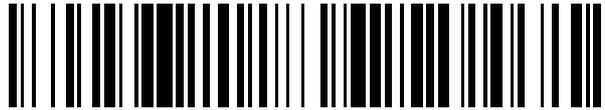


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 734**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19	(2006.01)
C12N 15/87	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61K 38/20	(2006.01)
C07K 14/525	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2016 PCT/US2016/012759**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2016 WO16112359**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2016 E 16735524 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3242947**

54 Título: **Terapia génica y electroporación para el tratamiento de neoplasias malignas**

30 Prioridad:

09.01.2015 US 201562101850 P
27.02.2015 US 201562126300 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2021

73 Titular/es:

ONCOSEC MEDICAL INCORPORATED (100.0%)
24 N Main Street
Pennington, NJ 08534, US

72 Inventor/es:

PIERCE, ROBERT, H. y
WRIGHT, JOCELYN, H.

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 809 734 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

Terapia génica y electroporación para el tratamiento de neoplasias malignas

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona el suministro intratumoral de inmunomoduladores. En particular, proporciona el suministro de moléculas coestimuladoras por electroporación intratumoral.

10 Antecedentes de la invención

La inmunoterapia ha llamado la atención recientemente como un cuarto método después de la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia para el tratamiento de tumores. Dado que la inmunoterapia usa la inmunidad inherente a los humanos, se dice que la carga física sobre los pacientes es menor en la inmunoterapia que en las otras terapias. Los enfoques terapéuticos conocidos como inmunoterapias incluyen: terapia de transferencia celular en la cual las células, tales como las células activadas por linfocinas, las células T asesinas naturales o las células T $\gamma\delta$ obtenidas, por ejemplo, a partir de linfocitos T citotóxicos inducidos exógenamente (CTL) o linfocitos de sangre periférica por cultivo de expansión se transfieren mediante el uso de diversos métodos; terapia de transferencia de células dendríticas o terapia de vacuna peptídica mediante la cual se espera la inducción in vivo de CTL específicos de antígeno; terapia con células Th1; y la terapia génica inmunitaria en la que los genes que se espera que tengan diversos efectos se introducen ex vivo en las células mencionadas anteriormente para transferirlas in vivo. En estas inmunoterapias, tradicionalmente se sabe que las células T CD4 positivas y las células T CD8 positivas desempeñan un papel fundamental.

25 Las células T CD8 positivas son células efectoras principales que son capaces de destruir directamente las células tumorales in vivo e in vitro. Estas células son estrictamente específicas para los péptidos antigénicos presentados por las moléculas MHC Clase 1. Por el contrario, las especificidades antigénicas de las células NKT no son tan estrictas, y se consideran células efectoras que muestran respuestas inmunes intrínsecas.

30 Se considera que las células T CD4 positivas tienen un papel fundamental para regular las respuestas inmunitarias antitumorales a través de una pluralidad de mecanismos, aunque no destruyen los tumores directamente. Las células T CD4 positivas que han reconocido un péptido antígeno tumoral representado por las moléculas MHC de clase II promueven la activación y proliferación de los CTL a través de la interacción con las células presentadoras de antígeno (APC).

35 Por el contrario, se ha demostrado que las células CD25 positivas/CD4 positivas (células T reguladoras: Treg) inhiben las respuestas inmunitarias antitumorales y la progresión de diversas enfermedades autoinmunes (véanse los documentos US 2003049696 y S. Sakaguchi y otros, Immunol. Rev. 182 (2001), págs. 18-32). Específicamente, dado que las células T reguladoras suprimen la actividad de las células T citotóxicas CD8 positivas a través del control de la función auxiliar al dirigirse a las células T CD4 positivas, se considera que algunos tumores usan este sistema para su proliferación, evitando así el ataque del sistema inmune.

45 El GITR, que se ha encontrado como un gen expresado en células T reguladoras ("Tregs"; ver S. Sakaguchi y otros, Immunol. Rev. 182 (2001), págs. 18-32), es un receptor de proteína transmembrana de la superficie celular y un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR). Se ha demostrado que el GITR está presente constitutivamente en Tregs y células T activadas. El GITR se une a otra proteína transmembrana denominada ligando GITR (en lo sucesivo denominado "GITR-L"). Se ha demostrado que los anticuerpos agonistas contra GITR anulan la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras, lo que sugiere que el GITR desempeña un papel funcional en la regulación de la actividad de las células T reguladoras a través de GITR (ver McHugh y otros, Immunity 16 (2002), págs. 311- 23). De manera similar, otras moléculas coestimuladoras como CD137, CD134, CD40L, CD27, etc. también funcionan para estimular la inmunidad.

55 La electroporación in vivo es una técnica de suministro de genes que se ha usado con éxito para la administración eficiente de ADN plasmídico a muchos tejidos diferentes. Los estudios han informado de la administración de electroporación in vivo para el suministro de ADN plasmídico a melanomas B16 y otros tejidos tumorales. La expresión sistémica y local de un gen o ADNc codificado por un plásmido puede obtenerse con la administración de electroporación in vivo. El uso de la electroporación in vivo mejora la captación de ADN plasmídico en el tejido tumoral, lo que resulta en la expresión dentro del tumor, y suministro de plásmidos al tejido muscular, lo que resulta en la expresión sistémica de proteínas secretadas, tales como las citocinas (ver, por ejemplo, el documento US8026223).

60 Se ha demostrado que la electroporación puede usarse para transfectar células in vivo con ADN plasmídico. Estudios recientes han demostrado que la electroporación es capaz de mejorar el suministro de ADN plasmídico como agente antitumoral. La electroporación se ha administrado para el tratamiento de carcinomas hepatocelulares, adenocarcinoma, tumores de mama, carcinoma de células escamosas y melanoma B16.F10 en modelos de roedores. 65 Los modelos de tumor singeneico murino B16.F10, CT-26 y MC-38 se han usado ampliamente para probar protocolos

de inmunoterapia potenciales para el suministro de una molécula inmunomoduladora que incluye citocinas como proteína recombinante o mediante terapia génica.

5 Pueden usarse varios protocolos conocidos en la técnica para el suministro del plásmido que codifica un agonista coestimulador que usa electroporación in vivo para el tratamiento del cáncer. Los protocolos conocidos en la técnica describen la terapia génica basada en citocinas mediada por electroporación in vivo, tanto intratumoral como intramuscular, mediante el uso de corrientes de pulso larga y baja tensión.

10 En consecuencia, lo que se necesita en la técnica es un protocolo de electroporación para el suministro de un plásmido que codifique un agonista coestimulador, como un agonista GITRL, CD137, CD134, CD40L y CD27, que proporcionará resultados sustancialmente mejorados en la regresión de tumores cancerosos, tales como el melanoma, al tiempo que mejora sustancialmente las tasas de supervivencia a largo plazo.

15 El documento US 8,802,643 describe un método para tratar tumores cancerosos que incluye inyectar una dosis efectiva de un plásmido codificado para IL-12, B7-1 o IL-15 en un tumor canceroso y posteriormente administrar al tumor al menos un pulso de alta tensión y corta duración. Se descubrió que los tratamientos intratumorales que usan electroporación no solo produjeron regresión tumoral sino que también indujeron una respuesta de memoria inmune que evitó la formación de nuevos tumores. Stone Geoffrey William y otros, The FASEB Journal, Federation of American Societies for Experimental Biology, Estados Unidos, Vol. 19, núm. 5, Supl. S, Parte 2, 28 de febrero de 2005, páginas
20 A1403-1404 describe el tratamiento de tumores murinos establecidos mediante inyecciones peritumorales de ADN plasmídico para el ligando multimérico soluble CD40 y el ligando GITR.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 muestra la estructura de construcciones recombinantes unidas a la membrana y de GITRL humano soluble, OX40L y 4-1BBL. Los genes recombinantes mostrados se insertan en la cadena principal del plásmido pUMVC3. Las proteínas solubles que contienen un solo dominio extracelular (ECD) y un motivo de trimerización GCN4pII se denotan: GITRL4, OX40L4 y 4-1BBL4. Las proteínas solubles con tres ECD consecutivos se denominan Trímero de Cadena Única (SCT) con y sin uno de los tres dominios de anticuerpos Fc añadidos (IgG1 humana, IgG1 de ratón e IgG2a de ratón). Las formas unidas a la membrana que contienen un dominio transmembrana heterólogo (TM) se denominan GITRL4-TM1 y SCT-TM. También se crearon formas idénticas con el ECD de ratón en lugar del ECD humano para estudios preclínicos.

35 La Figura 2 muestra un ELISA funcional que muestra la unión de proteínas GITRL4 recombinantes solubles a la proteína de fusión soluble G1TR-Fc.

40 La Figura 3 muestra la señalización dependiente del ligando G1TR recombinante de G1TR a la expresión del gen de luciferasa dirigida por NFkB en un ensayo de cotransfección HEK 293. El gráfico de barras muestra las unidades de actividad de luciferasa relativas en los lisados celulares. Los valores son la media +/- la SD para la actividad medida a partir de tres lisados de cotransfecciones separadas.

45 La Figura 4 muestra la actividad de las proteínas GITRL recombinantes de la superficie celular en cocultivo con células indicadoras Jurkat de un ensayo de potencia G1TR Promega. RLU son las unidades de luciferasa relativas. Las EC50 se expresan como el número de células transducidas con GITRL en el ensayo de cocultivo

50 La Figura 5 muestra la reducción de tumores subcutáneos CT26 primarios, tratados (Figura 5A) y contralaterales, no tratados (Figura 5B) en ratones BALB/c con electroporación intratumoral de plásmidos que codifican proteínas GITRL recombinantes de ratón. Los tumores no tratados y los tumores de ratones tratados sistémicamente con el anticuerpo agonista G1TR, DTA-1 se muestran para comparación. Las mediciones del volumen tumoral se grafican como medios con SD; * = p < 0,01 vs. Sin tratamiento; # = p < 0,05 vs. Sin tratamiento.

55 La Figura 6 muestra que la electroporación intratumoral de los plásmidos que codifican proteínas GITRL de ratón aumentó las células T CD8+CD44 de unión al dextrámero AH1 en el bazo 4 días después de un solo tratamiento. Se muestran gráficos de puntos bidimensionales con tinción de intensidad de fluorescencia logarítmica con anti-CD44 (eje x) y el péptido AHI unido a dextrámeros (eje y). Los esplenocitos de ratones no tratados y tratados con DTA-1 se muestran para comparación. Los datos presentados en cada gráfico son de esplenocitos de un solo ratón.

60 La Figura 7 muestra que la electroporación intratumoral de plásmidos que codifican proteínas GITRL de ratón disminuyó la expresión del gen Foxp3 en linfocitos que infiltran tumores en comparación con la electroporación con control de vector vacío pUMVC3. Cada punto representaba valores por triplicado de RT-PCR de un solo ratón. Se aisló ARN total de múltiples ratones con tumores CT26: n = 6 para las cohortes EP/vector vacío y DTA-1, y n = 14 para la cohorte EP/GITRL4. El % de expresión génica es relativo al valor promedio para la
65 cohorte de control de vector vacío.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un plásmido para usar en un método para el tratamiento de neoplasias malignas, en donde la administración del plásmido que codifica para una proteína coestimuladora terapéutica y un ácido nucleico que codifica al menos una citocina inmunoestimuladora, en combinación con la electroporación tiene un efecto terapéutico en tumores primarios, así como en tumores distantes y metástasis.

La presente invención proporciona el plásmido para usar en un método de tratamiento de un sujeto con un tumor canceroso, el método que comprende: inyectar al tumor canceroso una dosis efectiva del plásmido que codifica para una proteína terapéutica y un ácido nucleico que codifica al menos una citocina inmunoestimuladora; y administrar terapia de electroporación al tumor, la terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión de 200 V/cm a 1500 V/cm sobre un ancho de pulso de 100 microsegundos a 20 milisegundos. En ciertas modalidades, el tumor canceroso es melanoma. El plásmido que codifica la proteína terapéutica es un plásmido que codifica una forma soluble de una molécula coestimuladora, y la molécula coestimuladora se selecciona de agonistas de GITR, CD137, CD134, CD40L y CD27. En una modalidad adicional, el plásmido codifica además la al menos una citocina inmunoestimuladora, que puede seleccionarse de IL-12, IL-15 y una combinación de IL-12 e IL-15. En ciertas modalidades, el pulso de tensión suministrado al tumor es de 200 V/cm a 1500 V/cm.

La presente invención proporciona el plásmido para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con un tumor canceroso, el método que comprende: administrar un primer tratamiento en el momento T1, en donde el primer tratamiento comprende además inyectar el tumor canceroso con una primera dosis efectiva del plásmido que codifica para la proteína terapéutica y administrar una primera terapia de electroporación al tumor en el momento T1, la primera terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión que tiene una duración de 100 microsegundos a 20 milisegundos; y administrar un segundo tratamiento en el momento T2, en donde el momento T2 es un tiempo posterior al momento T1, en donde el segundo tratamiento comprende además inyectar el tumor canceroso con una segunda dosis efectiva del plásmido que codifica para la proteína terapéutica y administrar una segunda terapia de electroporación para el tumor en el momento T2, la segunda terapia de electroporación comprende además la administración de al menos un pulso de tensión con una duración de 100 microsegundos a 20 milisegundos. En ciertas modalidades, el tumor canceroso es melanoma. La proteína terapéutica es una molécula coestimuladora seleccionada de una forma soluble de agonistas de GITR-L, CD137, CD134, CD40L y CD27. En otra modalidad, el plásmido codifica además al menos una citocina inmunoestimuladora, elegida entre IL-12, IL-15, y una combinación de IL-12 e IL-15. En ciertas modalidades, el pulso de tensión suministrado al tumor es de 200 V/cm a 1500 V/cm. En otra modalidad, se añade un tercer tratamiento en el momento T3, en donde el momento T3 es un tiempo posterior al momento T2, en donde el tercer tratamiento comprende además inyectar el tumor canceroso con una tercera dosis efectiva del plásmido que codifica para la proteína terapéutica y administrar una tercera terapia de electroporación al tumor, la tercera terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión con una duración de 100 microsegundos a 20 milisegundos. Ciertas modalidades implican inyectar una dosis efectiva del plásmido que codifica para una proteína terapéutica en el tumor canceroso del sujeto; y administrar la electroporación al sujeto por vía intratumoral mediante el uso de al menos un pulso de tensión bajo con un ancho de pulso de 100 microsegundos a 20 milisegundos y el pulso de tensión suministrado al tumor es de 200 V/cm a 1500 V/cm.

La presente invención proporciona el plásmido para su uso en un método de tratamiento de un sujeto con un tumor canceroso, el método que comprende: administrar un primer tratamiento en el momento T1, en donde el primer tratamiento comprende además inyectar el tumor canceroso con una primera dosis efectiva del plásmido que codifica para la proteína terapéutica y administrar una primera terapia de electroporación al tumor en el momento T1, la primera terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de que tiene una duración de 100 microsegundos a 0 milisegundos; administrar un segundo tratamiento en el momento T2, en donde el momento T2 es un tiempo posterior al momento T1, en donde el segundo tratamiento comprende además inyectar el tumor canceroso con una segunda dosis efectiva del plásmido que codifica para la proteína terapéutica y administrar una segunda terapia de electroporación al tumor en el momento T2, la segunda terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión con una duración de 100 microsegundos a 20 milisegundos; y administrar un tercer tratamiento en el momento T3, en donde el momento T3 es un tiempo posterior al momento T2, en donde el tercer tratamiento comprende además inyectar el tumor canceroso con una tercera dosis efectiva del plásmido que codifica para la proteína terapéutica y administrar una tercera terapia de electroporación al tumor, la tercera terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión alto con una duración de 100 microsegundos a 20 milisegundos. En ciertas modalidades, el tumor canceroso es melanoma. La proteína terapéutica es una molécula coestimuladora, seleccionada de una forma soluble de agonistas GITR-L, CD137, CD134, CD40L y CD27. En una modalidad adicional, el plásmido codifica al menos una citocina inmunoestimuladora, seleccionada de IL-12, IL-15, y una combinación de IL-12 e IL-15. En una modalidad particular, el pulso de tensión suministrado al tumor es de 200 V/cm a 1500 V/cm.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en este documento, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras como "un, una", "un, una" y "el, la" incluyen sus correspondientes referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 Definiciones

Como se usa en la presente descripción, "molécula coestimuladora" se refiere a un grupo de receptores/ligandos de la superficie de la célula inmune que se enganchan entre las células T y las células presentadoras de antígeno y generan una señal estimuladora en las células T que se combina con la señal estimuladora (es decir, "coestimulación") en células T que resulta del reconocimiento por parte del receptor de células T ("TCR") del antígeno en las células presentadoras de antígeno. Las moléculas coestimuladoras incluyen, pero no se limitan a, agonistas de GITR, CD137, CD134, CD40L, CD27 y similares.

Como se usa en la presente descripción, "coestimulador de activación de células T" se refiere a la capacidad de un ligando coestimulador para unirse y activar células T que se han activado a través del TCR. La activación coestimuladora puede medirse para las células T mediante la producción de citocinas como es bien conocido y mediante ensayos de proliferación como son bien conocidos y descritos en los ejemplos. La forma soluble de una molécula coestimuladora que es biológicamente activa también puede analizarse para determinar la unión al receptor afín en las células T activadas.

Como se usa en la presente descripción, una forma soluble de una molécula coestimuladora "derivada de una célula presentadora de antígeno" se refiere a una molécula coestimuladora expresada normalmente por células B, macrófagos, monocitos, células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno, que se han diseñado como se describe en la presente descripción para hacerlo soluble. Las moléculas coestimuladoras solubles preferidas derivadas de una célula presentadora de antígeno incluyen cualquiera de GITR-L, CD137-L, CD134-L (también conocido como OX40-L), CD40, CD28. La forma soluble de una molécula coestimuladora derivada de una célula presentadora de antígeno conserva la capacidad de la molécula coestimuladora nativa de unirse a su receptor/ligando afín en las células T y estimula la activación de las células T.

El término "agonista de la molécula coestimuladora" incluye moléculas solubles coestimuladoras y agonistas de contrapartes de unión de la molécula coestimuladora. Por ejemplo, la contraparte de unión de GITR-L es GITR. Los agonistas de GITR pueden incluir anticuerpos agonistas de GITR, polipéptidos de GITR-L, que incluye formas multiméricas solubles y transmembrana, imitadores de GITR u otras moléculas que comprometen e inducen la actividad biológica de GITR.

Como se usa en la presente descripción, el término ligando del receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides "GITR" (también conocido como GITR-L, TNFSF18 (superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 18)) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tienen función biológica como moléculas coestimuladoras que comparten al menos el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos el 90 % de identidad de secuencia, con preferencia al menos el 95 % de identidad de secuencia e incluso con la mayor preferencia al menos el 98 % de identidad de secuencia con GITR-L como se define en Swiss Prot Id. Núm. Q9UNG2).

Como se usa en la presente descripción, el término "CD137-L" o "agonista de CD137" (también conocido como ligando 4-1 BB o TNFL9) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga función biológica como moléculas coestimuladoras que comparten al menos el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos el 90 % de identidad de secuencia, con mayor preferencia al menos el 95 % de identidad de secuencia e incluso con la mayor preferencia al menos el 98 % de identidad de secuencia con CD137-L humano como se define en Swiss Prot Id. Núm. P41273.

El CD137-L humano es una proteína de membrana tipo II que contiene 254 aminoácidos (sin secuencia señal) (ver secuencia en Swiss Prot Id núm. P41273). La proteína contiene un dominio citoplasmático en los residuos 1-28, un dominio transmembrana en las residencias 29-49 y un dominio extracelular en los residuos 50-254. La secuencia de nucleótidos de CD137-L (1645 pb) está disponible en bases de datos públicas (ver el número de acceso de Genbank NM 003811). El CD137-L es descrito por Alderson y otros (1994) Eur J. Immunol. 24(9):2219-27. El CD137-L se expresa en las células presentadoras de antígeno, que incluye las células B, los monocitos y las células dendríticas esplénicas y los linfocitos T. El CD137-L interactúa con CD137 en las células T activadas.

Como se usa en la presente descripción, el término "CD134-L" o "agonista de CD134" (también conocido como ligando OX40 o TNRSF4) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica como moléculas coestimuladoras que comparten al menos el 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos el 90 % de identidad de secuencia, con mayor preferencia al menos el 95 % de identidad de secuencia e incluso con la mayor preferencia al menos el 98 % de identidad de secuencia con CD134-L, como se define en Swiss Prot Id. Núm. P23510.

65

5 El CD134-L humano es una proteína de membrana tipo II que contiene 183 aminoácidos (sin secuencia señal). La proteína contiene un dominio citoplasmático en los residuos 1-23, un dominio transmembrana en los residuos 24-50 y un dominio extracelular en los residuos 51-183. La secuencia de nucleótidos de CD134-L (3510 pb, con la secuencia de codificación 157-708) está disponible en bases de datos públicas (ver. el número de acceso de Genbank NM_003326.2). CD134-L es descrito por Godfrey y otros, J Exp Med. 1 de agosto de 1994; 180(2):757-62. CD134-L se expresa por las células dendríticas y otras APC y se une a CD134, que está presente en las células T activadas.

10 Como se usa en la presente descripción, el término "CD40" (también conocido como TNFRSF5 o receptor de ligando CD40) se refiere a una molécula específica asociada con este nombre y cualquier otra molécula que tenga una función biológica como moléculas coestimuladoras que comparten al menos el 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente al menos el 90 % de identidad de secuencia, con mayor preferencia al menos el 95 % de identidad de secuencia e incluso con la mayor preferencia al menos el 98 % de identidad de secuencia con CD40 como se define en Swiss Prot Id. Núm. P25942).

15 La secuencia de CD40 humano contiene 277 aminoácidos, de los cuales 20 aminoácidos en el extremo N representan la secuencia señal (ver secuencia en Swiss Prot Id núm. P25942). Un dominio transmembrana se encuentra en los residuos 194-215 y el dominio citoplasmático se encuentra en los residuos 216-277. La secuencia de nucleótidos de CD40 (1177 pb) está disponible en bases de datos públicas (ver el número de acceso de Genbank NM_001250). CD40 y varias isoformas son descritas por Tone y otros Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 98 (4), 1751-1756
20 (2001). CD40 se expresa por monocitos y las células B se unen a CD40-L (también conocido como ligando CD40 o CD153) expresado por las células T activadas.

25 Como se usa en la presente descripción, "CD28" es una glicoproteína transmembrana de tipo I y es miembro de la familia de las inmunoglobulinas en virtud de su dominio extracelular único de tipo variable Ig que tiene un motivo MYPPPY (SEQ ID NO: 639) requerido para unirse a CD80 y CD86 (Peach y otros (1994) J. Exp. Med. 180: 2049-2058). CD28 tiene un residuo de cisteína ubicado después del dominio de tipo variable Ig, que está involucrado en su homodimerización. La secuencia de proteína de CD28 y un ácido nucleico que codifica un CD28 humano se describen, por ejemplo, en Harper y otros J. Immunol. (1991) 147: 1037-44. La secuencia de un ARNm humano que codifica CD28 también se describe en el número de acceso de NCBI NM_006139, actualizado por última vez el 19 de abril de
30 2009, por ejemplo. La secuencia proteica completa de un CD28 humano también se describe en el número de acceso de NCBI NP_006130.

35 El término "cáncer" incluye una miríada de enfermedades generalmente caracterizadas por proliferación celular inapropiada, proliferación celular anormal o excesiva. Los ejemplos de cáncer incluyen, entre otros, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de riñón, cáncer de cerebro o sarcomas. Dichos cánceres pueden ser provocados por anomalías cromosómicas, crecimiento degenerativo y trastornos del desarrollo, agentes mitogénicos, radiación ultravioleta (UV), infecciones virales, expresión inapropiada de un gen en los tejidos, alteraciones en la expresión de un gen o agentes cancerígenos.

40 El término "tratamiento" incluye, pero no se limita a, inhibición o reducción de la proliferación de células cancerosas, destrucción de células cancerosas, prevención de la proliferación de células cancerosas o prevención del inicio de células malignas o detención o reversión de la progresión de células premalignas transformadas a enfermedad maligna o mejora de la enfermedad.

45 El término "sujeto" se refiere a cualquier animal, preferentemente un mamífero tal como un humano. Los usos veterinarios también están destinados a ser abarcados por esta invención.

50 Los términos "electroporación", "electropermeabilización" o "mejora electrocinética" ("EP") tal como se usan indistintamente en la presente descripción se refieren al uso de un pulso de campo eléctrico transmembrana para inducir vías microscópicas (poros) en una biomembrana; su presencia permite que biomoléculas como plásmidos, oligonucleótidos, ARNip, fármacos, iones y agua pasen de un lado de la membrana celular al otro.

55 El término "biomolécula", como se usa en la presente descripción, abarca anticuerpos codificados por plásmidos, fragmentos de anticuerpos, proteínas inmunomoduladoras de longitud completa, dominios solubles de moléculas ancladas a la membrana, proteínas de fusión y similares.

Anticuerpos

60 La presente invención proporciona un enfoque inmunoterapéutico para reducir el tamaño de un tumor o inhibir el crecimiento de células cancerosas en un individuo, o reducir o inhibir el desarrollo de cáncer metastásico en un individuo que padece cáncer. La terapia se logra mediante el suministro intratumoral de plásmidos que codifican diversas formas solubles de moléculas coestimuladoras, o agonistas de las mismas, mediante el uso de la electroporación.

65 Los agonistas coestimuladores pueden estar en forma de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, los cuales pueden codificarse en un plásmido y suministrarse al tumor por electroporación.

El término "anticuerpo" tal como se usa en la presente descripción incluye inmunoglobulinas, que son el producto de las células B y variantes de las mismas, así como el receptor de células T (TcR), que es el producto de las células T, y sus variantes. Una inmunoglobulina es una proteína que comprende uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por los genes de la región constante de la inmunoglobulina kappa y lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como también innumerables genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, las cuales a su vez definen las clases de la inmunoglobulina IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. También se conocen subclases de la cadena pesada. Por ejemplo, las cadenas pesadas de la IgG en humanos pueden ser cualquiera de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Se sabe que una unidad estructural de inmunoglobulina típica comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, y cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente de 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente de 50-70 kDa). La porción N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Los anticuerpos existen como anticuerpos intactos de longitud completa o como una serie de fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con diversas peptidasas o productos químicos. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab')₂, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El F(ab')₂ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de la bisagra convirtiendo así el dímero F(ab')₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un fragmento Fab con la región bisagra (ver, Fundamental Immunology, WE Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Un fragmento Fab y un fragmento Fc se generan al digerir IgG con papaína. La papaína corta en la región de la bisagra justo por encima de los residuos involucrados en el enlace S-S entre cadenas, lo que da como resultado fragmentos Fab monovalentes y el fragmento Fc, que incluye dos fragmentos de la región constante, cada uno de los cuales contiene la parte inferior de los dominios de bisagra, CH2 y CH3. Los fragmentos de la región constante de la Fc se estabilizan como un dímero a través del enlace S-S entre cadenas de los residuos inferiores de la región de la bisagra.

La inmunoglobulina "Fc" se refiere clásicamente a la porción de la región constante generada por la digestión con papaína. Incluye la bisagra inferior que tiene los enlaces S-S entre cadenas. El término "Fc", como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína dimérica que comprende un par de polipéptidos de la región constante de inmunoglobulina, cada uno de los cuales contiene la parte inferior del dominio bisagra, CH2 y CH3. Tal fragmento "Fc" puede o no contener puente de S-S entre cadenas en la región de la bisagra. Debe entenderse que un Fc puede ser de cualquier clase de Ig y, como tal, puede incluir un dominio CH4 tal como en el caso de la IgM. Se conocen secuencias mutantes de un Fc tal como se describe por Wines y otros, J. Immunol. 15 de mayo de 2000; 164(10):5313-8 y puede usarse en la presente descripción.

Mientras que varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que cualquiera de una variedad de fragmentos de anticuerpos puede sintetizarse de novo ya sea químicamente o mediante el uso de la metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en la presente descripción, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o sintetizados de novo o anticuerpos y fragmentos obtenidos al usar metodologías de ADN recombinante.

Los anticuerpos recombinantes pueden ser anticuerpos convencionales de longitud completa, fragmentos de anticuerpos conocidos a partir de digestión proteolítica, fragmentos de anticuerpos únicos tales como Fv o Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos con dominio eliminado y similares. Los fragmentos pueden incluir dominios o polipéptidos con tan solo uno o algunos aminoácidos eliminados o mutados, mientras que es posible una eliminación más extensa, tal como la eliminación de uno o más dominios.

Un anticuerpo Fv tiene un tamaño de aproximadamente 50 Kd y comprende las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican VH y VL ya sea unidas directamente o unidas por un conector que codifica un péptido. Ver, por ejemplo, Huston, y otros (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos, 85:5879-5883. Una serie de estructuras para convertir las cadenas ligera y pesada de polipéptidos naturalmente añadidos, pero separados químicamente, de una región V de anticuerpo en una molécula scFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno.

Se ha encontrado una alternativa a los fragmentos de anticuerpos tradicionales anteriores en un conjunto de anticuerpos únicos producidos por los sistemas inmunes de camellos, llamas y tiburones. A diferencia de otros anticuerpos, estos reactivos de afinidad están compuestos de solo dos cadenas pesadas; mejor aún, un solo dominio forma los sitios de unión a antígeno para estos anticuerpos de cadena pesada. Los dominios pueden incluso modificarse genéticamente para producir fragmentos de anticuerpos recombinantes de un solo dominio extremadamente pequeños y muy estables, llamados "nanocuerpos". Los plásmidos que codifican solo cadena pesada

(VHH), anticuerpos de dominio único y nanocuerpos también se contemplan para el suministro intratumoral por electroporación.

Agonistas Solubles

5 Los agonistas de moléculas coestimuladoras pueden ser moléculas solubles tales como el GITR-L soluble, que comprende al menos el dominio extracelular (ECD) de GITR-L. Otras moléculas coestimuladoras carecerán igualmente de dominios transmembrana e intracelular, pero son capaces de unirse a sus contrapartes de unión y provocar un efecto biológico. Para el suministro intratumoral por electroporación, los ECD se codificarán en un vector de expresión y se expresarán cuando se suministren al tumor.

15 La forma codificada soluble de la molécula coestimuladora puede estar unida en el vector de expresión al ADN que codifica otra proteína o polipéptido. Dicho otro polipéptido puede ser la porción Fc de una inmunoglobulina, albúmina o cualquier otro tipo de proteína del suero o fragmento de la misma que mantenga la solubilidad de la molécula coestimuladora. La forma soluble de la molécula coestimuladora puede estar unida a una inmunoglobulina a través de la cadena pesada y/o ligera, que puede ser un fragmento o una cadena pesada o ligera de longitud completa. La inmunoglobulina puede ser un anticuerpo que puede dirigirse a un antígeno asociado con una célula cancerosa o tumor. La molécula coestimuladora también puede expresarse en la superficie celular de las células, puede tener la adición de dominios de trimerización heterólogos (por ejemplo, GCN4) o puede tener mutaciones puntuales en el dominio de unión al receptor que hacen que el ligando sea más potente (ver, por ejemplo, Chattopadhyay y otros (2007) Proc. Natl. Acad. Sci., 104:19 452-19 457).

25 El agonista de la molécula coestimuladora se suministra como un ácido nucleico. El ácido nucleico se refiere a un compuesto polinucleotídico, que incluye oligonucleótidos, que comprende nucleósidos o análogos de nucleósidos que tienen bases heterocíclicas nitrogenadas o análogos de bases, unidos covalentemente por enlaces fosfodiéster estándar u otros enlaces. Los ácidos nucleicos pueden incluir ARN, ADN, polímeros quiméricos de ADN-ARN o sus análogos. El ADN puede ser un plásmido que expresa un agonista de molécula coestimuladora particular de interés.

30 El plásmido de ADN usado para la electroporación de moléculas coestimuladoras codificadas, es uno que incluye una secuencia codificante de un antígeno recombinante que puede expresarse en una célula de mamífero, cuando dicho plásmido de ADN ingresa después de la electroporación. Preferentemente, la secuencia codificante es un agonista de molécula coestimuladora de consenso que provoca una respuesta inmune en el tumor diana. En algunas modalidades, las construcciones de secuencia codificantes están optimizadas para la expresión en mamíferos, que pueden incluir uno o más de los siguientes: que incluye la adición de una secuencia Kozak, optimización de codones y optimización de ARN. Estas secuencias de codificación optimizadas se pueden subclonar en varios vectores disponibles comercialmente.

Terapias de combinación

40 Se contempla que la electroporación intratumoral del ADN que codifica los agonistas coestimuladores puede administrarse con otras entidades terapéuticas. La Tabla 1 proporciona posibles combinaciones. La administración de las terapias combinadas puede lograrse mediante la electroporación sola o una combinación de electroporación y suministro sistémico.

Tabla 1: terapias combinadas con agonistas coestimuladores

Combinación	Métodos de suministro propuestos	Método en referencia	Referencias
*GITRL + CTLA4 anticuerpo agonista ("Ab") o ligando	<ol style="list-style-type: none"> 1. Electroporación ("EP") de plásmidos que codifican ligandos para ambos receptores 2. EP del gen GITRL + anti-CTLA-4 sistémico 3. EP de genes que codifican anti-CTLA-4 + GITRL 	Transfección del gen agonista de CTLA-4 Ab + gen GITRL en células dendríticas	Pruitt y otros, (2011) Eur. J. Immunol. 41: 3553-3563
GITRL + citocinas (es decir, IL-12 o IL-2)	<ol style="list-style-type: none"> 1. EP de plásmidos que codifican ambos genes 	Exposición sistémica al agonista anti-OX40 Ab + citocina IL-2	Redmond, William L. y otros (2012) PLoS ONE 7.4 Ed. Naglaa H. Shoukry. Ruby y otros, (2008) J Immunol. 180: 2140-2148
GITRL + Vacuna tumoral	<ol style="list-style-type: none"> 1. EP del gen GITRL + agente citotóxico (por separado) para crear un grupo de antígeno tumoral local 2. EP del gen GITRL + sistema de suministro de vacuna tumoral (es decir, vacuna peptídica gp100 para melanoma) 	Sistema de suministro del agonista Ab + partículas de replicón de alfavirus que codifican antígeno de melanoma	Avogadri y otros, _ Cancer Immunol. Res. 2014 mayo; 2 (5): 448-58 Vergati y otros, 2010. J. Biomed. Biotechnol. 2010: ID de artículo 596432
GITRL + Bleomicina, Gemzar, Cytozan, 5-fluorouracilo, Adriamycina u otro agente quimioterapéutico	<ol style="list-style-type: none"> 1. EP intratumoral de fármaco + plásmido que codifica GITRL 2. EP del GITRL + sistema de suministro de fármaco 	Inyección intraperitoneal de fármacos + agonista Ab	Documento US 8,591,886
GITRL + inhibidores de molécula pequeña (es decir, Sunitinib, Imatinib, Vemurafenib, Trastuzumab, Bevacizumab, Cetuximb, rapamicina, Bortezomib, inhibidores de PI3K-AKT, inhibidores de IAP	<ol style="list-style-type: none"> 1. EP del gen GITRL combinado con suministro local de fármacos 2. EP del gen GITRL combinado con tratamiento farmacológico sistémico 	Suministro sistémico de anticuerpos terapéuticos con fármacos de terapia dirigida	Hu-Lieskovan y otros, (2014) J. Clin. Oncol. 32 (21):2248-54 Vanneman y Dranoff (2014) Nat. Rev. Cancer 12 (4): 237-251
GITRL + radiación dirigida	Dosis de radiación subletal localmente en el sitio del tumor, seguida por EP GITRL	Esbozo de revisión del potencial de la radioterapia en combinación con la inmunoterapia, particularmente la coestimulación de células T y/o el bloqueo del punto de control	Almo SC, Guha C. (2014) Radiation Res. 182(2): 230-238.
GITRL + antagonista anti-PD1 Ab (+ fármacos quimioterapéuticos)	EP de GITRL más tratamiento sistémico anti-PD-1 Ab	Inyección intraperitoneal de anticuerpos terapéuticos	Lu y otros (2014) J. Transl. Med. 12:36
GITRL + antagonista anti-PDL1 Ab	EP de GITRL más tratamiento sistémico anti-PDL-1 Ab	Tratamiento sistémico con bloqueo anti PDL-1 Ab + agonista anti-CD137 Ab	Vezyz y otros, (2011) J Immunol. 187 (4):1634-42

Otras terapias de combinación contempladas son los agonistas coestimuladores combinados con: agonistas de TLR (por ejemplo, Flagellin, CpG); antagonistas de IL-10 (por ejemplo, anticuerpos anti-IL-10 o anti-IL-10R); antagonistas del TGFβ (por ejemplo, anticuerpos anti-TGFβ); inhibidores de PGE2; inhibidores de Cbl-b (ligasa E3); agonistas de CD3; antagonistas de la telomerasa, etc. En particular, se contemplan diversas combinaciones de IL-12, IL-15/IL-15Ra y/o GITR-L. Se ha demostrado que IL-12 e IL-15 tienen efectos antitumorales sinérgicos (ver, por ejemplo, Kimura y otros (2000) Cancer Immunol. Immunother. 49:71-77). El ADN que codifica cada molécula puede estar en plásmidos de expresión separados o combinarse con promotores apropiados en un solo plásmido de expresión, y suministrarse al tumor mediante diversas técnicas descritas a continuación.

10 Electroporación

Los dispositivos están contemplados para su uso en pacientes afectados por cáncer u otros crecimientos no cancerosos (benignos). Estos crecimientos pueden manifestarse como una lesión, pólipo, neoplasia (por ejemplo, Neoplasia urotelial papilar), papiloma, neoplasia maligna, tumor (por ejemplo, Tumor de Klatskin, tumor hiliar, tumor urotelial papilar no invasivo, tumor de células germinales, tumor de Ewing, tumor de Askin, tumor neuroectodérmico primitivo, tumor de células de Leydig, tumor de Wilms, tumor de células de Sertoli), sarcoma, carcinoma (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma cloacogénico, adenocarcinoma, carcinoma adenoescamoso, colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma urotelial papilar invasivo, carcinoma urotelial plano), lumbar o cualquier otro tipo de crecimiento canceroso o no canceroso. Los tumores tratados con los dispositivos y métodos descritos en la presente descripción pueden ser no invasivos, invasivos, superficiales, papilares, planos, metastásicos, localizados, unicéntricos, multicéntricos, de bajo grado y de alto grado.

Los dispositivos están contemplados para su uso en numerosos tipos de tumores malignos (es decir, cáncer) y tumores benignos. Por ejemplo, los dispositivos y métodos descritos en la presente descripción se contemplan para su uso en

25 cáncer cortical suprarrenal, cáncer anal, cáncer de vías biliares (por ejemplo, cáncer periférico, cáncer de vías biliares distales, cáncer de vías biliares intrahepáticas), cáncer de vejiga, cáncer óseo benigno y canceroso (por ejemplo, Osteoma, osteoma osteoide, osteoblastoma, osteocondroma, hemangioma, fibroma condromixoide, osteosarcoma, condrosarcoma, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, tumor de células gigantes del hueso, cordoma, linfoma, mieloma múltiple), cáncer de cerebro y sistema nervioso central (por ejemplo, meningioma, astrocitoma oligodendrogliomas, ependimoma, gliomas, meduloblastoma, ganglioglioma, Schwannoma, germinoma, craneofaringioma), cáncer de mama (por ejemplo, carcinoma ductal in situ, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma lobular in situ, ginecomastia), enfermedad de Castleman (por ejemplo, hiperplasia de ganglios linfáticos gigantes, hiperplasia de ganglios linfáticos angiofolículos), cáncer de cuello uterino, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio (por ejemplo, adenocarcinoma del endometrio, adenocantoma, adnocarcarinoma papilar seroso, carcinoma de células claras), cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar (adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células pequeñas), tumores carcinoides gastrointestinales (por ejemplo coriocarcinoma, carioadenoma destruens), enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (por ejemplo, cáncer de células renales), cáncer de laringe e hipofaringe, cáncer de hígado (por ejemplo, hemangioma, adenoma hepático, hiperplasia nodular focal, carcinoma hepatocelular), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de células pequeñas de pulmón, cáncer de células no pequeñas de pulmón), mesotelioma, plasmacitoma, cáncer de cavidad nasal y seno paranasal (por ejemplo, estesioneuoblastoma, granuloma de la línea media), cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de glándula pituitaria, cáncer de próstata, retinoblastoma, rbdomiosarcoma (por ejemplo, rbdomiosarcoma embrionario, rbdomiosarcoma alveolar, rbdomiosarcoma pleomórfico), cáncer de glándulas salivales, cáncer de piel, ambos melanoma y cáncer de piel no melanoma), cáncer de estómago, cáncer testicular (por ejemplo, seminoma, cáncer de células germinales no seminoma), cáncer de timo, cáncer de tiroides (por ejemplo, carcinoma folicular, carcinoma anaplásico, carcinoma poco diferenciado, carcinoma medular de tiroides, linfoma de tiroides), cáncer vaginal, cáncer de vulva y cáncer uterino (por ejemplo, leiomiosarcoma uterino).

Los dispositivos y métodos descritos en la presente descripción funcionan para tratar tumores cancerosos mediante el suministro de terapia eléctrica continuamente y/o en pulsos a tumores durante un período de tiempo que varía desde una fracción de segundo a varios días, semanas y/o meses. En una modalidad preferida, la terapia eléctrica es terapia eléctrica de corriente continua.

El término "electroporación" (es decir, hacer que las membranas celulares sean permeables) como se usa en la presente descripción puede ser causado por cualquier cantidad de culombios, tensión y/o corriente suministrados a un paciente en cualquier período de tiempo suficiente para abrir agujeros en las membranas celulares (por ejemplo, para permitir difusión de moléculas como productos farmacéuticos, soluciones, genes y otros agentes en una célula viable).

El suministro de terapia eléctrica al tejido provoca una serie de reacciones biológicas y electroquímicas. A una tensión suficientemente alta, las estructuras celulares y el metabolismo celular se ven gravemente alterados por la aplicación de la terapia eléctrica. Aunque tanto las células cancerosas como las no cancerosas se destruyen en ciertos niveles de terapia eléctrica, las células tumorales son más sensibles a los cambios en su microambiente que las células no cancerosas. Las distribuciones de macroelementos y microelementos se modifican como resultado de la terapia eléctrica.

En una configuración de electrodo único, el tensión puede aplicarse durante fracciones de segundos a horas entre un electrodo de plomo y la carcasa del generador, para comenzar la destrucción del tejido canceroso. La aplicación de una tensión dada puede ser en una serie de pulsos, con cada pulso que dura de fracciones de segundo a varios minutos. La baja tensión también puede aplicarse por una duración de fracciones de segundos a minutos, lo que puede atraer glóbulos blancos al sitio del tumor. De esta manera, el sistema inmune mediado por células puede eliminar las células tumorales muertas y puede desarrollar anticuerpos contra las células tumorales. Además, el sistema inmunitario estimulado puede atacar las células tumorales del límite y las de metástasis.

Pueden usarse varios adyuvantes para aumentar cualquier respuesta inmunológica, en dependencia de la especie huésped, que incluye pero no se limita a adyuvantes de Freund (completos e incompletos), sales minerales tales como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, diversas citocinas, sustancias tensioactivas tales como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite y adyuvantes humanos potencialmente útiles como BCG (bacille Calmette-Guerin) y *Coryne-bacteria parvum*. Alternativamente, la respuesta inmune podría potenciarse mediante la combinación y/o el acoplamiento con moléculas tales como hemocianina de lapa californiana, toxoide tetánico, toxoide diftérico, ovoalbúmina, toxina del cólera o sus fragmentos.

La patente de los Estados Unidos Núm 7,245,963 de Draghia-Akli, y otros describe los sistemas de electrodos modulares y su uso para facilitar la introducción de una biomolécula en las células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Los sistemas de electrodos modulares comprenden una pluralidad de electrodos de aguja; una aguja hipodérmica; un conector eléctrico que proporciona un enlace conductivo desde un controlador de pulso de corriente constante programable a la pluralidad de electrodos de aguja; y una fuente de energía. Un operador puede agarrar la pluralidad de electrodos de aguja que están montados en una estructura de soporte e insertarlos firmemente en el tejido seleccionado en un cuerpo o planta. Las biomoléculas se suministran luego a través de la aguja hipodérmica al tejido seleccionado. El controlador de pulso de corriente constante programable se activa y el pulso eléctrico de corriente constante se aplica a la pluralidad de electrodos de aguja. El pulso eléctrico de corriente constante aplicado facilita la introducción de la biomolécula en la célula entre la pluralidad de electrodos.

Publicación de patente de los Estados Unidos 2005/0052630 describe un dispositivo de electroporación que puede usarse para facilitar efectivamente la introducción de una biomolécula en las células de un tejido seleccionado en un cuerpo o planta. El dispositivo de electroporación comprende un dispositivo electrocinético ("dispositivo EKD") cuya operación se especifica mediante software o firmware. El dispositivo EKD produce una serie de patrones de pulso programables de corriente constante entre electrodos en una matriz basada en el control del usuario y la entrada de los parámetros de pulso, y permite el almacenamiento y la adquisición de datos en forma de onda de corriente. El dispositivo de electroporación también comprende un disco de electrodo reemplazable con una matriz de electrodos de aguja, un canal de inyección central para una aguja de inyección y un disco guía extraíble.

Las matrices de electrodos y los métodos descritos en la Patente de los Estados Unidos Núm. 7,245,963 y la publicación de patente de los Estados Unidos 2005/0052630 están adaptados para una penetración profunda no solo en tejidos como el músculo, sino también en otros tejidos u órganos. Debido a la configuración de la matriz de electrodos, la aguja de inyección (para suministrar la biomolécula de elección) también se inserta completamente en el órgano diana, y la inyección se administra perpendicularmente al problema objetivo, en el área previamente delineada por el electrodos.

Típicamente, los campos eléctricos necesarios para la electroporación celular in vivo son generalmente similares en magnitud a los campos requeridos para las células in vitro. La magnitud del campo eléctrico puede variar de aproximadamente 10 V/cm a aproximadamente 1500 V/cm, preferentemente de aproximadamente 300 V/cm a 1500 V/cm y preferentemente de aproximadamente 1000 V/cm a 1500 V/cm. Alternativamente, fuerzas de campo más bajas (de aproximadamente 10 V/cm a 100 V/cm, y con mayor preferencia de aproximadamente 25 V/cm a 75 V/cm) la longitud del pulso es larga. Por ejemplo, cuando el campo eléctrico nominal es de aproximadamente 25-75 V/cm, se prefiere que la longitud del pulso sea de aproximadamente 10 mseg. La terapia de electroporación para uso en la invención comprende la administración de al menos un pulso de tensión de 200 V/cm a 1500 V/cm sobre un ancho de pulso de 100 microsegundos a 20 milisegundos.

La longitud del pulso puede ser de aproximadamente 10 μ s unos 100 ms. Puede haber cualquier número deseado de pulsos, típicamente de uno a 100 pulsos por segundo. El retraso entre los conjuntos de pulsos puede ser cualquier tiempo deseado, como un segundo. La forma de onda, la intensidad del campo eléctrico y la duración del pulso también pueden depender del tipo de células y del tipo de moléculas que deben ingresar a las células mediante electroporación. La terapia de electroporación para usar en la invención comprende la administración de al menos un pulso de tensión de 200 V/cm a 1500 V/cm en un ancho de pulso de 100 microsegundos a 20 milisegundos.

La aceptación de los vectores de suministro no virales para su uso en la presente invención también puede potenciarse mediante electroporación de plasma, también denominada transfección por avalancha. Brevemente, las descargas de microsegundos crean microburbujas de cavitación en la superficie del electrodo. La fuerza mecánica creada por el colapso de las microburbujas combinadas con el campo magnético sirve para aumentar la eficiencia del transporte a través de la membrana celular en comparación con el transporte mediado por difusión asociado con la electroporación convencional. La técnica de electroporación de plasma se describe en Vankov, y otros Patente de los Estados Unidos

Núm. 7,923,251 concedida el 12 de abril de 2011 y Vankov y otros Patente de los Estados Unidos Núm. 8,283,171 concedida el 9 de octubre de 2012. Esta técnica también puede emplearse in vivo para la transformación de células. Chalberg, y otros (2006) Investigative Ophthalmology & Visual Science 47:4083-4090; Chalberg, y otros Patente de Estados Unidos Núm. 8,101169 concedida el 24 de enero de 2012.

5

Ejemplos

I. Tumores y ratones

10 Las células CT-26.WT obtenidas de ATCC (CRL2638) se descongelaron y se pasaron mínimamente antes de la implantación. Las células CT-26.WT adherentes se eliminaron de la placa con tripsina y la viabilidad celular se determinó mediante tinción con AO/PI, y se realizó un recuento vivas/muertas mediante el uso de un contador de células Auto2000 (Nexcelcom Biosciences). Las células se resuspendieron en DPBS a una densidad de $1,0 \times 10^7$ células vivas/ml o $0,5 \times 10^7$ /ml y se mantuvieron en hielo hasta la implantación.

15

Se rasuraron ratones BALB/cJ (número de inventario 000651) hembra de 6 semanas de edad adquiridos en Jackson Laboratories en ambos flancos traseros un día antes de la implantación del tumor. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano hasta que no respondieron a una prueba de pellizco. Se extrajeron células CT-26.WT en una jeringa estéril de 1,0 ml mediante el uso de una aguja de 18 Ga, que se reemplazó con una aguja de 26 Ga para la implantación. Se inyectaron células CT-26.WT por vía subcutánea, rostral al flanco trasero en un volumen de 0,1 ml, lo que dio como resultado en la implantación de $1,0 \times 10^6$ células (para tumor primario) o $0,5 \times 10^6$ células (para tumor contralateral).

20

El crecimiento tumoral se controló comenzando 4 días después de la implantación al medir los ejes largos y cortos de los tumores con calibradores digitales. El volumen tumoral se calculó mediante el uso de la fórmula para estimar el volumen elipsoide $(A^2 \times B)/2$, donde "A" es el eje corto y "B" es el eje largo. Se descartaron los ratones con tumores bilobulados o tumores implantados más profundos que subcutáneos. Cuando los volúmenes tumorales primarios alcanzaron 40-90 mm³, los ratones se aleatorizaron en cohortes que contenían volúmenes tumorales promedio similares. Los ratones se alojan de acuerdo con las pautas de AALAM.

25

30

II. ADN plasmídico

Se generaron plásmidos pUMVC3 (ALDEVERON) para la expresión tanto de tipo salvaje como de formas recombinantes solubles y unidas a membrana de GITRL humano, OX40L o 4-1BB (estructuras ilustradas en la Figura 1). Se añadió el dominio extracelular (ECD) para cada ligando (Genbank ID AF125303 [GITRL], D90224 [OX40L] y U03398 [4-1BBL].) En una modificación (denotado GITRL4, OX40L4 y 4-1BBL4), se añade un dominio de trimerización heteróloga (Harbury, PB Nature 371: 80.) En otra variación (denotado trímero de cadena simple, SCT), se añadieron 3 dominios ECD en secuencia, con conectores de secuencia compuestos de combinaciones variables de Glicina y Serina para introducir 'bamboleo'. La longitud del conector varía entre 12 y 23 aminoácidos. En algunas construcciones se añadió el extremo C del dominio transmembrana del receptor PDGF (tomado del vector pDisplay, Thermo Fisher) a los ECD. En algunas construcciones, la región constante (Fc) de los anticuerpos humanos o de ratón se añadió el extremo C a los ECD (Fc-IgG1 humano [de pFUSE-hlgG1-Fc, InvivoGen], Fc-IgG1 d ratón [de pFUSE-mlgG1-Fc, InvivoGen], Fc-IgG2a de ratón [de pFUSE-mlgG2a-Fc, InvivoGen].)

35

40

Se informa que el GITRL de ratón y humano no reacciona de forma cruzada (ver, por ejemplo, Bossen y otros, (2006) J. Biol. Chem. 281:13 964-13 971), por lo que se construyeron así homólogos de ratón para GITRL humano recombinante para estudios preclínicos en ratones. El GITRL de ratón es naturalmente un dímero. Las construcciones de GITRL recombinante de ratón se hicieron como dímeros y trímeros mediante el uso de motivos de multimerización GCN4 (Harbury, PB Nature 371: 80). La unión relativa de las formas de dímero y trímero a GITR-Fc de ratón se comparó mediante el uso de un ELISA funcional. La forma de trímero mostró una mayor afinidad de unión y se usó para todos los estudios posteriores (EC50 para dímero, 39,24 uM; EC50 para trímero, 12,38 uM). Sustituyendo el dominio ECD del GITRL de ratón (Genbank # de acceso NM_183391) para los dominios ECD humanos en todas las construcciones descritas anteriormente, se hicieron versiones de ratón de las formas SCT usadas en estudios preclínicos. El pUMVC3 que contiene un agonista de la molécula coestimuladora (es decir, GITRL) se prepara con un kit sin endotoxina. Todo el ADN plasmídico se diluyó en solución salina inyectable estéril (0,9 %) y se almacenó a -20 °C.

50

55

III. Expresión en células de cultivo de tejidos

60 Transfección de plásmidos GITRL en células HEK293 (ATCC) con reactivo Mirus TransIT-LT1 (# de catálogo: MIR 2300). Las células a transducir se asientan a 400 000 células en un plato de 6 pocillos. 24 horas después, las células se superpusieron con 4µl de Mirus y 1µg de ADN. Las células se cosecharon 4-7 días después para su análisis por transferencia Western, citometría de flujo, para ensayos de actividad, las proteínas secretadas se cosecharon a partir de los sobrenadantes celulares y se purificaron mediante el uso de resina de Ni²⁺ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Novagen)

65

IV. Detección de proteínas por transferencia Western y citometría de flujo

Para la transferencia Western, se añadió tampón de muestra SDS Laemmli (Alfa Aesar J61337) a cada muestra y se llevó a ebullición a 100 °C durante 10 minutos y las muestras se centrifugaron. Se cargaron 20 µl de proteína + tampón por pocillo y el gel se ejecutó a 150 voltios durante aproximadamente una hora hasta que el estándar más pequeño alcanzó el fondo del gel. Las proteínas del gel se transfirieron a membranas de PVDF a 100 voltios durante 1 hora en hielo, se enjuagaron con PVDF 3X con 1X TBST, y más tarde se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en un balancín con 5 % de BSA en TBST. Las membranas enjuagadas se incubaron durante la noche con anticuerpo marcado anti-NWSH-PQFEK, mAb, ratón (Genscript A01732-100) diluido en TBST+5 % de leche en polvo descremada. Las transferencias se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 700 anticuerpos secundarios marcados anti-ratón (Rockland). Las imágenes se analizaron mediante el uso de un generador de imágenes LICOR.

V. Citometría de flujo

Para la citometría de flujo, las células se eliminaron de la placa mediante el uso de PBS tibio sin Ca ++ o Mg ++. Las células fueron contadas y distribuidas en tubos con 5 x 10⁶ células/tubo, lavadas y resuspendidas en 100-200 µl de tampón FC (5 % FBS filtrado + 0,1 % de NaN₃ en PBS sin Ca ++ o Mg ++). Se añadieron Anti-GITRL marcado con PE (R&D systems del clon 109101), control de isotipo (R&D systems del clon 11711), o anti-FC y el correspondiente control de isotipo (Biolegend) e incubaron en hielo durante 1 hora. Las muestras se lavaron 3 veces con tampón FC. En el caso de que la muestra se incubase con anti-FC, las células se incubaron primero con la proteína de fusión anti-GITR-FC en tampón FC durante 1 hora en hielo. Las células se analizaron mediante el uso de un escáner FAC Becton-Dickenson, un citómetro de flujo GUAVA 12HT (Millipore) o LSR-II (Beckman).

Cuando se transdujeron en células humanas HEK 293, las proteínas de estas construcciones se sintetizaron y se localizaron adecuadamente en el espacio extracelular (la forma soluble) o en la superficie celular y se detectaron por transferencia Western con anticuerpo marcado Anti-NWSHPQFEK, y anti-GITRL Ab por citometría de flujo. Las proteínas GITRL recombinantes trimerizadas unidas a membrana, cuando se expresan en células HEK 293 unidas a proteínas de fusión solubles GITR-FC.

Tabla 2: Intensidades medias de fluorescencia de las células HEK 293 transfectadas que expresan proteínas GITR de la superficie celular que demuestran la expresión de la superficie celular y la unión a la proteína de fusión soluble GITR-Fc (R&D Systems)

Proteína	Anti-GITRL	GITR-Fc + Anti-Fc	Anti-Fc
TM1	159,5	192,9	13,5
TM-SCT	982,5	771,4	13,0

VI. Unión al receptor por ELISA funcional

Se añadió anticuerpo anti-Fc humano (Pierce 31125) a placas de ELISA de fondo plano de 96 pocillos (Costar # de catálogo 3690), diluido a 1 µg/ml diluido con PBS e incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pozos se lavaron con 150 µl PBST 3X, decantado y secado. Los pozos se bloquearon al añadir 150 µl/pocillo Superblock (Scytek AAA999) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, se añadió 50 µl/pocillo de proteína quimérica Fc recombinante humana GITR/TNFRSF18 (R&D 689-GR-100) a una concentración de 500 ng/ml. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron posteriormente. Los siguientes se añadieron en triplicado: 50 µl del estándar del ligando de GITR humano recombinante rhGITRL/TNFSF18 (R&D 6987-GL-025) de 5000 ng/ml diluido cinco veces con PBS hasta cero; 50 µl del sobrenadante del cultivo HEK 293 puro (control negativo sin expresión génica) diluido cinco veces con PBS hasta cero; y la proteína soluble GITRL humana, también titulada. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se lavaron nuevamente. Se añadió 50 µl/ pocillo del anticuerpo biotinilado humano anti-ratón hGITRL (R&D BAM6943) a 500 ng/ml diluido con PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, se añadió 50 µl/pocillo de estreptavidina HRP 1:15000 (Abcam 7403). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, se añadieron 50 µl/pocillo de sustrato TMB (Pierce # de catálogo 34028) y las muestras se incubaron durante 10 minutos. La reacción se detuvo con la adición de 25 µl/pocillo de H₂SO₄. La densidad óptica se determinó mediante el uso de un lector de microplacas ajustado a 450 nm, con una corrección de longitud de onda establecida a 540 o 570 nm. Se determinó la concentración de GITRL en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA convencional mediante el uso de anticuerpo anti-GITRL para la unión y detección, y un estándar de proteína GITRL (R&D 6987-GL-025)

Las proteínas GITRL-SCT-Fc y GITRL4 soluble se unen a la proteína de fusión GITR-FC en un ELISA con una afinidad mayor que 2 veces que la de la proteína GITRL disponible comercialmente ((R&D 6987-GL-025; Tabla 3), y un actividad específica mayor que 2 veces (unidades de actividad por ng; Figura 2). Las proteínas GITRL recombinantes solubles demostraron una afinidad de unión a GITR comparable a MK-4166 reticulado.

Tabla 3: Afinidad de unión a la proteína soluble GITRL a la proteína de fusión GITR-Fc unida a placa y la comparación con el anticuerpo agonista de GITR MK-4166 reticulado (ver, por ejemplo, el documento US8709424).

Proteína	GITRL R&D	GITRL4	GITRL-SCT	GITRL-SCT-Fc	MK-4166
EC50	1,495	0,5806	4,759	0,5355	0,2912

VII. Ensayos Indicadores de NFkB-luciferasa

Los plásmidos GITRL se transdujeron en células humanas HEK 293 junto con los plásmidos que codifican la luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor impulsado por NFkB (Promega). El plásmido que expresaba el gen GITR humano (Origene) y un plásmido que expresaba la luciferasa de Renilla estaban bajo el control de un promotor constitutivo del CMV (Promega; control para la variabilidad de la transducción). Después de 48 horas después de la transfección, las células se lisaron y se analizaron para determinar la actividad de la luciferasa de luciérnaga y Renilla mediante el uso de un kit de ensayo Dual Luciferase (Promega, E1910). Las proteínas GITRL solubles estimularon la señalización de GITR a NFkB en un sistema de línea celular informadora (Figura 4). Las proteínas GITRL solubles se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo HEK 293 en condiciones libres de suero mediante el uso de Ni⁺⁺-Resin según las instrucciones del fabricante (Novagen). Las proteínas purificadas se normalizaron por absorbancia A280 y por ELISA. Se añadieron equivalentes molares de proteína a células Jurkat diseñadas que expresan el GITR humano y una luciferasa secretada impulsada por NF-kB (ensayo de potencia GITR, Promega CS184002). Se midió una respuesta a la dosis para cada proteína y se comparó con el GITRL humano soluble disponible comercialmente (R&D systems). El ensayo se realizó según las instrucciones fabricadas con y sin la adición de anticuerpos de reticulación: Anti-HA para el estándar de GITRL de R&D (R&D Systems) y Anti-NWSHPQFEK Tag (Genscript) para nuestras proteínas GITRL.

Las proteínas GITRL de la superficie celular también se probaron en el ensayo de potencia de GITR (Promega CS184002) al adaptar el protocolo de ensayo a la estimulación del cocultivo. Las células HEK 293 se transdujeron con plásmidos que codifican la superficie celular. Las proteínas GITRL se eliminaron de la placa con PBS-M⁺⁺⁺-Ca⁺⁺ después de 4 días en cultivo, y se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos en una dilución en serie de 100 000 a 1 célula/pocillo en bandejas de cultivo de tejidos (Corning) y se dejaron durante la noche para adherirse al sustrato. Se descongelaron y usaron las células Jurkat (Promega CS184002) se superpusieron de acuerdo con las instrucciones del fabricante sobre células HEK 293 que expresan GITRL y se cultivaron conjuntamente durante 7 horas. Los sobrenadantes se eliminaron del cocultivo y se midió la actividad de la luciferasa como se describe en el protocolo estándar (Promega GITR Potency Assay) mediante el uso de un luminómetro BioTek. Los resultados se compararon con células no transfectadas como control negativo y con el GITRL soluble de R&D como control positivo para cada experimento.

Tabla 4: Las proteínas GITRL solubles muestran una fuerte activación de GITR en el ensayo indicador de luciferasa Promega

Proteína	EC50 (uM)	
	Anticuerpo -	Anticuerpo +
hGITRL4	0,31	0,10
hGITRL-SCT	39,10	2,26
hGITRL-SCT-Fc	0,29	0,28
hGITRL R&D		0,97

El GITRL4 soluble y el GITRL-SCT-FC tenían una potencia mayor de 3 y 10 veces mejor en este ensayo de actividad de GITR, respectivamente, que el GITRL humano disponible comercialmente (R&D Systems). La superficie celular de GITRL también mostró una fuerte activación cuando se cocultivó con células indicadoras Jurkat en el ensayo de potencia de GITR (Figura 4).

VIII. Estimulación primaria de células T humanas y unión a la superficie celular de GITRL soluble

Las células Pan T humanas primarias (Allcells, PB009-1) se sembraron en placas de pocillos recubiertos durante la noche con anti-CD3 (OKT3 10 ug/ml) solo o en combinación con anti-CD28 soluble (15E8, 1 ug/ml) o sobrenadantes de cultivo de Células HEK 293 con y sin transfección previa con el GITRL soluble. Las células se cultivaron en RPMI + FBS al 10 % durante 4 días. Las células de control no estimuladas se sembraron en RPMI + FBS al 10 % en paralelo.

Para la unión a la superficie celular, las células que habían sido estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28 se lavaron con tampón FC (FBS filtrado al 5 % + NaN₃ al 0,1 % en PBS sin magnesio ni calcio), sobre hielo. Las células se incubaron con o sin sobrenadantes de cultivo HEK 293 durante 1 hora en hielo. Después de lavar en tampón FC, las células se incubaron con anticuerpos conjugados: anticuerpo StrepTAG II conjugado con FITC (GenScript A10736-100), control de isotipo conjugado con FITC (Invitrogen GM4992), anticuerpo GITR humano conjugado con PE. Las células se lavan con tampón FC y se analizan por citometría de flujo como se describe anteriormente.

Para el ensayo de proliferación, se tiñeron pozos duplicados de células estimuladas o controles no estimulados con solución de tinción vital AO/PI (Nexcelom CS2-0106-5ML), y se contó con un contador de células Auto 2000 4 días después de la estimulación.

5 Para los ensayos de producción de citocinas, las células T CD4+ y las células T Pan (Allcells) se coestimularon con 0,1, 0,2 o 0,5 ug/ml de CD3 antihumano (# de Cat: 100207) de Biolegend y moléculas de agonista soluble GITRL. Se usó el CD28 antihumano (# de Cat: 102111) como control positivo. Las células T coestimuladas se incubaron durante 72 horas a 37 °C antes de que se recogieran los sobrenadantes. El nivel de IFN- γ humano e IL-2 en los sobrenadantes celulares se midió mediante kits de ELISA R&D (# de Cat: DY485-05 y # de Cat: DY402-05).

10 El GITRL4 recombinante soluble se une a la superficie celular de las células pan T humanas primarias estimuladas.

15 Tabla 5. Las intensidades medias de fluorescencia (MFI) se muestran para las células T teñidas con un anticuerpo contra el epítopo marcado de la proteína GITRL4 después de la incubación con los sobrenadantes de cultivo de células transducidas pUMVC3-GITRL4 en comparación con los controles de isotipo o la incubación de células T con sobrenadantes de células no transducidas.

Incubación previa	Intensidad media de fluorescencia	
	(-)	Isotipo control-PE
	6,10	55,18
Sobrenadante de cultivo GITRL4	Isotipo control-FITC	Anti-StrepTagII-FITC
	5,08	48,40
Control de sobrenadante de cultivo	Isotipo control-AF488	Anti-StrepTagII-AF488
	4,90	8,51

20 La adición de sobrenadante de cultivo de las células HEK 293 transducidas con plásmidos que expresan GITRL4 aumenta la respuesta proliferativa de células T humanas primarias a la reticulación del TCR con el anticuerpo anti-CD3, pero en menor medida que los anticuerpos anti-CD28. La adición de las proteínas GTRL también aumenta la producción de citocinas en respuesta a la reticulación de TRC,

30 Tabla 6: Estimulación de la proliferación primaria de células T por la proteína GITRL4. La concentración de células por mililitro se muestra en millones después de la estimulación con las proteínas indicadas.

Duplicados biológicos	Sin estimulación	Anti-CD3	Anti-CD3 + GITRL sup	Control anti-CD3 + sup	Anti-CD3 + Anti-CD28
Pocillo 1	1,83	3,01	3,42	2,45	3,89
Pocillo 2	2,16	2,55	3,32	2,7	3,93

40 Tabla 7: Cuando INF γ se midieron los niveles en los sobrenadantes de cultivo de células Pan T humanas primarias, se observó un aumento en esta citocina cuando se añadió proteína GITRL4 soluble junto con niveles subóptimos de anticuerpo Anti-CD3 (OKT3). Cada valor representa el promedio de pocillos por triplicado de los sobrenadantes de células T estimuladas.

Proteína (u g/ml)	IFN- γ (pg/ml)	
	0,2 OKT3	0,5 OKT3
ninguna	235	1005
a-CD28	6824	10 079
0,2 I + D hGITRL	302	846
1,0 hGITRL R&D	2006	3273
0,2 hGITRL4	361	839
1,0 hGITRL4	2821	4425

55 Tabla 8: Las proteínas Fc-SCT GITRL aumentaron la producción de INF γ e IL-2 de células T primarias humanas CD4+ estimuladas con dosis subóptimas de anti-CD3.

Proteína (μ M)	IFN- γ (ng/ml)		IL-2 (ng/ml)	
	0,1 OKT3	0,5 OKT3	0,1 OKT3	0,5 OKT3
no estimulado	0,021	0,007	0,025	0,007
ninguna	0,066	0,313	0,032	0,043
15 a-CD28	1,764	3,180	0,402	0,734
100 hGITRL-SCT-Fc	0,115	0,777	0,041	0,127
10 hGITRL-SCT-Fc	0,131	0,734	0,043	0,099

Comúnmente, estos datos indican que los plásmidos que codifican las proteínas GITRL recombinantes se expresan cuando se introducen en las células y pueden unirse y estimular el GITR endógeno de la superficie celular en las células T. Dentro del microambiente tumoral, se predice que la estimulación de la GITR de la superficie celular en los linfocitos T mejorará la activación de estos linfocitos dentro del microambiente tumoral y facilitará una respuesta inmune contra las células del tumor.

IX. Comparación de homólogos de ratón para GITRL recombinante con DTA-1 en células T primarias de ratón.

Las proteínas GITRL recombinantes de ratón se expresaron en células HEK 293 y se verificó por transferencia Western la retención en la célula (aquellas que contenían dominios TM) o la secreción en el medio de cultivo. La unión a GITR en la superficie de los esplenocitos primarios de ratón se verificó por citometría de flujo mediante el uso del anticuerpo anti-StrepTAG II (Genscript). Además, se observó un aumento en la estimulación de las células T primarias de ratón con una dosis subóptima de anti-CD3 (1452C11) con la adición de proteínas GITRL de ratón solubles purificadas en células T CD4+ y CD8+, así como también en los cultivos de esplenocitos completos. En cada caso, el GITRL recombinante de ratón mostró una actividad coestimuladora de células T comparable o mejor que el anticuerpo agonista de GITR, DTA-1 (BXcell BE0063). Por ejemplo, en esplenocitos completos recubiertos con 0,5 ug/ml de anti CD-3 Ab 1452C11 (Biolegend 100207), DTA-1 tenía un EC50 de 1,29 uM, mGITRL-SCT-FcIgG2a tenía un EC50 de 0,473 uM, mGITRL4 tenía un EC50 de 3,32 uM.

X. Tratamiento intratumoral

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano para el tratamiento. El ADN plasmídico circular se diluyó a 1 ug/ul en solución salina estéril al 0,9 %. Se inyectaron 50 ul de ADN plasmídico centralmente en tumores primarios mediante el uso de una jeringa de 1 ml con una aguja de 26 Ga. La electroporación se realizó inmediatamente después de la inyección. La electroporación de ADN se logró mediante el uso de un electroporador de onda cuadrada BTX ECM 830 que proporciona 8 pulsos de 350 V/cm, 10 mseg cada uno con una separación de 1 segundo. La electroporación se suministró mediante un mango Medpulsar con agujas espaciadas a 0,5 cm de distancia, configuradas para suministrar corriente unidireccionalmente de 2 agujas a 2 agujas opuestas. Las agujas de electroporación se insertaron en el tumor donde el tamaño del tumor lo permitía. Los tratamientos se realizaron los días 0,4 y 7, o los días 0 y 4 según el estudio. Después del tratamiento, el volumen del tumor se determinó cada 2-3 días mediante el uso de calibradores digitales como se describió anteriormente. Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen del tumor primario o contralateral alcanzó 1000 mm³.

Para cada experimento, se electroporó una cohorte de 10-15 ratones con plásmidos que codifican las proteínas GITRL recombinantes de ratón y se compararon con una cohorte ip tratada con el anticuerpo agonista de GITR DTA-1 de 500 µg el día 1 o se dejaron sin tratar.

En comparación con los ratones no tratados, los volúmenes tumorales para los tumores electroporados se redujeron significativamente (Figura 5A). Además, también se observó una reducción estadísticamente significativa en los tumores no tratados en el flanco contralateral del ratón (Figura 5B). Los tumores tratados demostraron una reducción comparable en el volumen como el tratamiento sistémico con DTA-1.

XI. Caracterización de las células T en el bazo y el tumor por citometría de flujo

Los tumores y el bazo se extirparon de los ratones sacrificados y se colocaron en RPMI + FBS al 10 %. Los esplenocitos se aislaron al presionar el bazo a través de un filtro de 70 micras, sometidos a lisis hipotónica de glóbulos rojos (tampón ACK; ThermoFisher). Los esplenocitos aislados se purificaron mediante el uso de linfolito M (Cedarlane) antes de la tinción. Los tumores se disociaron mediante el uso de Gentle-MACS para tumores (kit de disociación tumoral Miltenyi 130-096-730, tubos en C, 130-093-237) y se homogeneizaron mediante el uso de un disociador Octo Miltenyi gentleMACS™ con calentadores (130-096-427). Las muestras se almacenaron en hielo hasta que todas las muestras estuvieron listas. Las células se sedimentaron a 1200 rpm (800 x g) durante 5 minutos a 4 °C y se resuspendieron en PBS + FBS al 2 % + EDTA 1 mM (PFB) y se superpusieron sobre 5 ml de Lympholyte-M (Cedarlane) en tubos de centrifuga cónicos de 15 ml. Las columnas de Lympholyte se centrifugaron en una centrifuga a 2000 rpm (1500 x g) durante 20 minutos a temperatura ambiente sin freno. La capa de linfocitos se transfirió a 10 ml de PFB, luego se centrifugó a 1200 rpm (800 x g) durante 5 minutos a 4 °C. Los sedimentos celulares se resuspendieron suavemente en 500 µl de PFB con bloqueo Fc (BD Biosciences 553142). En una placa de 96 pocillos, las células se mezclaron con una solución de AH1-detrámero (immudex JG3294-APC), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron cócteles de tinción de anticuerpos que contienen lo siguiente: Anti-CD45-AF488 (Biolegend 100723), anti-CD3-BV785 (Biolegend 100232), Anti-CD4-PE (eBioscience12-0041), anti-CD8a-APC (eBioscience 17-0081), anti-CD44-APC-Cy7 (Biolegend 103028), anti-CD19-BV711 (Biolegend 11555), y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se lavaron 3 veces y se fijaron en PFB con paraformaldehído al 1 % durante 15 minutos en hielo. Las células se lavaron con PFB y se almacenaron a 4 °C en la oscuridad. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo LSR II (Beckman).

La electroporación intratumoral de GITRL aumentó las células T CD8+CD44+ de unión al dextrámero AH1 en el bazo (Figura 6). Un aumento en las células T efectoras CD8+ activadas que se unen al péptido AH1, que representa el antígeno inmunodominante en los tumores CT26, indica un aumento en la inmunidad sistémica a los tumores CT26 en ratones tratados.

Se usó RT-PCR para medir los cambios de expresión génica dentro del tumor tratado. Los tumores congelados exhibidos se resuspendieron en PBS y se homogeneizaron mediante el uso de un disociador suave MACS (Miltenyl Biotech). El homogenizado se transfirió más tarde a Trizol (Life Technologies Corp.). El ARN total se aisló de acuerdo con el protocolo del fabricante seguido por el tratamiento con DNasa. Se usó 1ug de ARN para preparar ADNc (kit de síntesis de ADNc Maxima H Minus First Strand con dsDNasa, Thermo Fisher Scientific). La RT-PCR se realizó mediante el uso de TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) y un CFX96 (Biorad). Los niveles relativos de ARNm se normalizaron a 18 segundos y el número de ciclo se usó para calcular la cantidad de cada producto mediante el uso del método 2- $\Delta\Delta$ CT (Livak y otros, Methods, 2001).

La electroporación intratumoral de GITRL disminuyó la expresión del gen Foxp3 dentro del tumor tratado (Figura 7). La expresión del factor de transcripción Foxp3 es un marcador para las células T reguladoras (Treg), que realizan una función inmunosupresora dentro del microambiente tumoral. El DTA-1, un anticuerpo agonista de GITR, se sabe que reduce el número de Tregs dentro de los tumores, y también se ha demostrado que reduce los niveles del gen Foxp3 presente en los tumores (Schaer y otros, (2013) Cancer Immunol Res. 1:320 -331) Del mismo modo, observamos una reducción en los niveles del gen Foxp3 en el tumor electroporado con pUMVC3-GITR4 en comparación con los tumores electroporados con el vector vacío pUMVC3.

Estos análisis de células T de bazos y tumores de ratones tratados sugieren que la electroporación intratumoral del plásmido que codifica para GITRL recombinante puede alterar los niveles de Treg dentro del tumor tratado y dar como resultado un aumento sistémico de las células T efectoras reactivas al antígeno tumoral.

Además de la monoterapia con GITRL, se realizó un estudio combinado mediante el uso del modelo de tumor singeneico CT26. El plásmido pUMVC3 que codifica el GITRL4-TM1 se sometió a electroporación intratumoral junto con pUMVC3 que codifica para las subunidades p35 y p40 de la citocina IL-12 (A Daud y otros, (2008) J. Clin. Oncol. 26:5896-5903).

Se observó una disminución estadísticamente significativa en el volumen tumoral medio del tumor contralateral no tratado en comparación con el control del vector pUMVC3 o el plásmido pUMVC3-IL12 solo, medido 6, 8, 11 y 13 días después del primer tratamiento con EP. Además, la regresión tumoral completa de los tumores no tratados tuvo una cinética más rápida. Por ejemplo, 19 días después del comienzo del tratamiento, 7/15 ratones habían completado tumores contralaterales en regresión mientras que la cohorte tratada con IL-12 tenía solo 1/15. Además, se observó un aumento en el número de ratones con una respuesta completa (CR) tanto en el primario (tratado) como en el contralateral (no tratado) en comparación con pUMVC3-IL-12 solo.

Tabla 8: La electroporación intratumoral de plásmidos que codifican el GITRL recombinante y la citocina, IL-12 redujo el crecimiento tumoral. Se muestra el volumen tumoral contralateral medido el día 11, así como también la incidencia de regresión tumoral completa (CR), respuesta parcial (PR) y enfermedad progresiva (PD) en tumores tratados y no tratados, medida 26 días después del primer tratamiento con EP (P = tumor primario; C = tumor contralateral).

Tratamientos	volumen tumoral mm ³ (media +/- SEM)	Número de ratones con CR de 15		Número de ratones con PR de 15		Número de ratones con PD de 15	
		P	C	P	C	P	C
No tratado	751,7 +/- 175,5	0	0	1	2	14	13
pUMVC3	675,7 +/- 36,5	2	0	1	3	12	12
pUMVC3-IL-12	176,6 +/- 115,8	13	8	0	3	2	5
pUMVC3-GITRL- TM1/pUM VC3-IL-12	64,25 +/- 61,8	13	11	0	1	2	3

Estos resultados indican que la terapia de combinación con GITRL e IL-12 en el microambiente tumoral del tumor primario (tratado) tuvo mayor eficacia que la IL-12 sola en un tumor contralateral no tratado.

X. Tratamiento intratumoral con IL-12, IL-15/IL15Ra, GITRL

La IL-12, la IL-15 y el GITRL tienen todos un efecto separado sobre la estimulación del sistema inmune. Los plásmidos que codifican las subunidades α y β de la IL-12, la IL-15 e IL-15Ra, y el GITRL recombinante se electroporan juntos (en plásmidos separados o en un solo plásmido) en tumores CT26 en un modelo de tumor contralateral para evaluar si la combinación de estos 5 genes tiene más eficacia en la regresión de tumores establecidos en ratones BALB/c. La eficacia de la electroporación intratumoral de un plásmido grande y único que codifica los 5 genes también se prueba en comparación con los ratones no tratados. Además, la prueba de estos genes en combinación y por separado se realiza en un modelo de tumor contralateral B16F10 en ratones C57/Bl6. Los volúmenes tumorales se miden en el tiempo y se mide el por ciento de ratones con respuesta completa.

XI. Histología

5 Los ratones son sacrificados humanamente por asfixia con CO₂. Los tumores se extirpan y se colocan en tubos cónicos de 50 ml que contienen 10 ml de formalina al 10 %. El tejido se tiñe con H&E después de la fijación, de la siguiente manera: después de la fijación en formalina tamponada neutra al 10 % durante 6 horas, las muestras de tejido representativas se procesan en bloques de parafina mediante el uso de un procesador de tejido Miles VIP (Miles Inc., Mishawaka, IN). En resumen, los tejidos se deshidratan en grados ascendentes de etanol, se limpian en xileno y se infiltran en parafina (Tissue Prep 2; Fisher Scientific). Después de la incrustación, los tejidos se seccionan en un micrótopo rotatorio estándar y se recuperan secciones de 4 mm de un baño de agua y se montan en portaobjetos de vidrio. Se examinan tres secciones por tumor. Las secciones se secan con calor y se tiñen con H&E (Richard-Allen Scientific, Kalamazoo, MI) mediante el uso de técnicas histológicas estándar.

15 XII. Inmunohistoquímica

15 La tinción inmunohistoquímica se realiza para examinar los tumores en busca de la presencia de linfocitos CD4+, linfocitos CD8+ y vasos sanguíneos mediante el uso de los siguientes anticuerpos: CD4 anti-ratón de rata, CD8 anti-ratón de rata (Ly2) y CD31 anti-ratón de rata (PECAM-1), respectivamente (PharMingen, Cambridge, MA). Los ratones son sacrificados humanamente por asfixia con CO₂. Los tumores se extirpan con unas tijeras y se elimina la piel, más tarde se congelan inmediatamente en una mezcla de hielo seco y etanol, y se almacenan a (-80 °C). Se obtienen secciones congeladas de 5 m. Para el análisis inmunohistoquímico, se aplica CD4 anti-ratón de rata, CD8 anti-ratón de rata (Ly2) o CD31 anti-ratón de rata (PECAM-1) a las secciones de tejido a una dilución de 1:50 y se incuban durante 20 30 minutos, seguido por detección con el kit Vector Elite Rat IgG Peroxidase a una concentración de 2X (15 minutos cada uno en IgG anti-rata biotinilada y complejo ABC). La inmunotinción se lleva a cabo en el equipo de tinción 25 automático Dako. Las secciones se analizan con un aumento de 400X.

XIII. Métodos de estadística

30 El análisis estadístico se realiza mediante ANOVA, prueba de Mann-Whitney o prueba T de Student de dos colas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un plásmido que codifica para una forma soluble de un agonista de GITR, CD137, CD134, CD40L o CD27 para usar en un método de tratamiento de un sujeto con un tumor canceroso, el método que comprende: inyectar el tumor canceroso con una dosis efectiva de dicho plásmido y un ácido nucleico que codifica al menos una citocina inmunoestimuladora; y administrar terapia de electroporación al tumor, la terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión de 200 V/cm a 1500 V/cm sobre un ancho de pulso de 100 microsegundos a 20 milisegundos.
- 10 2. El plásmido para usar en el método de la reivindicación 1, en donde el tumor canceroso es melanoma.
3. El plásmido para usar en el método de la reivindicación 1 o 2 en donde la forma soluble de un agonista de GITR, CD137, CD134, CD40L o CD27 es una forma soluble de GITR-L, CD137-L, CD134-L o CD40.
- 15 4. El plásmido para usar en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el plásmido comprende además el ácido nucleico que codifica al menos una citocina inmunoestimuladora.
- 20 5. El plásmido para usar en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la citocina inmunoestimuladora se selecciona del grupo que consiste en: IL-12, IL-15 y una combinación de IL-12 e IL-15.
- 25 6. El plásmido para usar en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el al menos un pulso de tensión suministrado al tumor es de 200 V/cm a 1500 V/cm.
- 30 7. El plásmido para usar en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el método comprende: administrar un primer tratamiento por primera vez (T1), en donde el primer tratamiento comprende además inyectar el tumor canceroso con una primera dosis efectiva de dicho plásmido y administrar una primera terapia de electroporación al tumor en el momento T1, la primera terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión que tiene una duración de 100 microsegundos a 20 milisegundos; y administrar un segundo tratamiento en un segundo momento (T2), en donde el momento T2 es un tiempo posterior al momento T1, en donde el segundo tratamiento comprende además inyectar el tumor canceroso con una segunda dosis efectiva de dicho plásmido y administrar una segunda terapia de electroporación al tumor en el momento T2, la segunda terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión que tiene una duración de 100 microsegundos a 20 milisegundos.
- 35 8. El plásmido para usar en el método de la reivindicación 7, en donde el método comprende además: administrar un tercer tratamiento en un tercer momento (T3), en donde el momento T3 es un tiempo posterior al momento T2, en donde el tercer tratamiento comprende además inyectar el tumor canceroso con una tercera dosis efectiva de dicho plásmido y administrar una tercera terapia de electroporación al tumor, la tercera terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión que tiene una duración de 100 microsegundos a 20 milisegundos.
- 40 9. El plásmido para usar en el método de la reivindicación 7, en donde el método comprende además: inyectar una dosis efectiva de dicho plásmido en el tumor canceroso del sujeto; y administrar la electroporación al sujeto por vía intratumoral mediante el uso de al menos un pulso de tensión bajo con un ancho de pulso de 100 microsegundos a 20 milisegundos.
- 45 10. Un plásmido que codifica para una forma soluble de un agonista de GITR, CD137, CD134, CD40L o CD27 para usar en un método de tratamiento de tumores distantes y metástasis en un sujeto con cáncer, el método que comprende: inyectar un tumor canceroso con una dosis efectiva de dicho plásmido y un ácido nucleico que codifica al menos una citocina inmunoestimuladora; y administrar la terapia de electroporación al tumor, la terapia de electroporación que comprende además la administración de al menos un pulso de tensión de 200 V/cm a 1500 V/cm durante un ancho de pulso de 100 microsegundos a 20 milisegundos.
- 50
- 55

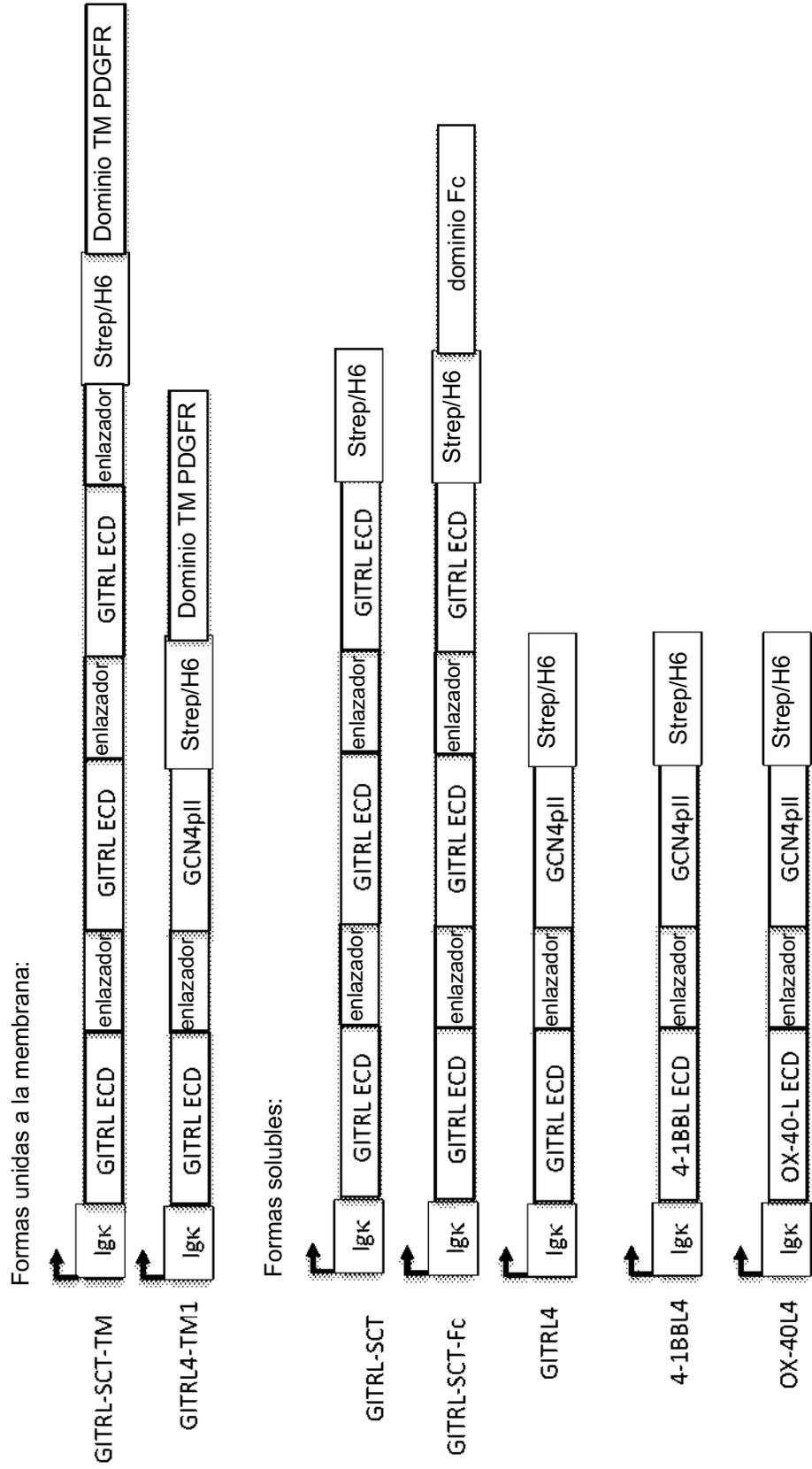
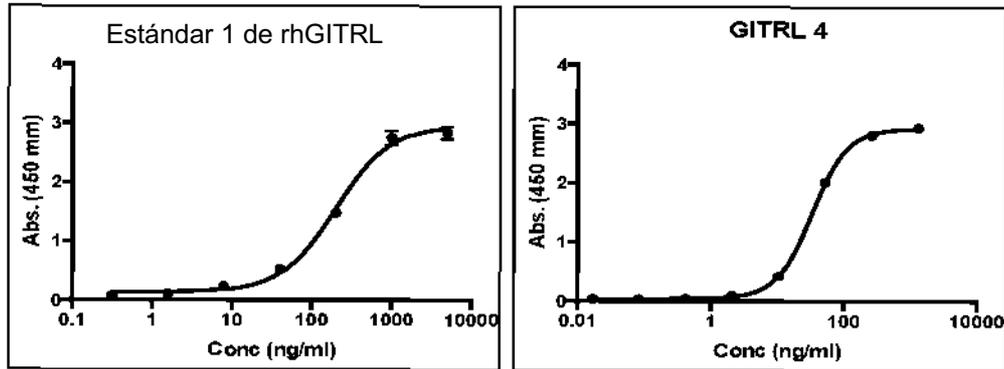


Figura 1



proteína	Absorbancia (450)	Actividad (unidades/ng)
Estándar GITRL (R&D)	0,23	22,92
sGITRL#4	0,41	40,79

Figura 2

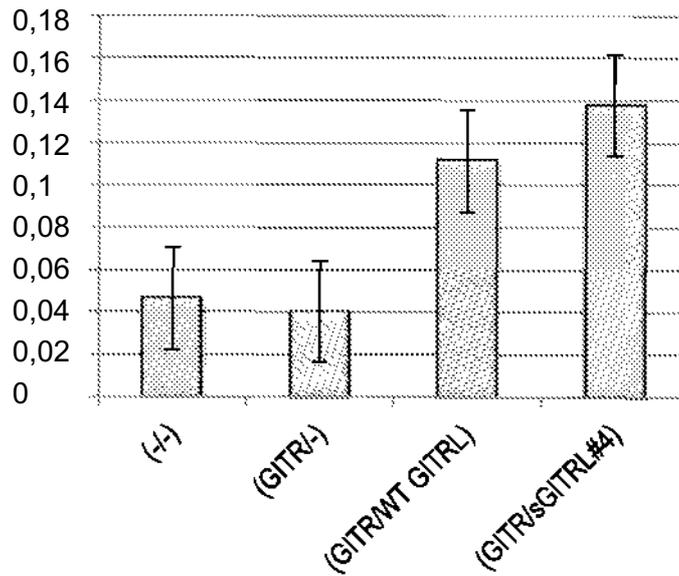


Figura 3

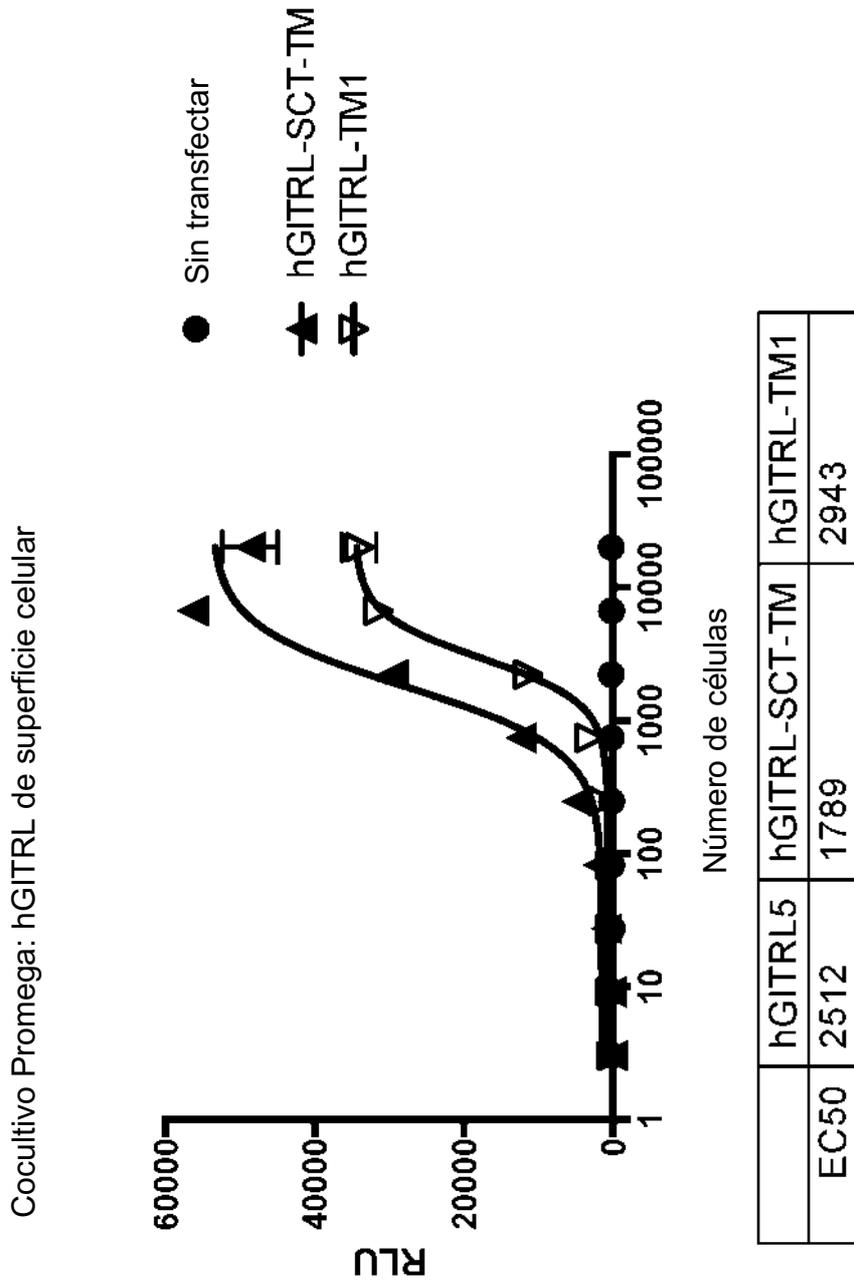


Figura 4

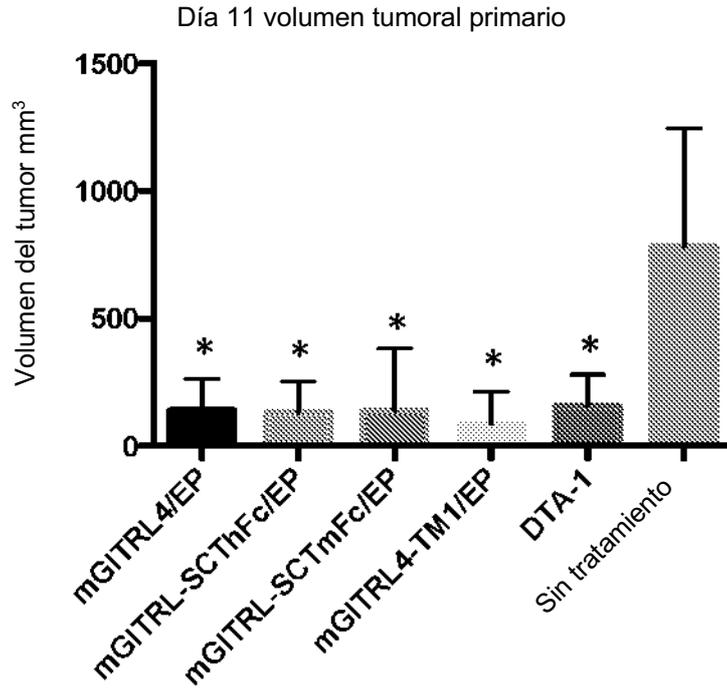


Figura 5A

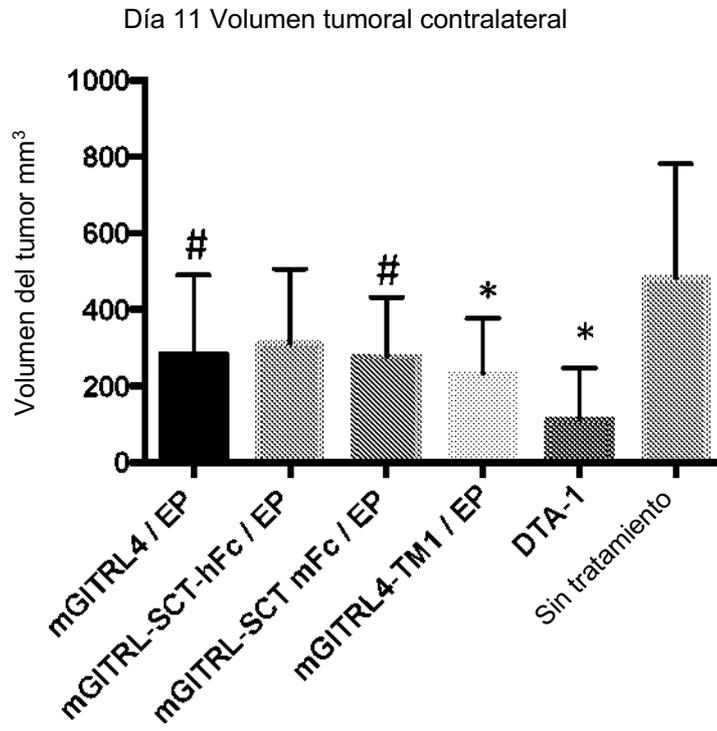


Figura 5B

Células activadas CD8+ del tetrámero positivo

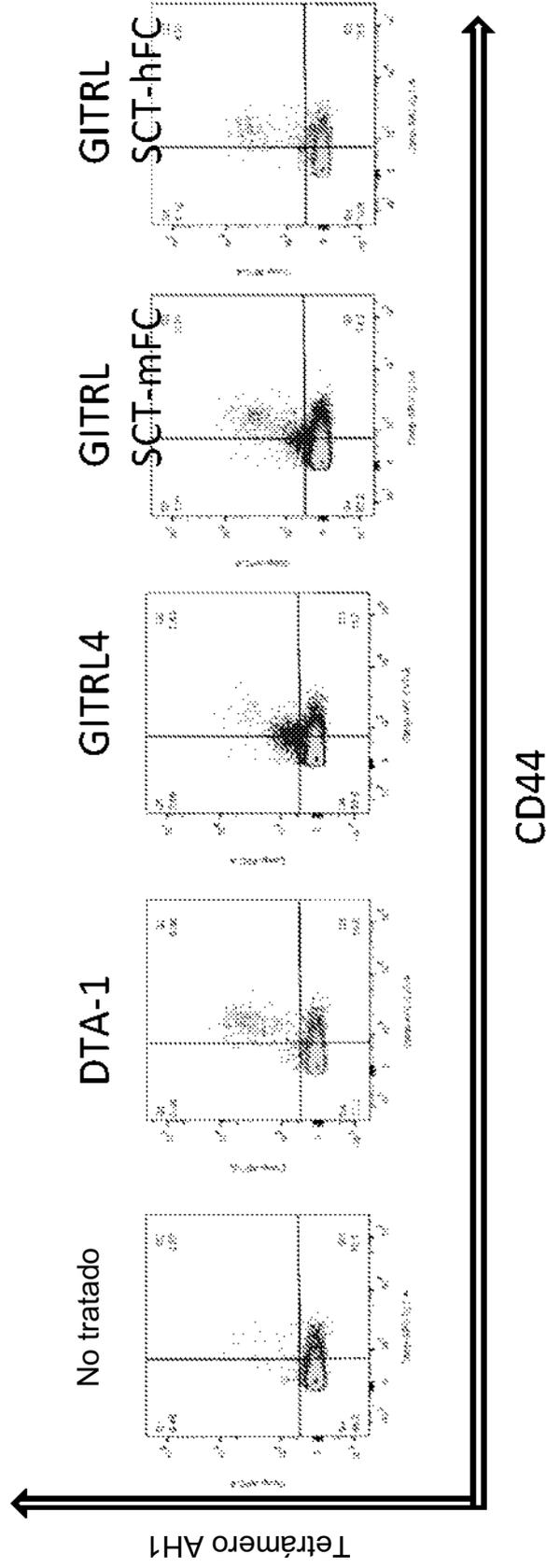


Figura 6

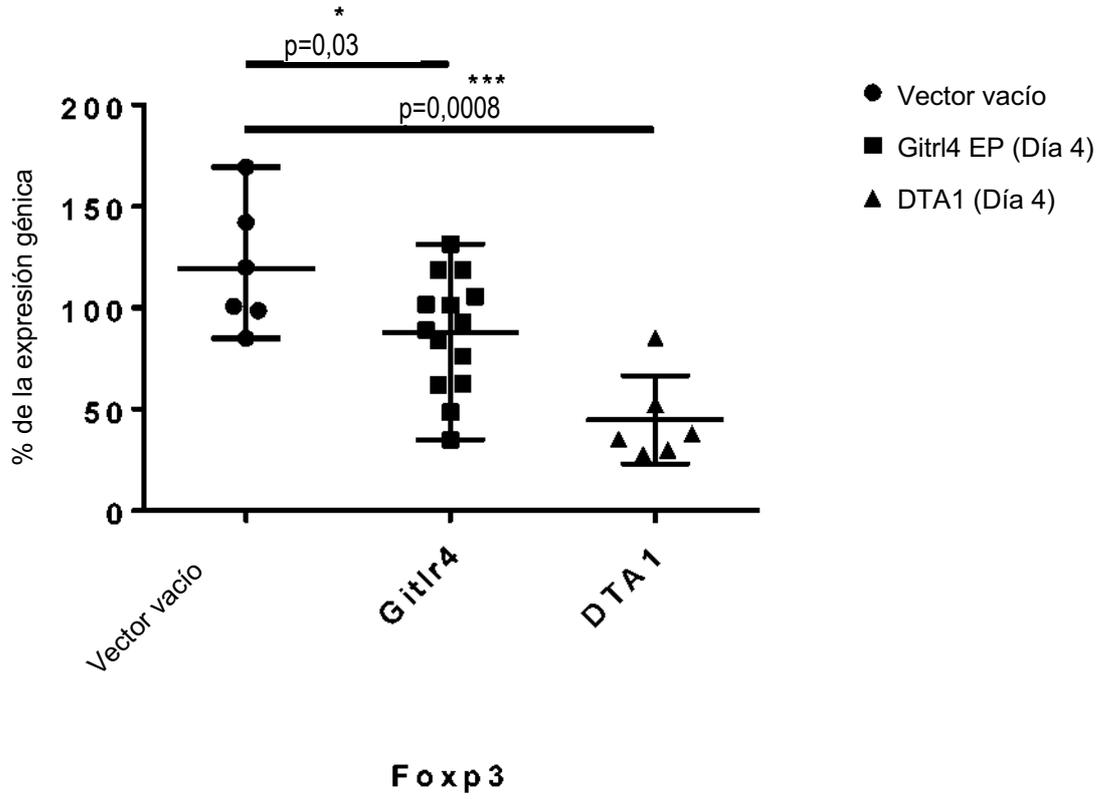


Figura 7