que las nanovesículas de tipo exosoma liberadas por las células musculares murinas pueden ser modificadas por derivados de Nef^{mut} como se demostró previamente en células 293T humanas transformadas de tipo epitelial.

Los productos derivados de Nef^{mut} se pueden detectar en exosomas del plasma de ratones inoculados con ADN

Con base en los resultados *in vitro* que se obtuvieron con células musculares murinas, se ha intentado la expresión del vector basado en Nef^{mut} *in vivo*. Para este objetivo, se inocularon 50 µg de Nef^{mut}-GFP, Nef_{G2A}-GFP o vector vacío en cada cuádriceps de ratones C57 Bl/6. Tres días después, se sacrificaron varios ratones inoculados y se criopreservaron sus patas. Luego, los cortes obtenidos de las zonas de inoculación se analizaron para la expresión de productos relacionados con GFP. Consistentemente con las características ya descritas de Nef y sus mutantes/derivados, Nef^{mut} aparentemente se acumuló en la membrana plasmática mientras se disponía también en un patrón punteado intracelular. De manera diferente, el mutante Nef_{G2A}, como consecuencia de la falta de miristoilación del terminal N, dispuesto en una distribución intracitoplasmática más difusa (Figura 3A). Tres y nueve días después de la inoculación, el plasma se recuperó del resto de los ratones inoculados y los exosomas se aislaron por centrifugación diferencial. Las preparaciones de exosomas se valoraron luego en términos de actividad de AchE, y las mismas cantidades de exosomas se unieron a perlas blancas de látex de aldehído/sulfato. A través de este método, incluso se esperaba que las nanovesículas fluorescentes raras fueran detectables mediante análisis por FACS. Las señales positivas se puntuaron en muestras que comprenden exosomas aislados del plasma de ratones tanto 3 como 9 días después de la inyección con el vector Nef^{mut}-GFP pero no Nef_{G2A}-GFP (Figura 3B). Estos resultados sugirieron que la inoculación en ratones de vectores que expresan derivados de Nef^{mut} puede conducir a la generación de exosomas modificados.

Respuesta de CTL específica de HPV-E7 tras la inoculación i.m. de un vector de ADN que expresa Nef^{mut}/E7

A continuación, se evaluó la inmunogenicidad de los antígenos cargados en exosomas modificados generados por la inoculación de vectores de ADN que expresan derivados de Nef^{mut}. Con este objetivo, se inocularon i.m. ratones C57 Bl/6 (seis por grupo) en cada pata trasera con 50 µg de vectores que expresan Nef^{mut}/E7 o E7 solo, o con un vector vacío. Es de destacar que el análisis de la respuesta inmune después de la inyección de un vector que expresa E7 solo fue instrumental para evaluar el beneficio de la fusión de Nef^{mut} en términos de inmunogenicidad de células T CD8⁺. Las inoculaciones se repitieron 10 días después, y después de 10 días adicionales se sacrificaron los ratones y se cultivaron durante la noche los esplenocitos en micropozos Elispot para IFN-γ en presencia de nonámeros H-2 K^b específicos de Nef o E7 no relacionados. Los niveles de activación de células T CD8⁺ observados en cultivos con péptidos no relacionados permanecieron en niveles de fondo y similares a los detectados en esplenocitos cultivados en ausencia de péptidos (no mostrados). Por otro lado, la activación celular fue claramente detectable en esplenocitos de ratones inoculados con el vector que expresa Nef^{mut}/E7 después de la incubación con nonámeros E7 o Nef (Figura 4A). Por el contrario, no se detectó respuesta de células T CD8⁺ en cultivos de esplenocitos de ratones que recibieron vector que expresaba E7 o vacío, cualquiera que sea el péptido utilizado.

Para evaluar si la respuesta de células T CD8⁺ asociada con una actividad de CTL medible, las células T CD8⁺ se aislaron de grupos de esplenocitos, y luego se pusieron en cocultivo durante 6 horas a diferentes proporciones de células (es decir, de 20:1 a 5:1) con células EL-4 marcadas con CFSE pretratadas durante la noche con no relacionados o E7. Posteriormente, los cocultivos se marcaron con 7-AAD, y los niveles de mortalidad de las células objetivo se puntuaron mediante análisis por FACS. Los resultados reportados en la Figura 4B muestra un claro aumento de la mortalidad de células objetivo tanto en cocultivos 20:1 como 10:1 que comprenden linfocitos T CD8⁺ solo de ratones inoculados con el vector que expresa Nef^{mut}/E7 con EL-4 pretratado con no números específicos de E7. Este resultado demostró que los linfocitos T CD8⁺ activados detectados en ratones inoculados con el vector que expresa Nef^{mut}/E7 mediante el ensayo Elispot para IFN- γ poseían actividad citotóxica específica de E7. En particular, los anticuerpos anti-E7 se detectaron solo en plasma de ratones inoculados con el vector que expresa E7 solo (Figura 4C).

En conjunto, estos datos indican que la inoculación i.m. de un vector que expresa un antígeno heterólogo fusionado con Nef^{mut} conduce a la inducción de una fuerte respuesta de CTL específica de antígeno en ausencia de producción de anticuerpos.

La inoculación del vector de ADN que expresa la isoforma de Nef de tipo silvestre no provoca activación de células T CD8⁺ específicas de Nef.

Los resultados proporcionan evidencia de que la inyección i.m. de vectores de ADN que expresan derivados de Nef^{mut} conduce a la producción de exosomas que cargan productos de Nef^{mut} que se correlacionan con la inducción de una respuesta de CTL contra el antígeno foráneo incorporado en los exosomas. Para respaldar la idea de que los altos niveles de incorporación de Nef^{mut} en los exosomas eran obligatorios para provocar la respuesta de células T CD8⁺ específicas de antígeno, los experimentos de inmunogenicidad se reprodujeron sin embargo al inocular ratones con vectores que expresaban la isoforma de Nef de tipo silvestre que se incorpora en exosomas en extensiones mucho más bajas en comparación con Nef^{mut} (13). Para este fin, se inyectaron i.m. ratones C57 Bl/6 (cuatro por grupo) en cada pata trasera con 50 μ g de un vector que expresa ya sea Net de tipo silvestre o Nef^{mut}, o con el vector vacío. Las inoculaciones se repitieron 10 días después, y después de 10 días adicionales se sacrificaron los ratones. Los esplenocitos se aislaron y se cultivaron durante la noche en micropozos Elispot para IFN- γ en presencia de no números no relacionados o específicos de Nef. Como se muestra en la Figura 5, los ratones inoculados con el vector que expresa Nef de tipo silvestre, de manera diferente a los que recibieron el vector de Nef^{mut}, no pudieron montar una respuesta específica de Nef de T CD8⁺ detectable.

Estos resultados indican que la eficacia de la carga de antígenos en los exosomas es crítica para la inducción de la respuesta inmune, lo que también sugiere que las funciones de Nef de tipo silvestre no estaban involucradas per se en la activación de las células T CD8⁺ que se observaron.

Los exosomas aislados del plasma de ratones inmunizados con un vector de ADN que expresa Nef^{mut}/E7 inducen una respuesta de células T CD8⁺ específicas de E7 en ratones singénicos.

Para reforzar la hipótesis de que la respuesta inmune de células T CD8⁺ detectada tras la inoculación de vectores que expresan Nef^{mut} se basa en la producción *in vivo* de exosomas modificados, se evaluó si los exosomas purificados del plasma de ratones inoculados eran inmunogénicos en ratones receptores no modificados. Con este objetivo, se inoculó a ocho ratones con vectores que expresaban E7, Nef^{mut}/E7 o el vector vacío siguiendo el programa detallado anteriormente en el presente documento. Ocho días después de la última inmunización, las PBMC se recuperaron a través del sangrado retro orbital y se colocaron en micropozos Elispot para IFN- γ para verificar la respuesta de células T CD8⁺ específicas de E7. Como ya se observó, la inyección del vector que expresa Nef^{mut}/E7, pero no el que expresa E7 solo, dio lugar a una respuesta de células T CD8⁺ específicas de E7 bien detectable (Figura 6A). Los plasma de grupos homogéneos se agruparon y los exosomas se aislaron por centrifugación diferencial. Posteriormente, los exosomas se valoraron en términos de actividad de AchE, y el equivalente de 6 mU de actividad AchE de exosomas se inyectó s.c. en ratones singénicos tres veces con intervalos de diez días. Finalmente, se sacrificaron los ratones y se analizaron los esplenocitos para las respuestas de células T CD8⁺ específicas de E7. Curiosamente, por cultivo durante la noche en micropozos de Elispot para IFN- γ se notó una activación celular específica de E7 solo en cultivos de esplenocitos de ratones inoculados con exosomas purificados de ratones inyectados con el vector de expresión de Nef^{mut}/E7 (Figura 6B).

Estos resultados indican que la inyección i.m. de ADN que expresa Nef^{mut}/E7 conduce a la producción de exosomas inmunogénicos, por lo tanto, respalda aún más la idea de que la producción dirigida por ADN de exosomas endógenos modificados se basó en la respuesta inmune fuertemente observada de células T CD8⁺ específicas de E7

Efecto antitumoral terapéutico de la respuesta de CTL específica de HPV-E7 inducida por inoculación i.m. del vector de ADN que expresa Nef^{mut}/E7

Finalmente, se ha evaluado la potencia de la respuesta inmune de células T CD8⁺ evocada por inyección del vector que expresa Nef^{mut}/E7 en términos de efecto antitumoral. Con este fin, se han configurado los ensayos de inmunización terapéutica en ratones C57 Bl/6 inoculados s.c. con 2×10^5 células TC-1. Los ratones que desarrollaron una masa

tumoral detectable por palpación, es decir, de aproximadamente 2 mm de diámetro, se inocularon con 50 µg/pata trasera de vectores que expresaban ya sea el vector vacío, Nef^{mut} (4 ratones por cada grupo) o Nef^{mut}/E7 (seis ratones) en los días 4 y 11 después de la implantación celular. Como control, 4 ratones implantados con tumor fueron inyectados con el vehículo solo. En el día 21, el sangrado retro orbital realizado en ratones inyectados con vectores que expresan Nef^{mut} o Nef^{mut}/E7 sirvió para evaluar la inducción de la respuesta inmune de células T CD8⁺ específicas de E7 (Figura 7A). El crecimiento de los tumores se controló durante 30 días, y posteriormente se sacrificaron los ratones, se extrajeron los tumores y se pesaron. La Figura 7B muestra claramente que, mientras que la inyección de vectores de ADN de control no influyó en el crecimiento de las células tumorales implantadas, su expansión se vio gravemente afectada en ratones inoculados con el vector de Nef^{mut}/E7, siendo las células tumorales aparentemente eliminadas en 3 ratones, de acuerdo con lo confirmado por la evaluación del peso del tumor (Figura 7C).

A partir de estos datos, se puede concluir que la inoculación del vector de ADN que expresa Nef^{mut}/E7 provoca una respuesta inmune de células T CD8⁺ también en presencia de células tumorales. Lo más importante, esta respuesta inmune fue tan fuerte como lo suficientemente rápida como para inhibir fuertemente el crecimiento de células tumorales singénicas previamente implantadas.

En conjunto, estos resultados representan un hito relevante hacia posibles aplicaciones terapéuticas de estrategias de inmunización basadas en exosomas endógenos basados en Nef^{mut}.

Ejemplo 2: Estudio sobre la inmunidad de células T CD8⁺ provocada por la inoculación *in vivo* de vectores que expresan antígenos fusionados con Nef^{mut}

La estrategia de inmunización basada en la inoculación de vectores de ADN que expresan un antígeno fusionado al terminal C de Nef^{mut} se ha aplicado con éxito también a una variedad de antígenos virales adicionales (véase la Tabla 1). En detalle, los vectores que expresan tales antígenos fusionados con Nef^{mut} se han inyectado en ratones C57 Bl/6 o Balb/c siguiendo el programa descrito anteriormente. De 10 a 15 días después de la última inoculación, se realizaron ensayos ELISPOT de IFN γ con esplenocitos de los ratones inyectados utilizando los péptidos enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1. Inmunidad de células T CD8⁺ específica de antígeno inducida en ratones inoculados con vectores que expresan diferentes antígenos fusionados con Nef^{mut}.^a

Antígeno	Unidades formadoras de manchas/10 ⁶ células	Péptidos para detectar inmunidad de células T CD8 ⁺	Número de acceso de la secuencia
EboV VP24	310 ± 35	KFINKLDALH (SEQ ID NO:8) DAVLYYHMM (SEQ ID NO:9)	AY142960
EboV VP40	285 ± 18	LRIGNQAFLQEFVLPP (SEQ ID NO: 10)	L11365
EboV NP	409 ± 21	VYQVNNLEEIC (SEQ ID NO:11) DAVLYYHMM (SEQ ID NO:12)	AY142960
HCV NS3	190 ± 57	ITQMYTNV (SEQ ID NO:13) WYELTPAETSV (SEQ ID NO:14)	AFN53788.1
WNV NS3	210 ± 17	GYISTKVEL (SEQ ID NO:15) DRRWCFDGPRTNTI L (SEQ ID NO: 16)	ABG67747.1
Flu NP	232 ± 44	ASNENMETM (SEQ ID NO:17)	ACX46208.1

^a Se muestran los valores medios ± DE restados de los valores de fondo calculados a partir de los datos obtenidos con esplenocitos de cuatro ratones inoculados, cada uno probado en pozos por triplicado.

Los resultados apoyan la idea de que la inyección de antígenos que expresan ADN fusionados a Nef^{mut} es instrumental para inducir inmunidad de CTL contra una amplia gama de antígenos de longitud completa.

Ejemplo 3: Estudio de la actividad de CTL provocada por exosomas modificados *in vivo* para su uso de acuerdo con la presente invención en cáncer de mama

Materiales y métodos

Constructos moleculares

El ADN que codifica el dominio extracelular (ECD) de rHER2/neu activado se recuperó por RT-PCR realizada en ARN total extraído de células N202.1A, es decir, una línea celular derivada de ratones FVB transgénicos para rHER- 2/neu (27). Se usaron los siguientes cebadores que comprenden los sitios de restricción de NheI y EcoRI en el extremo 5' respectivo: directo (justo secuencia abajo del péptido señal) 5' CTAGCTAGCACCCAAGTGTGTACCG GC 3' (SEQ ID NO: 18); inverso: 5' CCGGAATTCTCAGTGGGTCAGTTGATGGG 3' (SEQ ID NO: 19). Para obtener el vector que expresa el producto de fusión de Nef^{mut}/ECD de HER2, el producto de PCR se cortó con NheI/EcoRI y se insertó en el marco en el terminal 3' de un vector con base en pcDNA3 digerido con NheI/EcoRI que expresa Nef^{mut}. A través de esta estrategia, se esperaba que las secuencias de ECD de HER2 de rata y ratón se fusionaran con Nef^{mut} en los

constructos moleculares resultantes. La selección se realizó sobre la base de la presencia de la secuencia de rHER2/neu. Los vectores que expresan Nef^{mut}, Nef^{mut}/GFP y Nef^{mut}/MART-1 ya se han descrito (13). El vector promovido por IE-CMV que expresa el rHER2/neu fue amablemente proporcionado por A. Amici, Universidad de Urbino, Italia.

5 Cultivos celulares y transfecciones

Se cultivaron células 293T, MCF-7, C₂C₁₂ músculo de murino (todas obtenidas de American Type Culture Collection) y TC-1 (28) en medio de Eagle modificado de Dulbecco más suero de ternera fetal (FCS) al 10% inactivado por calor. Los ensayos de transfección se llevaron a cabo mediante el método basado en Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), que en el caso de las células C₂C₁₂ se modificó mediante la adición de liposomas en células recién tripsinizadas. Las HLA-A.02 B-LCL (29), los esplenocitos de murino y los linfocitos T CD8⁺ se cultivaron en medio RPMI más FCS al 10%. Las células primarias humanas del músculo esquelético (SKMC) se obtuvieron de Lonza y se cultivaron con el medio recomendado.

15 Las PBMC humanas se aislaron de donantes sanos mediante gradientes de densidad de Ficoll-Hypaque. Los monocitos se aislaron de PBMC utilizando un kit inmunomagnético de selección de monocitos (Miltenyi). La pureza de las poblaciones de células recuperadas se ensayó mediante análisis por FACS usando mAb anti-CD14 conjugado con PE (Becton Dickinson). Los monocitos se diferenciaron a iDC después de 4-5 días de cultivo en medio RPMI suplementado con FCS al 20%, 30 ng/mL de factor estimulante de colonias de granulocitos- macrófagos (GM-CSF) (Serotec Ltd) y 500 unidades/mL de IL-4 (R&D Systems). La maduración de DC se obtuvo a través de tratamiento durante la noche con 10 ng/mL de lipopolisacárido (LPS).

25 Preparación y purificación de exosomas.

Los exosomas se aislaron mediante centrifugaciones diferenciales como se describió previamente (30) a partir de sobrenadantes de células 293T 48 a 72 horas después de la transfección. Las cantidades de exosomas recuperados se evaluaron midiendo la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE, es decir, un marcador de exosoma clásico) (31) a través del kit Amplex Red (Molecular Probes, Thermo Fisher) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

30 Transferencia Western

Los análisis de transferencia Western de los lisados celulares y los exosomas se llevaron a cabo como se describe en (13). Los filtros se revelaron usando un antisuero de oveja anti-Nef ARP 444 (MRC) diluido 1:1000, mAb AC-74 anti-β actina diluido 1:250 de Sigma y Ab policlonales anti-Alix H-270 diluido 1:100 de Santa Cruz.

35 Modelo de ratón

Todos los estudios con animales descritos en el presente documento han sido aprobados por el Comité Ético de la ISS (protocolo No. 107/2016-PR) de acuerdo con el Decreto Legislativo 116/92 que ha implementado en Italia la Directiva Europea 86/609/EEC sobre protección de animales de laboratorio. Los animales utilizados en esta investigación han sido alojados y tratados de acuerdo con las directrices insertadas en el Decreto Legislativo mencionado anteriormente. Se utilizó una colonia de ratones transgénicos 129Sv-NeuT generados y criados en la instalación animal de la ISS (32). En estos ratones, el gen rHER-2/neu activado es promovido por las LTR del MMLV y las hembras vírgenes desarrollan espontáneamente carcinomas mamarios que se vuelven palpables a las 15-20 semanas de edad. La presencia del transgén rHER2/neu se verificó rutinariamente por PCR como se describe en (32). Los ratones fueron inoculados i.m. dos veces a las 15 y 17 semanas de edad con 50 µg por cada cuádriceps de ADN plasmídico purificado con el kit Qiagen sin endotoxina. Las glándulas mamarias fueron inspeccionadas una vez por semana para monitorizar el tumor. Se sacrificaron ratones con tumores que superaban los 30 mm de diámetro.

50 Detección de anticuerpos

El plasma de ratones inoculados se diluyó 1:20 y se analizó la presencia de anticuerpos anti-HER2/neu en células 293T transfectadas dos días antes con un vector que expresa HER2/neu. Después de 2 horas de incubación a 4 °C, las células se lavaron y se incubaron con IgG anti-ratón conjugados con FITC, y se analizó por FACS 1 hora más tarde. Como control positivo, se usó un clon 7.16.4 de mAb anti HER2/neu diluido 1:20 (Sigma).

55 Ensayo ELISPOT

60 Para detectar respuestas inmunitarias de células T CD8⁺ específicas de HER2/neu y Nef, se colocaron esplenocitos en micropozos Elispot para IFN-γ (Millipore) en presencia de 5 µg/ml de bien sea péptidos HER2/neu o Nef de VIH-1 de 9-mer que se unen al complejo H-2 K^b de ratones transgénicos 129Sv, es decir, ILHDGAYSL (aa 436-444) (33) y TAATNADCA (aa 48-56) (34), respectivamente. Los péptidos heterólogos que se unen a H-2 K^b (35) se usaron como control. Después de incubación durante la noche, se desarrollaron placas Elispot para IFN-γ (Mabtech) y se contaron las unidades formadoras de manchas (SFU).

Ensayo de cebado cruzado

Se transfectó un total de 10^6 SKMC con $10 \mu\text{g}$ de vectores basados en Nef^{mut} o de control. Después de 48 horas, las células se pusieron en cocultivo con iDC en una proporción de células 1:5 y, en algunos casos, en presencia de $2 \mu\text{M}$ de los inhibidores de la biosíntesis de exosomas GW4869 y espiroepóxido (36-41). Después de una incubación durante la noche, las iDC se aislaron y maduraron mediante tratamiento con LPS durante 24 horas. Posteriormente, las iDC se lavaron y se pusieron en cocultivo con linfocitos de sangre periférica (PBL) autólogos en una proporción de células 1:10. Una semana después, se repitió el procedimiento de estimulación y, después de una semana adicional, se recuperaron las células T CD8^+ para los ensayos de CTL.

Ensayos de CTL

Se realizaron ensayos de CTL con células murinas aislando células T CD8^+ de esplenocitos mediante selección inmunomagnética positiva (Miltenyi). Se colocaron en cocultivo durante 6 horas en RPMI con FCS al 10% con células TC-1 previamente marcadas con succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE, Invitrogen, Thermo Fisher) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se trataron durante la noche con HER2/neu, Nef, o péptidos no relacionados. Los cocultivos se corrieron con una proporción células efectoras/objetivo de 10:1 en $200 \mu\text{L}$ de RPMI al 20% en placas de 96 pozos con fondo en U. Posteriormente, la mortalidad de células TC-1 se calificó mediante análisis por FACS poco después de la adición de 7-AAD a una concentración final de $1 \mu\text{g}/\text{mL}$. Los ensayos de CTL en células humanas se llevaron a cabo de manera similar, excepto que se utilizaron MCF-7 o B-LCL como células objetivo.

Análisis microscópico confocal

Los cocultivos nocturnos que comprenden iDC y SKMC transfectados dos días antes con vectores que expresan GFP o $\text{Nef}^{\text{mut}}/\text{GFP}$, se llevaron a cabo en una proporción de células 1:5 en presencia o no de GW4869 y espiroepóxido. Posteriormente, las células se tiñeron primero con anti-CD45 (es decir, un marcador de iDC) durante 1 hora a 4°C , y luego con Ab secundarios conjugados con Alexa-Fluor 610. Finalmente, los cocultivos se marcaron con 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI, Vector Laboratories) y se fijaron en formaldehído tamponado (2% v/v). Las imágenes de contraste de fase y fluorescencia se registraron con un dispositivo Olympus IX-81.

Análisis estadístico

Cuando es apropiado, los datos se presentan como la media + desviación estándar (DE). En algunos casos, se usó la prueba t de Student pareada y se confirmó usando la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon no paramétrica. $p < 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

El dominio extracelular de rHER2/neu se carga eficientemente en exosomas tras la fusión con Nef^{mut}

El ECD de rHER2/neu privado del péptido señal se fusionó al terminal C de Nef^{mut} en el contexto de un vector eucariota promovido por IE-CMV. Para verificar tanto la estabilidad como la incorporación de exosomas del producto de fusión, las células 293T se transfectaron transitoriamente con vectores que expresaban Nef^{mut} o $\text{Nef}^{\text{mut}}/\text{ECD}$ de HER2, o con un vector vacío. Después de 48 horas, las células se lisaron y los sobrenadantes se sometieron a centrifugaciones diferenciales para aislar los exosomas. Tanto los lisados celulares como los exosomas se analizaron mediante transferencia Western (Figura 8). El producto de fusión parecía estable y cargado en extensiones valiosas en exosomas. Se obtuvieron resultados similares mediante la transfección de células musculares murinas C_2C_{12} (no mostradas).

La inyección en ratones transgénicos rHER2/neu de un vector de ADN que expresa $\text{Nef}^{\text{mut}}/\text{ECD}$ de HER2 induce una activación específica de linfocitos T CD8^+ en ausencia de respuesta de anticuerpos

Se ha asumido que, como ya se ha demostrado para otros productos de fusión basados en Nef^{mut} (21), la inyección i.m. en ratones del vector que expresa $\text{Nef}^{\text{mut}}/\text{ECD}$ de HER2 conduce a la producción de exosomas inmunogénicos modificados endógenamente que incorporan el producto de fusión $\text{Nef}^{\text{mut}}/\text{ECD}$ de HER2. La pregunta era si la inmunogenicidad de linfocitos T CD8^+ esperada de estos exosomas era lo suficientemente fuerte como para romper la tolerancia hacia HER2/neu.

La inducción de anticuerpos anti-HER2/neu, es decir, un efecto ya descrito en ratones inyectados con vectores de ADN rHER2/neu (42, 43) se ha probado primero (). Con este fin, se inyectó a los ratones transgénicos HER2/neu con vectores de ADN que expresan Nef^{mut} o $\text{Nef}^{\text{mut}}/\text{ECD}$ de HER2 (3 por grupo). Quince días después de la segunda inyección, se recuperó el plasma y se analizó la presencia de Ab anti-HER2/neu utilizando células indicadoras 293T transfectadas transitoriamente con un vector de ADN que expresa HER2/neu. Como se informó en la Figura 9, no se detectaron anticuerpos específicos para HER2/neu en plasma de ratones inyectados con el vector de ADN que expresa $\text{Nef}^{\text{mut}}/\text{ECD}$ de HER2. De manera diferente, los Ab fueron detectables en plasma de ratones inyectados con lisados de células que expresan rHER2/neu, como se describió previamente (32). Estos resultados parecían

completamente consistentes con lo que se informó previamente sobre la falta de respuesta de anticuerpos contra los productos incorporados en los exosomas modificados (14, 21).

5 A continuación, se analizó la respuesta de linfocitos T CD8⁺ específicos de antígeno que analizaba los esplenocitos de ratones inyectados a través de ensayos Elispot de IFN- γ llevados a cabo mediante la estimulación con nonámeros de Nef restringidos con H2^b y ECD de HER2. Como se muestra en la Figura 10, se detectó la activación de linfocitos cuando los esplenocitos de ratones inyectados con ADN que expresa Nef^{mut} se estimularon con el péptido Nef, pero no con aquel de ECD de HER2. Por otro lado, tanto los péptidos Nef como los del ECD de HER2 indujeron la activación de linfocitos en cultivos de esplenocitos de ratones inyectados con Nef^{mut}/ECD de HER2. Se obtuvieron resultados similares probando PBMC recuperadas por sangrado retroorbital (no mostrado).

Estos datos demuestran la inducción de respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicos de Nef y HER/neu en ratones inyectados con el vector de ADN de Nef^{mut}/ECD de HER2.

15 Inducción de la actividad de CTL específica de antígeno en ratones transgénicos rHER2/neu inyectados con el vector de ADN que expresa Nef^{mut}/ECD de HER2.

A continuación, el objetivo del estudio fue evaluar si la inyección del vector de ADN que expresa Nef^{mut}/ECD de HER2 puede inducir una actividad de CTL específica de HER2/neu. Con este fin, los linfocitos T CD8⁺ se aislaron de esplenocitos de ratones transgénicos HER2/neu inoculados con un vector vacío o con vectores que expresaban Nef^{mut} o Nef^{mut}/ECD de HER2. Los linfocitos T CD8⁺ se pusieron en cocultivo con células TC-1 singénicas, marcadas con CFSE, tratadas previamente con los péptidos apropiados. Después de 5 horas, los cocultivos se detuvieron, se marcaron con 7-AAD y se analizaron mediante FACS para evaluar los porcentajes de células objetivo TC-1 muertas. Como se muestra en la Figura 11, se detectó un aumento de la mortalidad de las células objetivo cuando los linfocitos T CD8⁺ de ratones inyectados con el vector de ADN de Nef^{mut} se cultivaron conjuntamente con TC-1 pretratado con el péptido Nef. Más importante, una actividad de CTL también fue evidente cuando los linfocitos T CD8⁺ de ratones inyectados con el vector de ADN de Nef^{mut}/ECD de HER2 se cocultivaron con TC-1 pretratadas con péptidos restringidos de H2^b específicos de Nef o HER2.

30 Estos resultados establecieron un vínculo entre el suministro i.m. del vector de ADN de Nef^{mut}/ECD de HER2 y la inducción de actividad de CTL específica de HER2/neu.

La ruptura de la tolerancia a HER2/neu se asocia con una actividad antitumoral

35 A continuación, el objetivo del estudio fue evaluar si la actividad de CTL específica de ECD de HER2 se acoplaba con una actividad antitumoral detectable. Se inyectaron ratones transgénicos 129Sv-NeuT de quince semanas de edad todavía libres de lesiones palpables ya sea con vehículo o vectores de ADN que expresan Nef^{mut} y Nef^{mut}/ECD de HER2. Las inyecciones se repitieron dos semanas después, y la aparición de tumores palpables se controló semanalmente. Como se informa en la Figura 12, la inyección de ADN que expresa Nef^{mut}/ECD de HER2 se asocia con un retraso significativo en el desarrollo de tumores. El monitoreo se detuvo en el momento de los primeros sacrificios necesarios por razones éticas.

Estos datos destacan una relación directa entre la actividad de CTL específica de ECD de HER2 inducida por inyección i.m. de ADN y actividad antitumoral.

45 Traslado de la plataforma de vacunas de CTL a humanos: inducción de actividad de CTL específica de antígeno por exosomas modificados

50 Para abrir la posibilidad de explotar la plataforma de vacuna de CTL en clínica, es obligatorio demostrar su eficacia en el sistema humano. Con este fin, se establecieron experimentos que utilizan condiciones que reproducen al menos en parte el mecanismo subyacente a la inducción de la respuesta inmune de linfocitos T CD8⁺ específica de antígeno descrita previamente en ratones inyectados con vectores de ADN que expresan Nef^{mut} (1). La transferencia de exosomas de las células musculares transfectadas a las iDC se documentó por primera vez. Las SKMC se transfectaron con vectores de ADN de GFP o Nef^{mut}/GFP, y la eficacia de transfección se verificó mediante análisis por FACS (Figura 13A). Sobre este tema, se ha documentado previamente que la expresión de Nef^{mut}/GFP conduce a la producción de exosomas fluorescentes (13). Después del cocultivo de SKMC transfectadas con iDC, la presencia de agregados fluorescentes en las iDC se documentó mediante análisis de microscopía confocal al etiquetar las iDC del receptor con mAb anti-CD45 (Figura 13B, paneles centrales). Mientras tanto, no se detectó fluorescencia de GFP dentro de la población de células CD45⁺ cuando se usaron SKMC transfectadas con GFP, así como cuando los cocultivos se trataron con los inhibidores de la biosíntesis de exosoma GW4869 y espiroepóxido (Figura 13B, paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Este resultado respalda la idea de que la entrada de moléculas de Nef^{mut}/GFP en las iDC estuvo mediada por la transmisión intercelular de exosomas.

65 A continuación, se realizaron ensayos de cebado cruzado destinados a evaluar la inducción de la actividad de CTL específica de antígeno como se resume en la Figura 14A. En detalle, las SKMC se transfectaron con vectores de ADN que expresaban derivados de Nef^{mut}, y luego se cultivaron conjuntamente con iDC HLA-A.02. Veinticuatro horas

después, se aislaron iDC, se maduraron con LPS y luego se pusieron en cocultivo con PBL autólogos. Los cocultivos de DC-PBL maduros (m) se llevaron a cabo durante siete días y, posteriormente, los linfocitos se aislaron y se sometieron a un segundo ciclo de estimulación mediante la adición de mDC frescas previamente cocultivadas con SKMC transfectadas. Después de siete días adicionales, los linfocitos se recuperaron de los cocultivos, la fracción T CD8⁺ se aisló y se colocó en cocultivo en el contexto de un ensayo de CTL con células HLA-A.02 MCF-7, ya sea parentales o modificadas para la expresión estable de Nef^{mut} (Figura 14B). Los resultados de los ensayos de CTL (Figura 14C) mostraron una mortalidad de las células objetivo MCF-7/Nef^{mut} que aparecían más altas cuando fueron desafiadas con células T CD8⁺ estimuladas por DC cocultivadas con SKMC que expresaban Nef^{mut} comparado con el detectado en cocultivos con células T CD8⁺ estimuladas por DC de cocultivos con SKMC transfectadas con el vector de control. Por otro lado, no se detectó actividad de CTL específica de antígeno con el uso de MCF-7 parental como células objetivo.

A continuación, estas investigaciones se extendieron hacia antígenos fusionados con Nef^{mut}. Además, se verificó si la producción de exosomas modificados se basó en la inducción de la actividad de CTL específica de antígeno. Con este objetivo, los ensayos de cebado cruzado se reprodujeron usando un vector de ADN que expresa Nef^{mut} fusionado con MART-1, es decir, un antígeno asociado a melanoma humano (44), y siguiendo los procedimientos representados en la Figura 14A, excepto que los cocultivos de SKMC- iDC se llevaron a cabo en presencia o no de los inhibidores de la biosíntesis de exosoma GW4869 y espiroepóxido. Los ensayos de CTL finalmente se realizaron cultivando conjuntamente los linfocitos T CD8⁺ con B-LCL HLA-A.02 previamente tratados con MART-1 restringido a HLA-A.02 (es decir, AAGIGILTV (SEQ ID NO: 20), aa 27-35) (45) o péptidos no relacionados. Como se informa en la Figura 15, los linfocitos T CD8⁺ estimulados mostraron actividad de CTL específica de MART-1. Sin embargo, ya no era detectable cuando se usaban linfocitos T CD8⁺ estimulados por DC de cocultivos con SKMC llevados a cabo en presencia de inhibidores de exosomas.

Estos datos indican que la producción de células musculares transfectadas de exosomas modificados para la incorporación de Nef^{mut} o sus derivados son parte del mecanismo subyacente a la inducción de la actividad de CTL específica de antígeno que se observó con células humanas. Por lo tanto, estos hallazgos respaldan la idea de que la plataforma de vacuna de CTL tiene el potencial de aplicarse en humanos contra antígenos tumorales.

Referencias

- Halstead S.B., S.J. Thomas. 2011. New Japanese encephalitis vaccines: alternatives to production in mouse brain. *Expert Rev. Vaccines*. 10: 355-64. doi:10.1586/erv.11.7.
- Ng T., D. Hathaway, N. Jennings, D. Champ, Y.W. Chiang, H.J. Chu. 2013. Equine vaccine for West Nile virus. *Dev. Biol.*;114: 221-7.
- El Garch H., J.M. Minke, J. Rehder, S. Richard, C. Edlund Toulemonde, S. Dinic, C. Andreoni, J. C. Audonnet, R. Nordgren, V. Juillard. 2008. A West Nile virus (WNV) recombinant canarypox virus vaccine elicits WNV-specific neutralizing antibodies and cell-mediated immune responses in the horse. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123: 230-9.
- Stüve O., T.N. Eagar, E.M. Frohman, P.D. Cravens. 2007. DNA plasmid vaccination for multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 64: 1385-6.
- Guescini M., D. Guidolin, L. Vallorani, L. Casadei, A. M. Gioacchini, P. Tibollo, M. Battistelli, E. Falcieri, L. Battistin, L.F. Agnati, V. Stocchi. 2010. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res.* 16: 1977-84. doi:10.1016/j.yexcr.2010.04.006.
- Romancino D.P., G. Paterniti, Y. Campos, A. De Luca, V. Di Felice, A. d'Azzo, A. Bongiovanni. 2013. Identification and characterization of the nano-sized vesicles released by muscle cells. *FEBS Lett.* 587: 1379-84. doi:10.1016/j.febslet.2013.03.012.
- Morse M.A., J. Garst, T. Osada, S. Khan, A. Hobeika, T.M. Clay, N. Valente, R. Shreenivas, M.A. Sutton, A. Delcayre, D.H. Hsu, J.B. Le Pecq, H.K. Lyerly. 2005. A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J. Transl Med.* 3: 9.
- Escudier B., T. Dorval, N. Chaput, T. Andre, M.P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leblouaire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J.B. Le Pecq, A. Spatz, C O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin, L. Zitvogel. 2005. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J. Transl Med.* 3: 10.
- Dai S., D. Wei, Z. Wu, X. Zhou, X. Wei, H. Huang, G. Li. 2008. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther.* 16: 782-90. doi: 10.1038/mt.2008.1.
- Tan A., H. De La Peña, A.M. Seifalian. 2010. The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int J Nanomedicine.* 5: 889-900. doi:10.2147/IJN.S13402.
- Chaput N., C. Théry. 2011. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol.* 33: 419-40. doi: 10.1007/s00281.
- Peretti S., I. Schiavoni, K. Pugliese, M. Federico. 2005. Cell death induced by the herpes simplex virus-1 thymidine kinase delivered by human immunodeficiency virus-1-based virus-like particles. *Mol Ther.* 12: 1185-96.
- Lattanzi L., M. Federico. 2012. A strategy of antigen incorporation into exosomes: comparing cross-presentation levels of antigens delivered by engineered exosomes and by lentiviral virus-like particles. *Vaccine.* 30: 7229-37. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.010.

14. Di Bonito P., B. Ridolfi, S. Columba-Cabezas, A. Giovannelli, C. Chiozzini, F. Manfredi, S. Anticoli, C. Arenaccio, M. Federico. 2015. HPV-E7 delivered by engineered exosomes elicits a protective CD8⁺ T cell-mediated immune response. *Viruses*. 7: 1079-99. doi: 10.3390/v7031079.
- 5 15. Fry EA, Taneja P, Inoue K. 2016. Clinical applications of mouse models for breast cancer engaging HER2/neu. *Integr Cancer Sci Ther* 3(5): 593-603.
16. Rolla S, Nicoló C, Malinarich S, Orsini M, Forni G, Cavallo F, Ria F. 2006. Distinct and non-overlapping T cell receptor repertoires expanded by DNA vaccination in wild-type and HER-2 transgenic BALB/c mice. *J Immunol* 177(11): 7626-7633.
- 10 17. Rovero S, Amici A, Di Carlo E, Bei R, Nanni P, Quaglino E, Porcedda P, Boggio K, Smorlesi A, Lollini PL, Landuzzi L, Colombo MP, Giovarelli M, Musiani P, Forni G. 2000. DNA vaccination against rat her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. *J. Immunol* 165(9): 5133-5142.
18. Quaglino E, Iezzi M, Mastini C, Amici A, Pericle F, Di Carlo E, Pupa SM, De Giovanni C, Spadaro M, Curcio C, Lollini PL, Musiani P, Forni G, Cavallo F. 2004. Electroporated DNA vaccine clears away multifocal mammary carcinomas in her-2/neu transgenic mice. *Cancer Res* 64(8): 2858-2864.
- 15 19. Quaglino E, Mastini C, Iezzi M, Forni G, Musiani P, Klapper LN, Hardy B, Cavallo F. 2005. The adjuvant activity of BAT antibody enables DNA vaccination to inhibit the progression of established autochthonous Her-2/neu carcinomas in BALB/c mice. *Vaccine* 23(25): 3280-3287.
20. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. 2011. Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331 (6024): 1565-1570.
21. Di Bonito P, Chiozzini C, Arenaccio C, Anticoli S, Manfredi F, Olivetta E, Ferrantelli F, Falcone E, Ruggieri A, Federico M. 2017. Antitumor HPV E7-specific CTL activity elicited by *in vivo* engineered exosomes produced through DNA inoculation. *Int J Nanomedicine* 12: 4579-4591.
22. van der Burg SH, Arens R, Ossendorp F, van Hall T, Melief CJ. 2016. Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat Rev Cancer* 16(4): 219-233.
- 25 23. Keppler O.T., I. Allespach, L. Schuller, D. Fenard, W.C. Greene, O.T. Fackler. 2005. Rodent cells support key functions of the human immunodeficiency virus type 1 pathogenicity factor Nef. *J. Virol.* 79: 1655-65.
24. D'Aloja P., E. Olivetta, R. Bona, F. Nappi, D. Pedacchia, K. Pugliese, G. Ferrari, P. Verani, M. Federico. 1998. gag, vif, and nef genes contribute to the homologous viral interference induced by a nonproducer human immunodeficiency virus type 1 (VIH-1) variant: identification of novel VIH 1-inhibiting viral protein mutants. *J. Virol.* 72: 4308-19.
- 30 25. Massa S., P. Simeone, A. Muller, E. Benvenuto, A. Venuti, R. Franconi. 2008. Antitumor activity of DNA vaccines based durante la noche the human papillomavirus-16 E7 protein genetically fused to a plant virus coat protein. *Hum. Gene Ther.* 19: 354-64. doi: 10.1089/hum.2007.122.
26. Arenaccio C., C. Chiozzini, S. Columba-Cabezas, F. Manfredi, M. Federico. 2014. Cell activation and VIH-1 replication in unstimulated CD4⁺ T lymphocytes ingesting exosomes from cells expressing defective VIH-1. *Retrovirology*. 11: 46. doi: 10.1186/1742-4690-11-46.
- 35 27. Nanni P, Nicoletti G, De Giovanni C, Landuzzi L, Di Carlo E, Cavallo F, Pupa SM, Rossi I, Colombo MP, Ricci C, Astolfi A, Musiani P, Forni G, Lollini PL. 2001. Combined allogeneic tumor cell vaccination and systemic interleukin 12 prevents mammary carcinogenesis in HER-2/neu transgenic mice. *J Exp Med* 194: 1195-1205.
28. Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. 1991. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol* 65: 473-478.
- 40 29. Di Bonito P, Grasso F, Mochi S, Petrone L, Fanales-Belasio E, Mei A, Cesolini A, Laconi G, Conrad H, Bernhard H, Dembek CJ, Cosma A, Santini SM, Lapenta C, Donati S, Muratori C, Giorgi C, Federico M. 2009. Anti-tumor CD8⁺ T cell immunity elicited by VIH-1-based virus-like particles incorporating HPV-16 E7 protein. *Virology* 395: 45-55.
30. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. 2006. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Prot Cell Biol* 3. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.
- 45 31. Rieu S, Géminard C, Rabesandratana H, Sainte-Marie J, Vidal M. 2000. Exosomes released during reticulocyte maturation bind to fibronectin via integrin alpha4beta1. *Eur J Biochem*; 267: 583-590.
32. Aricò E, Sestili P, Carpinelli G, Canese R, Cecchetti S, Schiavoni G, D'Urso MT, Belardelli F, Proietti E. 2016. Chemo-immunotherapy induces tumor regression in a mouse model of spontaneous mammary carcinogenesis. *Oncotarget* 7(37): 59754-59765.
- 50 33. Gritzapis AD, Mahaira LG, Perez SA, Cacoullos NT, Papamichail M, Baxevanis CN. 2006. Vaccination with human HER-2/neu (435-443) CTL peptide induces effective antitumor immunity against HER-2/neu-expressing tumor cells *in vivo*. *Cancer Res* 66(10): 5452-5460.
34. Liang X, Fu TM, Xie X, Emini EA, Shiver JW. 2002. Development of VIH-1 Nef vaccine components: immunogenicity study of Nef mutants lacking myristoylation and dileucine motif in mice. *Vaccine* 20: 413-421.
- 55 35. Bauer S, Heeg K, Wagner H, Lipford GB. 1995. Identification of H-2Kb binding and immunogenic peptides from human papilloma virus tumour antigens E6 and E7. *Scand J Immunol* 42: 317-323.
36. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. 2010. Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol* 190: 1079-1091.
- 60 37. Kogure T, Lin WL, Yan IK, Braconi C, Patel T. 2011. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology* 54: 1237-1248.
38. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. 2010. Secretory mechanisms and intracellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 285: 17442-17452.
39. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. 2012. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem* 287: 1397-1405.
- 65

40. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M. 2008. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319: 1244-1247.
41. Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, Igarashi Y. 2012. Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia. *J Biol Chem* 287: 10977-10989.
- 5 42. Nanni P, Landuzzi L, Nicoletti G, De Giovanni C, Rossi I, Croci S, Astolfi A, Iezzi M, Di Carlo E, Musiani P, Forni G, Lollini PL. 2004. Immunoprevention of mammary carcinoma in HER-2/neu transgenic mice is IFN-gamma and B cell dependent. *J Immunol* 173(4): 2288-2296.
43. Rolla S, Marchini C, Malinarich S, Quaglino E, Lanzardo S, Montani M, Iezzi M, Angeletti M, Ramadori G, Forni G, Cavallo F, Amici A. 2008. Protective immunity against neu-positive carcinomas elicited by electroporation of plasmids encoding decreasing fragments of rat neu extracellular domain. *Hum Gene Ther* 19(3): 229-240.
- 10 44. Busam KJ, Jungbluth AA. 1996. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol* 6: 12-18.
45. Rivoltini L, Kawakami Y, Sakaguchi K, Southwood S, Sette A, Robbins PF, Marincola FM, Salgaller ML, Yannelli YR, Appella E, Rosenberg SA. 1995. Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by *in vitro* stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. *J Immunol* 154: 2257-2265.
- 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polinucleótido que codifica una proteína de fusión, dicha proteína de fusión comprende o consiste en la proteína de anclaje al exosoma de la secuencia SEQ ID NO: 1 fusionada en su terminal C con un antígeno inmunogénico, o un vector de expresión de ADN que comprende dicho polinucleótido, para su uso en vacunación preventiva o terapéutica mediante la inducción de una respuesta inmune de CTL, en la que la SEQ ID NO: 1 es la siguiente secuencia:

MGCKWSKSSV VGWPAVRERM RRAEPAADGV GAASRDLEKH
 GAITSSNTAA TNADCAWLEA QEEEEVGFPV TPQVPLRPMT
 YKAAVDLSHF LKEKGGLEGL IHSQRRQDIL DLWIYHTQGY
 FPDWQNYPTG PGIRYPLTFG WCYKLVPEP EKLEEANKGE
 NTSLLHPVSL HGMDDPGREV LEWRFD SRLA FHHVARELHP
 EYFKNC

- 10 en la que dicho vector de expresión de polinucleótido o ADN se administra por administración intramuscular.

- 15 2. Vector de expresión de polinucleótidos o ADN para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el antígeno se elige del grupo que consiste en el antígeno del virus del papiloma humano tal como E6 y E7, el antígeno del VIH tal como Gag y Tat, el antígeno del virus del Ébola tal como VP24, VP40, NP y GP, antígeno del virus del Nilo Occidental tal como NS3, antígeno del HBV tal como Core, antígeno del HCV tal como Core, NS3, E1 y E2, antígeno del virus de Crimea-Congo tal como GP y NP, antígeno del virus de la influenza A tal como NP y M1, antígeno de melanoma humano tal como MAGE-A3 y MART-1, antígenos asociados a tumores humanos tales como Her2/Neu, Hox B7.

- 20 3. Vector de expresión de polinucleótidos o ADN para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el polinucleótido que codifica la proteína de anclaje al exosoma de la secuencia SEQ ID NO: 1 tiene la siguiente secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2:

atg ggt tgc aag tgg tca aaa agt agt gtg gtt gga tgg cct gct gta agg
 gaa aga atg aga cga gct gag cca gca gca gat ggg gtg gga gca gca
 tct cga gac cta gaa aaa cat gga gca atc aca agt agc aat aca gca gct
 acc aat gct gat tgt gcc tgg cta gaa gca caa gag gag gag gag gtg ggt
 ttt cca gtc aca cct cag gta cct tta aga cca atg act tac aag gca get
 gta gat ctt agc cac ttt tta aaa gaa aag ggg gga ctg gaa ggg cta att
 cac tcc caa cga aga caa gat atc ctt gat ctg tgg atc tac cac aca caa
 ggc tac ttc cct gat tgg cag aac tac aca cca gga cca ggg gtt aga tat
 cca ctg acc ttt gga tgg tgc tac aag cta gta cca gtt gag cca gag aag
 tta gaa gaa gcc aac aaa gga gag aac acc agc ttg tta cac cct gtg agc
 ctg cat gga atg gat gac ccg gcg aga gaa gtg tta gag tgg agg ttt gac
 agc cgc cta gca ttt cat cac gtg gcc cga gag ctg cat ccg gag tac ttc
 25 aag aac tgc tga

- 30 4. Vector de expresión de polinucleótidos o ADN para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para la prevención y el tratamiento de enfermedades elegidas del grupo que consiste en enfermedades infecciosas crónicas tales como HBV, HCV y VIH, tuberculosis y malaria, enfermedades infecciosas agudas tales como la influenza, el virus del Nilo Occidental, la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y enfermedades del Ébola, tumores como el tumor de mama, pulmonar, de próstata o de vejiga.

- 35 5. Vector de expresión de polinucleótidos o ADN para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vector de expresión de polinucleótidos o ADN está asociado con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables.

6. Vector de expresión de polinucleótidos o ADN para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el adyuvante es un adyuvante de la respuesta de células T CD8⁺.

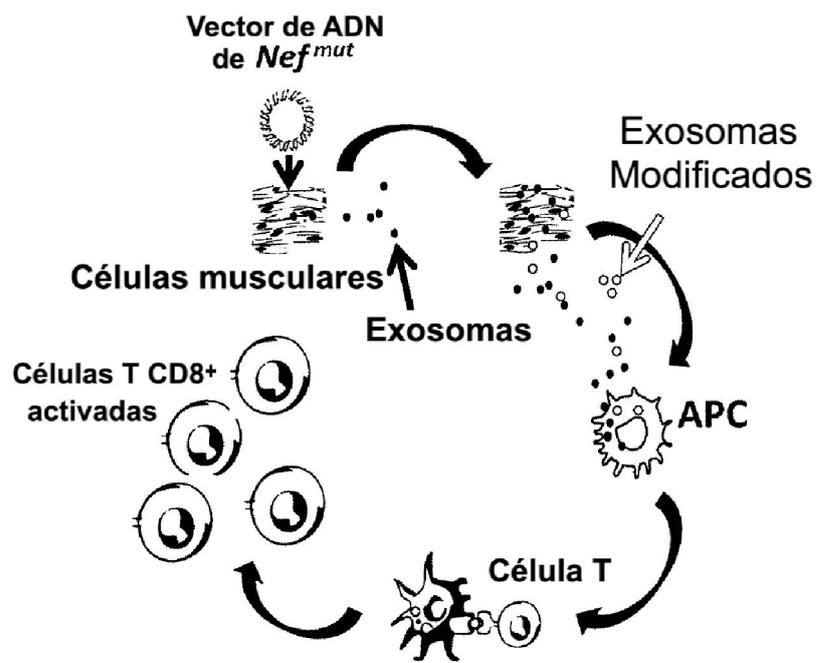


Fig. 1

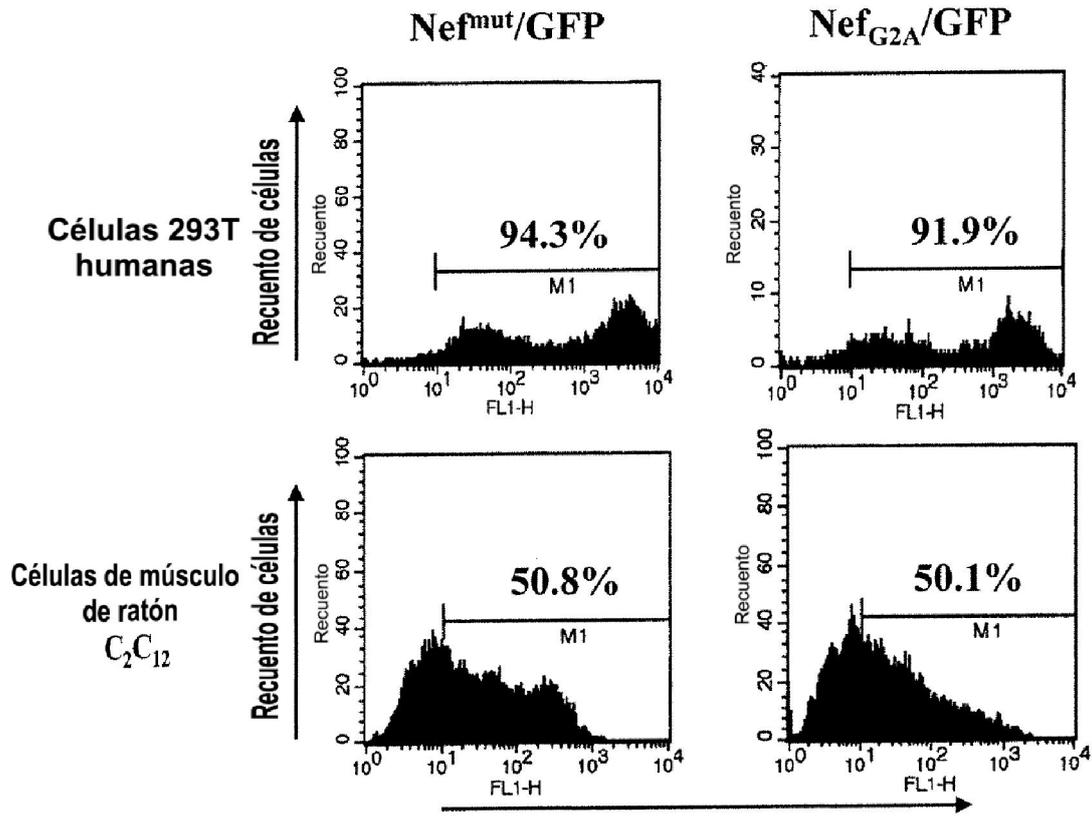


Fig. 2A

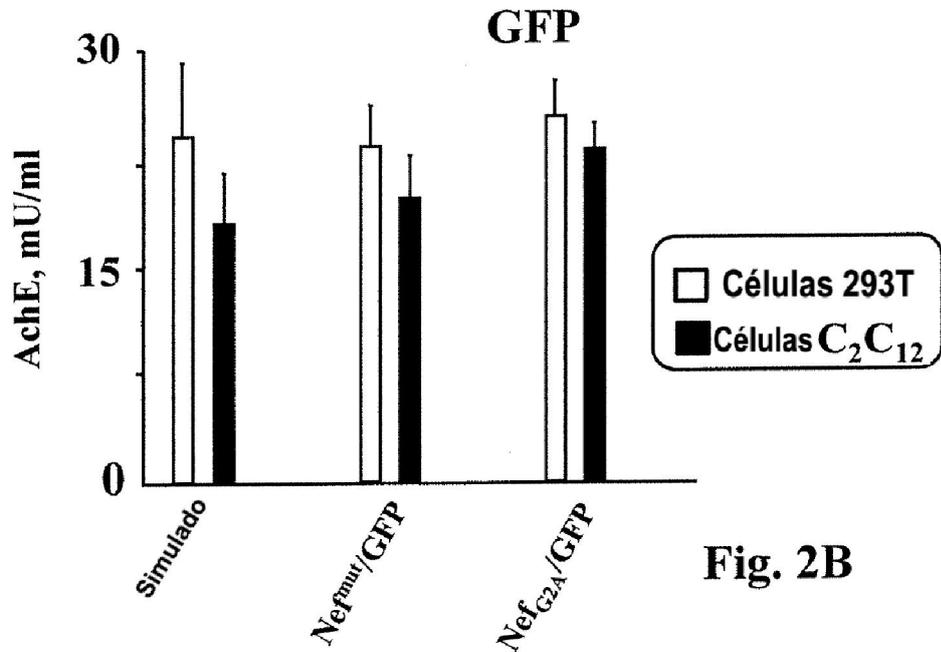


Fig. 2B

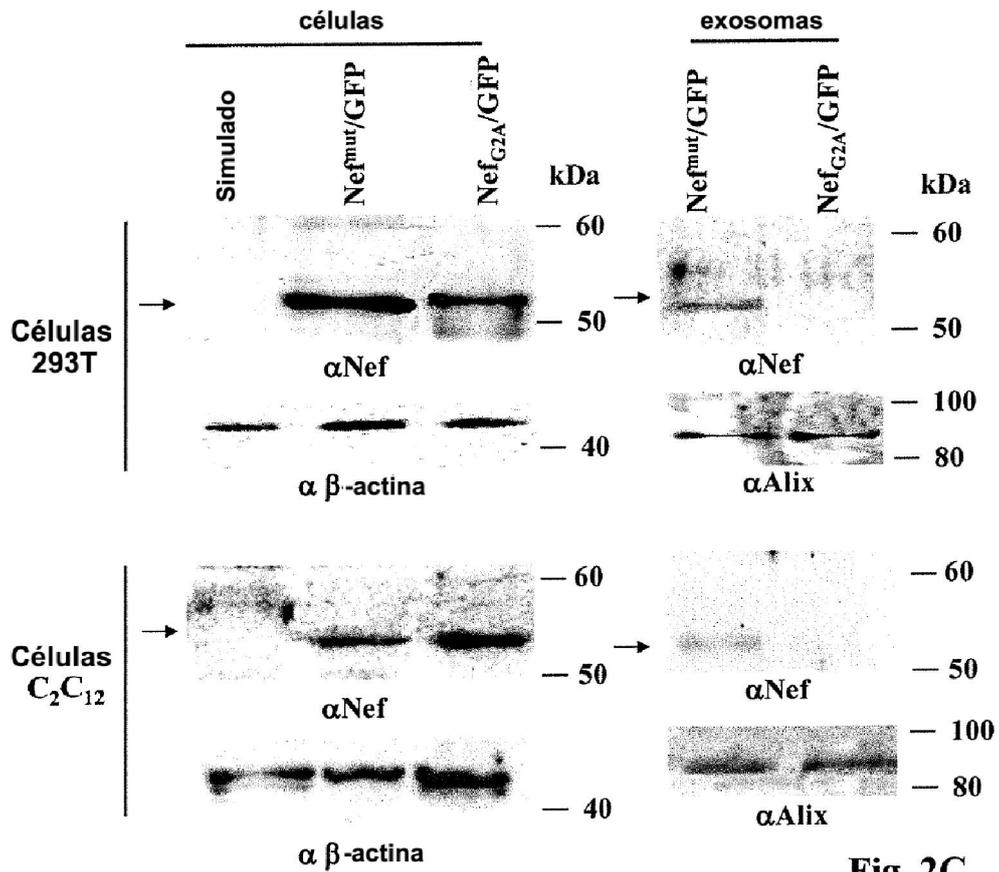


Fig. 2C

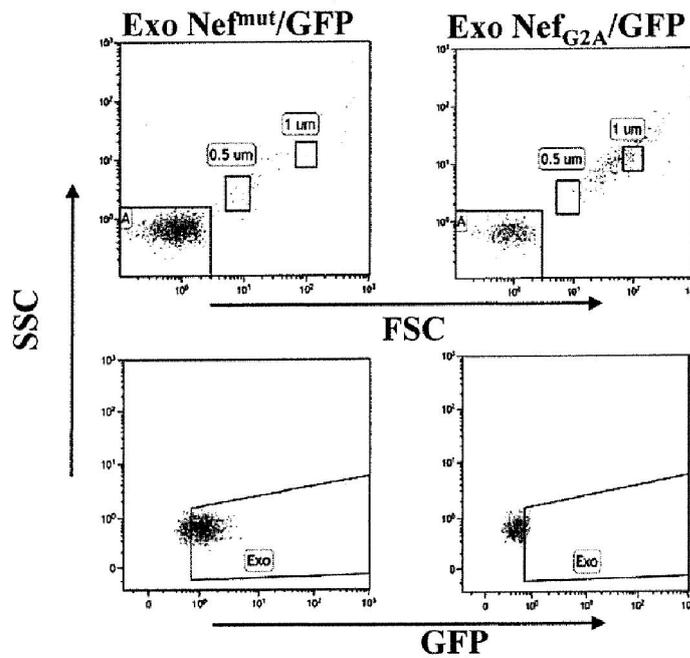
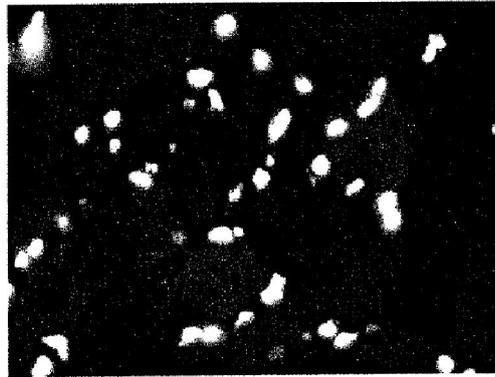
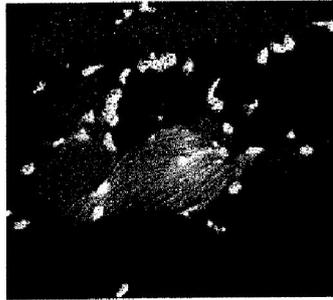


Fig. 2D

Vector



Nef^{mut}-GFP



Nef_{G2A}-GFP

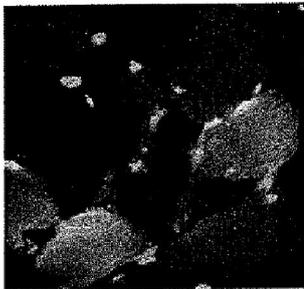


Fig. 3A

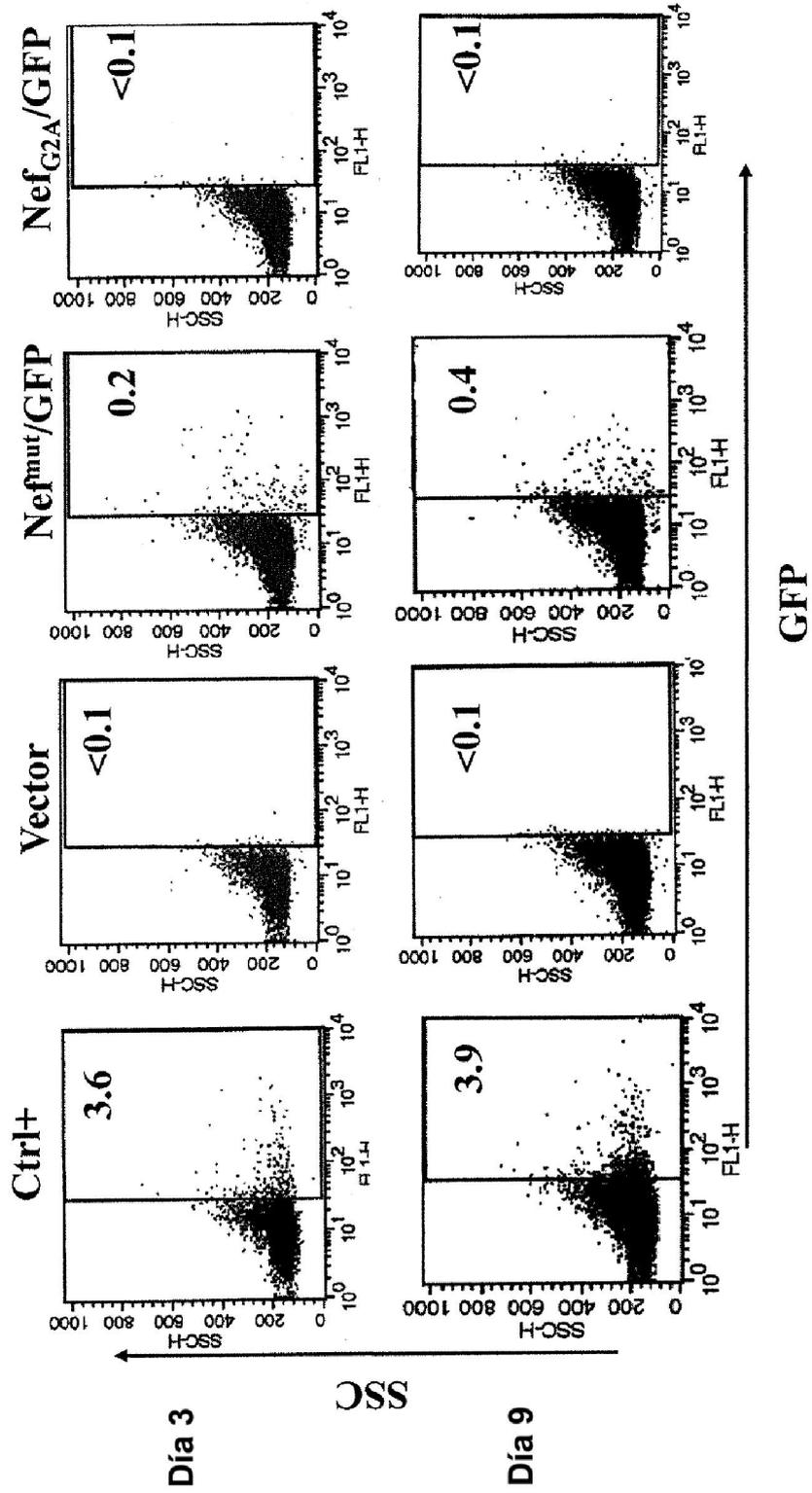


Fig. 3B

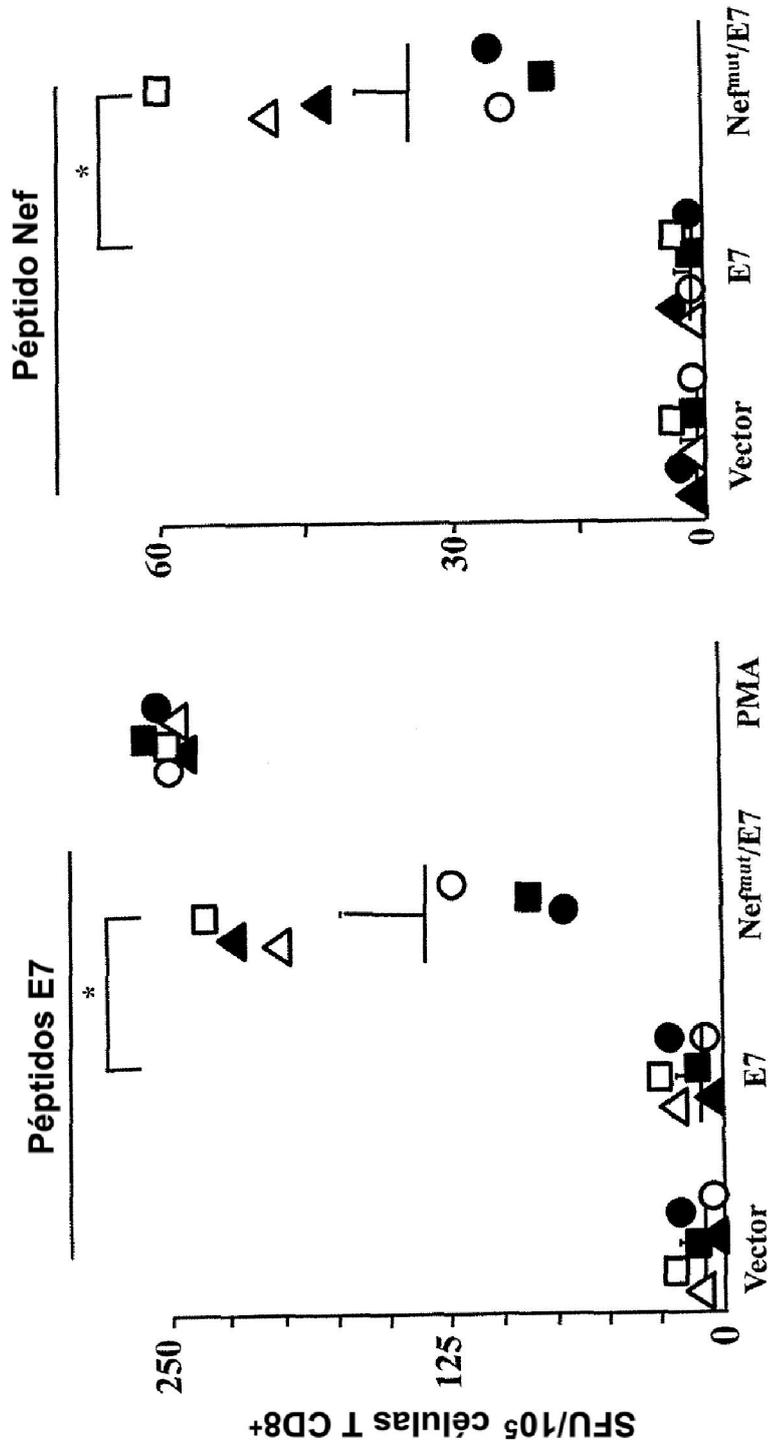


Fig. 4A

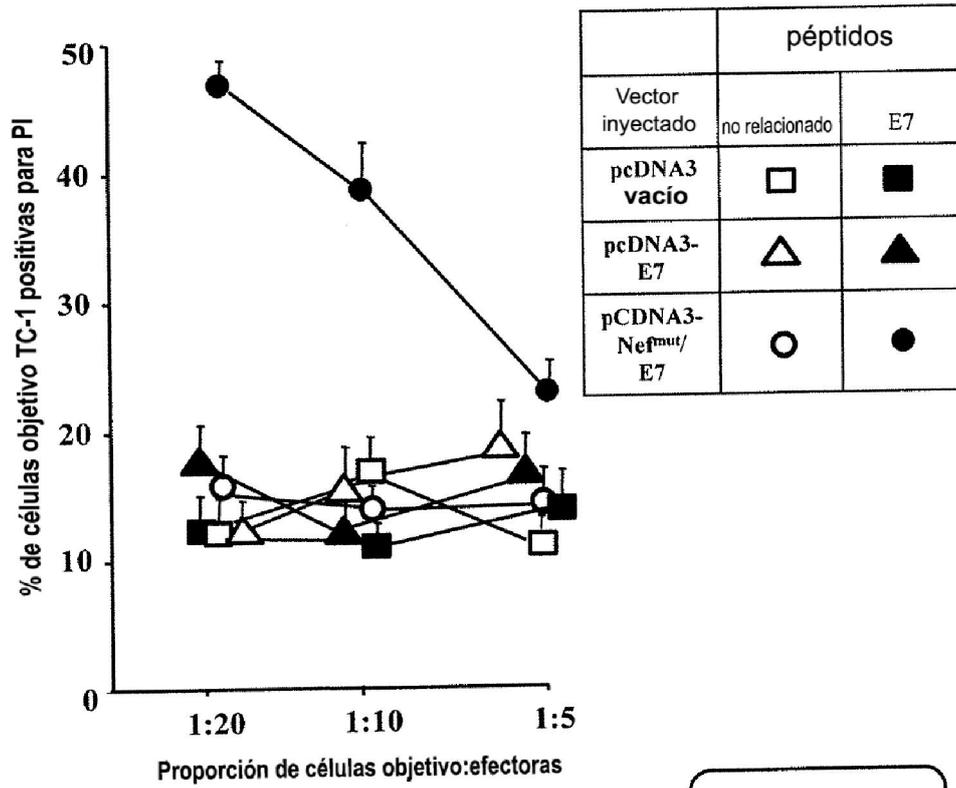


Fig. 4B

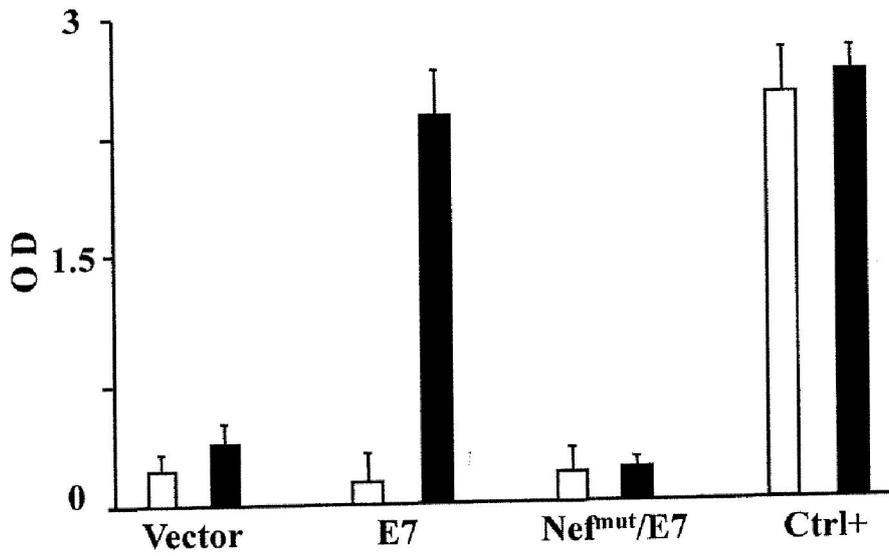
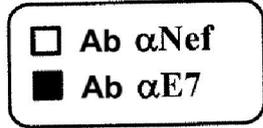


Fig. 4C

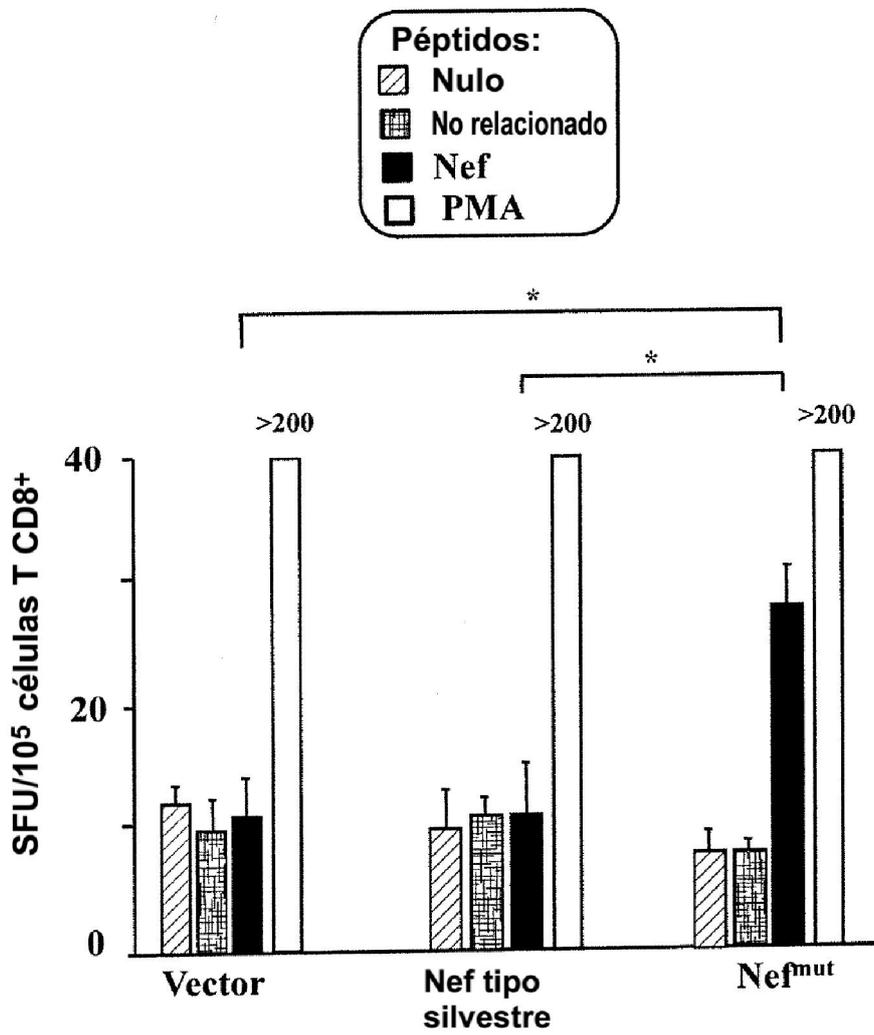


Fig. 5

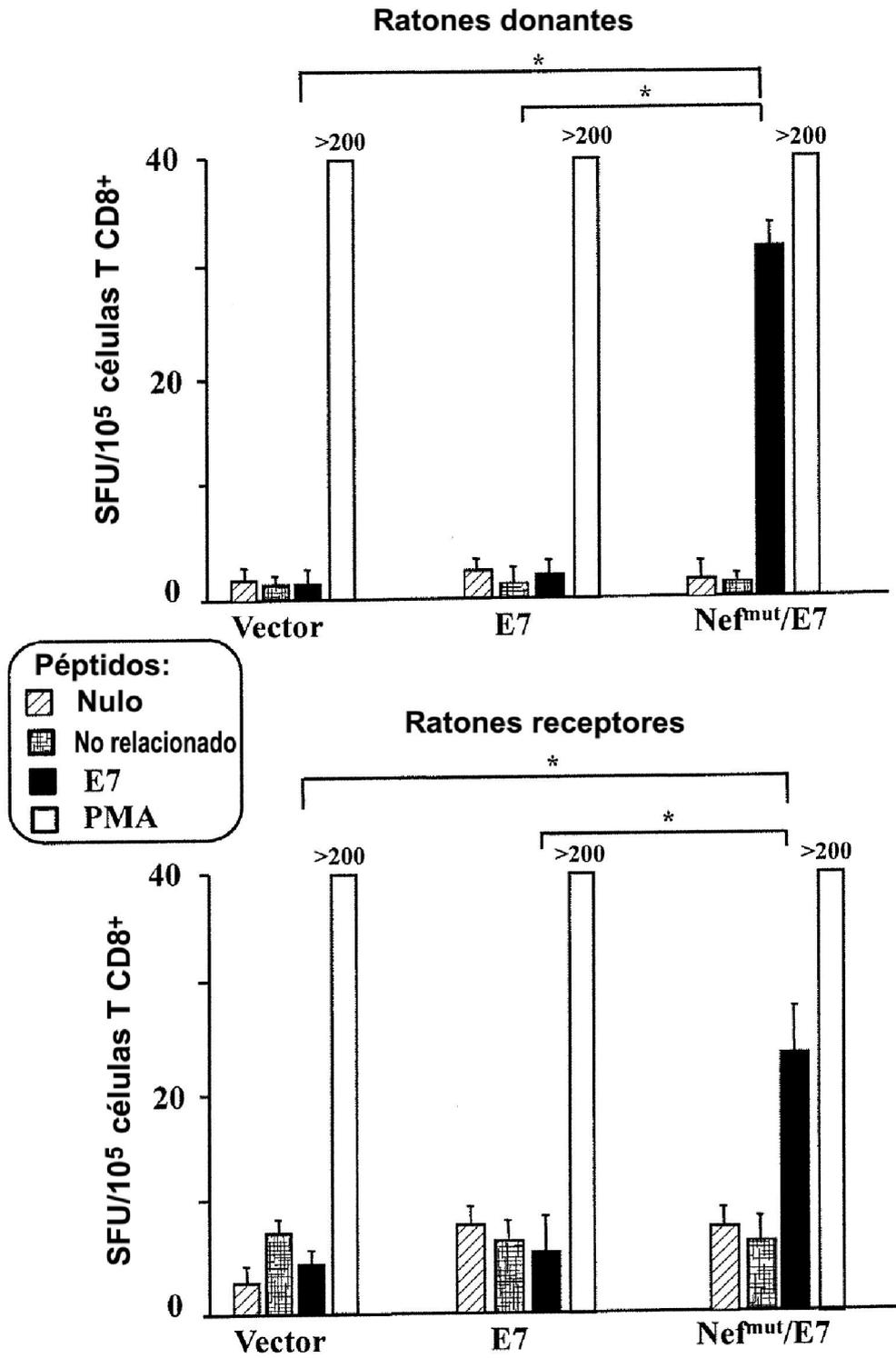


Fig. 6

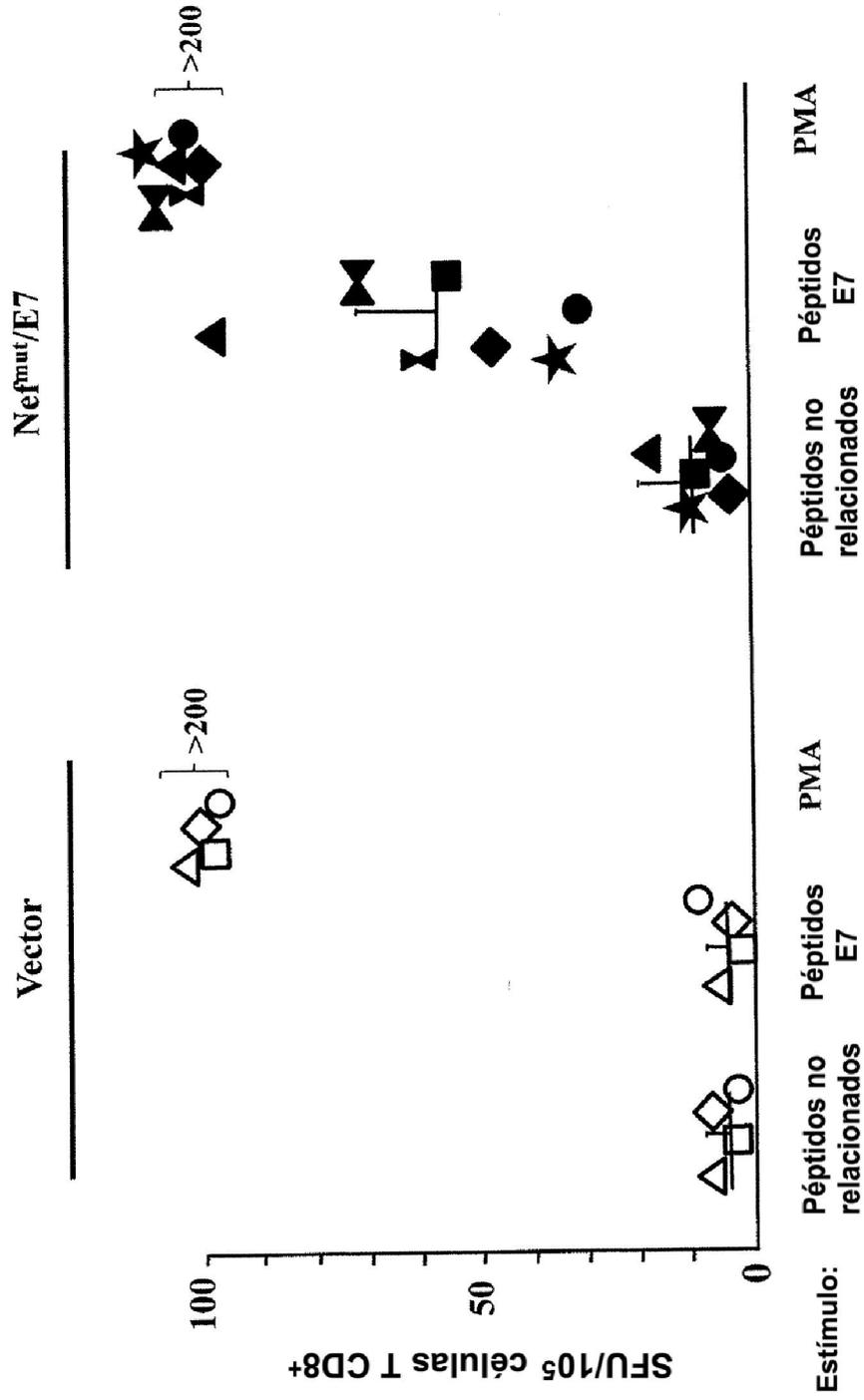


Fig. 7A

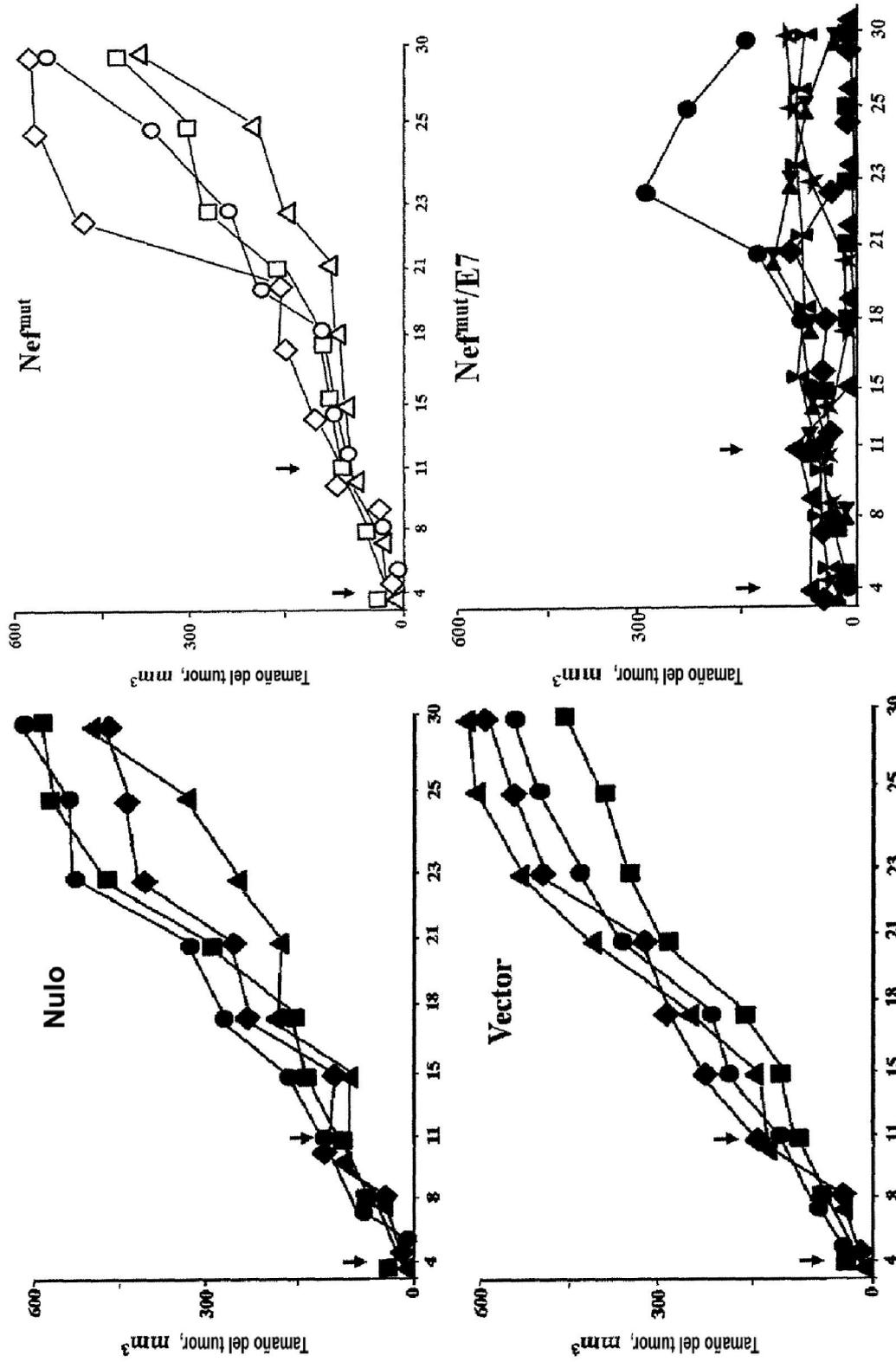


Fig. 7B

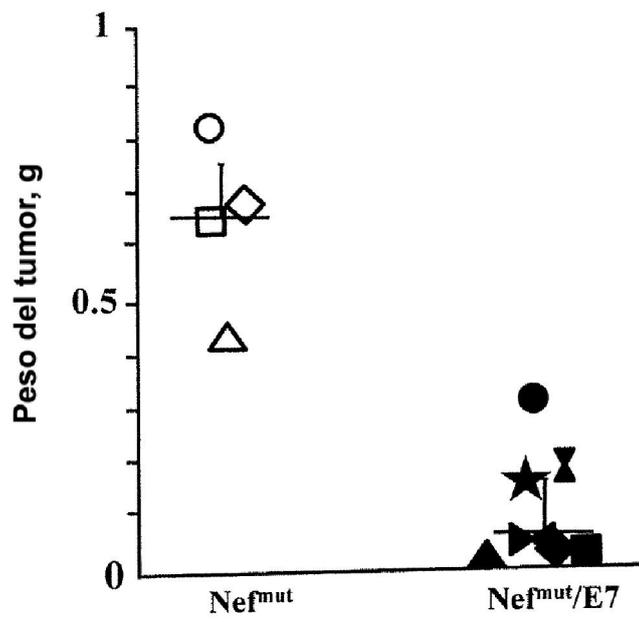


Fig. 7C

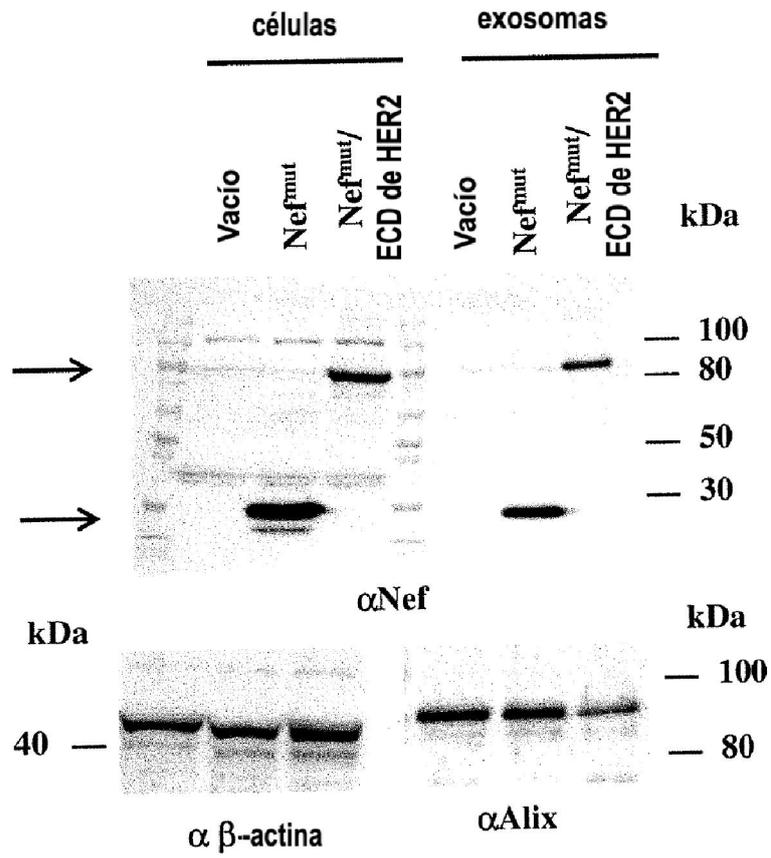


Fig. 8

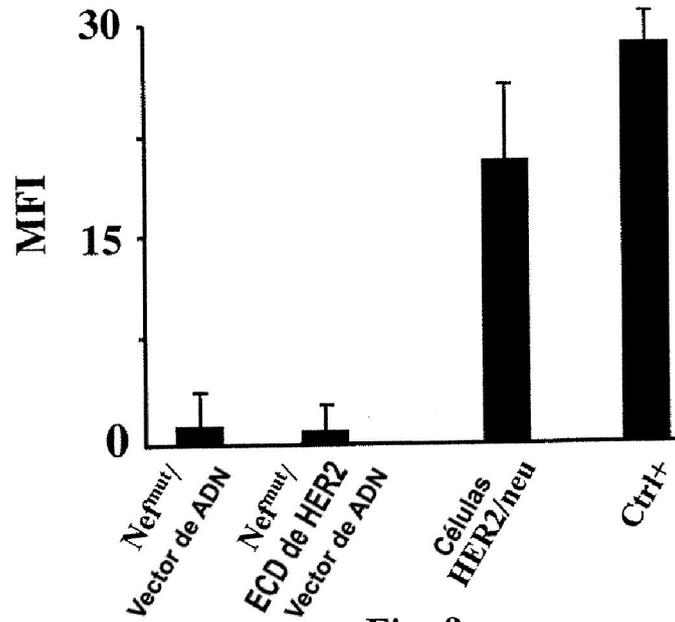


Fig. 9

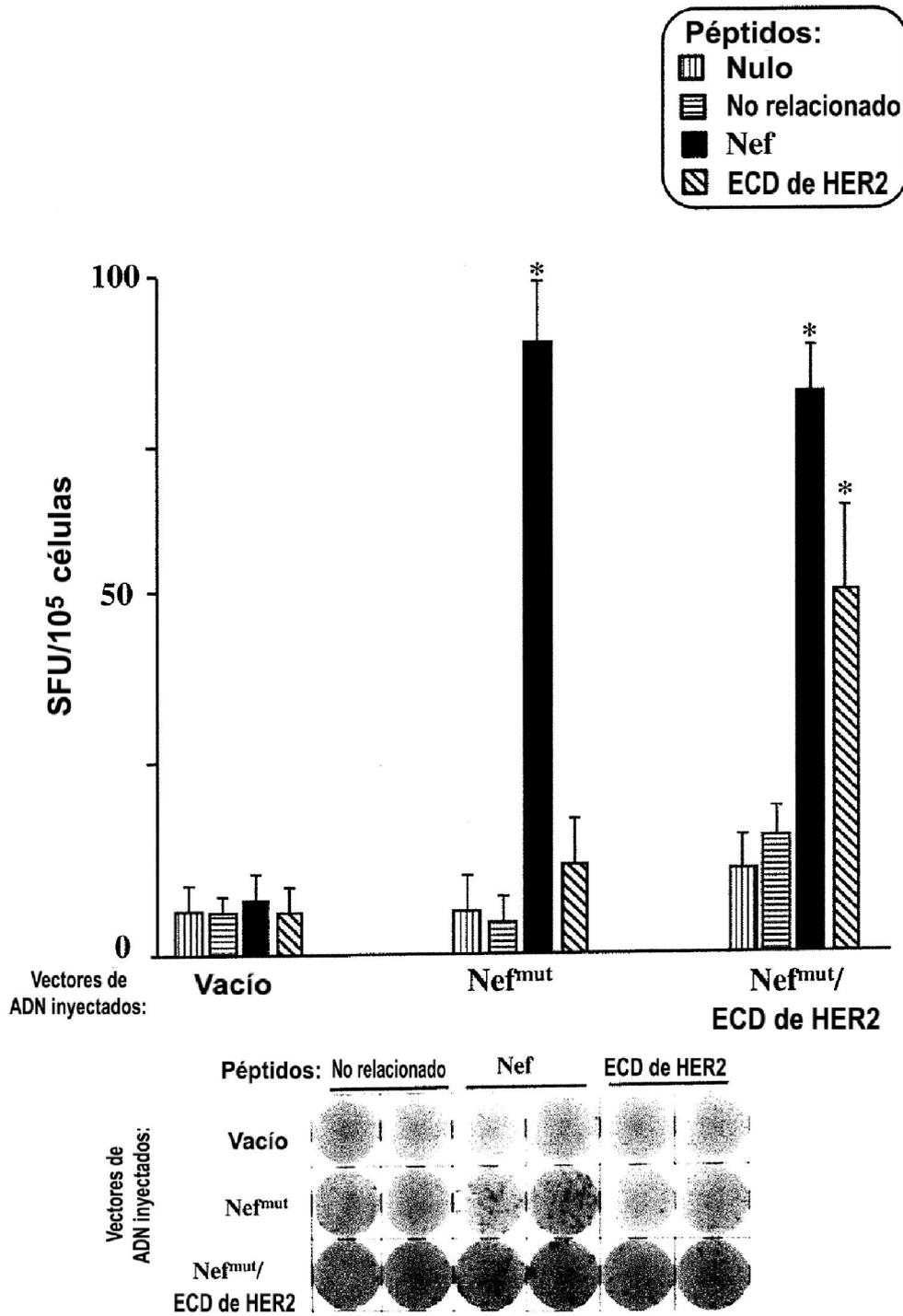


Fig. 10

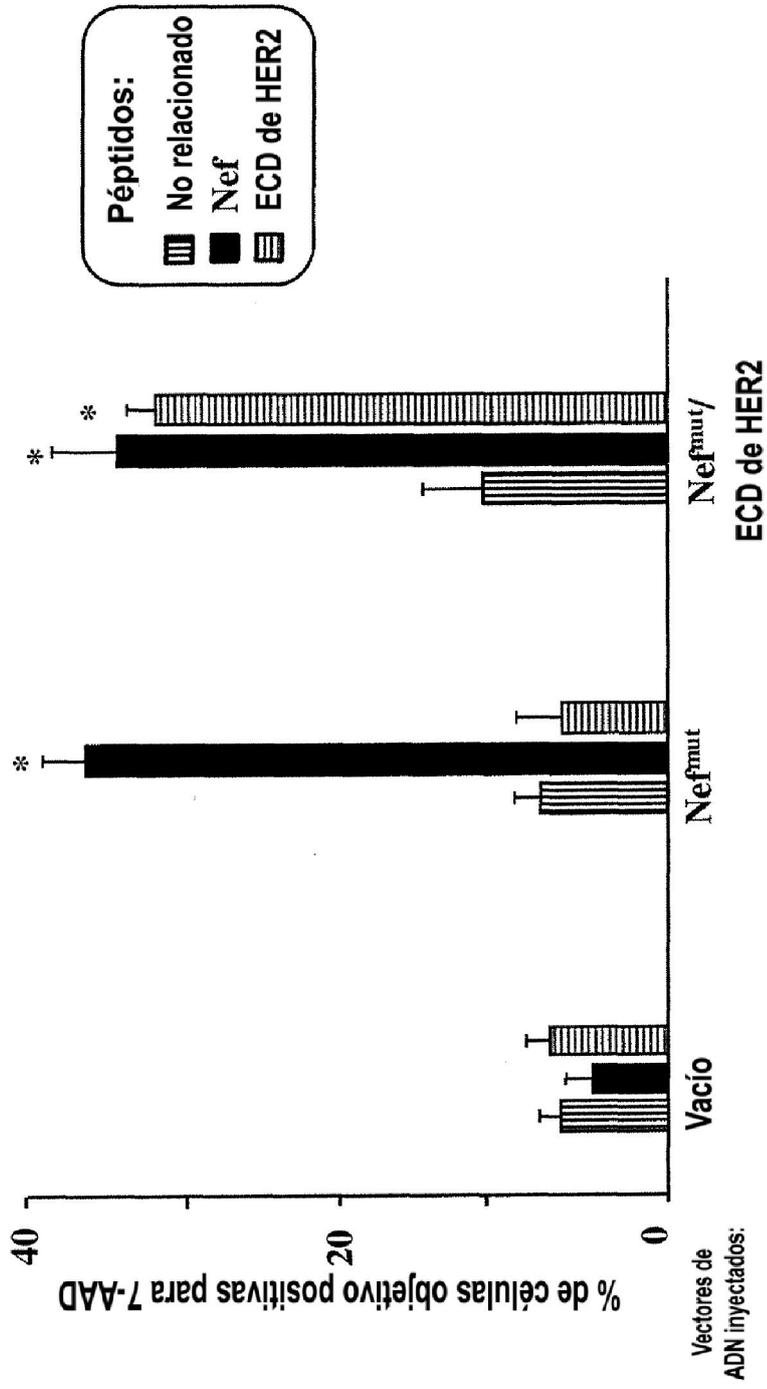


Fig. 11A

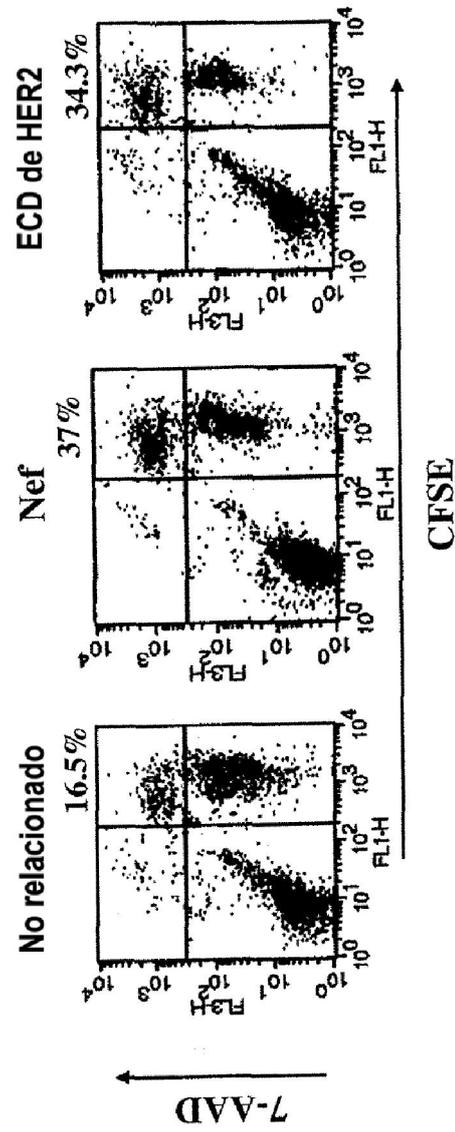


Fig. 11B

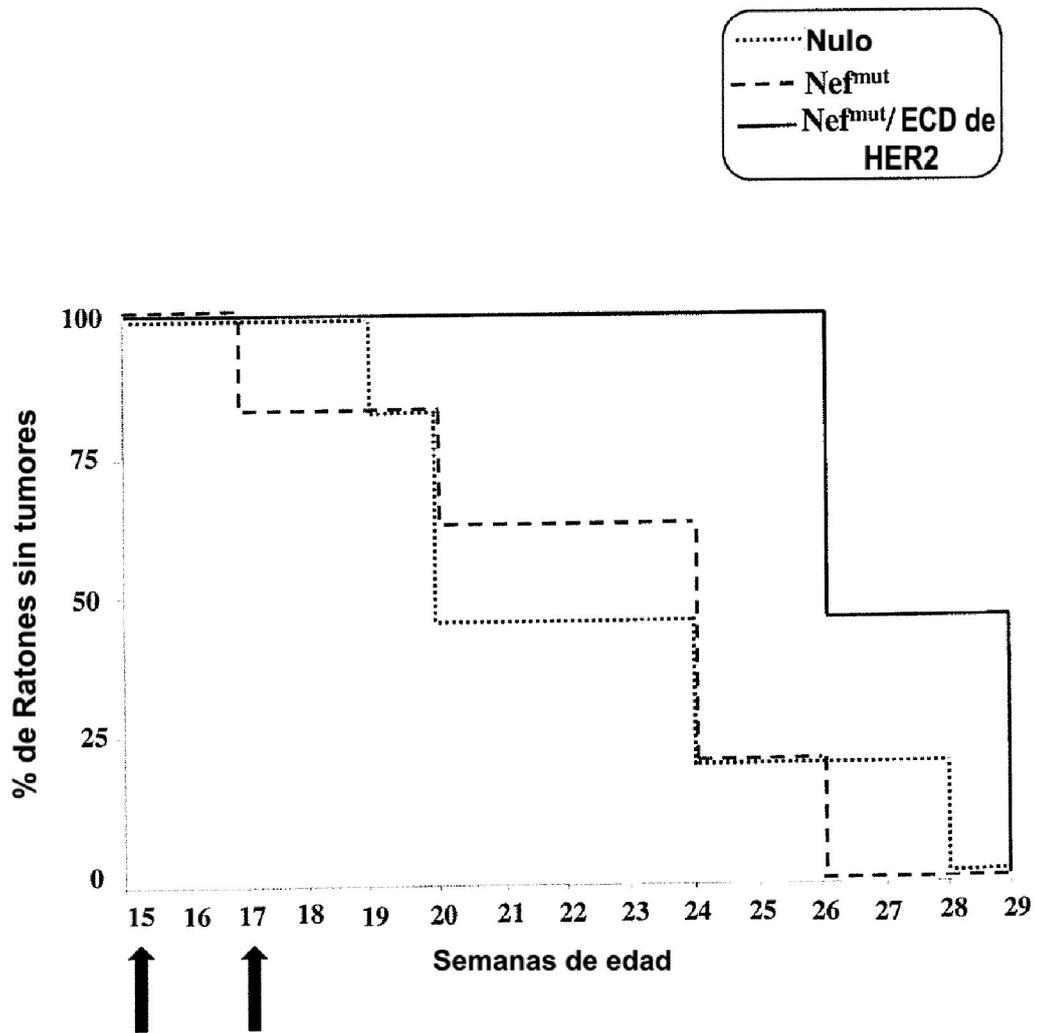


Fig. 12A

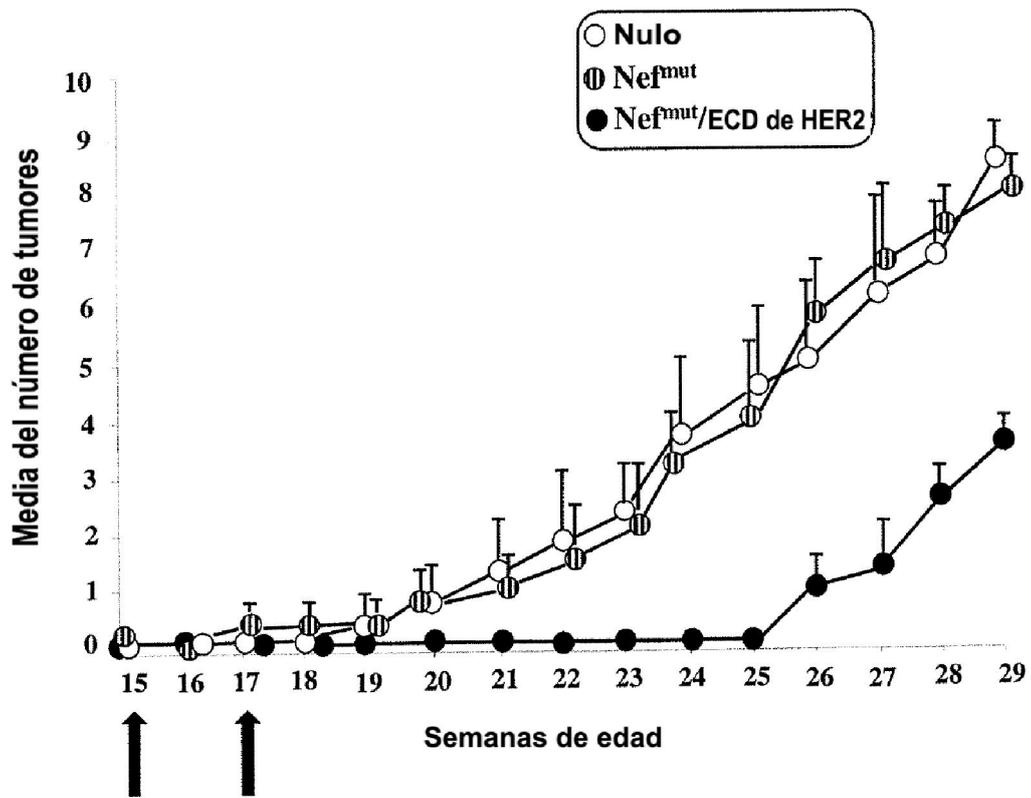


Fig. 12B

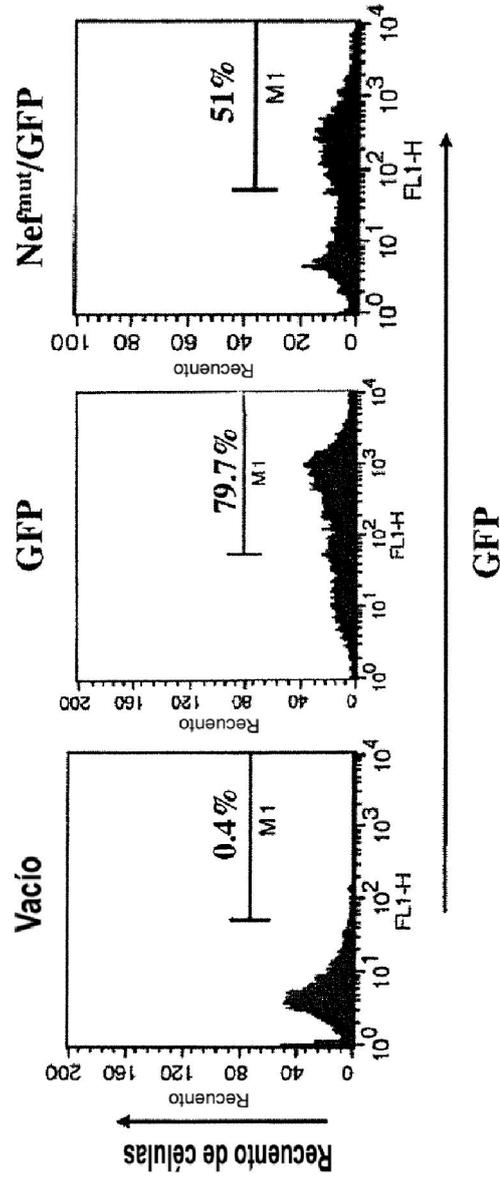


Fig. 13A

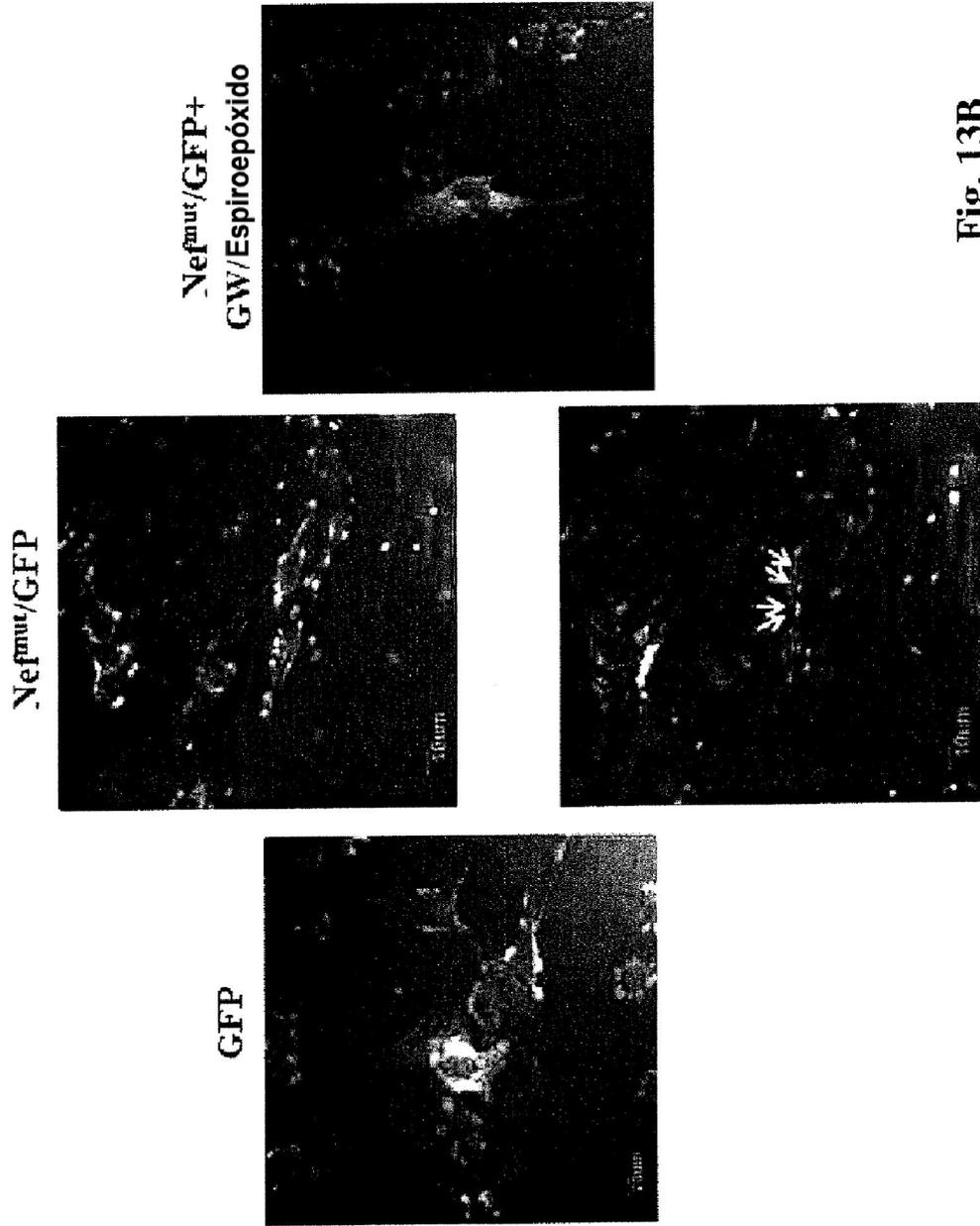


Fig. 13B

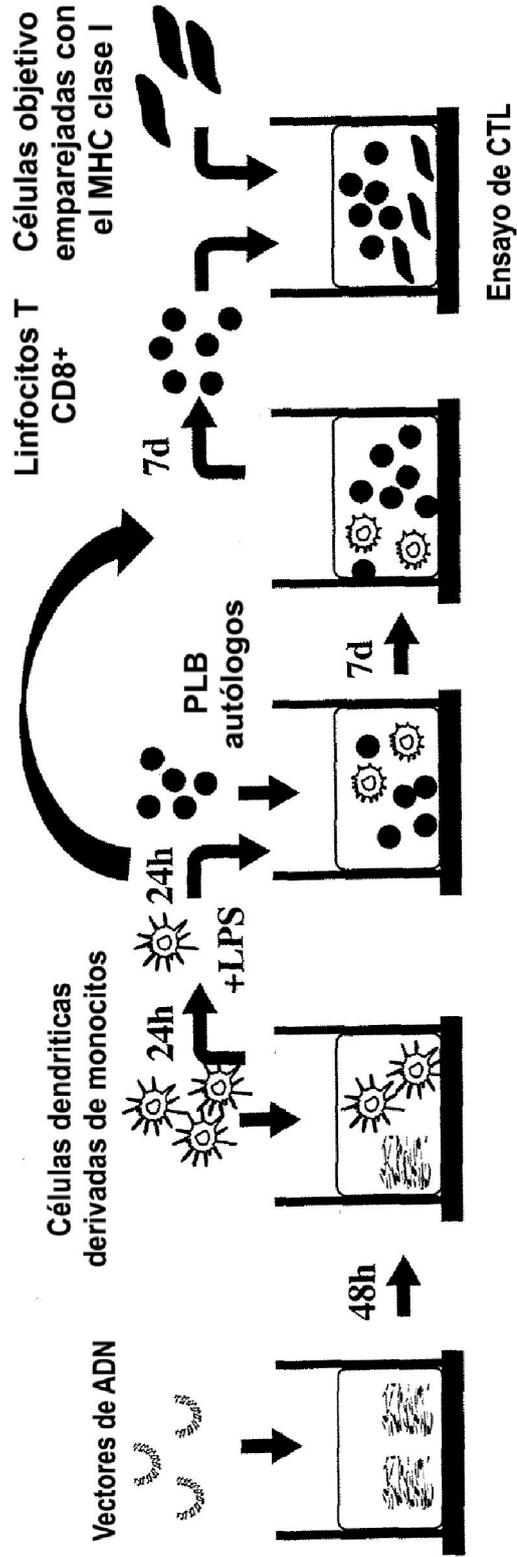


Fig. 14A

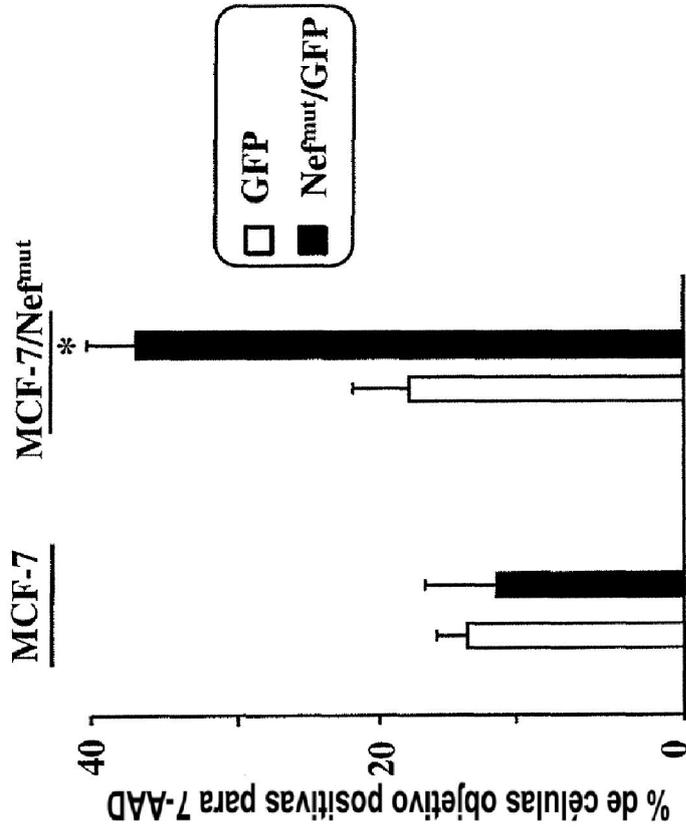


Fig. 14C

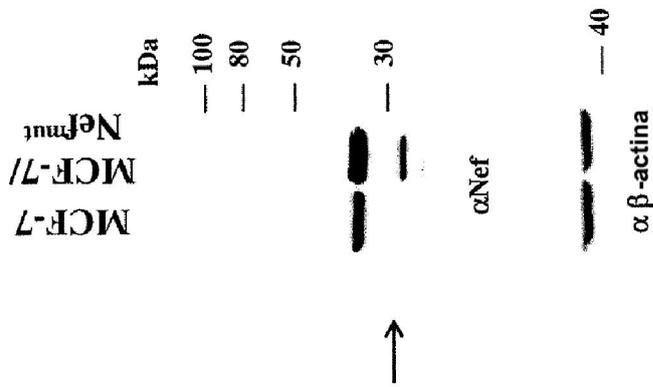


Fig. 14B

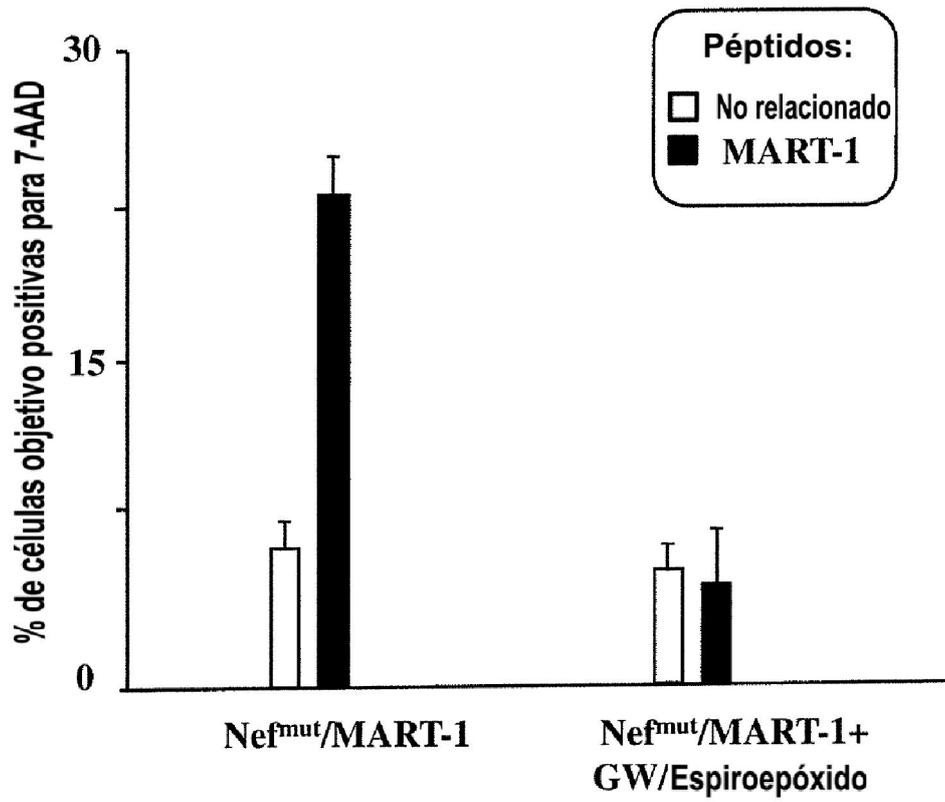


Fig. 15