

DEPARTAMENT GENÈTICA

TERAPIA GÈNICA ANTITUMORAL MEDIANTE VACUNAS  
CON CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

MARIA JOSÉ HERRERO CERVERA

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 25 de juliol de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Esteban Morcillo Sánchez
- D. Guillermo Güenetxea Amurrio
- D. Salvador Lledó Matoses
- D. Rafael Botella Estrada
- D<sup>a</sup>. Amparo Latorre Castillo

Va ser dirigida per:

D. Salvador F. Aliño Pellicer

©Copyright: Servei de Publicacions  
Maria José Herrero Cervera

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7297-5

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**TERAPIA GÉNICA ANTITUMORAL  
MEDIANTE VACUNAS CON CÉLULAS  
MODIFICADAS GENÉTICAMENTE**

**TESIS DOCTORAL  
MARÍA JOSÉ HERRERO CERVERA**

**Valencia, Junio 2008**

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**



**“TERAPIA GÉNICA ANTITUMORAL  
MEDIANTE VACUNAS CON CÉLULAS  
MODIFICADAS GENÉTICAMENTE”**

**TESIS DOCTORAL**  
**MARÍA JOSÉ HERRERO CERVERA**

**Valencia, Junio 2008**

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**Dr. Salvador F. Aliño Pellicer**, Catedrático del departamento de Farmacología de la Universidad de Valencia, con DNI 20761100N, hace constar:

que el trabajo titulado “ Terapia génica antitumoral mediante vacunas con células modificadas genéticamente”, presentado por la licenciada María José Herrero Cervera, con DNI 53053049F, para obtener el grado de Doctora, ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, bajo mi dirección.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizo la presentación de esta tesis doctoral.

En Valencia, a 8 de Abril de 2008

Asimismo, hacemos constar que la fase académica (cursos de doctorado) y administrativa (tramitación) de esta tesis doctoral ha sido realizada en el departamento de Genética de la Facultad de Biología de la Universidad de Valencia, a cuyo personal agradecemos sus ayudas y enseñanzas.

*Después de estos años realizando esta tesis, hay muchas cosas por las que estar agradecido y muchas personas a las que agradecer:*

*Al “boss”, Salvador F. Aliño, gracias por la oportunidad que me diste hace ya siete años y por todas las valiosas enseñanzas así como por tu comprensión, siempre. No sería la profesional que hoy soy si no hubiese crecido contigo.*

*A mis más cercanos apoyos en el laboratorio: Antonio Crespo, Antoñet, qué fácil es trabajar codo con codo con alguien que te enseña tanto y te brinda tanta ayuda y tanta amistad.*

*María Sánchez, adaptarse siempre es un reto, y tú, una vez más, lo has superado. Te admiro. Somos un equipo.*

*A todos los compañeros del departamento de farmacología, así como de la Universidad y Unidad Central de Investigación Médica, que siempre me han ofrecido su alegría y compañerismo cuando lo he necesitado. Especialmente, aquellos que se han convertido en algo más que compañeros: Víctor Víctor, Mila Rocha, Manolo Mata, Lara Milián, Paco Dasí, Maleles Martínez, Silvia Nieto, Vicent Guillem.*

*Al personal del servicio de radioterapia del Hospital Clínico, por su ayuda y colaboración y al Dr. Rafael Botella, del Instituto Valenciano de Oncología, que también confió en mí desde el principio.*

*Finalmente, a mi familia, que siempre están conmigo, con las alegrías, pero también con los disgustos y agobios, ojalá os transmita más de las primeras y menos de los últimos. Mamá y Pach, juntas lo hemos superado todo, os quiero muchísimo y os necesito. Papá, todo lo bueno que hago en la vida va dedicado a ti, sé que de esto también estarás orgulloso. Luca, que has tenido que comprender a la fuerza lo que implica esta profesión y “sufrirla” conmigo, dándome el don de olvidar lo malo cuando estoy a tu lado.*

*A todos, mil gracias.*

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>	<b>1</b>
<b>PRESENTACIÓN</b>		<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS</b>		<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>		<b>9</b>
1- Terapia Génica		<b>10</b>
2- Mecanismos de Introducción de Genes: Vectores de transferencia génica		<b>11</b>
3- Terapia Génica y Cáncer		<b>14</b>
4- Modificación de la Respuesta Inmune Antitumoral para el Tratamiento del Cáncer: la Inmunomodulación		<b>18</b>
5- Principales Estrategias en las VacunasAntitumorales: el melanoma como modelo de estudio		<b>27</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>		<b>32</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>		<b>33</b>
1- Líneas Celulares		<b>34</b>
2- Plásmidos y Bacterias		<b>35</b>
3- Obtención de Proteínas hidrosolubles de Membrana Tumoral (TMP)		<b>38</b>
4- Preparación de Liposomas y Lipopoliplexos		<b>39</b>
5- Transfección celular <i>in vitro</i> mediante métodos no virales		<b>43</b>
5.1- Poliplexo PEI/ADN		
5.2- Lipoplejo DOTAP/ADN		

<b>6- Transfección <i>in vivo</i> mediante métodos no virales</b>	<b>44</b>
<b>6.1- Acondicionamiento Genético Tisular</b>	
<b>6.2-Transferencia Génica Hidrodinámica</b>	
<b>7- ELISA de mGM-CSF y mIL-12</b>	<b>45</b>
<b>8- Análisis de la expresión de m-B7.2</b>	<b>46</b>
<b>por Citometría de Flujo</b>	
<b>9- Selección y Purificación de Células Transfectadas:</b>	<b>47</b>
<b>Bolas Magnéticas</b>	
<b>10- Vacunas</b>	<b>48</b>
<b>10.1- Vacunas Preventivas</b>	<b>48</b>
<b>10.1.1- Vacunas con Antígenos:</b>	<b>50</b>
<b>Libres o Encapsulados en Liposomas</b>	
<b>10.1.2- Vacunas con Asociación</b>	<b>50</b>
<b>de Antígenos y Genes</b>	
- Vacunas con Lipopolíplejos	
- Vacunas con Acondicionamiento Genético	
<b>Tisular (Directo e Inverso)</b>	
<b>10.1.3- Vacunas con Células</b>	<b>53</b>
<b>Modificadas Genéticamente</b>	
- Vacunas con Células Transfectadas	
<b>No Seleccionadas.</b>	
- Segunda Exposición al Tumor: Reimplantación	
- Vacunas con Células Transfectadas y	
<b>Seleccionadas mediante Bolas Magnéticas</b>	
<b>10.2- Vacunas Terapéuticas</b>	<b>56</b>
<b>10.2.1- Efecto del acondicionamiento</b>	<b>56</b>
<b>sistémico mediante transferencia génica hidrodinámica,</b>	
<b>sobre el crecimiento del tumor</b>	

10.2.2- Vacuna Terapéutica con Células Modificadas Genéticamente	57
- Tratamiento Celular Dosis Baja.	
- Tratamiento Celular con Ciclofosfamida más Dosis Baja	
- Tratamiento Celular Dosis Alta. Obtención de Linfocitos a partir de la Sangre. Caracterización de Células T Reguladoras por Microscopía Confocal.	
11. Medida del Tamaño tumoral. Supervivencia. Análisis Estadístico	60
12. ELISA específico Anti-TMP	61
<b>RESULTADOS</b>	<b>63</b>
1. Vacunas Preventivas	
1.1- Vacunas con Antígenos: Libres o Encapsulados en Liposomas	64
1.1.1-Eficacia de la Encapsulación de Proteína en Liposomas	
1.1.2-Efecto de la Vacunación sobre el Crecimiento Tumoral	
1.2- Vacunas con Lipopolíplejos	67
1.2.1- Eficacia de la Encapsulación de TMP en Liposomas Sencillos y Complejos	
1.2.1- Efecto Antitumoral de la Vacunación con Lipopolíplejos	
1.3- Vacunas con Acondicionamiento Genético	75

1.3.1- Evaluación por RT-PCR de la Eficacia del Acondicionamiento Genético Tisular	
1.3.2- Efecto Antitumoral de la Vacuna con Acondicionamiento Tisular Directo	
1.3.3- Efecto Antitumoral de la Vacuna con Acondicionamiento Tisular Inverso	
<b>1.4- Vacunas con Células Transfectadas</b>	<b>83</b>
No Seleccionadas	
1.4.1- Evaluación de la Producción del Transgén en las Células Transfectadas por ELISA	
1.4.2- Efecto Antitumoral de la Vacuna con Células Transfectadas No Seleccionadas	
1.4.3- Reimplantación de Tumor: Comprobación de la Memoria Inmunológica	
<b>1.5- Vacunas con Células Transfectadas y Seleccionadas mediante Bolas Magnéticas</b>	<b>100</b>
1.5.1- Eficacia de la Transfección <i>in vitro</i> del gen <i>m-B7.2</i> por citometría de flujo	
1.5.2- Purificación de Células Transfectadas mediante Bolas Magnéticas	
1.5.3- Eficacia de la Vacuna Antitumoral con Células Transfectadas y Seleccionadas	

Vacunas genéticas contra el melanoma

<b>2- Vacunas Terapéuticas</b>	<b>110</b>
<b>2.1- Efecto del Acondicionamiento Sistémico Mediante Transferencia Hidrodinámica, sobre el Crecimiento Tumoral</b>	<b>110</b>
<b>2.2- Tratamientos Celulares</b>	<b>114</b>
<b>2.2.1- Eficacia Antitumoral Terapéutica del Tratamiento Celular Dosis Baja</b>	
<b>2.2.2- Eficacia Antitumoral Terapéutica del Tratamiento Celular con Ciclofosfamida y Dosis Baja</b>	
<b>2.2.3- Eficacia Antitumoral Terapéutica del Tratamiento Celular Dosis Alta. Estudio de Células T reguladoras.</b>	
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>140</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>161</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>163</b>

**ANEXO: publicaciones derivadas de la tesis doctoral**

## **PRESENTACIÓN**

Desde los inicios de la investigación en vacunas antitumorales hemos asistido a un progresivo aumento de la eficacia de las mismas en los diferentes modelos experimentales, indicando que era plausible su aplicación en la terapia del cáncer. Desafortunadamente, al llegar a la clínica se han encontrado grandes limitaciones, más en el campo terapéutico que en el preventivo, apuntando a la existencia de complejas barreras limitantes al efecto de estas vacunas fuera de los modelos de laboratorio.

Pensamos que el mejor conocimiento de los mecanismos desencadenados por estas vacunas nos permitirá sortear esas barreras. La consecución de este objetivo podría suponer importantes beneficios en los pacientes portadores de tumor.

Nuestro laboratorio cuenta con una amplia experiencia en el campo de la terapia génica así como el de las vacunas, lo que se ha visto reflejado en numerosas tesis doctorales que abarcan trabajos desde los liposomas, lipopoliplexos y proteínas tumorales hasta las células. Los resultados ponen de manifiesto los beneficios en la terapia preventiva y como principal limitación, el fracaso terapéutico. En el presente trabajo de tesis doctoral hemos querido reunir la experiencia previa con la más reciente, para conseguir añadir un paso más hacia el éxito de la vacunación terapéutica antitumoral.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

### **ABREVIATURAS**

APC	Célula Presentadora de Antígeno
APC	En los experimentos de inmunotinción: Alofococianina
CH	Colesterol
CMV	Citomegalovirus
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Dicetilfosfato
DRV	Dehydration-Rehydration Vesicles
EF1 $\alpha$	Elongation Factor 1 $\alpha$
FerH y FerL	Cadena pesada (H) y ligera (L) de la Ferritina
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
GITR	Glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor
HLA	Human Leukocyte Antigen
LB	Luria Broth
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo de Histocompatibilidad Molecular
MLV/ MLV-FT	Multilamellar Vesicles / MLV Freeze-Thaw
NK	Natural killer cell
OPD	Ortofenilendiamina
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Fosfatidilcolina
PE	Ficoeritrina
PEI	Polietilenimina
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
SBF	Suero Bovino Fetal
SM	Esfingomielina
SV40	Simian Virus 40
TMP	Tumor Membrane Protein
UTR	Untranslated region

# **INTRODUCCIÓN**

## 1- LA TERAPIA GÉNICA

La Terapia Génica viene definida por el empleo de los genes como material terapéutico para la cura de enfermedades. Esta idea surge gracias a los grandes avances, especialmente en el campo de la genética, a partir de los años 70 del pasado siglo, así como gracias a la biología molecular y la farmacología, entre otras disciplinas. Está fundamentada en la idea de combatir la enfermedad desde su causa real inicial, silenciando, reparando, sustituyendo o implementando los genes “defectuosos” que, en última instancia, son los causantes de las diferentes patologías. Esta idea supuso en su momento una revolución conceptual en la terapéutica convencional, casi siempre paliativa, y se presentaba en sus inicios como la panacea de la medicina y el futuro de la misma.

Sin embargo, con el paso de los años se fue constatando que realmente no era tan sencillo llevarla a la práctica como conceptualmente parecía. El primer problema era poder identificar el gen o genes causantes de una patología, entre otras razones porque la mayoría de las enfermedades son de etiología no sólo poligénica sino además multifactorial. Por otra parte, tampoco se mostró fácil la entrega eficaz del nuevo “medicamento” al organismo *in vivo*.

Con todo esto, la terapia génica ha tenido que ir adaptando sus propuestas a la realidad y por ello sólo ciertas enfermedades, que cumplen una serie de requisitos son en principio, candidatas adecuadas para ser tratadas mediante este tipo de terapia. Estos requisitos, a grandes rasgos, dividen las aplicaciones de la terapia génica en dos grandes grupos de enfermedades, enfermedades genéticas (principalmente monogénicas y sin ninguna otra posibilidad terapéutica actual) y enfermedades adquiridas (cáncer y enfermedades infecciosas) donde la diana principal es el sistema inmunitario. Tres son las estrategias que se pueden plantear a la hora de abordar un posible tratamiento de terapia génica, según la etiología de la enfermedad:

- Implementación génica, con el fin de introducir genes que aporten funciones que no existían previamente en el organismo o que

incrementen una función o suplan una defectuosa por medio de la introducción de copias “sanas” del gen;

- Silenciamiento génico, como en el caso del silenciamiento de oncogenes u otros genes cuya sobreexpresión sea causante de patología;
- Reparación génica, también conocida como cirugía génica, consistente en la reparación directa de una mutación o defecto conocido en el gen.

## **2- MECANISMOS DE INTRODUCCIÓN DE GENES: LAS DOS FAMILIAS DE LA TERAPIA GÉNICA**

Dos son los procedimientos básicos por los cuales introducimos material genético exógeno en las células, los **métodos virales** y los **métodos no virales**. Todos ellos quedan reflejados en el siguiente esquema:

### **Terapia Génica**

#### **1-Viral**

- 1.1-Retrovirus
  - Lentivirus
  - Otros
- 1.2-Adenovirus
- 1.3-Adenoasociados
- 1.4-Herpesevirus

#### **2-No Viral**

- 2.1- ADN desnudo
- 2.2- Fosfato Cálculo
- 2.3- Microinyección
- 2.4- Electroporación
- 2.5- proyectiles
- 2.6-Complejos: Vectores no virales + ADN/ARN
  - 2.6.1-liposomas
  - 2.6.2-lípidos catiónicos
  - 2.6.3-polímeros catiónicos

Los virus parten con la ventaja de miles de años de evolución en los que se ha seleccionado una forma muy eficiente de entrar a las células, llegar a su núcleo y depositar en él, incluso de una forma dirigida, su propio material genético. De todo este largo proceso nos hemos beneficiado a la hora de

## Vacunas genéticas contra el melanoma

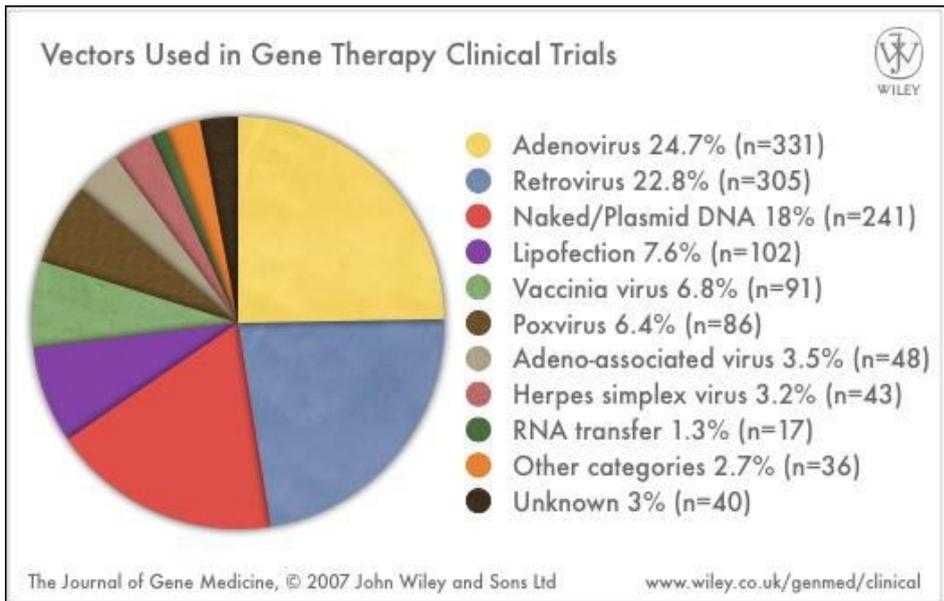
utilizar los virus como vehículo de “infección” y entrega del material genético que nos interesa introducir en las células. El tropismo natural de ciertos virus hacia tejidos u órganos determinados ha facilitado mucho la entrega dirigida de genes a células diana, como sucede con los adenovirus para el hígado y los herpesvirus para el sistema nervioso.

Sin embargo, manipular los virus en el laboratorio, sobretodo algunos tipos, no siempre resulta fácil y además las reacciones adversas que en muchos casos se producen en los tratamientos al paciente (fiebre, malestar, reacciones de hipersensibilidad,...) pueden llegar a ser muy peligrosas e incluso letales si se llega al caso de las mutaciones provocadas por estos virus. Estos efectos, que hoy se conocen como mutagénesis u oncogénesis insercional por integración retroviral, tienen como resultado la activación de protooncogenes. Han ocasionando incluso la muerte de pacientes y se describieron por primera vez en el año 2002 en la revista Science [1]. Desafortunadamente, en 2003 el grupo de Alain Fischer y Marina Cavazzana-Calvo anunció [2] el primer efecto adverso grave en lo que hasta el momento había sido el mayor éxito de la terapia génica en la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X, SCID-X1 [3]. A día de hoy, uno de sus diez pacientes ha fallecido y tres más sufren leucemia mieloide aguda. Los procesos de integración de los virus que cuentan con esta capacidad, todavía no están perfectamente controlados, aunque se están realizando grandes esfuerzos al respecto [4-6]. Estos hallazgos también han llevado a diferentes grupos a optar por otra familia de virus, los Lentivirus, como vectores más seguros ya que parecen no tener preferencia por los sitios de integración que sí tienen los retrovirus [7, 8], entre otras ventajas.

De todos modos, no hay que olvidar que actualmente los vectores virales están funcionando en un total de 40 ensayos clínicos en todo el mundo, con un total de 250 pacientes y únicamente se han descrito los efectos adversos graves anteriormente mencionados. En enfermedades como la deficiencia en adenosín deaminasa, ADA, siempre se ha logrado beneficio clínico, sin aparecer efectos adversos y en la granulomatosis crónica, CGD, aunque sí se

ha encontrado algún efecto adverso, éstos siguen siendo superados por los beneficios.

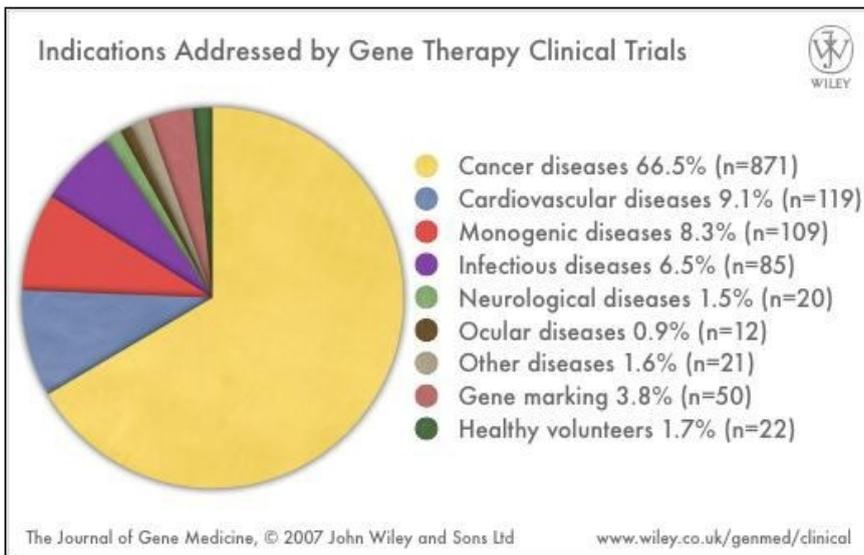
En el gráfico siguiente podemos comprobar cuáles son los vectores empleados en los ensayos clínicos de terapia génica a nivel mundial en la actualidad [9].



En nuestras investigaciones hemos elegido la opción de los métodos no virales, que aunque no logran fácilmente las grandes eficacias de transfección y persistencia en la expresión de algunos virus, al menos ofrecen la ventaja de su seguridad, demostrando hasta el momento ser prácticamente inocuos para el organismo a tratar. Además es muy importante tener en cuenta la finalidad de cada tratamiento y así, en el caso concreto de la terapia génica del sistema inmune, que es el nuestro, suele ser más interesante una producción no excesivamente elevada del transgén y además durante un periodo concreto, no de forma prolongada, con lo que los vectores no virales nos ofrecen sus características como ventajosas y nos eximen de los inconvenientes que pudieran tener los virales.

### 3- TERAPIA GÉNICA Y CÁNCER

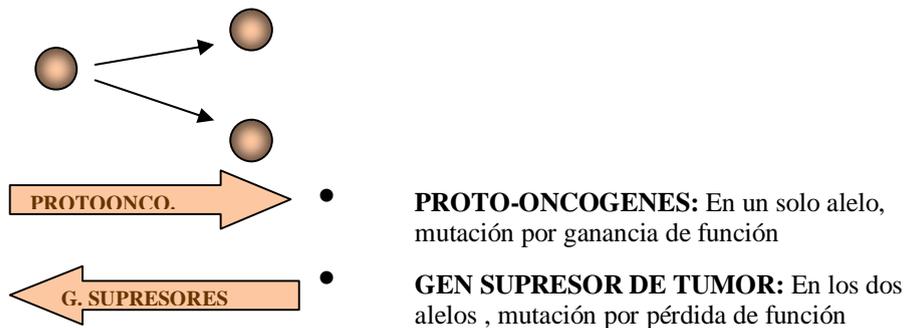
Según los datos más recientes [9] más del 65% de los protocolos de terapia génica humana han sido aprobados en el campo del cáncer, como podemos comprobar en el esquema inferior. Esto es debido al intenso esfuerzo dedicado a la elucidación de los mecanismos de carcinogénesis. Tras un gran estudio de todos estos procesos se admite que el cáncer no es consecuencia de un solo evento sino el resultado de una cadena de alteraciones genéticas. Estas alteraciones varían de acuerdo con el tipo y estado del cáncer. Actualmente, cirugía, radiactividad y quimioterapia forman la dirección médica del cáncer, pero gracias al énfasis en estudiar nuevos protocolos humanos en la terapia génica del cáncer, se están encontrando nuevos tratamientos exitosos.



#### Las causas moleculares del cáncer

El cáncer surge de una pérdida o mal funcionamiento de los mecanismos reguladores que controlan el crecimiento celular y la proliferación. Esta pérdida puede provenir de mutaciones en los genes que codifican estos procesos regulatorios. En general, una mutación recesiva se correlaciona con

una pérdida de función, tal y como ocurre en los genes supresores de tumores, mientras que una mutación dominante se correlaciona con una ganancia de función como ocurre en la sobreexpresión de un oncogén, el cual es silencioso en condiciones normales (figura inferior). Ambos tipos de mutaciones podrían desregular el crecimiento celular.



El objetivo de la terapia génica en cáncer es la manipulación de estas mutaciones genéticas para controlar los mecanismos celulares normales o bien, si esto no es posible, centrarse en la siguientes fase, ya no tan dependiente de los genes en sí sino del siguiente paso: la capacidad de las células tumorales para evadir el sistema inmunitario, no ser reconocidas como extrañas y así burlar todos los mecanismos de retención, comenzando su proliferación descontrolada [10].

Así pues, la terapia génica para el tratamiento del cáncer se dirige a:

- 1) Reemplazamiento de genes supresores de tumores defectuosos
- 2) Silenciamiento de oncogenes sobreexpresados
- 3) Entrega de componentes genéticos para terapias dirigidas a prodrogas/genes suicidas
- 4) Modulación de la respuesta inmune antitumoral (immunopotenciación genética)

Esta tesis doctoral está centrada en este último punto (4).

### **La respuesta inmune**

La selección y activación de las células, con especificidad correcta para un antígeno particular ocurre en el nódulo linfático. Es aquí, donde las células T interactúan con células presentadoras de antígenos (APC), como es el caso de las células dendríticas. Las células dendríticas regresan al nódulo linfático después de haberse encontrado con las células patógenas en la periferia. Las células dendríticas son perfectamente adecuadas para esta función ya que expresan no sólo las moléculas de histocompatibilidad, MHC I y II, sino también moléculas coestimuladoras específicas como B7.1, B7.2, CD40L, ICAM 1,2,3, VCAM-1 y LFA-3. Con el reconocimiento específico y activación de la célula T, el clon o clones migra desde el nodo y viaja directamente allá donde están las células o agentes patogénicos. Como células T activadas, sólo requerirán reconocimiento, que sucede gracias a la misma señal que fue presentada por las MHC de la célula presentadora de antígeno, para atacar y destruir a las células marcadas. Ésta es la **respuesta celular**, que destruye las células tumorales a través de la liberación de perforinas y otros elementos que, por la vía de la apoptosis, van a provocar la muerte de las células reconocidas. Participan también en esta respuesta las células Natural Killer (NK) y los macrófagos.

La **respuesta humoral** está protagonizada por los linfocitos B, incluye la citotoxicidad mediada por anticuerpos, la citotoxicidad mediada por el sistema de complemento y la opsonización. Además de los linfocitos T CD8+, diferentes poblaciones leucocitarias (fagocitos mononucleares, neutrófilos, eosinófilos y, sobretodo, células NK) son capaces de inducir la muerte de células diana, pero en muchos casos, la citotoxicidad mediada por estas células requiere que la célula diana esté recubierta por Igs específicas: IgG, IgE o IgA. Para que un linfocito B se active totalmente, prolifere y se diferencie a célula plasmática productora de anticuerpos, requiere la colaboración de los linfocitos Th2. El reconocimiento de los antígenos se realiza a través del MHC clase II.

De forma paralela, la unión de los anticuerpos específicos a las células tumorales producirá la destrucción de las mismas por el sistema del complemento a través de la formación de poros en la membrana produciendo la lisis osmótica de la célula atacada. Además, con la opsonización los anticuerpos unidos a las células tumorales sirven de señal para que estas células sean engullidas por los macrófagos que las destruyen y procesan los antígenos para poderlos presentar a otras células del sistema inmune [10-13]. Desafortunadamente, en muchos casos las células tumorales escapan a estos sistemas de control, principalmente porque escapan al reconocimiento y no se detectan como células extrañas. Un tumor no es algo completamente extraño dentro de un organismo, ya que son células propias y por lo tanto con una gran carga antigénica reconocible por el sistema inmune del paciente. Además, no es un grupo de células extrañas que llegue en masa, sino que desde un número muy pequeño va creciendo y además va cambiando paulatinamente al mismo tiempo que crece. Debido a estas características, entre otras, los tumores escapan a la inmunovigilancia: sus antígenos se incorporan como una variante más de lo propio ya que se admite un cierto grado de versatilidad. Es en esa tolerancia donde reside la potencialidad inicial de escape del cáncer.

Potenciar el reconocimiento y el rechazo a las células tumorales es uno de los frentes de la terapia génica contra el cáncer, y el objetivo de este trabajo. El hecho de presentar los antígenos en un contexto adecuado hace que el sistema inmunitario cambie la decisión de reconocerlos como propios a hacerlo como extraños [13]. La estrategia a seguir consiste en nuestro caso, en introducir las células tumorales en forma de vacuna, habiendo activado previamente una respuesta proinflamatoria para fomentar que el sistema inmune no sea permisivo, detecte esas células como extrañas y luche contra ellas y sus semejantes: en esto consiste básicamente la inmunomodulación que hemos utilizado.

#### **4- MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER: LA INMUNOMODULACIÓN**

La causa o el desarrollo de gran número de las enfermedades abordables con terapia génica reside en algún tipo de defecto en el sistema inmunitario del paciente, bien sea porque rechaza lo propio en lugar de aceptarlo y no reaccionar contra ello, como es el caso de las enfermedades autoinmunes, o todo lo contrario, como es el caso del cáncer, en el que las células tumorales no son reconocidas como defectuosas y se les permite proliferar de forma incontrolada. La importancia de este hecho en la terapia antitumoral queda reflejada en el dato de que un 48% [9-11] de los protocolos de terapia génica del cáncer están basados precisamente en lo que llamamos inmunomodulación: el uso de nuestro propio sistema inmunitario como arma principal de lucha, modificándolo de manera que potenciemos o frenemos su acción allá donde sea necesario.

Quién mejor para defendernos que aquel que lleva siglos de evolución haciéndolo y que seguramente, por ser autólogo, no presentará muchos de los problemas de toxicidad que muestran otros tratamientos. Potenciar nuestro sistema inmunitario frente al reconocimiento y rechazo de tumores, será pues la meta de este conjunto de estrategias de terapia génica.

##### **Sistemas de regulación positiva**

En nuestros estudios hemos utilizado como activadores del sistema inmune a las citoquinas GM-CSF, IL-12 y a la molécula coestimuladora B7.2.

Las citoquinas son proteínas secretadas por las células inmunes que actúan como potentes mediadores de la respuesta inmune, orquestando y provocando funciones en las diferentes células implicadas y la coordinación entre ellas. El mundo del estudio de las citoquinas es realmente complicado ya que hay una enorme imbricación entre los procesos que cada una desencadena. Además, una misma citoquina puede ejercer diferentes efectos sobre un mismo tipo

celular, a veces muy diferentes, según sean el resto de señales que están llegando a esa célula. También una misma citoquina provoca reacciones diferentes en cada tipo celular del sistema inmune y finalmente, los procesos de regulación y señalización de unas citoquinas sobre otras son realmente complejos.

El uso de las citoquinas en las vacunas contra el cáncer existe desde los primeros intentos de inmunización contra esta enfermedad y ya en los inicios se comprobó que los efectos antitumorales de las citoquinas eran mucho más efectivos si éstas eran secretadas por las propias células del entorno en lugar de aparecer tras ser inyectadas en el escenario [12]. Es por ello que se han creado multitud de líneas de investigación que usan la terapia génica para entregar genes de citoquinas a las células tumorales o a otras células accesorias, creándose así un ambiente alrededor de las células tumorales que podría facilitar su destrucción. Virtualmente todas las citoquinas estudiadas han mostrado un efecto en el crecimiento tumoral y en la supervivencia de algunos modelos animales [11, 12, 15-21]. Este efecto antitumoral ha sido atribuido a la activación y expansión de células inmunes antitumorales presentes en el tumor y alrededores. Sin embargo, es también posible que de la inducción de esta respuesta inflamatoria en el tumor, pueda generarse un beneficio para el mismo, dando lugar a una afluencia y activación de muchos tipos celulares en el lugar donde se encuentra el tumor, así que es realmente complicado alcanzar el punto beneficioso sin traspasarlo y comenzar con el perjuicio.

En la siguiente tabla se muestran las citoquinas utilizadas en ensayos clínicos. De ellas, una de las más estudiadas, y que ocupa el papel central en esta tesis, es el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, GM-CSF.

**Citoquinas, Moléculas Accesorias, y Factores de Crecimiento que se han empleado en diversos ensayos clínicos en cancer.**

<b>Citoquina</b>	<b>Actividad Biológica</b>	<b>Tumor</b>
IL-2	Factor de crecimiento de células T, expande linfocitos Tc	Cerebro, mama, colon, pulmón, melanoma, ovario
IL-4	Factor de crecimiento de células T y B	Cerebro y estadíos avanzados
IL-7	Inhibe respuesta Tc	Colon, linfoma, melanoma, renal
IL-12	Activa respuesta Th1, activa Tc	Melanoma y estadíos avanzados
IFN- $\gamma$	Activata CD8 <sup>+</sup> , activa macrófagos. Activa expresión MHC I y II	Melanoma, prostata, cerebro
GM-CSF	Activa Cél. Dendríticas y Macrófagos	Renal, prostata, melanoma, mama, ovario, pulmón, páncreas

Desde los inicios de los estudios con citoquinas en el campo del cáncer [16] hasta los más recientes ensayos clínicos en humanos [22-24], el GM-CSF ha estado presente, mostrando todo un abanico de respuestas en diversos tipos de cáncer.

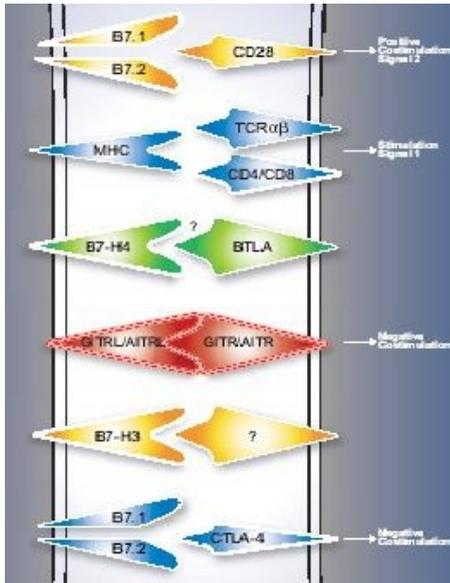
El GM-CSF es una proteína secretada junto con otros factores por las células T y los macrófagos al ser activados por antígenos. La síntesis de GM-CSF por otros tipos celulares, como por ejemplo células endoteliales y fibroblastos, es inducida por TNF-alfa, TNF-beta, IL-1, IL-2 y IFN. Esta citoquina estimula la activación de células presentadoras de antígenos (APC), y por ello, podría esperarse una expansión indirecta de células Tcitotóxicas. GM-CSF es un

fuerte quimioatrayente para neutrófilos. Aumenta la actividad microbicida, el metabolismo oxidativo y la actividad fagocitaria de macrófagos y neutrófilos, aumentando también su citotoxicidad. Además, estimula la proliferación y diferenciación de neutrófilos, eosinófilos, y líneas monocíticas, también estimula la expresión de determinadas proteínas de adhesión celular, que pueden ser las responsables de la acumulación de granulocitos en los lugares de inflamación. Estimula la liberación de metabolitos del ácido araquidónico y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno y por todo ello aumenta la capacidad de presentación y reconocimiento de antígenos.

La interleuquina 12, IL-12, es otro de nuestros protagonistas. Es producida de forma natural por las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B en respuesta a la estimulación antigénica. IL-12 está implicada en la diferenciación de células T a Th1. Estimula el crecimiento y función de las células T en general. Estimula la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por parte de las células Tc y las NK y reduce IL-4 mediante supresión de IFN- $\gamma$ . IL-12 posee también actividad antiangiogénica ya que al aumentar la producción de IFN- $\gamma$ , éste aumenta a su vez la producción de la proteína inducible 10 y es esta proteína la que participa en el bloqueo de la formación de nuevos vasos sanguíneos. Hay un gran número de trabajos con IL-12 [19, 22] siendo la citoquina más usada después de GM-CSF, además ya se ha utilizado en combinación con él en diversas ocasiones [25, 26]).

La molécula coestimuladora B7.2, también llamada CD86, es una proteína de membrana, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se expresa en la superficie de las APCs.

## Vacunas genéticas contra el melanoma



Es el ligando para dos proteínas de la superficie de los linfocitos, el antígeno CD28 y el CTLA-4.

Las células dendríticas son las APCs profesionales, las más potentes. Cuando un antígeno es introducido en un paciente, ellas lo toman, procesan y presentan a los linfocitos T en el contexto de las moléculas MHC de clase I (a los Tc, CD8<sup>+</sup>) y clase II (a los Th, CD4<sup>+</sup>). La unión del complejo péptido procesado-MHC con el receptor del linfocito T correspondiente constituye la “Señal I”. La siguiente unión de las moléculas B7.1 y B7.2 de la célula dendrítica a la molécula CD28 de las células T forma la “Señal II”, que resulta en la transformación y activación de las células T. La presencia de la señal I sin la señal II resulta en tolerancia (no activación). Las llamadas células dendríticas “inmaduras” poseen bajos niveles de expresión de moléculas coestimuladoras, son altamente fagocíticas e ideales para la carga del antígeno. En presencia de una señal de peligro, indicada por moléculas y citoquinas presentes en el medio a causa de daño celular o invasión por patógeno extraño, las células dendríticas maduran, perdiendo su capacidad de toma de antígeno, pero ganando altos niveles de expresión de las moléculas estimuladoras que son ideales para iniciar una respuesta inmune. El carácter de la consiguiente respuesta estará altamente determinado por el perfil de

moléculas de superficie y secreción de citoquinas de la célula dendrítica madura, lo que constituye la “Señal III”, que puede ser polarizada hacia la activación de Th1 (favoreciendo inmunidad celular) o hacia Th2 (favoreciendo la humoral) [27].

Ahora bien, las células neoplásicas por sí mismas carecen de las moléculas coestimuladoras y conocemos que la entrega de la señal MHC sin la coestimulación puede anergizar las células T (efecto negativo) y representar un mecanismo por el cual las células tumorales evadan el ataque inmunitario por tolerancia. Es por esto que una de las aproximaciones para superar esta falta de moléculas coestimuladoras haya sido transfectar células tumorales con los genes de las mismas de manera que las propias células tumorales funcionen como APCs [28-33] y esa ha sido también nuestra aproximación en parte de este trabajo.

### **Sistemas de regulación negativa**

En el tramo final de nuestros estudios nos ocupamos no sólo de tratar de activar el sistema inmunitario sino también de identificar y suprimir un sistema que podía potencialmente estar frenando el éxito de la activación: las células T reguladoras o inmunosupresoras. Desde las primeras estrategias de vacunación, muchos investigadores fueron conscientes de que una parte del propio sistema inmune que querían potenciar podía estar no sólo no colaborando, sino incluso jugando en contra. Por ello, ya desde aquellos inicios había estudios que contaban con una prevacunación con una droga antineoplásica, generalmente ciclofosfamida, en un esfuerzo por aumentar la inmunización mediante la depleción del compartimento linfocítico proliferativo, permitiendo después, teóricamente, la proliferación preferencial de células T antígeno-específicas en respuesta a la presencia del antígeno de la vacuna [27, 34-36].

Más recientemente se han logrado definir lo que hoy conocemos como células T reguladoras (Treg) o inmunosupresoras. Tras mucha discusión, parece

Vacunas genéticas contra el melanoma

haberse llegado al consenso de que las Treg “clásicas” vienen definidas por la coexpresión de CD4, CD25 y Foxp3 [27, 37, 38]. No obstante, aún hoy no está determinado si este marcaje resulta inequívoco. Como puede apreciarse en la siguiente figura, hay también caracterizados otros tipos celulares que presentan marcadores diferentes y que igualmente funcionan como células T reguladoras.

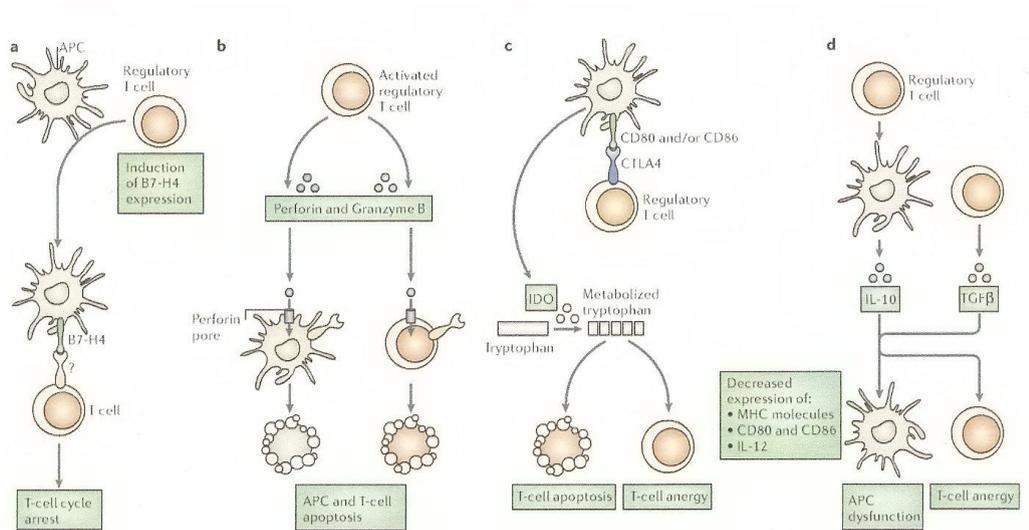
Treg Subsets			
Regulatory T Cell Types	Natural Treg (nTreg)		
	nTreg	$\gamma\delta$ T	NKT
Phenotype	CD4+/CD25 <sup>hi</sup> +	TCR $\gamma\delta$	CD3, NK1.1, CD56
MHC Restriction	No	Yes	CD1d
Cellular proteins	CTLA4, GITR, Foxp3	TCR	TCR
Origin	Thymus	Thymus	Thymus
CD28 dependency	Role in thymic development & maintenance in periphery	Yes	
Mechanism of suppression/ Target cells	Contact dependent, Granzyme B-dependent, makes TGF- $\beta$ /APC & T	Contact, cytokines	Makes, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ /tumor cells
In vivo role	Self tolerance, suppresses autoreactive T cells, non-inflammatory, specific for self antigens	Mucosal immunity	Innate immunity
In vitro propagation	Difficult to expand in vitro	TCR	IL-15, Flt3L

Regulatory T Cell Types	Adaptive or Inducible Tregs (Treg)				
	Tr1	Th3	CD8	CD8	DN
Phenotype	CD4+CD25-	CD4+CD25-	CD8+	CD8+CD28-	TCR+/ CD4-/CD8-
MHC Restriction			Qa-1 (HLA-E)	MHC I	MHC I
Cellular proteins	CD25 <sup>low/variable</sup> CD45Rb <sup>low</sup> Foxp3-	CD25 <sup>low/variable</sup> CD45Rb <sup>low</sup>		Foxp3+	
Origin	Thymus? Thru n Tregs?	Thymus? Thru n Tregs?	Thymus/ periphery?	Thymus?	Thymus?
CD28 dependency	Not for development or function		Yes	Yes	
Mechanism of suppression/ Target cells	Thru cytokines, makes IL-10	Thru cytokines, makes TGF- $\beta$	Contact	Thru IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$ , contact	Contact
In vivo role	Inflammatory response to microbes, or transplanted tissues, specific for tissue & foreign antigens			Tumor induced suppression	Alloantigen-specific prevention of GI/HD
	Mucosal immunity	Mucosal immunity			
In vitro propagation	TCR, IL-10, TGF- $\beta$ , or Vitamin D			TCR signal	MHC II - mismatched cells

Fuente: [www.ebioscience.com](http://www.ebioscience.com)

Se cree que la función normal de estas células reside en mantener la tolerancia inmune a los antígenos propios, eliminando las respuestas mediadas por otras células inmunes frente a esos antígenos, tal y como se postula en la siguiente figura [37].

## Vacunas genéticas contra el melanoma



**Posibles mecanismos supresores de las células Treg.** Múltiples mecanismos supresores son propuestos. **a-** Treg inducen la expresión de B7-H4 en las APC y esto induce el paro del ciclo de la célula T. **b-** Las Treg activadas matan directamente a las células diana tales como células T y APC mediante rutas dependientes de perforinas o granzima-B. **c-** Las Treg CTLA4<sup>+</sup> inducen la expresión de indolamina 2,3-dioxigenasa en las APC, lo que suprime la activación de las células T por la reducción de triptófano. **d-** Las Treg liberan IL-10 y TGFβ, inhibiendo indirectamente la activación de las células T y suprimiendo la función de las APC al inhibir la expresión de moléculas MHC, B7.1, B7.2 e IL-12.

Ya que tienen un importante papel en la supresión de la respuesta a los antígenos asociados a tumor, su manipulación e incluso depleción representan una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer, que ha sido ya utilizada por numerosos grupos [34, 37-47] sola o en combinación con otras estrategias de vacunación.

Por otra parte, el grupo de Iván Borrello ha venido trabajado con una nueva célula inmune, no perteneciente al linaje de los linfocitos T sino al linaje

mieloide, con actividad supresora y por tanto también con gran relevancia en cáncer, al igual que las Treg clásicas: la llamada Célula Mieloide Supresora [48-51], que probablemente también deberá ser considerada y cobrará relevancia en futuros estudios.

## **5- PRINCIPALES ESTRATEGIAS EN LAS VACUNAS ANTITUMORALES: EL MELANOMA COMO MODELO DE ESTUDIO**

El melanoma es particularmente conocido por su inherente inmunogenicidad, basada en numerosos informes de casos de remisión espontánea del tumor con base inmunológica, lo que ha propiciado múltiples investigaciones para aumentar esta característica mediante vacunación.

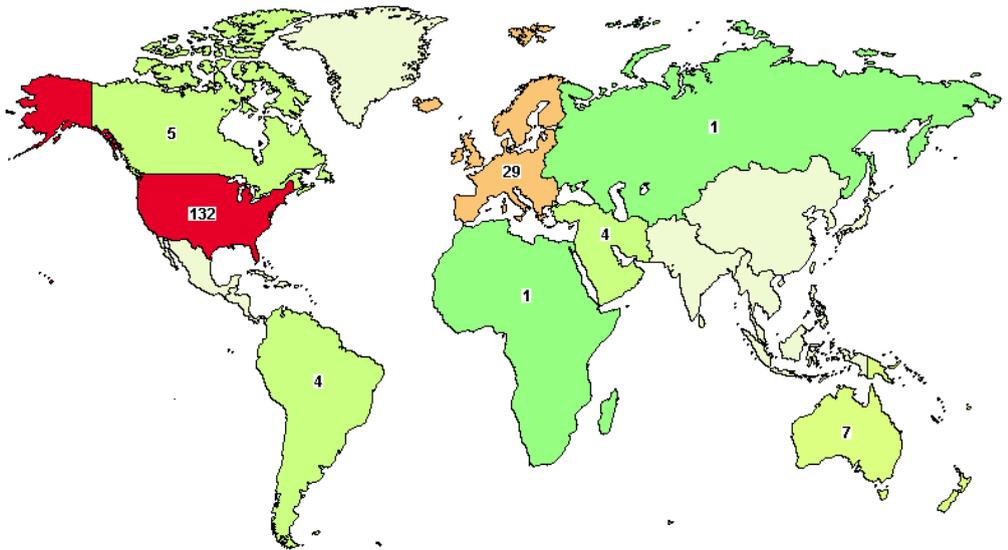
Son numerosas también las diferentes estrategias de vacunación utilizadas, abarcando prácticamente todas las aproximaciones empleadas en terapia génica por inmunomodulación y tipos de vectores, que quedan resumidas en la siguiente tabla [27].

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Summary of vaccination strategies for melanoma

Vaccine type	Advantages	Disadvantages
Autologous tumor cell vaccine	Patient specific—potential to generate immunity against any antigens, known or unknown, expressed by the patient's tumor Possibility of generating humoral and cellular antitumor immunity	Not widely applicable Requires adequate tumor tissue for manufacture Time-consuming and technically challenging manufacturing process Fluctuations in the panel of antigens expressed on a patient's tumor may render the vaccine ineffective
Allogeneic tumor cell vaccine	Widely applicable Patient's tumor tissue need not be available  Potentially targets humoral and cellular immunity	Not patient specific Response may be dictated by the similarity of patient's tumor cells to tumor cells comprising the vaccine Moderately complex/demanding preparation
Peptide vaccine	Acellular technique  Possibility of developing an "off the shelf" vaccine  Potentially widely applicable Known epitopes simplify immunologic monitoring	Important tumor regression peptides must be known Tumor escape is problematic when only one or two peptides are administered as part of a vaccine HLA restriction Only generates cellular immunity
Dendritic cell (DC) vaccine	Utilizes potent antigen-presenting cells that are the final common pathway for generation of antitumor immunity  Can be loaded with tumor antigens through a variety of techniques	Requires leukapheresis and ex vivo culture and processing with multiple opportunities for contamination Yield can be variable and patient dependent
Gene modified cellular vaccine	May enhance efficacy of non-gene modified approaches	Requires additional ex vivo manipulation with issues of altered cell viability and/or functionality
Plasmid DNA vaccine	Ability to immunize against the specific transgene encoded by the cDNA without causing immunity to components of a viral vector Successful immunization by in-vitro diagnostics when delivered via the intranodal route Known epitopes simplify immunologic monitoring	Unsuccessful in breaking tolerance against self antigens when administered intramuscularly or intradermally (without adjuvant)
Ganglioside vaccine	Acellular technique Possibility of developing an "off the shelf" vaccine Potentially widely applicable Generates humoral immunity	Does not generate cellular immunity
Viral vectors	Use of different vectors carrying distinct antigenic epitopes in the boost phase following a priming polyvalent vaccine may allow for broad expansion of multiple CTL clones with different specificities	Immune responses against viral antigens limit repeated administration

Este hecho se ve reflejado en los numerosos ensayos clínicos dedicados a este tipo de cáncer, como puede comprobarse consultando los datos actuales de la página web [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) [52], donde al introducir el término “melanoma” comprobamos que hay un total de 631 ensayos clínicos en la actualidad, 167 de los cuales corresponden a vacunas donde de algún modo se emplean células. El siguiente mapa refleja la distribución mundial de realización de estos 167 ensayos.

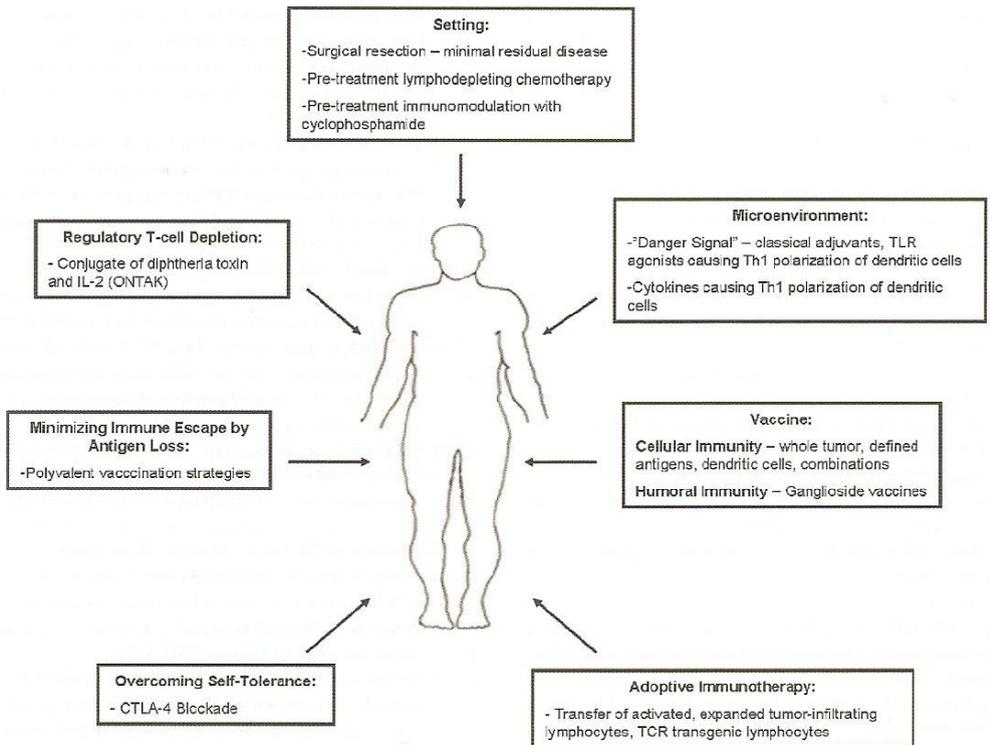


La vacunación preventiva ha demostrado fantásticos resultados preclínicos, pero desafortunadamente, el salto de preventivo a terapéutico ha resultado más difícil y desalentador. Una vez que el tumor está establecido son muchos los factores que le procuran crecimiento y evasión del rechazo inmune y por ello cada vez queda más clara la idea de que el ataque al melanoma, en

## Vacunas genéticas contra el melanoma

particular, pero a todos los cánceres en general, debe ser en múltiples frentes, en lo que algunos llaman ya “inmunoterapia multimodal”.

Esta idea queda reflejada en la siguiente figura [27]



que pretende indicar que el estímulo de vacuna ideal debe de suministrarse en el entorno perfecto, con los mejores adyuvantes y el bloqueo de la estimulación inmune negativa. Con la suma de todos estos elementos deberíamos poder alcanzar en un futuro próximo, tratamientos eficaces contra el cáncer.

En el presente trabajo de tesis doctoral hemos querido abordar una visión bastante amplia de las vacunas contra el melanoma por terapia génica no viral, desde diferentes aspectos de esta “multimodalidad”, intentando asimismo comprender los efectos temporales y de dosis de los componentes. Así, hemos estudiado las vacunas preventivas con péptidos, en diferentes formulaciones, con o sin GM-CSF como adyuvante, pero además mediante transfección *in vivo* del mismo. A continuación, vacunas alogénicas con células transfectadas para producir GM-CSF, IL-12, B7.2 y combinaciones de los mismos, con una aproximación a la reducción del número de células empleadas, utilizando métodos magnéticos de purificación celular en base a la expresión de genes específicos. Para terminar, los modelos terapéuticos, incluyendo una aproximación inicial al estudio de la inmunosupresión, tratando de esclarecer los mecanismos de bloqueo en nuestro modelo.

## **HIPÓTESIS**

Las vacunas contra el cáncer han sido una promesa durante muchos años, que todavía a día de hoy no se ha visto totalmente cumplida. Nuestra hipótesis propone que la mejora de los procedimientos de terapia génica existentes así como la incorporación de nuevas metodologías en el estudio de la respuesta ante este tipo de vacunas, debe contribuir de forma significativa al aumento de la supervivencia y/o la erradicación del tumor.

## **OBJETIVOS**

Los objetivos que nos fijamos han sido:

1-Evaluar la eficacia de vacunas preventivas basadas en antígenos.

Incluyendo estudios comparativos de eficacias de vacunación con antígenos libres, en liposomas o combinados con genes bien en forma de lipopolipéjos, bien con administración mediante acondicionamiento tisular. Estudio comparativo de la eficacia de transfección *in vivo* versus *in vitro* con las construcciones génicas de interés.

2-Evaluar la eficacia de vacunas preventivas celulares.

Lo que conlleva establecer las condiciones óptimas de transfección de las líneas celulares de trabajo, mediante métodos no virales. Mejora de los resultados previos en vacunas celulares preventivas, con reducción del número de células y la expresión en las mismas de hasta dos genes en la búsqueda de sinergias en el efecto antitumoral. Puesta a punto de un método eficaz de selección y purificación de células transfectadas con plásmidos bicistronicos, mediante bolas magnéticas, y vacunación con estas células.

3-Evaluar la eficacia de vacunas celulares terapéuticas.

Ello supone mejorar los procedimientos y eficacia de la vacunación celular terapéutica. Asimismo supone el estudio de la dosis celular en la vacuna terapéutica y el estudio de los efectos supresores del sistema inmune en nuestro modelo.

**MATERIAL  
Y MÉTODOS**

### **1- Líneas celulares**

La línea celular de melanoma murino B16 ha sido la utilizada en todos nuestros experimentos de vacunación. Estas células son singénicas con los animales que empleamos, ratones C57BL/6 (Harlan, España). Esta línea fue aislada en los laboratorios Jackson (Maine, EEUU) en 1954, a partir de un tumor cutáneo espontáneo. La administración in vivo da lugar a un crecimiento bastante rápido y agresivo, en forma de nódulos de consistencia blanda y color negro, con capacidad de metastatizar sobre todo en el pulmón.

Las B16 son células adherentes, productoras de melanina, que son crecidas en frascos de cultivo con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma, España), suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF), inactivado por calor, (Biomedica, Francia), penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml). Son cultivadas en incubadores humidificados con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Son despegadas de sus frascos con Tripsina-EDTA a 37°C o PBS-EDTA frío y se cuentan en las cámaras de recuento celular estándar, diluías con azul tripán para discriminar las células viables de las muertas.

Las células B16 se han usado en nuestros experimentos como fuente de antígeno para vacunación, bien como células enteras o bien empleadas para obtener un extracto de sus antígenos (TMP). En estos casos las células son irradiadas con una dosis de 150 Gy, tras ser despegadas y contadas, ya que estudios previos de nuestro grupo ajustaron esta dosis de irradiación para trabajar con estas células de forma segura en vacunas [53, 54]. Esta dosis de radiación resulta letal para estas células pero deja sus capacidades metabólicas activas el tiempo suficiente como para que, por ejemplo, los genes introducidos en los plásmidos con la transfección se expresen y sus productos se liberen. Tras la irradiación las células son centrifugadas y sus pellets resuspendidos en SBF con un 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Panreac, España), para ser congeladas a -80 ó -150°C hasta su uso.

Además ellas mismas se han utilizado como fuente de tumor experimental, implantando un número determinado de células frescas, salvajes, recién despegadas de sus frascos, en su medio habitual de cultivo limpio, en la pata izquierda de los animales, mientras que las vacunas se inyectaban en sus patas derechas.

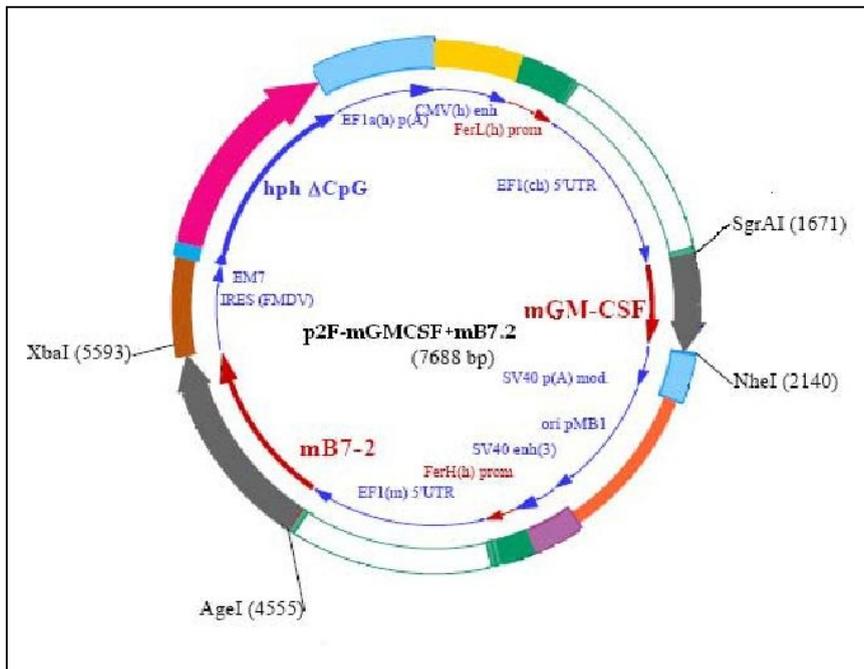
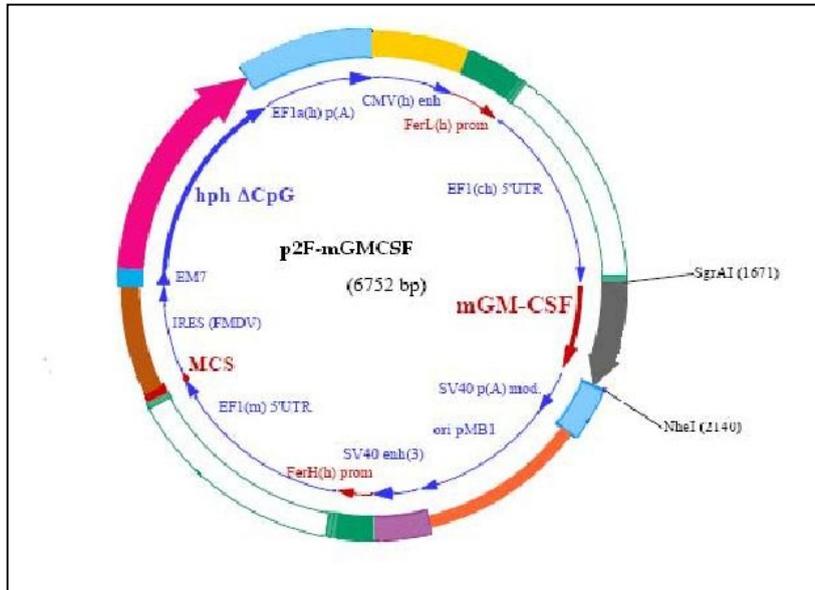
En uno de los experimentos, la vacunación celular preventiva con células seleccionadas, se empleó además de B16, otra línea celular: 3LL. Es un carcinoma pulmonar de ratón que se aisló a partir de un carcinoma espontáneo, también en ratones C5BL/6, en los laboratorios Wistar. Es también conocida como carcinoma pulmonar de Lewis. Es un carcinoma anaplásico de alta malignidad. Las condiciones de cultivo en el laboratorio fueron las mismas que para B16, si bien la dosis de irradiación fue menor, 50 Gy, de acuerdo con los estudios previos de viabilidad celular de nuestro grupo.

## **2- Plásmidos y bacterias**

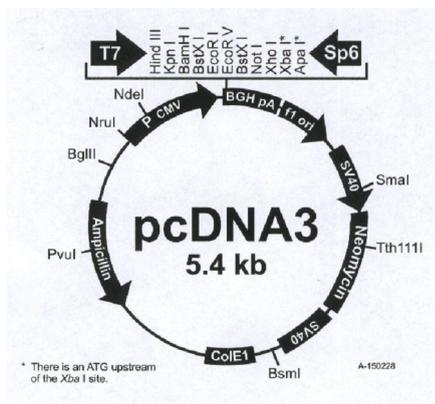
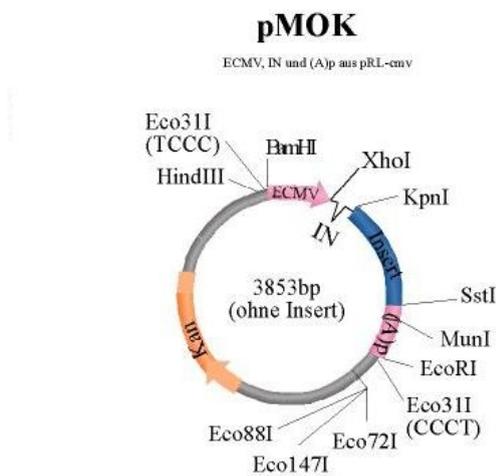
Los plásmidos p2F m-gmcsf, p2F m-B7.2, p2F m-IL12, p2F m-gmcsf + m-B7.2, p2F m-gmcsf + m-IL12 y p2F Ø fueron obtenidos a partir del plásmido base pVITRO2 (Invivogen, France), conteniendo los genes murinos de la citoquina GM-CSF, la molécula coestimuladora B7.2, la citoquina IL-12, combinaciones de los mismos o la estructura “vacía” del plásmido (sin contener ninguno de estos genes), respectivamente. Los plásmidos basados en pVITRO2 permiten la cotransfección de dos genes simultáneamente, contienen para ello 2 promotores humanos, el de la cadena pesada de la ferritina (FerH) y el de la cadena ligera de la misma (FerL), combinados respectivamente con los intensificadores (“enhancers”) de los virus SV40 (simian virus 40) y CMV (citomegalovirus) y con el gen de resistencia a higromicina, que permite tanto la selección de bacterias transformadas como de células eucariotas transfectadas. Para eliminar la regulación por hierro de

## Vacunas genéticas contra el melanoma

los promotores, sus regiones 5'UTRs han sido reemplazadas por las de los genes EF1 $\alpha$  de ratón y chimpancé.



El plásmido pcDNA3 de Invitrogen (España) también contiene el promotor del CMV y los genes de resistencia a neomicina y ampicilina, pero es de nuevo un plásmido “vacío”, sin genes terapéuticos insertados, por lo cual, como p2F Ø, también ha sido utilizado como control en algunos experimentos, sobretodo respecto al plásmido pMok m-gmcsf, que fue generosamente proporcionado por el Dr. A. Koenig (Mologen, Alemania). Éste último contiene el gen murino de GM-CSF controlado por el promotor del CMV y el gen de resistencia a la kanamicina.



Por último, también se empleó el plásmido p3c-EGFP, obtenido a partir de la inserción en pcDNA3 del gen de la proteína fluorescente verde (Enhanced Green Fluorescent Protein), para experimentos donde se requería un gen marcador.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Todos los plásmidos fueron introducidos por choque térmico y amplificados en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, España), en su correspondiente medio de cultivo selectivo LB (Pronadisa, Spain). Posteriormente, los plásmidos fueron extraídos a gran escala y con alto grado de pureza con el kit comercial Qiagen Giga Endofree (Izasa SA, España), cuantificados por espectrofotometría y testados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para comprobar su integridad y pureza. Los kits de extracción de plásmido “Endofree®” presentan una importante ventaja para nuestro campo de estudio: estos kits permiten la obtención del plásmido libre de endotoxinas, libre de los lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana de las bacterias Gram – empleadas, que pueden interferir negativamente tanto en el proceso de transfección in vitro como además provocar una estimulación inespecífica del sistema inmune in vivo. Evitar estos dos efectos es realmente importante para tratar de mejorar el proceso de transfección y evitar obtener respuestas inmunes no debidas específicamente a los tratamientos a estudiar.

### **3- Obtención de Proteínas Hidrosolubles de Membrana Tumoral (TMP)**

La mezcla de proteínas hidrofílicas de membrana de las células B16 (Tumor Membrane Proteins, TMP) empleada en los experimentos de inmunización, fue obtenida según un protocolo basado en el trabajo de C. Bordier [55]. Brevemente, tras despegar de sus frascos y contar las células B16, previamente irradiadas, su pellet es resuspendido en 1ml de “tampón de extracción” por cada 10 millones de células. Este tampón está compuesto por Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Triton X-114 0.5% (Sigma, España) y un inhibidor de proteasas, el fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF), 0.1 mM (Sigma, España), pH 7.2. La mezcla se incubaba en hielo durante 45 min., agitando suavemente cada 10. Después se centrifuga a 5300 rpm, 4 °C, durante 15 min. Se recupera el sobrenadante y se añaden alícuotas de 750  $\mu$ l sobre alícuotas de 250  $\mu$ l de “tampón de centrifugación” (sacarosa al 10% en tampón de extracción) en tubos de centrifugación. Se incubaba 3 min. a 37 °C y se centrifuga 5 min. a 2100 rpm. De nuevo el sobrenadante se recupera y esta

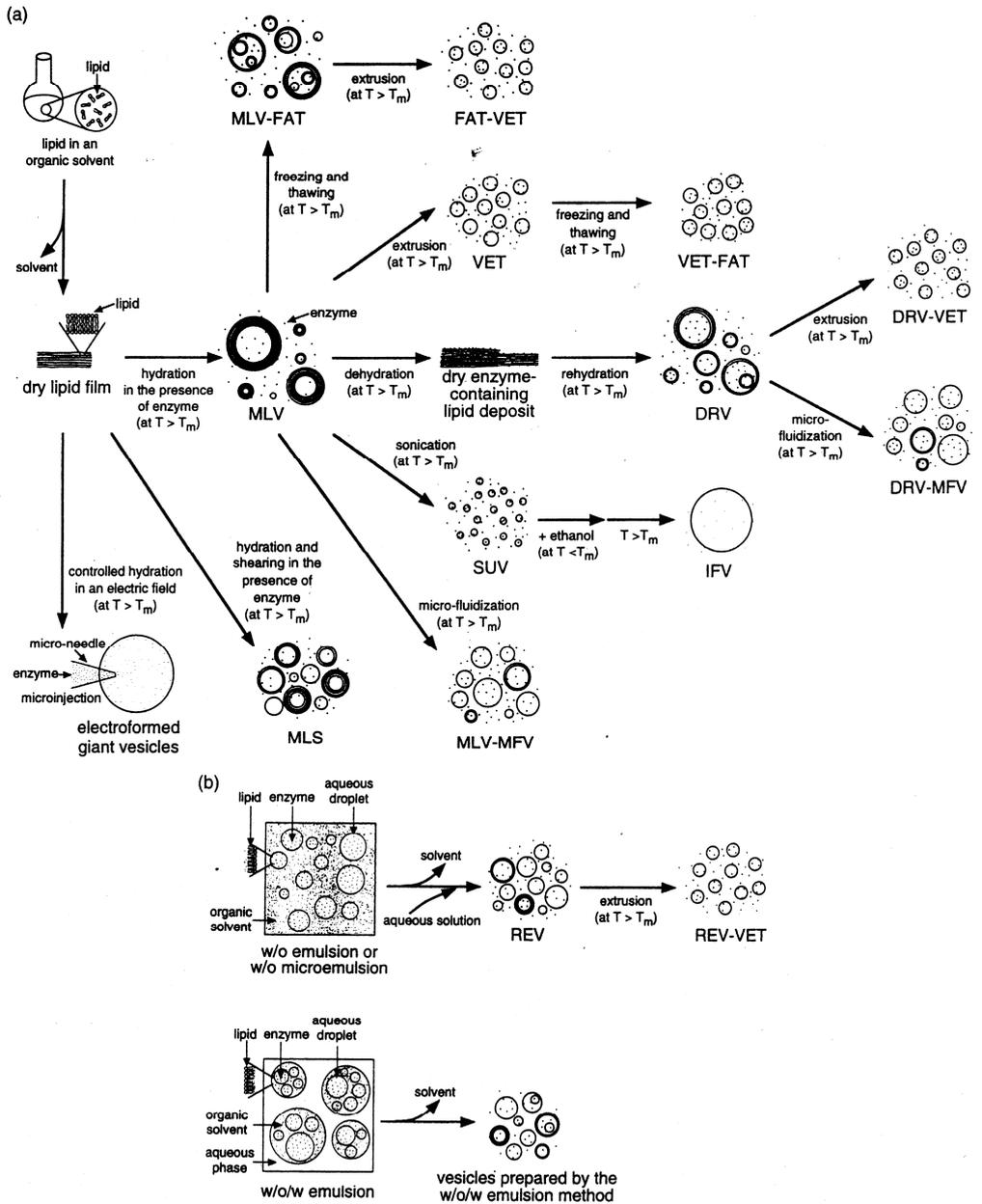
vez a las alícuotas de 750 µl se les añade Triton X-114 hasta una concentración final del 0.5% antes de ponerlos en hielo sobre 250 µl de tampón de centrifugación. Tras otros 3 min. a 37 °C y una última centrifugación de 5 min. a 2100 rpm, se obtienen dos fases, la superior contiene las proteínas hidrofílicas de las membranas celulares, que será retirada y guardada alicuotada a -20°C hasta su uso.

Para cuantificar la mezcla de proteínas obtenida se empleó el CBQCA protein quantitation kit (Molecular Probes-Invitrogen, España), basado en la detección fluorimétrica de un compuesto que se une a la proteína y nos permite cuantificarla en base a una curva estándar. Este reactivo está especialmente pensado para cuantificar proteínas obtenidas en presencia de lípidos (de las membranas) y detergentes (Triton), como es nuestro caso.

#### **4- Preparación de Liposomas y Lipopolíplejos**

Se ha trabajado con tres tipos diferentes de liposomas en cuanto a su forma de sintetización: vesículas multilamelares (Multilamellar Vesicles, MLV), vesículas de deshidratación y rehidratación (Dehydration-Rehydration Vesicles, DRV), y vesículas multilamelares formadas por congelación-descongelación (Freeze-Thawed Multilamellar Vesicles, MLV-FT), procediendo para la manufactura de acuerdo con la bibliografía y la experiencia previa del laboratorio[56, 57]. Los diversos procedimientos de preparación de liposomas, incluyendo los utilizados en este trabajo, quedan resumidos en la siguiente figura [57 ] (MLV-FT está marcado como MLV-FAT).

Vacunas genéticas contra el melanoma



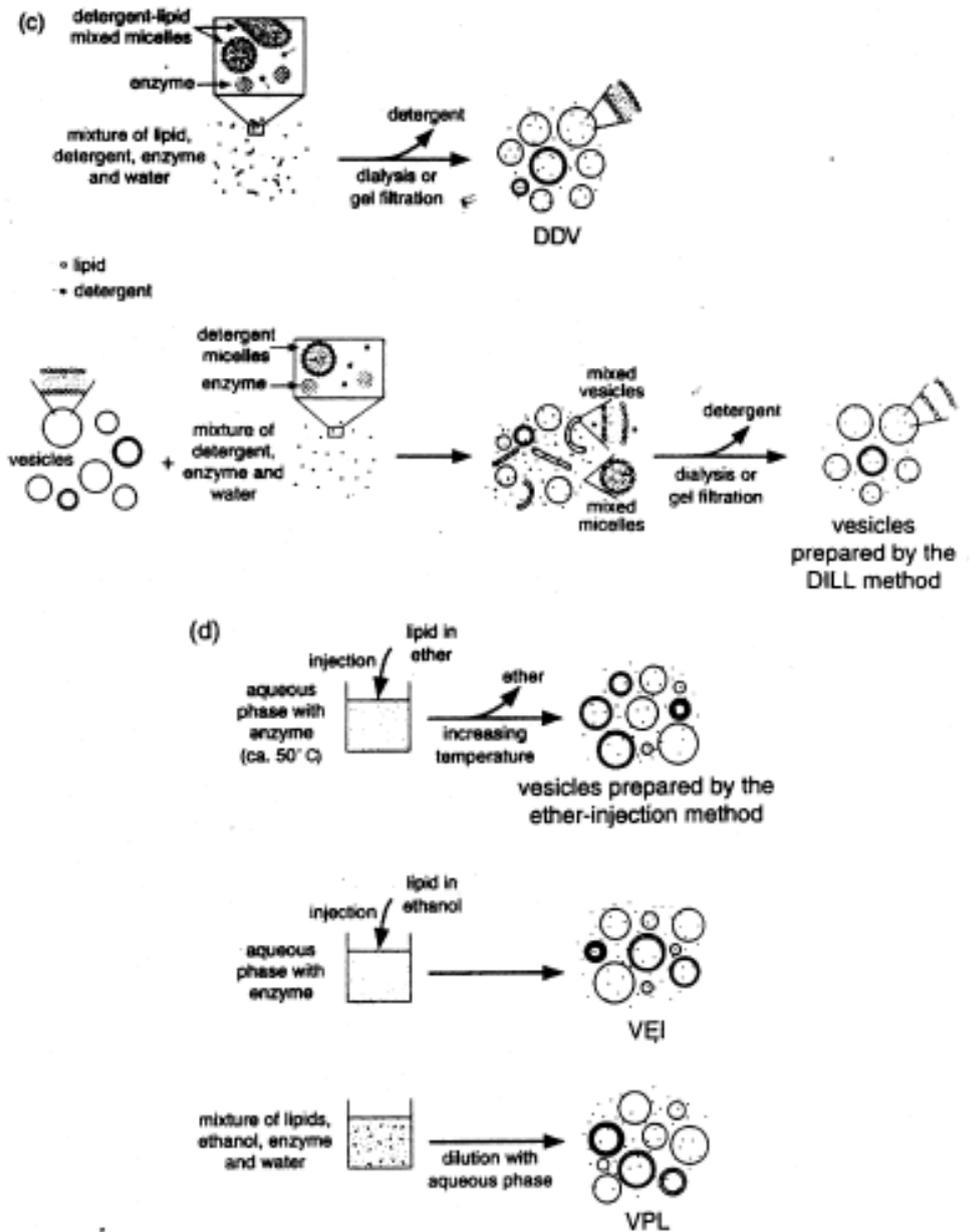


Fig. 4. (Continued)

## Vacunas genéticas contra el melanoma

En breve, las mezclas de lípidos en sus respectivos solventes orgánicos se desecan en monocapa dentro de tubos especiales de cristal, en rotación y con chorro de gas N<sub>2</sub> (inicio esquema a) ). A continuación se añade al tubo la solución de hidratación de los lípidos, conteniendo la molécula que se desea atrapar, en nuestro caso BSA o TMP. Según el tipo de liposoma que se quiere formar, en base a su tamaño y cantidad de capas lipídicas, el procedimiento se realizará mediante simples pasos de rehidratación y deshidratación (DRV), con unas etapas de sonicación (SUV) o con etapas de congelación y descongelación (MLV-FT).

Además, se han empleado cuatro composiciones lipídicas diferentes, con el fin de evaluar cuál es la combinación más adecuada para nuestros propósitos, utilizando fosfatidilcolina (PC), esfingomielina (SM), colesterol (CH) y dicetilfosfato (DP), todos de Sigma (España). Las formulaciones testadas fueron PC:CH y SM:CH a relación molar 6:4 y PC:CH:DP y SM:CH:DP a relación molar 5:4:1 en agua MilliQ<sup>®</sup>. Todas estas combinaciones se escogieron basándonos en los estudios previos realizados por el grupo de investigación [56, 58]. Para cuantificar la cantidad de proteína encapsulada en cada tipo de liposoma, se empleó de nuevo el CBQCA protein quantitation kit (Molecular Probes-Invitrogen, España) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los liposomas escogidos para la formación de lipopoliplexos fueron los PC:CH:DP (5:4:1), en base a los resultados de encapsulación de proteína. Estos liposomas fueron acoplados al poliplexo formado por PEI 25 KDa (polietiliminina, Sigma, España) unido al plásmido que se desease emplear, preparado en una relación molar 1.41:1, PEI:ADN, también en MilliQ<sup>®</sup>, tal y como también se venía haciendo en el grupo de investigación [56, 58-61].

## **5- Transfección celular *in vitro* mediante métodos no virales**

En la transfección *in vitro* de las células B16, para su utilización como vacunas, se testaron dos procedimientos de transfección no viral, ambos métodos químicos, uno basado en poliplejos, es decir, complejos ADN-polímero catiónico (PEI, Sigma, España) y el otro basado en lipoplejos, complejos ADN-liposomas (DOTAP, Roche, España). Cuando las células alcanzan un grado de confluencia igual o superior al 80% se procede a la preparación de los complejos y se inicia el protocolo de transfección:

**5.1- Poliplejo PEI/ADN.** La versión de esta molécula que hemos empleado es la de 25 KDa ya que estudios previos han demostrado que esta versión ramificada del polímero es la más adecuada en nuestro modelo [56]. Se preparan dos tubos con volúmenes iguales, ajustándolos con agua MilliQ<sup>®</sup> para posteriormente mezclarlos. Uno con PEI 25 KDa, preparado por ejemplo a 2 mg/ml, y la cantidad de agua MilliQ<sup>®</sup> necesaria. El otro con el plásmido que se desee transfectar, prepreparado por ejemplo a 1mg/ml, con la cantidad requerida para alcanzar la dosis de transfección que se necesite y la cantidad de agua MilliQ<sup>®</sup> necesaria. La relación entre la cantidad de PEI y de plásmido ha de ser 1.41: 1. Una vez se tienen las dos mezclas preparadas, se añade todo el contenido de la mezcla de ADN sobre la mezcla de PEI, se vortea vigorosamente y la mezcla se deja en el incubador de células (37°C y CO<sub>2</sub>) durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo de las células y se añade en su lugar los poliplejos recién formados en un volumen del medio de cultivo limpio, sin SBF ni antibióticos (por ejemplo, en 8 ml. Para un frasco de cultivo de 150 cm<sup>2</sup>). Se vuelven a introducir las células en su incubador y se dejan allí entre 1 y 2 horas (máximo) para a continuación, añadir a los cultivos el medio faltante para completar su volumen habitual de cultivo (12 ml. en el mismo ejemplo del frasco de 150 cm<sup>2</sup>), pero esta vez suplementado con el porcentaje de SBF y antibióticos que no se incorporaron con el primer DMEM (limpio), un total del 17% [56, 62].

## Vacunas genéticas contra el melanoma

**5.2- Lipoplejo DOTAP/ADN:** El DOTAP es un lípido catiónico comercial (Roche), el N-[1-(2, 3-Dioleoyloxy) propyl]-N,N,N – trimethylammonium methylsulfate, con un peso molecular de 774,28 Da, de fórmula  $C_{43}H_{83}NO_8S$ . Se presenta en forma de suspensión liposomal a pH 6.2, con carga externa positiva, lo que le permite interactuar de forma iónica con las cargas negativas del ADN. En su estructura aparece un amonio cuaternario y dos cadenas lipídicas esterificadas.

El protocolo de preparación de lipoplejos y de transfección es el mismo en este caso que en el del PEI, excepto por la relación entre DOTAP y ADN, que es de 4:1.

### **6- Transfección *in vivo* mediante métodos no virales**

Se llevaron a cabo experimentos de vacunación en los que se empleó transfección *in vivo* de los animales, local y sistémica.

**6.1- El Acondicionamiento Genético Tisular** es un procedimiento de transfección local que consiste en la inyección del plásmido desnudo (10-50  $\mu$ g ADN) que se desee transfectar, en un volumen relativamente grande (200  $\mu$ l en nuestro caso) de solución salina, suficiente para facilitar un desplazamiento de tejidos en el área de inyección y la internalización del plásmido.

La eficacia del procedimiento se evaluó mediante RT-PCR, recogiendo muestras tanto del área inyectada, como del área equivalente pero en la pata contralateral, para que nos sirviera de control. Las muestras fueron homogeneizadas en Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen, España), reactivo que se utiliza para la extracción de ADN, ARN y proteínas a partir de muestras biológicas. Se siguió el protocolo recomendado por el fabricante para la extracción del ARN a partir de nuestras muestras, que se cuantificó, comprobando también su pureza, por espectrofotometría. A continuación, se tomaron 5ng. De cada ARN, para proceder a realizar en un primer paso, la reacción de la enzima transcriptasa inversa (RT) y posteriormente, la PCR cuantitativa, empleando

las condiciones y reactivos de Applied Biosystems (España): TaqMan RT reagents, Taq Man Assay on Demand para *m-gmcsf* y Abi Prism 7700 Software. Los resultados de la PCR cuantitativa fueron expresados en  $2^{-\Delta Ct}$ , como ha sido empleado y descrito en la literatura [63].

6.2- La transferencia génica por **Inyección Hidrodinámica** es un procedimiento de transfección hepática de elevada eficacia que permite la acción sistémica de los productos de expresión secretados. Consiste en una inyección rápida (en menos de 5 segundos) de un gran volumen (2ml) de solución salina conteniendo el plásmido de interés, a través de la vena de la cola del ratón, previamente dilatada bajo una lámpara de infrarrojos. Este bolo de inyección consigue una muy eficaz transfección de los hepatocitos del hígado, que a su vez, secretan el producto de expresión génica al torrente sanguíneo, con lo cual la proteína puede ejercer su función a nivel sistémico. El mecanismo por el cual se verifica esta transfección, normalmente tan exitosa, no está del todo elucidado, aunque se están haciendo grandes esfuerzos al respecto, existiendo numerosos estudios que además ya ponen en práctica este método en fases experimentales muy avanzadas, tanto en ratones como en animales de mayor tamaño, como es el caso del cerdo [64-66]. La eficacia del procedimiento de transfección se comprobó tomando muestras de sangre de los animales tratados y analizando mediante ELISA los niveles plasmáticos de la proteína cuyo gen se había introducido con el plásmido.

## **7- ELISA de mGM-CSF y mIL-12**

Dado que tanto GM-CSF como IL-12 son dos citoquinas que la célula secreta al medio cuando las produce, elegimos la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) para determinar la cantidad producida por las células transfectadas. Se utilizó un kit comercial para el análisis de muestras de sobrenadante del medio de cultivo de las células transfectadas. Para ello, cada 24 h. se retira el medio de cultivo por completo y se sustituye por medio fresco. El medio retirado se centrifuga a 3000 rpm. durante 5 min., para

## Vacunas genéticas contra el melanoma

retirar cualquier resto celular que pudiera interferir en los ensayos posteriores, y se guardan alícuotas del medio congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación. Así se pudo estudiar la producción de las citoquinas por parte de las células transfectadas a lo largo del tiempo y con diferentes dosis de ADN en la transfección, obteniendo curvas del tipo “dosis-respuesta” y curvas de expresión a lo largo del tiempo.

El kit empleado fue el BD OptEIA ELISA kit para m-GMCSF y el BD OptEIA ELISA kit para m-IL12 (Pharmlingen, BD Biosciences, España).

### **8- Análisis de la expresión de m-B7.2 por Citometría de Flujo**

La molécula coestimuladora B7.2 permanece anclada en la superficie externa de la membrana celular y no es secretada al medio, por lo que se eligió la citometría de flujo para confirmar su presencia en las células transfectadas con plásmidos conteniendo el gen *m-B7.2*. Las células son despegadas, contadas y centrifugadas en fracciones de 500.000 células, 72 h. después de la transfección. A continuación, se lavan con PBS y tras tirar el sobrenadante, se incuban en hielo, durante al menos 30 min. con 200  $\mu\text{l}$  del anticuerpo primario (Biotin-conjugated rat anti-CD86 monoclonal antibody, Pharmlingen, BD, España) a 1  $\mu\text{g}/\text{millón}$  céls. en solución PBS-SBF (2.5%) - Azida (0.01%). Posteriormente, las células se lavan dos veces con 1 ml PBS-Azida y entonces se incuban en hielo y oscuridad con Estreptavidina-FITC (Pharmlingen, BD, España) a razón de 0.5  $\mu\text{g}/\text{millón}$  céls. Finalmente, las células son lavadas de nuevo dos veces y se resuspenden en 500  $\mu\text{l}$  PBS para ser pasadas por el citómetro (Coulter Epics, XL; Beckman Coulter, España) y analizar la fluorescencia en las distintas poblaciones para así identificar la proporción de células realmente transfectadas.

Para evitar confundir la autofluorescencia de las células o uniones inespecíficas del anticuerpo con resultados verdaderamente positivos, se emplearon diferentes controles. Los controles de autofluorescencia fueron los grupos **a**) células B16 tipo salvaje no transfectadas, sin ningún anticuerpo en

el medio y **b)** células B16 transfectadas con p2F m-gmcsf + m-B7.2, sin posterior incubación con los reactivos; los controles de fluorescencia inespecífica por los reactivos fueron **c)** células B16 tipo salvaje no transfectadas e incubadas con el anticuerpo y estreptavidina-FITC; **d)** células B16 transfectadas con p2F m-gmcsf + m-B7.2, incubadas sólo con el anticuerpo primario; **e)** células B16 transfectadas con p2F m-gmcsf + m-B7.2, incubadas sólo con estreptavidina-FITC; y finalmente el marcaje específico fue el grupo **f)** células B16 transfectadas con p2F m-gmcsf + m-B7.2, incubadas tanto con el anticuerpo primario como con estreptavidina-FITC.

### **9- Selección y purificación de células transfectadas: Bolas magnéticas**

Como observamos en nuestros estudios preliminares, la eficiencia del método de transfección es de un 20- 40% en las células B16. Por lo tanto, es difícil establecer en una vacuna que emplee estas células, la contribución de las células transfectadas y no transfectadas a la eficacia de estas vacunas que serían heterogéneas. Por esta razón, nos planteamos cuál sería la eficacia de la vacuna celular si lográsemos vacunar con un conjunto homogéneo de células, en el que el 100% estuvieran transfectadas.

La expresión en superficie de la molécula B7.2 nos permitió realizar un protocolo de selección y purificación de células transfectadas mediante bolas magnéticas (magnetic beads). Este protocolo aprovecha la unión antígeno-anticuerpo para acoplar una microesfera magnética al anticuerpo con el fin de poder separar todo el complejo unido a la bola magnética (célula transfectada-antígeno + anticuerpo-bola magnética) de entre la mezcla de células (transfectadas y no transfectadas) gracias al paso de toda la mezcla por un conducto flanqueado por imanes. Esta tecnología, desarrollada por “Automacs<sup>®</sup>” (Miltenyi Biotec, España), nos permite separar y recuperar sólo las células que expresan B7.2, que en nuestro caso son exclusivamente las células transfectadas con el plásmido p2F m-gmcsf + m-B7.2 y por tanto, productoras también de GM-CSF, como también comprobamos por ELISA.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Una vez transfectadas las células con los plásmidos p2F m-gmscf + m-B7.2 o los respectivos controles, se espera 72 h. para alcanzar los niveles de expresión óptimos de los genes transfectados. Se despegan y cuentan las células y se comienza con el protocolo de selección y purificación mediante bolas magnéticas unidas a estreptavidina “Streptavidin Microbeads” (Miltenyi Biotec, España), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se incuban con el anticuerpo primario biotinilado, (Biotin-conjugated rat anti-mouse CD86 monoclonal antibody, Pharmingen, BD, España), del modo descrito en el apartado anterior (citometría de flujo). Se continúa el protocolo incubando las células, ahora con las bolas magnéticas de estreptavidina, a modo de anticuerpo secundario. Finalmente, las células se pasan a través de una columna Automacs<sup>®</sup>, utilizando el programa “Posseld 2” del aparato. Este programa nos da dos fracciones de elución, una conteniendo las células no transfectadas y otra con las transfectadas, que contamos y llevamos a irradiar, con la dosis habitual de 150 Gy, para finalmente congelarlas hasta el momento de su utilización como vacuna genética celular.

## **10- Vacunas**

### **10.1- Vacunas preventivas**

Las vacunas preventivas son un buen modelo para evaluar la eficacia de la activación específica de la respuesta inmune, no sometida todavía a los sistemas de autorregulación inducidos por un tumor primario previo. Hemos realizado diferentes combinaciones de antígenos tumorales y genes de citoquinas, para conocer tanto el efecto de la dosis como el efecto de su orden de administración, en relación con la eficacia antitumoral de la vacuna. Además hemos buscado un protocolo experimental que nos diera la máxima

información posible en cada experimento, tales como la inhibición del crecimiento del tumor implantado, la supervivencia final de los animales y la producción y subtipos de inmunoglobulinas específicas en sangre periférica del animal.

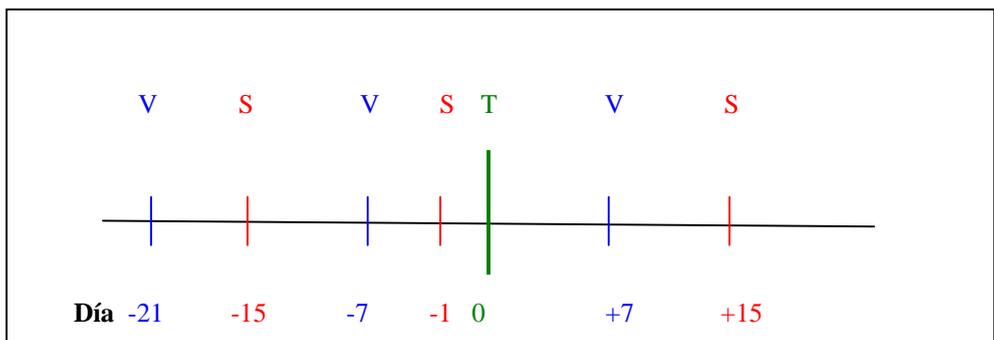
En todos los casos se ha empleado ratones C57BL/6 (Harlan, España) de entre 8-10 semanas de edad en el momento de inicio del experimento. Los ratones fueron ubicados en jaulas en grupos de 5 animales.

Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Investigación de la Universidad de Valencia.

Todos los experimentos que se explican a continuación siguieron básicamente el mismo diseño experimental: el día de implantación del tumor es considerado como **día 0**, en el que  $10^5$  células salvajes B16 son implantadas en el pata izquierda de los animales.

Las dosis de vacunación se suministran los **días -21, -7 y +7** (semanas -3, -1 y +1, respectivamente), de forma subcutánea, en la pata contralateral a la pata portadora del tumor.

El esquema es el siguiente:



donde V es vacunación, T es implantación de tumor y S es extracción de sangre.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Las extracciones de sangre para monitorizar la producción de inmunoglobulinas, se llevaron a cabo en el **día -15**, inicio del experimento (ninguna manipulación previa de los animales); **día -1**, cuando se ha suministrado ya una dosis de vacuna pero aún no se ha implantado el tumor; **día +15**, se implantó el tumor 15 días antes y se ha suministrado tres dosis de vacuna.

Estas tomas de sangre se realizan a todos los animales del experimento, utilizando capilares de vidrio heparinizados. Tras hacer una incisión con bisturí en la cola del animal, dilatando previamente los vasos sanguíneos de la misma bajo una lámpara infrarroja, se obtienen aprox. 200 µl de sangre por capilaridad. Los capilares se cierran con plastilina por uno de sus extremos y se centrifugan a 2400 rpm, lo que nos permite la separación del plasma del resto de los componentes sanguíneos. Alícuotas equivalentes del plasma de los ratones de un mismo grupo se agrupan y congelan a -20°C hasta su uso.

### **10.1.1- Vacunas con Antígenos: libres o encapsulados en liposomas**

En este experimento los animales fueron vacunados con un volumen de 100 µl. Los grupos de tratamiento fueron: **a)** 10 µg de TMP en solución salina; **b)** liposomas de PC:CH conteniendo 10 µg de TMP; **c)** liposomas de SM:CH conteniendo 10 µg de TMP y **d)** Control (100 µl solución salina).

### **10.1.2- Vacunas con asociación de antígenos y genes**

#### **- Vacunas con lipopoliplexos**

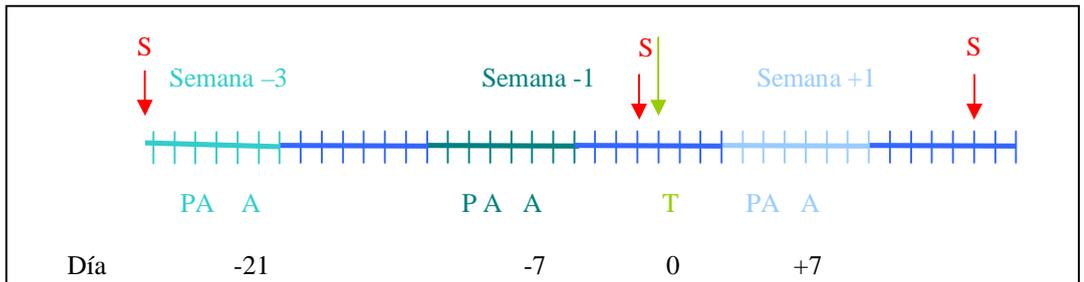
En este experimento se testaron los lipopoliplexos formados por liposomas PC:CH:DP encapsulando 2 ó 20 µg de TMP (TMP2 o TMP20) y poliplexos preparados con PEI y 10 ó 50 µg del plásmido p2F m-gmcsf (GM10 o GM50). Así, los grupos de vacunación fueron: **a)** GM10/TMP2; **b)** GM10/TMP20; **c)** GM50/TMP2; **d)** GM50/TMP20 y **e)** Control, 100 µl suero fisiológico.

**- Vacunas con acondicionamiento genético tisular**

Este conjunto de experimentos es el único de este apartado (10.1) que difiere de los demás en el procedimiento y esquema de vacunación. El acondicionamiento genético tisular pretende discriminar claramente el orden, el momento, en el que se presentan al sistema inmunitario los dos componentes de la vacuna: la citoquina GM-CSF, producida por la transfección *in vivo* de los tejidos y los antígenos, las TMP extraídas a partir de las células B16.

**Vacuna con acondicionamiento tisular directo.** 50µg del plásmido pMok m-gmcsf o pcDNA3 desnudos, fueron inyectados en 200 µl solución salina (sólo solución salina en el grupo Control), en el área inguinal derecha de los animales. Posteriormente, se administraron 2 dosis de antígeno, una a las 24 h. tras la administración del plásmido y otra a las 72 h. Las dosis de los antígenos TMP fueron 20 ó 200µg totales/dosis, las cuales fueron divididas en dos inyecciones de 100µl cada una.

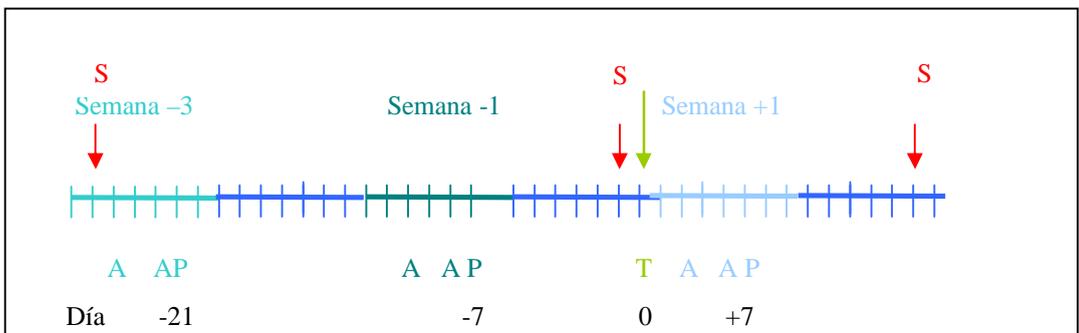
El esquema de vacunación fue el siguiente:



Siendo P, plásmido; A, antígeno; T, implantación de tumor y S, extracción de sangre.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

**Vacuna con acondicionamiento tisular inverso.** En este experimento invertimos el orden de administración de los componentes de la vacuna, inyectando primero el antígeno TMP, 100 µg /dosis (primer día y a las 48 h) y en segundo lugar el plásmido (a las 72 h). Además, en este experimento testamos dos dosis diferentes de plásmido, 10 ó 50 µg pMok m-gmcsf. El esquema resultante es el siguiente, siendo de nuevo P, plásmido; A, antígeno; T, implantación de tumor y S extracción de sangre:



### **10.1.3- Vacunas con Células Modificadas Genéticamente**

#### **- Vacunas con Células Transfectadas No Seleccionadas**

En estos experimentos, las células B16 transfectadas, irradiadas y congeladas, se descongelan y se lavan mediante centrifugación en DMEM con SBF.

Finalmente se resuspenden en DMEM solo a razón de  $2 \times 10^5$  células viables por dosis (100  $\mu$ l), por ratón.

Los grupos de tratamiento fueron: **a)** B16-B7.2; **b)** B16-IL12; **c)** B16-GMCSF; **d)** B16-pMok GMCSF; **e)** B16-GMCSF+B7.2/200; **f)** B16-GMCSF+IL12/200. La marca “/200” de los dos últimos grupos hace alusión a las  $2 \times 10^5$  células que se emplearon en ellos, ya que, sólo en el caso de estos dos tratamientos, hubo otra dosis adicional, que se reflejó en otros dos grupos de tratamiento: **g)** B16-GMCSF+B7.2/500; **h)** B16-GMCSF+IL12/400. En estos dos grupos se emplearon  $5 \times 10^5$  ó  $4 \times 10^5$ , respectivamente, que representan el número de células necesario para alcanzar la misma producción de GM-CSF que alcanza el grupo B16-GMCSF con  $2 \times 10^5$  células, de acuerdo con los experimentos de ELISA. Además los grupos control fueron tres: **i)** B16-p2F $\emptyset$ ; **j)** B16\*, con  $2 \times 10^5$  células B16 tipo salvaje irradiadas, inyectadas en los 100 $\mu$ l de DMEM, y grupo **k)** Control, en el que se inyectaron sólo 100  $\mu$ l DMEM en cada dosis de vacunación.

#### **- Segunda exposición al tumor: Reimplantación**

Un año después del inicio del experimento anterior, a los animales que habían sobrevivido se les expuso por segunda vez al tumor, con el fin de evaluar el grado de memoria inmune inducido y si éste era suficiente para proteger a los animales frente a la reimplantación del mismo.

Como grupo Control, empleamos nuevos animales (n=5), no tratados previamente, de una edad similar a la de los ratones supervivientes del experimento anterior (aprox. 14 meses de edad). Únicamente se administró a

## Vacunas genéticas contra el melanoma

los ratones tratados una dosis de vacunación de recuerdo, de las mismas características que la de un año atrás, y 14 días después se les volvió a implantar a todos el tumor con  $10^5$  células B16 tipo salvaje en la pata izquierda.

El resto de grupos fueron: **a)** B16-GMCSF , con n=4; **b)** B16-pMok GMCSF, con n=3; **c)** B16-IL12, con n= 2; **d)** B16-B7.2, con n=1; **e)** B16-GMCSF+B7.2/200, con n=3 ; **f)** B16-GMCSF+B7.2/500, con n=2 ; **g)** B16-GMCSF+IL12/200, con n=2 y **h)** B16-GMCSF+IL12/400, con n=2 .

### **- Vacunas con Células Transfectadas y Seleccionadas por Bolas Magnéticas**

En este experimento con células B16 transfectadas y seleccionadas, se eligió una dosis de células equivalente al número de células realmente transfectadas del experimento anterior. Por lo tanto, conociendo la eficacia de transfección de nuestro protocolo, decidimos vacunar en este experimento, sólo con una dosis del 20% del número de células que empleamos en el experimento de células sin seleccionar, es decir, 40.000 células. Además, para tener un abanico más amplio en nuestro experimento, probamos también un tratamiento con el doble de esas células.

Por otro lado, quisimos aprovechar la oportunidad que nos brindaba trabajar con un reducido número de células, para testar una nueva opción: mezclar nuestras células transfectadas B16 con otras células diferentes, en este caso 3LL. Los grupos de tratamiento fueron: **a)** Control (100  $\mu$ l DMEM solo), para implantar tumor B16; **b)** Control-bis (100  $\mu$ l DMEM solo), para implantar tumor 3LL; **c)** B16-GMCSF+B7.2/40, empleando 40.000 células seleccionadas (productoras de GM-CSF y B7.2) por dosis, por ratón, en 100  $\mu$ l DMEM solo; **d)** B16-GMCSF+B7.2/80, como en el grupo anterior pero con 80.000 células seleccionadas; **e)** B16-GMCSF+B7.2/80 + 3LL, en este grupo las dosis de vacuna fueron una mezcla de 80.000 células B16

seleccionadas y 320.000 células 3LL no transfectadas, con implantación de tumor de B16 (el habitual); f) B16-GMCSF+B7.2/80 + 3LL, idéntico al grupo anterior pero con implantación de tumor de 3LL ( $10^5$  células 3LL tipo salvaje).

## **10.2- Vacunas Terapéuticas**

Mientras las vacunas preventivas permiten evaluar la instauración de la respuesta específica frente al tumor, la vacuna terapéutica permite evaluar la eficacia de la vacuna en unas circunstancias similares a la práctica clínica, en las que el animal es ya portador del tumor en el momento de iniciar la vacunación. Por tanto, se espera que mecanismos de autorregulación de la respuesta inmune, que pueden limitar la eficacia de la vacuna, estén instaurados de una forma más efectiva.

### **10.2.1- Efecto del acondicionamiento sistémico mediante transferencia génica hidrodinámica, sobre el crecimiento del tumor**

Este experimento se efectuó sólo transfectando genes de citoquinas en animales portadores de tumor, y no con antígenos. Con ello quisimos testar no sólo la eficacia de la administración de nuestras citoquinas *per se*, producidas en este caso por la transfección de los hepatocitos, sino también la eficacia de las construcciones génicas, ya que pueden ser un factor determinante en el éxito del procedimiento hidrodinámico.

Este experimento fue por lo tanto, principalmente dirigido a evaluar los plásmidos y por ello las condiciones experimentales son un tanto particulares, así, la implantación de tumor se hizo con  $10^5$  células B16 tipo salvaje, lo que supone una cifra bastante elevada para los experimentos terapéuticos.

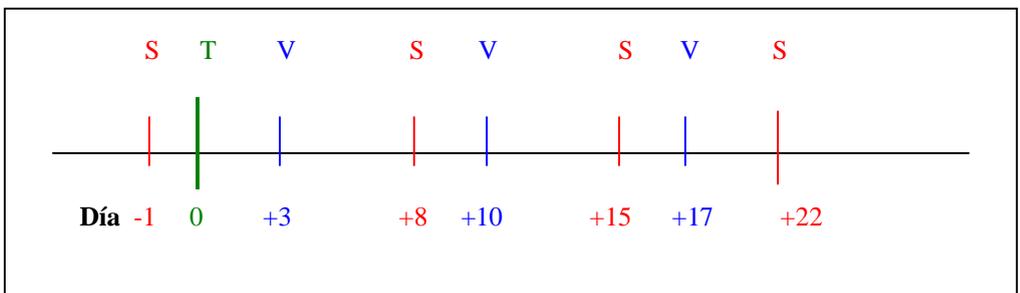
El día de implantación de tumor se toma como **día 0**. Se realizaron dos inyecciones hidrodinámicas, una en el **día +3** y otra en el **día +10**, consistiendo cada una de ellas en una inyección de 80 µg de plásmido en 2 ml de solución salina. Los grupos de tratamiento fueron: **a)** Control (sólo 2 ml de solución salina), **b)** p2FØ; **c)** pMok m-gmcsf; **d)** p2F m-gmcsf; **e)** p2F m-IL12; **f)** p2F m-gmcsf + m-IL12.

Se tomaron varias muestras de sangre a lo largo del experimento (**días +4, +6, +11 y +17**) para monitorizar tanto la respuesta inmune de los animales como la cinética de expresión de las citoquinas en plasma.

### 10.2.2- Vacunas terapéuticas con células modificadas genéticamente

En estos experimentos trabajamos con las células transfectadas que se han descrito en los anteriores apartados, siguiendo los mismos procedimientos de cultivo, transfección, irradiación, congelación y descongelación. Como en el caso de las vacunas preventivas, el tumor se implantó en la pata izquierda y las vacunas se inyectaron de forma subcutánea en la pata derecha. Las células fueron resuspendidas generalmente en volúmenes de 100-200  $\mu$ l de DMEM solo en cada dosis. Cuando las condiciones experimentales requirieron fraccionar las dosis, algunas de ellas fueron administradas bajo la piel del lomo.

El esquema temporal de vacunación fue el siguiente: primero se implanta el tumor (**día 0**) mediante inyección de  $2 \times 10^4$  células B16 tipo salvaje y posteriormente se administran tres dosis de vacuna, en los **días +3, +10 y +17** respecto a la implantación de tumor. También en estos experimentos se realizan tomas de sangre, con el mismo procedimiento que el descrito en las vacunas preventivas, pero tomando un total de 4, en los **días -1, +8, +15 y +22** (1 toma previa y 1 toma 5 días después de cada vacuna) como queda reflejado en el siguiente esquema:



Siendo V, vacuna; S, sangre y T, tumor.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

### **- Tratamiento Celular Dosis Baja**

La vacunación en este experimento se realizó utilizando dos dosis diferentes de células,  $5 \times 10^5$  ó  $2 \times 10^6$  por dosis, por ratón. Los grupos de vacunación fueron: **a)** Control (DMEM solo) ; **b)** B16- p2F Ø, 2 millones; **c)** B16-GMCSF, 0.5 millones; **d)** B16-GMCSF, 2 millones; **e)** B16-GMCSF+B7.2, 0.5 millones; **f)** B16-GMCSF+B7.2, 2 millones; **g)** B16-GMCSF+IL12, 0.5 millones; **h)** B16-GMCSF+IL12, 2 millones.

### **- Tratamiento Celular con Ciclofosfamida y Dosis Baja**

En esta vacunación terapéutica tratamos a los animales con ciclofosfamida (Sigma, España), manteniendo la dosis celular de vacuna del experimento anterior, en un intento de comprobar si este agente citostático lograba inhibir parte de la respuesta inmune supresora y así mejorar los resultados del experimento anterior. El esquema de vacunación fue modificado de modo que se llevó a cabo una inyección intraperitoneal de 3 mg de ciclofosfamida por ratón, en 500 µl de PBS en el **día +1** respecto al día de implantación de tumor (**día 0**) y se aguardó hasta el **día +5** para dar la primera dosis de vacuna. A partir de ese punto, sí se continuó con el esquema habitual, dando una nueva dosis de vacuna cada una de las dos semanas siguientes, en los **días +12 y +19**. Las tomas de sangre fueron similares a las de los dos experimentos anteriores, realizando una extracción previa y una tres días después de cada dosis de vacuna. Los grupos de vacunación fueron: **a)** Control (DMEM solo); **b)** Control ciclofosfamida, al que se le inyectó la ciclofosfamida en el día +1, pero no células sino DMEM solo; **c)** ciclofosfamida en el día +1 y las tres dosis de vacuna con B16- p2FØ, 2 millones de células/dosis; **d)** ciclofosfamida en el día +1 y las tres dosis de vacuna con B16-GMCSF, 2 millones de células/dosis.

### **- Tratamiento Celular Dosis Alta**

En este último caso decidimos seguir aumentando el número de células en la dosis de vacunación, con lo que administramos  $8 \times 10^6$  células por dosis, por ratón. Los grupos de vacunación fueron: **a)** Control (DMEM solo); **b)** B16\*, sin transfectar; **c)** B16- p2F Ø; **d)** B16-B7.2; **e)** B16-IL12; **f)** B16-GMCSF; **g)** B16-GMCSF+B7.2; **h)** B16-GMCSF+IL12.

### **Obtención de linfocitos a partir de la sangre**

La sangre recién extraída de los ratones de cada grupo con el capilar, se mezcla en un eppendorf para proceder a separar sus componentes con Ficoll-Paque Plus® (Amersham Biosciences, España). Este reactivo permite la separación no sólo del plasma de la sangre sino también de los linfocitos, que en esta vacunación nos interesan para experimentos adicionales. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se obtuvieron los dos componentes sanguíneos de interés, descartando los eritrocitos. El plasma se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  y los linfocitos se dejaron listos para las siguientes aplicaciones.

### **Caracterización de Células T Reguladoras por Microscopía Confocal**

En este experimento quisimos evaluar si nuestro tratamiento estaba afectando al número de linfocitos T reguladoras (Treg) presentes en la sangre periférica de los animales. Para ello, una vez separados los linfocitos de cada grupo de animales tratados, en las tomas de sangre de los días +8, +15 y +22 (5 días después de cada dosis de vacuna), se procedió a la inmunotinción de los mismos. El total de linfocitos de cada grupo es dividido, tras ser contado, en dos partes, una para la tinción de los linfocitos  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ , la otra para la tinción de los linfocitos Treg. Para el primer grupo se utilizó el anti-mouse CD8a marcado con Alexa Flour 647 y el anti-mouse CD4 marcado con FITC, ambos de eBioscience. En el caso de la fracción destinada al marcaje de Treg, se utilizó el Mouse regulatory T cell staining kit #2, también de eBioscience, que consta de FITC anti-mouse CD4, PE anti-mouse CD25, APC anti-mouse/rat Foxp3 FJK-16s y el anticuerpo APC Rat IgG2a isotype control para

## Vacunas genéticas contra el melanoma

evitar marcajes inespecíficos. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se efectuaron los marcajes, para, una vez terminados, pasar las células a cámaras de microscopía confocal LabTek, donde se añadió por último a las células 3  $\mu\text{l}$  de Hoechst 1mg/ml (Invitrogen) por pocillo, incubando tres minutos en oscuridad, para permitir la visualización posterior del total de células presentes en cada muestra. A continuación las células se analizaron con un microscopio confocal Leica TCS-SP2 con láser de argón y helio-neón, acoplado a microscopio invertido Leica DM1R13. En el marcaje para Treg, se obtuvieron imágenes en 5 canales diferentes: luz transmitida, color cian para el marcaje con Hoechst, color verde para FITC ( $\text{CD4}^+$ ), color rojo para PE ( $\text{CD25}^+$ ) y color azul para APC (Foxp3). En el marcaje para  $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ , se obtuvieron imágenes en 4 canales: luz transmitida, color cian para el marcaje con Hoechst, color verde para FITC ( $\text{CD4}^+$ ) y color rojo para Alexa Fluor 647 ( $\text{CD8}^+$ ).

Finalmente, se procedió al conteo del número de células por campo de cada uno de los marcajes, tomando entre 5 y 10 campos diferentes al azar de cada muestra y se prepararon las imágenes de superposición mediante el programa LCS Lite (Leica).

### **11- Medida del tamaño tumoral, supervivencia y análisis estadísticos**

En todos los experimentos de vacunación el crecimiento del tumor fue controlado visualmente y medido con un pie de rey desde el momento en que empezaba a ser aparente hasta el día en que los animales comenzaban a morir a causa del proceso canceroso. Con el pie de rey se miden dos dimensiones perpendiculares del tumor, A, el diámetro mayor y B, el diámetro menor, lo que nos permite calcular el volumen tumoral con la fórmula  $V = (A \times B^2)/2$ , expresando el resultado en  $\text{mm}^3$ .

La supervivencia total o parcial que fue lograda en los diferentes experimentos, se anotó, vigilando diariamente a los animales y anotando la fecha de muerte de cada uno, para poder construir las curvas de supervivencia. Para comparar los resultados de los diferentes grupos de tratamiento se empleó el test estadístico Two-way ANOVA, con el post test de Bonferroni (95% intervalo de confianza), expresando las diferencias significativas en base al parámetro P-valor, siendo éste  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  y  $P < 0.001$ , de menor a mayor diferencia estadísticamente significativa, respectivamente.

Las curvas de supervivencia se trazaron en base al método de Kaplan-Meier, para poder así aplicar posteriormente el test logrank y comparar las curvas dos a dos.

Tanto para los cálculos estadísticos como para las representaciones gráficas se utilizó el programa GraphPad Prism v. 4.

En el experimento de microscopía confocal, los resultados de conteo de células por campo se procesaron de modo que se obtuvieron porcentajes de cada tipo celular respecto al total de células y la media y desviación estándar de los mismos. A estos datos se les aplicó el test estadístico Two-way ANOVA y Bonferroni de forma doble, para evaluar la existencia de diferencia significativa entre diferentes tratamientos o entre los diferentes tiempos dentro de un mismo tratamiento.

## **12- ELISA específico anti-TMP**

La medida de los anticuerpos específicos del tipo IgG (total y subclases) que los animales generan frente a TMP, fue hecha en las muestras de plasma de los diferentes experimentos, según el protocolo descrito en la literatura [62, 67]. Básicamente, las placas de ELISA (Costar, España) son cubiertas con TMP a  $0.8 \mu\text{g/ml}$  ( $100 \mu\text{l}$ ) en tampón carbonato/bicarbonato  $50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 9.6$ , e incubadas durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ . Al día siguiente, las placas se bloquean con  $1\%$  PBS-BSA, durante  $1 \text{ h}$  a temperatura ambiente, se lavan con PBS-

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Tween 20 0.1% y a continuación se añaden las muestras problema diluídas en PBS-BSA 1%-Tween 20 0.1%, a 1/1.000 para determinar IgG total y la subclase IgG1 y a 1/100 para la subclase IgG2a. Estas muestras se incuban 3 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos se detectan con anti IgG totales de cabra (Biocheck, USA) a 1/10.000 y con los anti-subclases IgG de ratón a 1/1.000 (Sigma, Mouse monoclonal isotyping reagents, España), seguidos de dilución 1/5.000 de anti-IgG cabra biotilado de conejo (Sigma, España) y estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante (Sigma, España). Las placas son finalmente reveladas con una mezcla de ortofenilendiamina (OPD, Sigma, España) 30 mg/ml y peróxido de hidrógeno (Fluka, España), y la reacción detenida con HCl 1N, para leer la absorbancia a 492 nm. Todas las muestras fueron ensayadas por duplicado, para permitir el cálculo de la absorbancia media y la desviación estándar (SD).

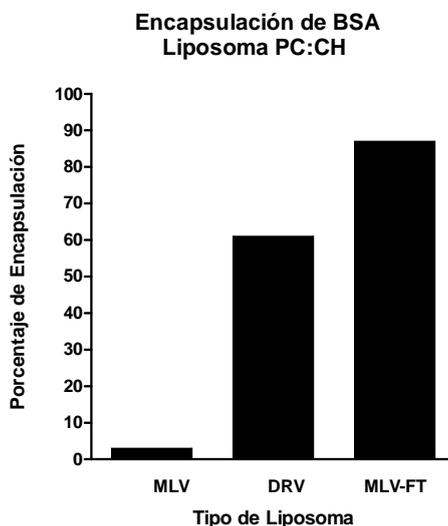
# **RESULTADOS**

## **1- Vacunas preventivas**

### **1.1- Vacunas con antígenos: libres o encapsulados en liposomas**

#### **1.1.1- Eficacia de la encapsulación de proteína en liposomas**

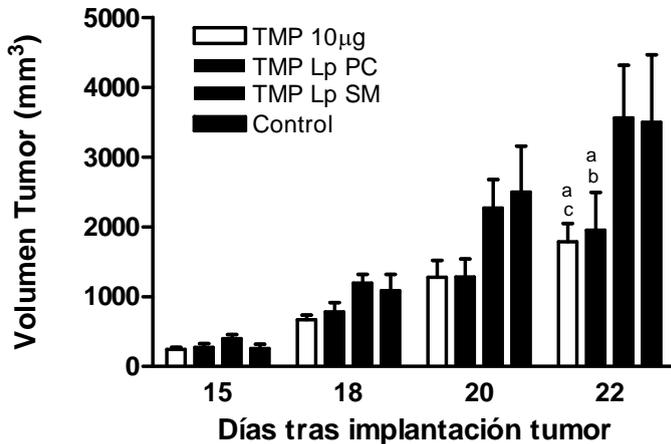
Los diferentes procedimientos de preparación de liposomas mostraron a su vez una diferente capacidad para encapsular proteína en su interior. En la **figura 1** podemos observar la eficacia de encapsulación de la proteína BSA en los diferentes tipos de liposomas, manteniendo en los tres tipos la formulación base PC:CH. Los ciclos de congelación y descongelación durante la formación de los liposomas MLV-FT, permiten a este tipo de vesículas atrapar prácticamente el 90% de la proteína presente en el medio. Estos resultados nos hicieron continuar con este tipo de liposomas en los siguientes experimentos ya que nuestro propósito era utilizarlos simplemente como vehículo de transporte y entrega de nuestros antígenos tumorales (TMP), así que cuanto mayor efectividad en la encapsulación, mejor para poder entregar más antígeno con una menor cantidad de lípido necesario.



**Figura 1. Encapsulación de la proteína BSA en liposomas.** Capacidad de encapsulación de la proteína BSA en diferentes tipos de liposomas: Vesículas Multilamelares (MLV), Vesículas de Deshidratación-Rehidratación (DRV) y Vesículas Multilamelares de Congelación-Descongelación (MLV-FT).

Los ratones C57BL/6 (n=5 por grupo) fueron vacunados de forma subcutánea en la pata derecha, con una dosis por semana, en las semanas **-3, -1 y +1 (días -21, -7 y +7)**, respecto a la implantación del tumor (**día 0**) con  $10^5$  células B16 tipo salvaje en la pata izquierda. Los liposomas conteniendo TMP o la TMP sola, siempre en un volumen de 100  $\mu$ l, fueron inyectados en cada una de las tres dosis según los siguientes grupos de tratamiento: **a)** 10  $\mu$ g de TMP libre; **b)** liposomas PC:CH conteniendo 10  $\mu$ g de TMP; **c)** liposomas SM:CH conteniendo 10  $\mu$ g de TMP; y **d)** Control (100  $\mu$ l solución salina). El crecimiento del tumor fue monitorizado visualmente y se midió con un pie de rey el diámetro largo (A) y el corto (B) del mismo, calculando el volumen de tumor con la fórmula  $V = (Ax B^2) / 2$ , expresando el resultado en  $\text{mm}^3$ , como puede verse en la **figura 2**.

## Vacuna con TMP y Liposomas

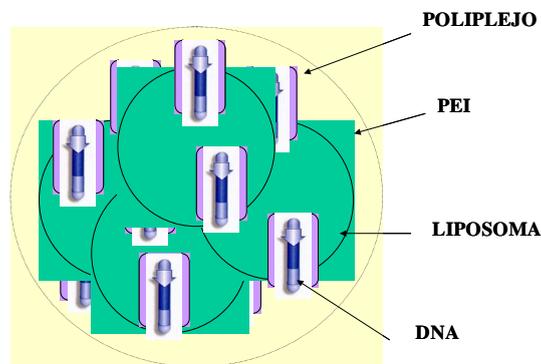


**Figura 2- Volumen tumoral en la vacuna de TMP libre y TMP encapsulada en liposomas.** R ratones C57BL/6 (n=5 por grupo) fueron vacunados en la pata derecha los días -21, -7 y +7 respecto al día de inyección de tumor, día 0 ( $10^5$  céls. B16 tipo salvaje) en la pata izquierda. Tratamientos: a) 10 µg de TMP libre; b) Liposomas PC:CH encapsulando 10 µg de TMP; c) Liposomas SM:CH encapsulando 10 µg de TMP; d) Control (100 µl solución salina). El volumen tumoral fue calculado con  $V = (Ax B^2) / 2$ , donde A es el diámetro mayor y B el menor, en  $mm^3$  finales, medido con un pie de rey. Tras hallar media y SD, se hicieron los test estadísticos de two-way ANOVA y post-test de Bonferroni. La diferencia significativa  $P < 0.05$  está representada por “a”, si es respecto a TMP Lp SM ; por “b” si es respecto al grupo Control, y “c”  $P < 0.01$  también respecto al grupo Control.

Los test estadísticos se llevaron a cabo mediante two-way ANOVA y post test de Bonferroni. En la **figura 2** podemos observar cómo tanto al vacunar con proteínas solas (TMP 10 µg) como con éstas encapsuladas en liposomas de fosfatidilcolina (TMP Lp PC) se obtienen inhibiciones del crecimiento tumoral 40-50%, en el día +22 después de la implantación de tumor (día 0). El grupo en el que se vacunó con las proteínas encapsuladas en liposomas de esfingomiélna (TMP Lp SM), no logró sin embargo diferenciarse del Control. Estos resultados, junto con los de eficacia de encapsulación de proteína, hicieron que continuásemos trabajando con liposomas de PC.

### 1.2- Vacunas con lipopoliplejos

Con el fin de evaluar la eficacia del transporte simultáneo de antígenos proteicos (TMP) y ADN codificante de genes de citoquinas (GM-CSF) en dos compartimentos independientes, en las vacunas antitumorales, se decidió preparar los denominados lipopoliplejos. En ellos las TMP son encapsuladas en liposomas aniónicos, mientras que el ADN es preparado como un poliplejo ADN/PEI, que resulta con carga neta positiva al ser el PEI un polímero catiónico que se incorpora en exceso. Por su parte, las TMP se encapsulan en liposomas con carga negativa, gracias a la presencia en la composición del lípido aniónico Dicitilfosfato (DP). De este modo, el lipopoliplejo se constituye de forma espontánea por interacción de cargas entre la superficie aniónica del liposoma y la carga neta catiónica del poliplejo. La **figura 3** ilustra un modelo del concepto de este lipopoliplejo.

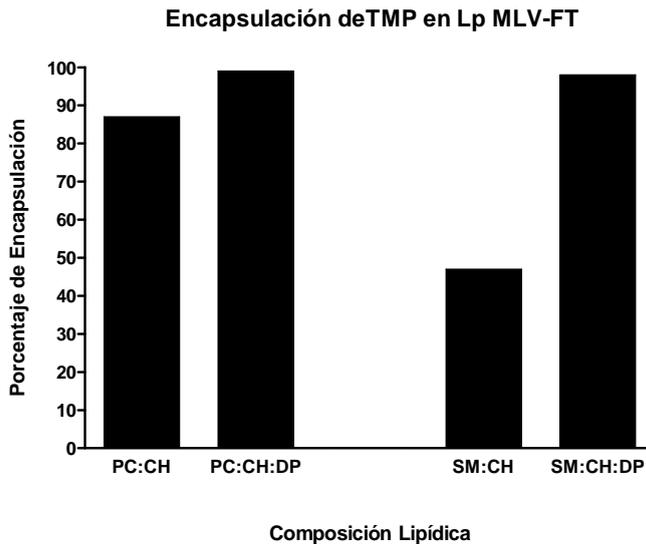


### LIPOPOLIPLEJO

**Figura 3. Modelo de lipopoliplejo.** El modelo representa el complejo formado por poliplejos (PEI+ADN) y liposomas (conteniendo los antígenos TMP). Debido a la interacción de cargas y los tamaños, se espera que varios poliplejos se unan a cada liposoma y además que varias de estas unidades se agrupen entre sí, formando una especie de agregados que deben permitir la entrega simultánea de los componentes TMP y ADN, que sin embargo viajan en compartimentos diferenciados.

### 1.2.1- Eficacia de la encapsulación de TMP en liposomas.

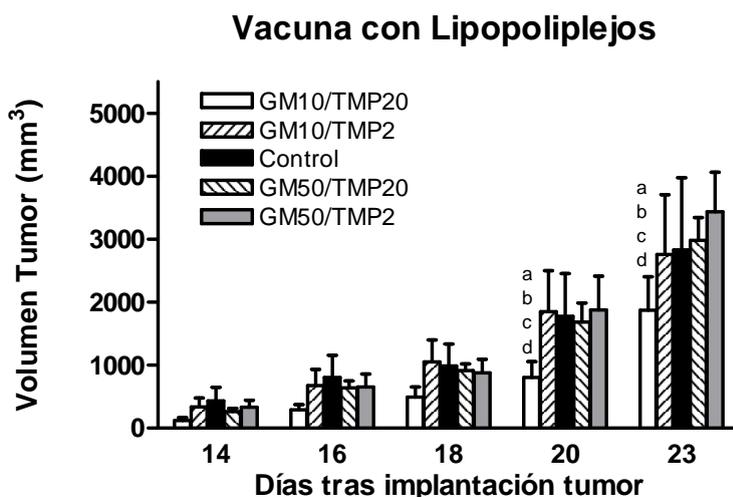
En la **figura 4**, se muestra que los mejores porcentajes de encapsulación de proteína tumoral en los liposomas MLV-FT son alcanzados con formulaciones que contienen PC y que la incorporación de un 10% de DP mejora esta eficiencia, alcanzando prácticamente el 100% de eficacia de encapsulación. A la vista de estos resultados, escogimos el liposoma PC:CH:DP para los experimentos siguientes con lipopolíplejos, ya que la fosfatidilcolina es uno de los lípidos clásicos y además fue nuestro lípido de elección en el experimento anterior.



**Figura 4. Encapsulación deTMP en Lp MLV-FT.** Porcentaje de encapsulación de TMP en liposomas MLV-FT con diferentes composiciones lipídicas: Fosfatidilcolina (PC), Esfingomielina (SM), Colesterol (CH) y Dicitilfosfato (DP).

### 1.2.2- Efecto antitumoral de la vacunación con lipopolíplejos.

En la vacunación con lipopolíplejos se emplearon 10 ó 50  $\mu\text{g}$  del plásmido p2F *m-gmcsf* (GM10 o GM50) acoplado a PEI 25 KDa y 2 ó 20  $\mu\text{g}$  de TMP (TMP2 o TMP20) encapsulada en liposomas PC:CH:DP, configurando los siguientes grupos de tratamiento: **a)** GM10/TMP2, **b)** GM10/TMP20, **c)** GM50/TMP2, **d)** GM50/TMP20 y **e)** Control (100 $\mu\text{l}$  salino). De nuevo, el tumor se midió en sus dos dimensiones perpendiculares A y B, para calcular su volumen en  $\text{mm}^3$  según la fórmula  $V = (A \times B^2) / 2$ . Los test estadísticos también fueron two-way ANOVA y Bonferroni.



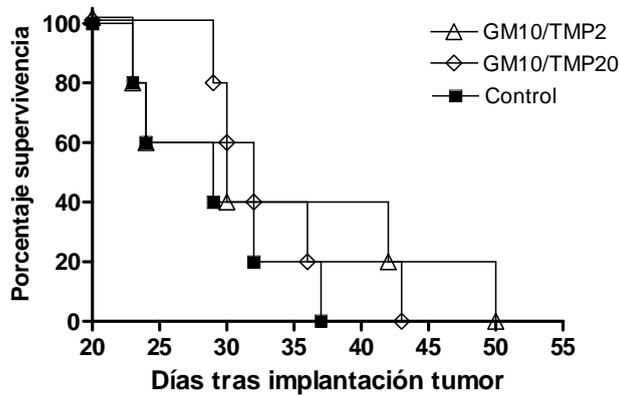
**Figura 5- Vacuna con Lipopolíplejos.** Siguiendo el mismo protocolo de la fig. 2, se vacunó a los ratones C57Bl/6 (n=5, por grupo) con lipopolíplejos preparados con: 10 ó 50  $\mu\text{g}$  de p2F *m-gmcsf* / PEI (GM10 o GM50) unidos a liposomas PC:CH:DP encapsulando 2 ó 20  $\mu\text{g}$  de TMP (TMP2 o TMP20). Los grupos fueron GM10/TMP2, GM10/TMP20, GM50/TMP2, GM50/TMP20. El cálculo del volumen tumoral y el análisis estadístico fueron los mismos que en la fig. 2. La diferencia estadística hallada es  $P < 0.001$  comparando GM10/TMP20 con cada uno de los siguientes grupos en la figura, simbolizada con “a, b, c y d”, respectivamente.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

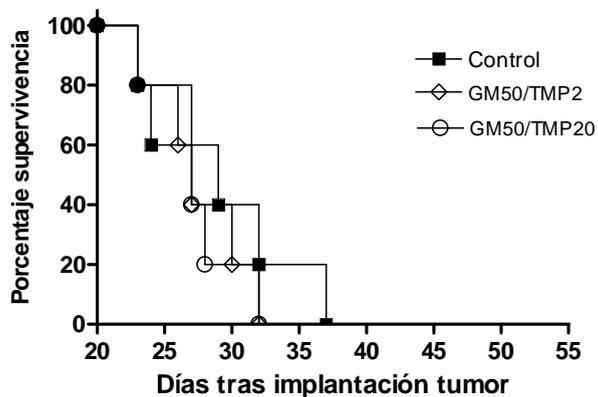
La **figura 5** muestra diferencias significativas en cuanto a la inhibición del crecimiento de tumor (40-50%,  $p < 0,001$ ) en los días +20 y +23, logradas sólo por el grupo GM10/TMP20, comparado con el resto de tratamientos. Los demás grupos no mostraron diferencias significativas entre ellos. La mejor combinación de entre las posibilidades que valoramos fue vacunar con un lipopoliplejo conteniendo la menor cantidad de ADN y la mayor cantidad de antígeno.

Aunque se observaron inhibiciones del crecimiento tumoral similares en las vacunas con liposomas y con lipopoliplejos, existen diferencias claras entre estas dos vacunas en los resultados de supervivencia, como puede apreciarse en la **figura 6**. Mientras que en la vacuna con liposomas no se modificó la supervivencia respecto al control, sí que se obtuvieron mejores resultados en la vacuna con lipopoliplejos. En el **gráfico superior**, se representan los dos grupos en los que la vacunación fue realizada con la dosis inferior de ADN. En ambos casos, el periodo de supervivencia total fue mayor que en el grupo control, si bien no se logró diferencia estadísticamente significativa aplicando el método de Kaplan-Meier y logrank ( $p = 0.3498$  Control vs. GM10/TMP2 y  $p = 0.338$  Control vs. GM10/TMP20). Aún así, estos resultados están de acuerdo con los de inhibición de tumor mostrados en la fig.5, y se aprecia que la mayor supervivencia fue alcanzada con 10  $\mu\text{g}$  de *m-gmcsf*, mientras que los grupos tratados poliplejos que contenían 50  $\mu\text{g}$  de ADN, en el **gráfico inferior**, tuvieron iguales o menores periodos de supervivencia que el grupo control. En estos grupos, tampoco se logró una diferencia estadística respecto al control (GM10/TMP2  $p = 0.3498$ , GM10/TMP20  $p = 0.338$ , respecto a Control y entre ellos  $p = 0.8667$ ).

### Vacuna con Lipopoliplejos: GM10



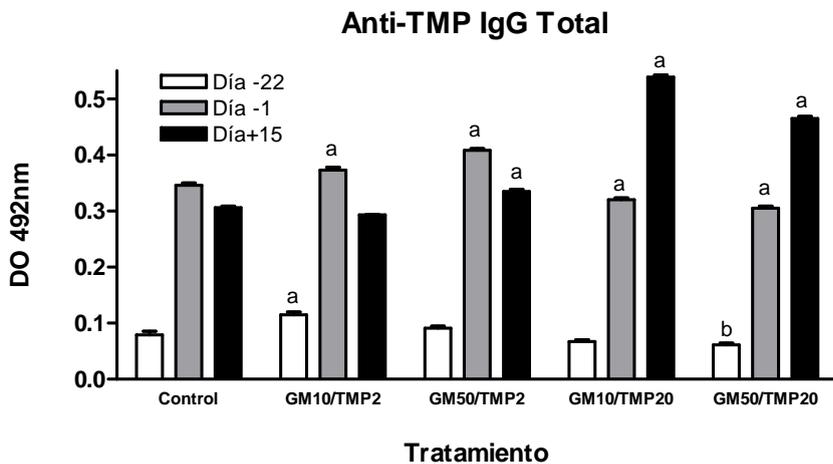
### Vacuna Lipopoliplejos: GM50



**Figura 6- Supervivencia en Vacuna con Lipopoliplejos.** Se recopiló la información de fechas de muerte de los animales vacunados, para construir las curvas de supervivencia. El gráfico superior muestra los resultados del grupo Control y los dos grupos tratados con lipopoliplejos conteniendo 10  $\mu\text{g}$  de p2F *m-gmcsf*. El gráfico inferior muestra los resultados del grupo Control y los dos grupos tratados con lipopoliplejos conteniendo 50  $\mu\text{g}$  p2F *m-gmcsf*. El test estadístico aplicado fue Kaplan-Meier seguido de logrank, no mostrando diferencias estadísticamente significativas.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Durante el experimento se tomaron muestras de sangre de los animales, agrupándolas por tratamiento y en los diferentes momentos: día -22 (antes de cualquier manipulación a los animales, sirviendo como nivel basal o control de cada grupo), día -1 y día +15, respecto al día 0, de implantación de tumor. La cantidad total de IgG específica anti-TMP detectada por ELISA se muestra en la **figura 7**. Las medidas se hicieron por duplicado y se representaron las medias y desviaciones estándar (SD), aunque la SD es casi inapreciable en el gráfico ya que es menor del 5% del valor de la media.

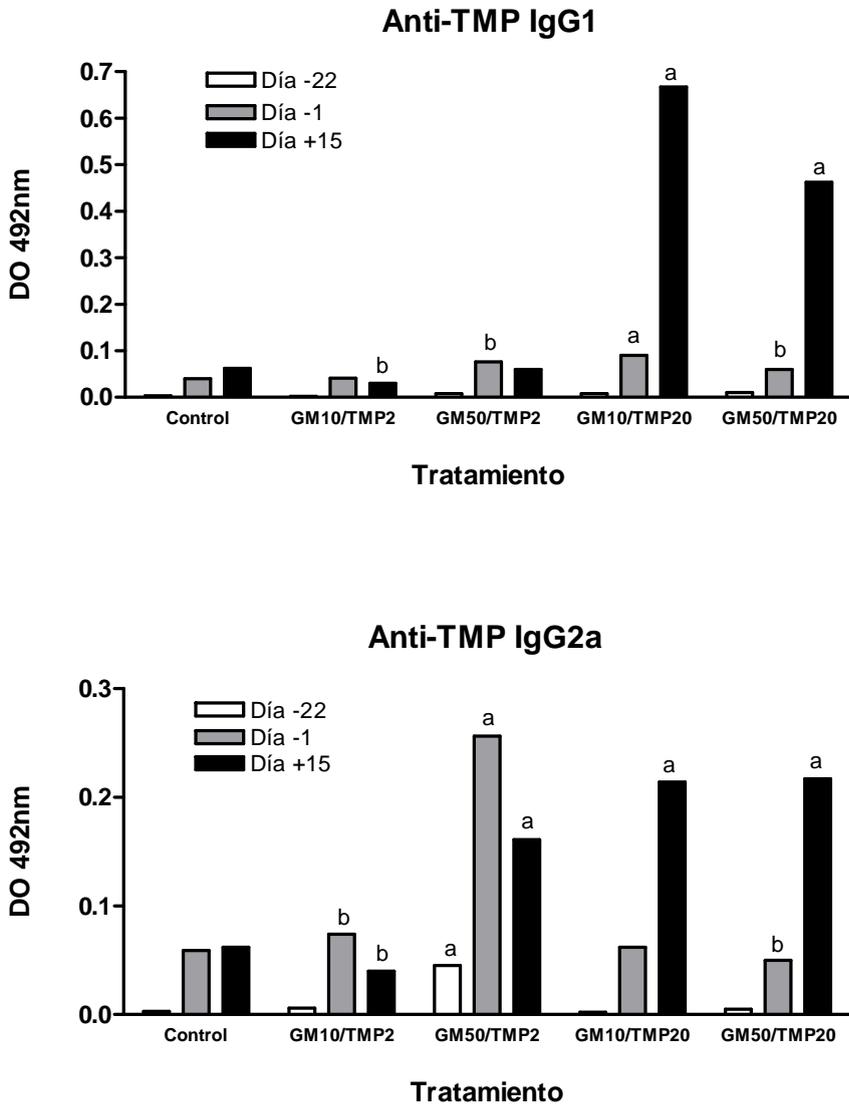


**Figura 7- Anti-TMP IgG total en Vacuna con Lipopolisplejo.** Muestras de sangre fueron tomadas de los animales en los días -22, -1 y +15, respecto al día 0 de implantación de tumor. Fueron agrupadas por tratamiento. Se obtuvo el plasma por centrifugación en capilares a 2420rpm durante 7 min. Las IgG totales, específicas frente a TMP se midieron por ELISA, como indicado en material y métodos. Todas las muestras se analizaron por duplicado, permitiendo el cálculo del valor medio de densidad óptica (DO) y la desviación estándar. **a** representa un p valor<0.001 respecto al Control y **b** p valor<0.01.

En esta figura, los tratamientos con las mayores dosis de antígeno (20 µg TMP) muestran la máxima respuesta de IgG totales el día +15, mientras que los dos grupos con la dosis más baja de TMP (2 µg), muestran sus máximos

con anterioridad, en el día -1, siendo estos niveles siempre inferiores a los máximos alcanzados por los otros dos grupos.

Con el fin de conocer cuál era la seroconversión de inmunoglobulinas inducida por esta vacuna, se estudiaron subtipos específicos de IgG anti-TMP (IgG1 e IgG2a) resumiéndose los resultados en la **figura 8**. En ella apreciamos cómo el mismo patrón observado en las IgG totales, se vuelve a repetir en los subtipos, siendo incluso más acentuado en las IgG1 (**gráfico superior**). Por otro lado, en cuanto a IgG2a (**gráfico inferior**), se alcanzan las mayores respuestas el día +15 al vacunar con dosis de 20 µg TMP y 10 µg *m-gmcsf*, ya que mayores dosis de ADN no ofrecieron ninguna ventaja. También GM50/TMP2 incrementó la respuesta IgG2a, pero principalmente limitada al día-1.

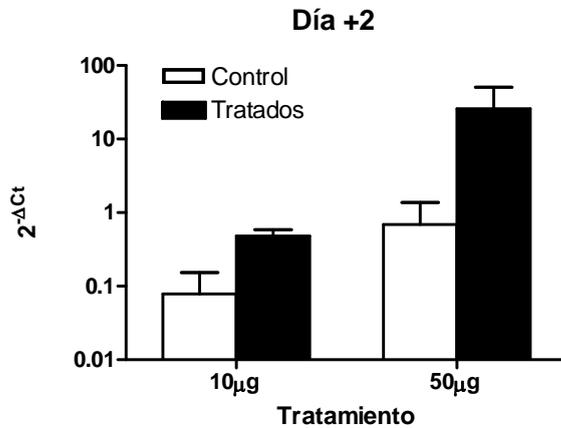


**Figura 8- Anti-TMP IgG subclases en Vacuna con Lipopoliplexo.** Se empleó el mismo protocolo y simbología que los descritos en la fig.7 para las subclases IgG1 (gráfico superior) e IgG2a (gráfico inferior). Las muestras problema se diluyeron 1/1000 para IgG1 y 1/100 para IgG2a.

### **1.3- Vacunas con acondicionamiento genético**

#### **1.3.1- Evaluación por RT-PCR de la eficacia del acondicionamiento genético tisular**

Para evaluar la eficacia de transfección de plásmidos desnudos mediante la inyección directa realizamos este experimento, inyectando 2 ratones con 10  $\mu\text{g}$  de pMok *m-gmcsf* y otros 2 con 50  $\mu\text{g}$ , en 200 $\mu\text{l}$  de suero fisiológico, en el área inguinal de la pata derecha. En el día +2 se sacrificaron los animales y se tomaron muestras de tejido (piel y músculo) de la zona inyectada y de la zona contralateral (usada como control) que fueron homogeneizadas en Trizol<sup>®</sup> para obtener el ARN y llevar a cabo con él un ensayo de RT-PCR cuantitativa. Los resultados están reflejados en la **figura 9**, donde se muestra la eficacia relativa de expresión del gen *m-gmcsf* respecto al gen de referencia *18S ribosomal*, expresado como valores de  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  ( $2^{\text{exp}-(\text{Ct de mGMCSF} - \text{Ct de 18S ribosomal})}$ ), una forma de referir los resultados de PCR ya descrita y utilizada en la literatura [63, 64]. Las diferencias de expresión del gen de interés entre el tejido tratado y el control alcanzaron cerca de un orden de magnitud. La diferente producción de GM-CSF es mayor al inyectar 50  $\mu\text{g}$  de pMok *m-gmcsf*, lo que significa que en este grupo se ha logrado una mayor producción neta de *m-gmcsf*.



**Figura 9. RT-PCR cuantitativa de *m-gmcsf*.** Los ratones C57BL/6 (n=2/grupo) fueron tratados con 10 ó 50 µg pMok *m-gmcsf* en 200µl de salino en la zona inguinal derecha (barras negras). La zona contralateral, no tratada, fue tomada como Control (barras blancas). Los animales fueron sacrificados dos días después de la inyección del plásmido (día +2). Las muestras fueron homogeneizadas en Trizol para obtener ARN y realizar qRT-PCR para detectar los niveles de expresión

### **1.3.2- Efecto antitumoral de la vacuna con acondicionamiento tisular directo**

En este experimento empleamos la transfección tisular, inyectando 50µg del plásmido pMok *m-gmcsf* o pcDNA3 (como plásmido control) desnudos, en 200 µl de suero fisiológico (sólo esto en el grupo Control) en el área inguinal derecha. Escogimos el plásmido pMok ya que fue con este plásmido con el que se hizo el estudio previo de transfección tisular por RT-PCRq.

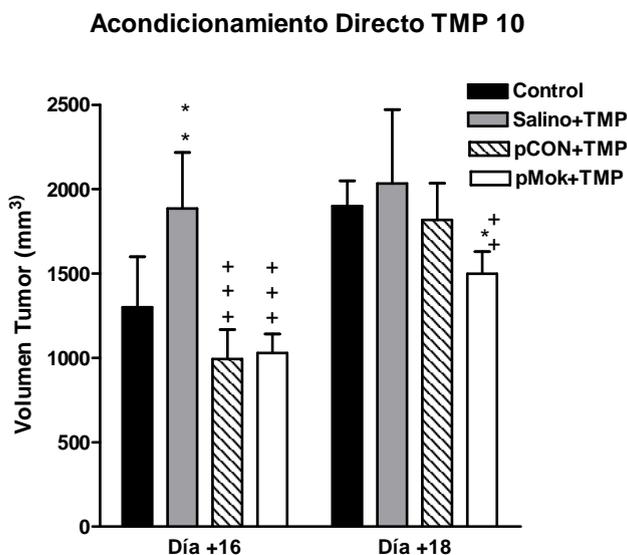
Posteriormente, a las **48** (día +2 respecto a inyección del plásmido) y **72 h.** tras la inyección del plásmido (el día +2 se eligió en base a los resultados del experimento de RT-PCRq) se inyectaron dos dosis de antígeno, en 100µl PBS 1x, en la misma área. Como antígenos utilizamos las TMP en dos cantidades diferentes: 10 µg/dosis ó 100 µg/dosis. Así tendríamos el equivalente en TMP a las dosis máximas del experimento anterior, de lipopolisacáridos, (20 µg) y además otro grupo con 10 veces más (200 µg), mientras que en este caso, en

cuanto al plásmido, escogimos la dosis que mejores resultados de producción de GM-CSF había dado en el experimento anterior (50  $\mu\text{g}$ ).

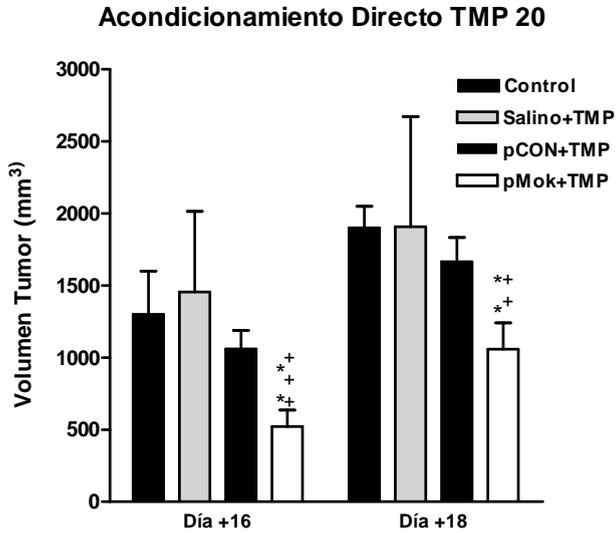
Este modelo de vacunación se siguió durante un total de 3 semanas, siendo éstas las semanas **-3, -1 y +1**, respecto al día de implantación del tumor, que como siempre es el **día 0**, en el que se inyectan en la pata izquierda  $10^5$  céls. B16 tipo salvaje.

Los resultados de inhibición del crecimiento tumoral pueden verse en las figuras

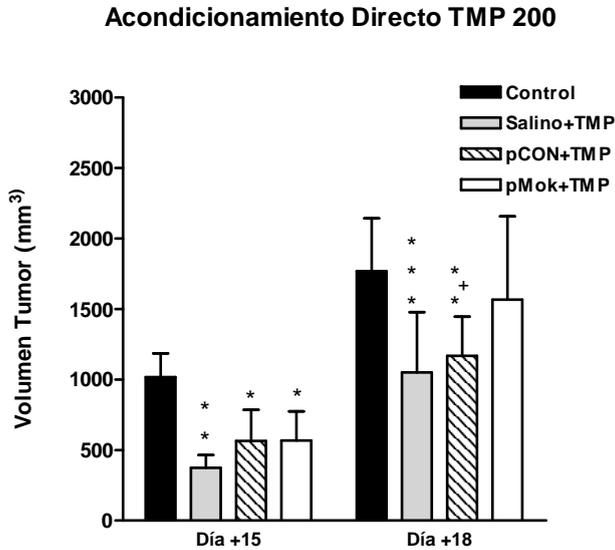
**10- A, B y C.**



**Figura 10-A- Vacuna con Acondicionamiento Tisular Directo, TMP 10.** Los ratones C57BL/6 (n=5 por grupo) fueron tratados con 50 $\mu\text{g}$  de plásmido en 200 $\mu\text{l}$  de solución salina, que se inyectaron en el área inguinal derecha. 24 h. después se les inyectó 10 $\mu\text{g}$  TMP (sólo salino en el grupo Control en las 3 inyecciones y sólo salino en lugar de plásmido en el grupo Salino+TMP). Estas 2 inyecciones se llevaron a cabo en las semanas **-3, -1 y +1**, respecto a la implantación de tumor en el día 0 ( $10^5$  céls. B16 tipo salvaje, implantadas en la pata izquierda). La medida del tamaño tumoral y la estadística son como los descritos en la figura 2, siendo en este caso \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 cuando se compara con el grupo Control, y el equivalente pero con los símbolos +, ++, +++ cuando se compara con Salino+TMP.



**Figura 10-B- Vacuna con Acondicionamiento Tisular Directo, TMP 20.** En esta figura se reflejan las mismas condiciones que en la fig.10-A, pero vacunando a los ratones con una dosis doble de TMP: 10  $\mu$ g por inyección a las 24 y a las 72h tras haber inyectado el plásmido, 10 +10= 20  $\mu$ g TMP por semana. La simbología estadística es la misma que en la fig. 10-A.



**Figura 10-C- Vacuna con Acondicionamiento Tisular Directo, TMP 200.** En esta figura se reflejan las mismas condiciones que en la fig.10-B, pero vacunando a los ratones con una dosis mayor de TMP: 100  $\mu\text{g}$  por inyección, 100 + 100= 200 $\mu\text{g}$  TMP por semana. La simbología estadística es la misma que la empleada en la fig. 10-A

Los resultados de la **fig. 10-A** parecían mostrar un beneficio al inyectar *gm-csf* para transfectar el tejido, logrando que la citoquina fuese producida y secretada justo en la zona de interés y que posteriormente apareciese en escena el antígeno. Por ello, en la vacuna de la **fig. 10-B** doblamos la dosis de antígeno, y el efecto mejoró, lográndose una reducción del volumen tumoral significativa en el grupo pMok+TMP. El siguiente paso para continuar con la mejora parecía ser continuar aumentando la dosis de antígeno. Sin embargo, a la vista de los resultados de la **fig.10-C**, el hecho de aumentar la dosis de antígeno por encima de un cierto umbral, contrariamente a lo que se pudiese esperar inicialmente, no resultó en una mejora de la inhibición tumoral sino todo lo contrario. Con la dosis 20  $\mu\text{g}$  de TMP y la inyección del plásmido con

## Vacunas genéticas contra el melanoma

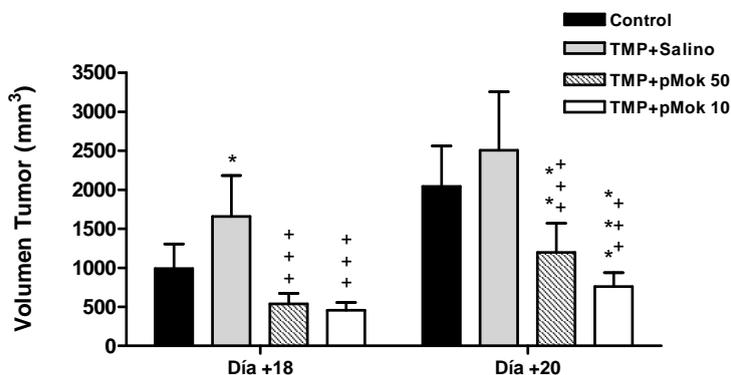
*gm-csf* (**fig.10-B**) se consiguió una inhibición significativa del crecimiento tumoral, con un  $P < 0.01$  en el peor de los casos, mientras que no hubo una reducción significativa ni con TMP sola ni asociada al plásmido control (pcDNA3). Sin embargo, la eficacia antitumoral de *gm-csf* se pierde cuando se utilizan mayores dosis de TMP (**fig.10-C**), y por tanto en ese experimento observamos las mejores eficacias de inhibición en los grupos de TMP, sola o asociada al plásmido vacío (pcDNA3).

### **1.3.3- Efecto antitumoral de la vacuna con acondicionamiento tisular inverso**

Como su nombre indica, en esta vacunación decidimos invertir el orden de administración de los componentes de la vacuna anterior. De este modo, el esquema de vacunación en cada una de las 3 semanas fue, una dosis inicial de 100  $\mu\text{g}$  de TMP, a las 48 h. una segunda dosis equivalente (total de 200  $\mu\text{g}/\text{semana}$ ) y a las 72 h. la inyección del plásmido.

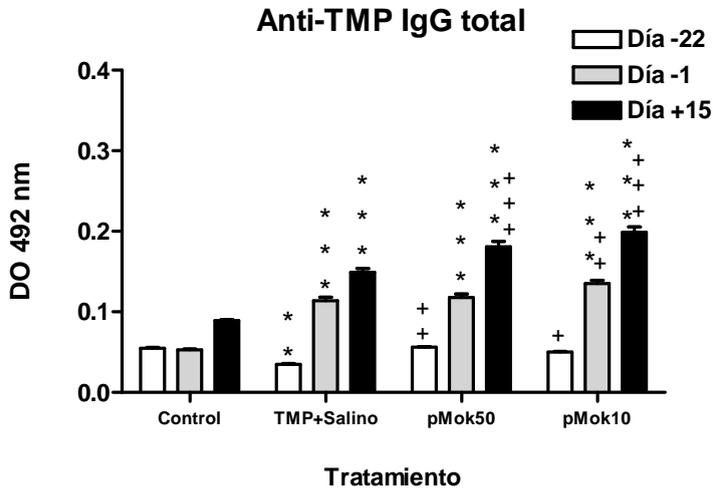
Además, quisimos testar si la cantidad de *gm-csf* era la adecuada, por lo que utilizamos la dosis de 50  $\mu\text{g}$  pMok m-gmcsf, pero también la dosis de 10  $\mu\text{g}$ , que en el experimento de RT-PCRq resultó en producciones más bajas de GM-CSF. La **figura 11** muestra los resultados de inhibición del crecimiento tumoral en esta vacuna.

## Acondicionamiento Inverso TMP 200



**Figura 11- Vacuna con Acondicionamiento Tisular Inverso, TMP 200.** En esta vacunación los ratones C57BL/6 recibieron el mismo tratamiento que los de las figuras 10-B y C, pero con dos diferencias: 1- la secuencia del tratamiento fue invertida, empezando con una dosis de TMP de 100µg el primer día de la semana, la segunda dosis, también de 100µg TMP, a las 48h. y finalmente a las 72 h. la inyección de plásmido (o salino en los grupos control). 2- En esta vacuna se testaron dos dosis diferentes de pMok m-gmcsf, 10 y 50µg. El volumen tumoral y el tratamiento estadístico se calcularon como se ha descrito anteriormente, siendo \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 cuando comparamos respecto al grupo Control y de forma análoga +, ++, +++ cuando comparamos con el grupo TMP+Salino.

Podemos resaltar que al vacunar a los animales con el procedimiento inverso, empleando la dosis doble y elevada de TMP (200 µg totales/semana) y posteriormente *gm-csf* se obtiene la mejor inhibición tumoral de todos los experimentos citados hasta el momento, especialmente al reducir la dosis de plásmido a 10 µg. (**fig. 11**, P<0.001 a día +20 en el grupo TMP+pMok 10). Continuamos el estudio realizando el ELISA específico para detectar IgG totales anti-TMP. Los resultados quedan reflejados en la **figura 12** y concuerdan con las observaciones de inhibición de crecimiento tumoral, ya que los grupos con mejor respuesta son los dos tratados con TMP seguida de *gm-csf*.



**Figura 12- Producción de Anti-TMP IgG totales en la Vacuna con Acondicionamiento Inverso.** Se tomaron muestras de sangre a los animales del experimento en los días -22, -1 y +15, respecto a la implantación de tumor del día 0. El plasma que se obtuvo fue empleado en ELISA para detectar las IgG específicas frente a las TMP con que habíamos vacunado. La simbología estadística es la misma que en las figuras anteriores.

## **1.4- Vacunas con células transfectadas, no seleccionadas**

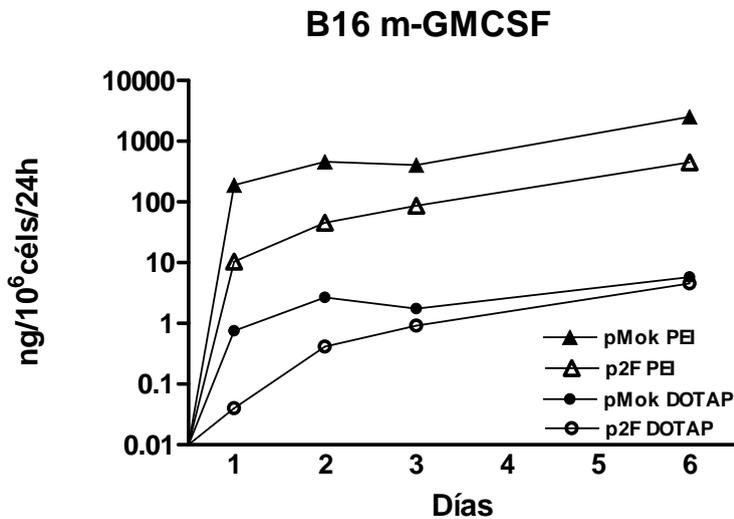
### **1.4.1- Evaluación de la producción del transgén en las células transfectadas por ELISA**

Antes de comenzar con los experimentos de vacunación celular, evaluamos las eficacias de transfección de nuestro protocolo sobre las células B16, evaluando las diferentes posibilidades en cuanto al vector a emplear y la dosis de transfección.

Las células B16 fueron transfectadas cuando se alcanzó un mínimo del 80% de confluencia en sus frascos de cultivo. Se evaluó la eficacia de las transfecciones con dos compuestos diferentes, poliplejos ADN/PEI y lipoplejos ADN/DOTAP. Se utilizaron además diferentes dosis de transfección y se evaluó la producción de citoquinas a lo largo del tiempo. Las muestras se tomaron del medio de cultivo de los frascos transfectados, cada 24h., durante 6 días. El medio se centrifugó a 3000rpm durante 5min., para eliminar cualquier resto celular que pudiera interferir en el estudio, y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la realización del ELISA para cuantificar la producción de mGM-CSF, empleando el kit BD OptEIA (Pharmlingen, Beckton Dickinson, España) y/o de mIL-12, con el mismo tipo de kit específico. Los resultados de la eficacia de transfección utilizando dos diferentes vectores (PEI y DOTAP) y dos construcciones plasmídicas diferentes conteniendo el gen *m-gmcsf* (p2F y pMok) se resumen en la **figura 13**, donde los valores de eficacia de expresión génica son mostrados como ng de proteína/ $10^6$  células/24h.

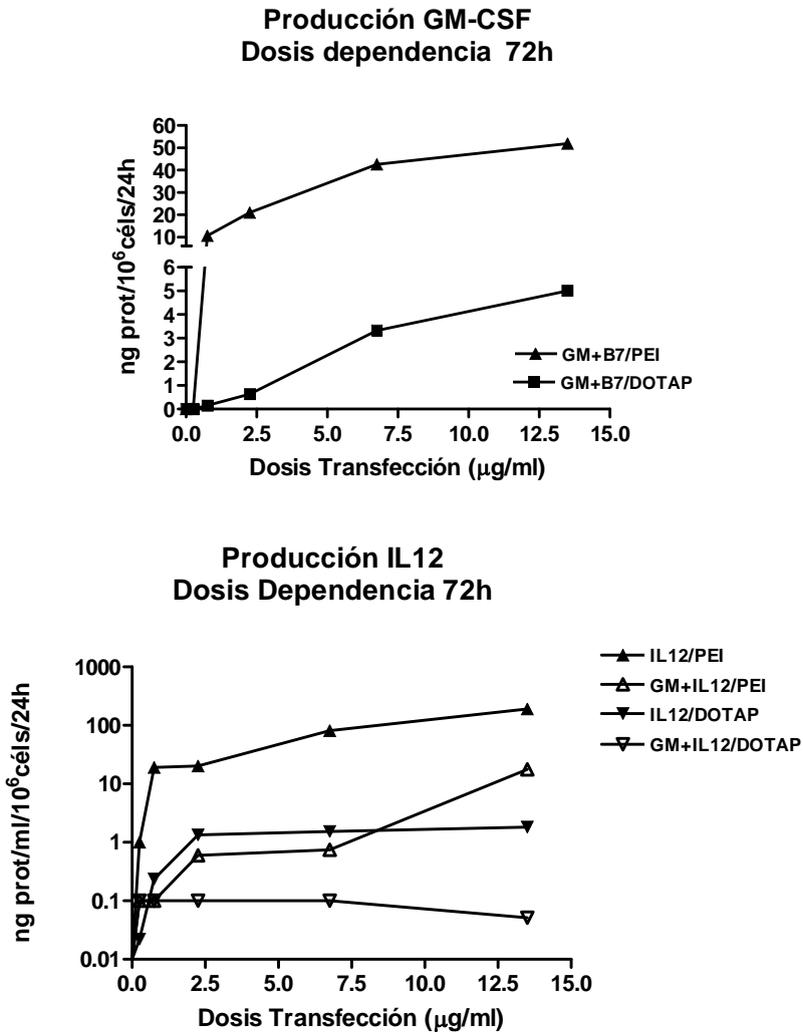
En esta figura se observa que los poliplejos con PEI son mucho más efectivos que los lipoplejos con DOTAP, tanto para un tipo de plásmido como para el otro, alcanzando al menos un orden de magnitud de producción más PEI que DOTAP, por ello escogimos los poliplejos para los siguientes experimentos, descartando el DOTAP. Sea cual sea el vector, el plásmido pMok ofrece resultados de producción más elevados que p2F al transfectar las células B16. Las células transfectadas empleadas en las vacunas se utilizaron 72 h. post transfección (procediendo en ese momento al despegado, irradiación y

congelación) en vista de estos resultados, ya que en ese momento alcanzan un nivel de expresión de GM-CSF dentro del rango recomendado en la bibliografía para conseguir resultados óptimos en vacunación [23, 68] y además es un tiempo razonable en el que las células se pueden mantener fácilmente en cultivo con seguridad, sin peligro de excesivo crecimiento celular y/o contaminación.



**Figura 13- ELISA de mGM-CSF.** Las células B16 fueron transfectadas con poliplexos PEI/DNA o lipoplejos DOTAP/DNA, con una concentración final de 7.5µg/ml para pMok m-gmcsf y 10µg/ml en el caso de p2F m-gmcsf. Se tomaron muestras de medio cada 24h, durante 6 días, que fueron centrifugadas a 3000rpm durante 5min., para eliminar células flotantes o restos de las mismas y luego realizar ELISA para cuantificar la producción de mGM-CSF con el BD OpTEIA Kit.

Una vez elegido el mejor vector, quisimos comprobar con un estudio de dosis dependencia, la dosis de transfección adecuada para emplearla con las células en los experimentos de vacunación. El estudio con el plásmido p2F m-gmcsf + m-B7.2 en el **gráfico superior** de la **figura 14** nos permitiría conocer este dato para el caso, más complicado, de los plásmidos con dos genes insertados, de modo que asegurando aquí la producción de mGM-CSF, la tendríamos garantizada en el plásmido sencillo (p2F m-gmcsf), que muestra una producción aproximada del doble de proteína respecto al plásmido con la combinación de genes (**fig.13** y datos no mostrados). El **gráfico inferior** refleja los resultados de producción de mIL-12, tanto para células transfectadas con el plásmido p2F m-IL12 como con p2F m-gmcsf + m-IL12.



**Figura 14- Dosis Dependencia en la Producción de los Transgenes.** Las células B16 fueron transfectadas con poliplejos PEI/DNA o lipoplejos DOTAP/DNA, con concentraciones finales crecientes, desde 0 hasta 13.5µg/ml con los plásmidos p2F m-gmcsf+mB7.2 en la **gráfica superior** y p2F m-IL12 y p2F m-gmcsf+m-IL12 en la **gráfica inferior**. Se tomaron muestras de medio cada 24h, durante 6 días, que fueron centrifugadas a 3000rpm durante 5min., para eliminar células flotantes o restos de las mismas y se reflejan los resultados de las muestras recogidas 72 h tras la transfección sometidas a ELISA para cuantificar la producción de mGM-CSF (**gráfica superior**) o mIL12 (**gráfica inferior**) con el BD OpTEIA Kit correspondiente.

Aunque cabe remarcar que cada transfección es un evento diferente, cuyo resultado no se puede extrapolar ni generalizar, sí podemos observar en todos los casos que la transfección con poliplejos PEI/ADN es siempre mucho más eficaz que la hecha con lipoplejos DOTAP/ADN, alcanzando como mínimo un orden de magnitud de diferencia con el mismo plásmido y la misma dosis. Siempre que las células B16 transfectadas con plásmidos que contuvieran el gen *m-gmcsf* fueron recolectadas, 72 h después de la transfección, para ser irradiadas y congeladas hasta el momento de su uso como vacuna, se guardó una muestra del sobrenadante de sus últimas 24 h de cultivo, para realizar ELISA sobre él y comprobar que en todos los casos las células alcanzaban una producción de mGM-CSF en el rango recomendado en la literatura [23, 68]. En general, la producción de GM-CSF en las células transfectadas con los plásmidos p2F m-gmcsf+m-B7.2 y p2F m-gmcsf+m-IL-12 fue aproximadamente la mitad de la producción de las células transfectadas con p2F m-gmcsf.

#### **1.4.2- Efecto antitumoral de la vacuna con células transfectadas no seleccionadas**

En este experimento además de estudiar la eficacia en la vacuna de células transfectadas, no seleccionadas, con *m-gmcsf*, estudiamos el efecto de esta citoquina en combinación con otras moléculas, con el fin de averiguar si existía algún tipo de sinergia. Esas moléculas fueron la citoquina IL-12 y la molécula coestimuladora B7.2.

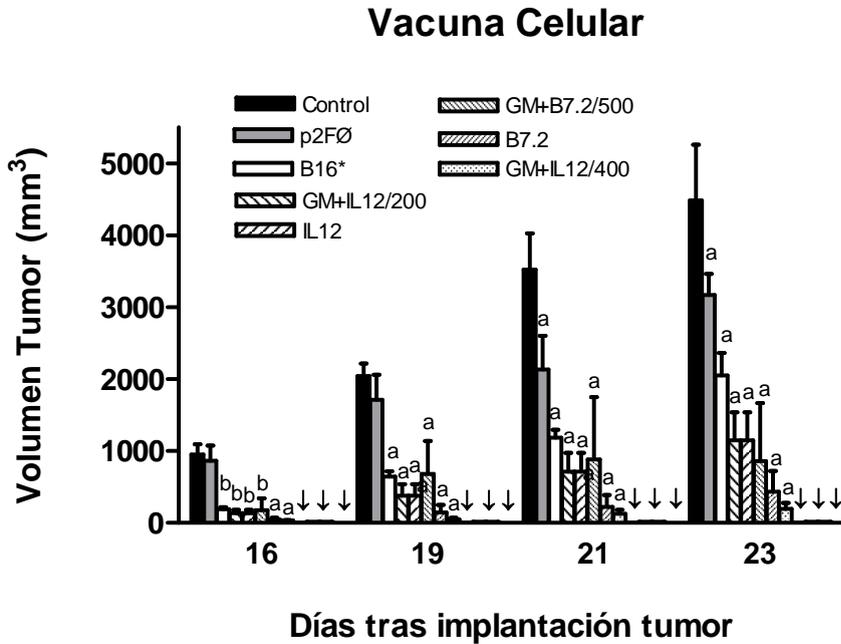
Las células fueron transfectadas con poliplejos PEI/ADN, con una dosis final de 7.5 µg/ml en el caso del plásmido pMok m-GMCSF y de 20 µg/ml en el resto de tratamientos, que fueron con plásmidos de la familia p2F. A las 72h post transfección, las células fueron despegadas (guardando una alícuota del medio de cultivo para comprobar por ELISA la producción de citoquinas en ese momento), irradiadas y congeladas hasta su uso en la vacuna.

Se vacunó a los ratones C57BL/6 (n=5 por grupo) con  $2 \times 10^5$  células viables por dosis, en 100 µl de DMEM solo.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Los grupos de tratamiento fueron **a)** B16-B7.2; **b)** B16-IL12; **c)** B16-GMCSF; **d)** B16-pMok GMCSF; **e)** B16-GMCSF+B7.2/200; **f)** B16-GMCSF+IL12/200 (“/200” por las  $2 \times 10^5$  células que se emplearon en estos grupos, ya que, sólo en el caso de estos dos tratamientos, hubo otra dosis diferente, que dio lugar a otros dos grupos de tratamiento); **g)** B16-GMCSF+B7.2/500; **h)** B16-GMCSF+IL12/400 (“/500” y “/400” por las  $5 \times 10^5$  ó  $4 \times 10^5$  células, respectivamente, que se utilizaron en estos grupos en cada dosis y que representan el número de células necesario para alcanzar la misma producción de GM-CSF que se tiene en el grupo **c)** B16-GMCSF, de acuerdo con los experimentos de ELISA previos para caracterizar la producción de GM-CSF en las células transfectadas; **i)** B16-p2FØ; **j)** B16\*, con  $2 \times 10^5$  células B16 tipo salvaje irradiadas, inyectadas en los 100µl de DMEM; **k)** Control, en el que se inyectaron sólo 100 µl DMEM en cada dosis de vacunación.

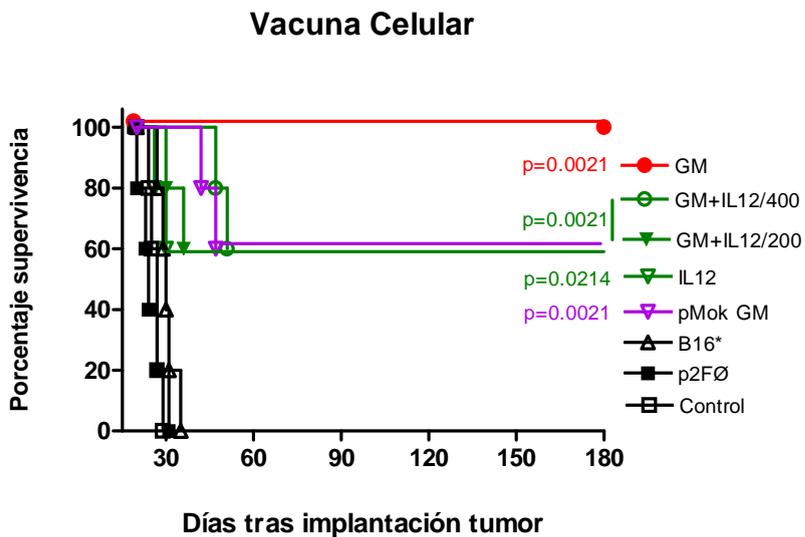
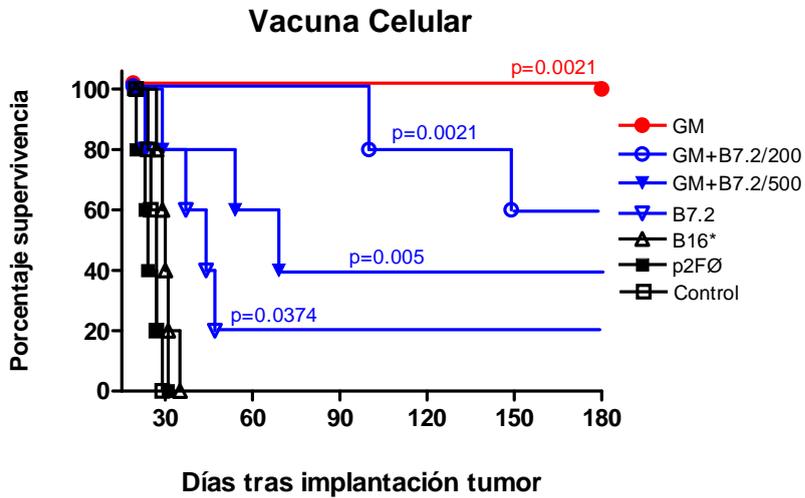
Se midió y calculó el volumen tumoral de la forma habitual, quedando reflejados los resultados en la **figura 15**. Los mejores resultados se obtuvieron con los grupos B16-GMCSF, B16-pMok GMCSF, B16-GMCSF+B7.2/200 (marcados con flechas en la figura), donde no hubo ningún desarrollo visible del tumor implantado, durante el periodo de medición, tiempo en el que ratones de otros grupos habían comenzado ya a morir a causa del desarrollo de su tumor. Cabe destacar que estos resultados se alcanzaron en los 3 grupos vacunando con  $2 \times 10^5$  células, teniendo en consideración que el grupo B16-GMCSF+B7.2/200 constaba de un total de células que en conjunto producían menos de la mitad de la cantidad de GM-CSF producida por los otros dos, ya que para alcanzar la producción equivalente era necesario vacunar con  $5 \times 10^5$  de estas células. Así pues, en el grupo B16-GMCSF+B7.2/200, con una menor cantidad total de GM-CSF estábamos logrando resultados equivalentes a los de los otros dos grupos.



**Figura 15. Vacuna con Células Transfectadas.** Resultados de inhibición de volumen tumoral en el experimento de células transfectadas y no seleccionadas, con los grupos de vacunación a) B16-B7.2; b) B16-IL12; c) B16-GMCSF; d) B16-pMok GMCSF; e) B16-GMCSF+B7.2/200; f) B16-GMCSF+IL12/200; g) B16-GMCSF+B7.2/500; h) B16-GMCSF+IL12/400; i) B16-p2FØ; j) B16\*; k) Control. Se utilizó una dosis de vacunación de  $2 \times 10^5$  células, pero además en los tratamientos con dos genes en la transfección celular, se testaron otras dosis, expresando el número de células empleado con /200, /400, o/500, siendo  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^5$  o  $5 \times 10^5$  células respectivamente. En la figura "a" corresponde a la diferencia estadística máxima,  $P = 0.001$ , y "b"  $P = 0.01$ , ambos respecto al grupo Control. Los grupos B16-GMCSF, B16-pMok GMCSF y B16-GMCSF+B7.2/200, con una inhibición total del crecimiento tumoral durante el periodo de medición, quedan representados en la figura con el símbolo ↓.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

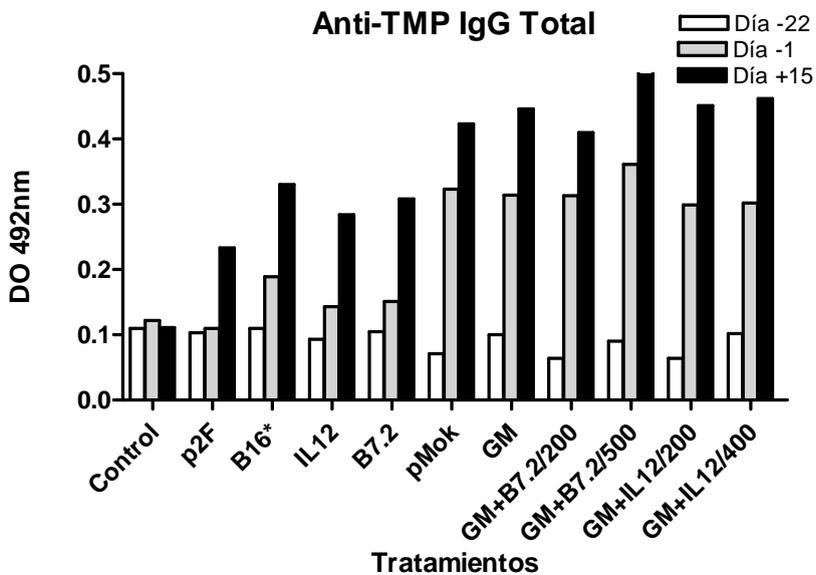
Las curvas de supervivencia alcanzadas por los diferentes grupos son mostradas en la **figura 16**. En la mayoría de los casos, las curvas fueron consistentes con los datos de inhibición de crecimiento tumoral, de modo que los grupos con menor tumor, sobrevivieron más tiempo. Esta supervivencia fue especialmente notable en dos de los grupos donde inicialmente el tumor no era detectable, así, en el grupo B16-GMCSF todavía se mantenía el 100% de supervivencia de los animales, más de seis meses después de la implantación del tumor; mientras que el valor fue de 80% en el grupo B16-GM+B7.2/200. El grupo B16-pMok GMCSF, sin embargo, no alcanzó un resultado de supervivencia mejor que otros grupos que sí habían presentado crecimiento tumoral en la figura 15 (60% supervivencia). Por este motivo, decidimos realizar los experimentos futuros prescindiendo del plásmido pMok m-gmcsf, ya que no nos había aportado ventajas respecto a p2F m-gmcsf, que sí mostraba un mejor comportamiento en nuestro modelo de vacuna. El resto de grupos alcanzaron supervivencias entre el 60% y el 20%, mientras que B16\* y p2F Ø no lograron diferenciarse del grupo Control.



**Figura 16. Supervivencia en la Vacuna con Células Transfectadas No Seleccionadas.** En la **gráfica superior** de la figura podemos observar la supervivencia de los 3 grupos control, además de los grupos que contenían B7.2 y GMCSF. En la **gráfica inferior** están de nuevo plasmados GMCSF y los 3 controles, como referencia, pero además los grupos con IL-12 y el grupo con células transfectadas con pMok-m gmcsf.

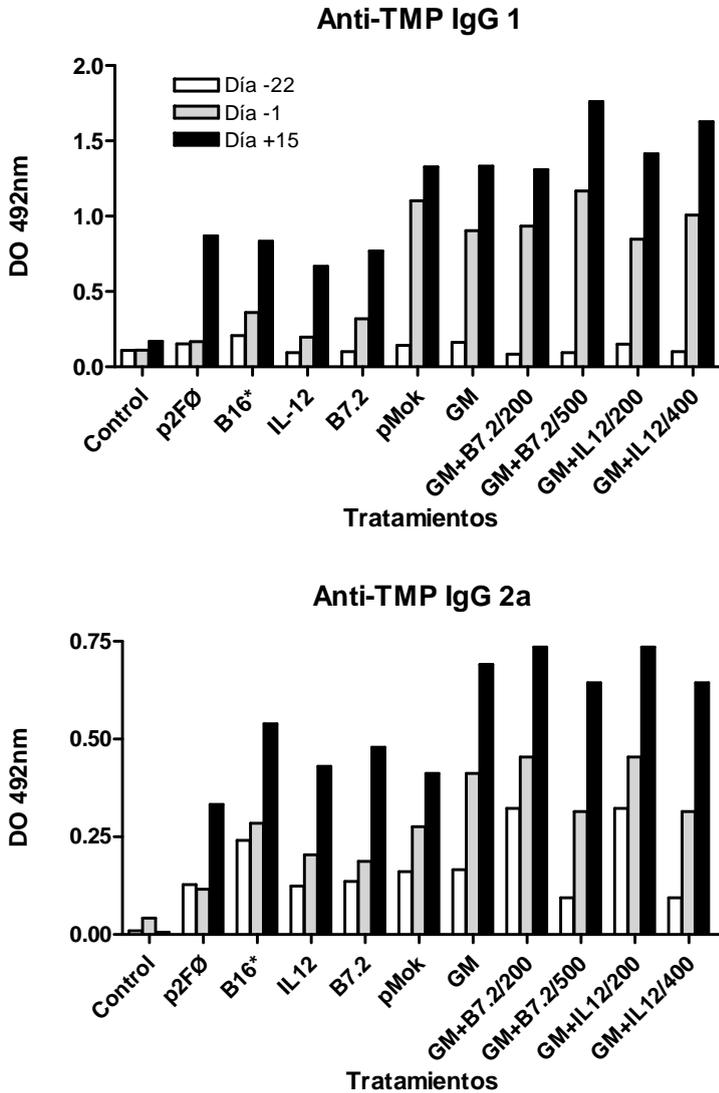
## Vacunas genéticas contra el melanoma

A los animales de esta vacunación también se les practicaron las extracciones de sangre habituales y posteriormente se realizaron los ELISAs sobre los plasmas, tanto de IgG específicas para TMP totales, como los subtipos IgG1 e IgG2a. Los resultados de las IgG totales se reflejan en la **figura 17**, donde podemos apreciar cómo los grupos que contienen GM-CSF son los que alcanzan mayor producción de IgG y además, generalmente con un salto menos brusco entre la producción a día -1 y la del día +15, por lo que parece que GM-CSF induce una estimulación más temprana que IL-12 o B7.2.



**Figura 17- Producción de IgG totales anti-TMP en la Vacuna con Células Transfectadas.** Tras tomar muestras de sangre a los animales los días -22, -1 y +15, respecto al día de implantación de tumor, día 0, y obtener el plasma, éste se utilizó para el ensayo de ELISA específico para IgG totales anti-TMP. Las muestras se ensayaron por duplicado para calcular media y desviación estándar, que es demasiado pequeña como para apreciarse en la figura. Los grupos de tratamiento son los descritos en la figura 15. Todos los grupos mostraron diferencia significativa respecto al Control como mínimo en los días -1 y +15, de p valor<0.001.

Los subtipos de inmunoglobulinas G, como queda reflejado en la **figura 18**, también ofrecen los mismos resultados globales que las IgG totales, especialmente en IgG2a. La transfección con GM-CSF contribuye a la eficacia de la respuesta antitumoral de forma significativa, mientras que B7.2 e IL12 aislados producen efectos más limitados. La combinación de cada una de estas moléculas con GM-CSF no supera prácticamente el efecto que ya consigue GM-CSF por sí mismo, así que aparentemente no hay un efecto mayor en las combinaciones, al menos en cuanto a producción de IgG se refiere.



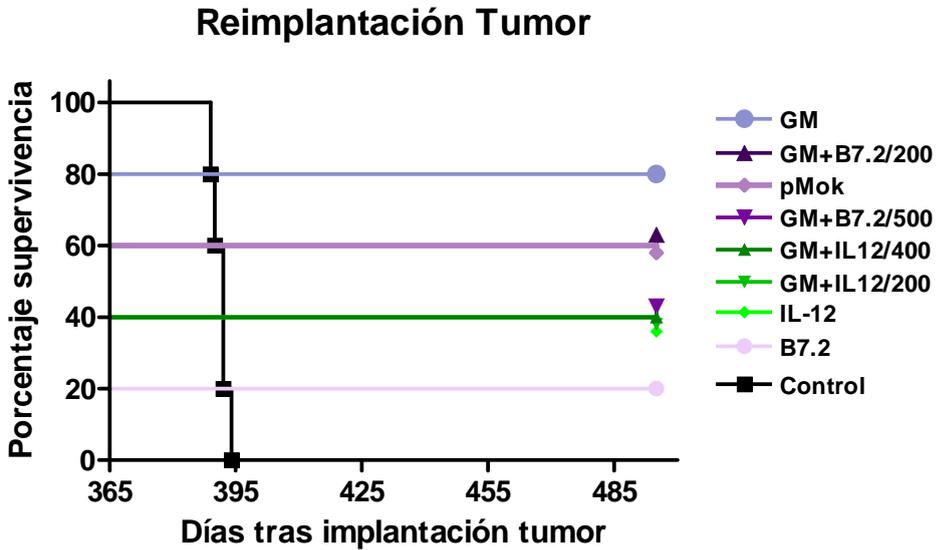
**Figura 18- Producción específica anti-TMP de subtipos de IgG en Vacuna con Células Transfectadas.** Tras extraer el plasma de las muestras de sangre obtenidas los días -22, -1 y +15, respecto a la implantación de tumor (día 0), se llevaron a cabo los ELISAs para determinar a producción de los subtipos IgG1 (**gráfico superior**) e IgG2a (**gráfico inferior**) por parte de los animales vacunados con los tratamientos descritos en la figura 15. Todos los grupos mostraron diferencia significativa respecto al Control como mínimo en los días -1 y +15, de p valor<0.001.

### **1.4.3- Reimplantación de Tumor: Comprobación de la Memoria Inmunológica**

Un año después del inicio del experimento anterior, expusimos a los ratones supervivientes al mismo tumor, para comprobar si la respuesta inmune que se instauró y les permitió sobrevivir entonces, había generado una memoria lo suficientemente potente como para protegerlos frente a una segunda exposición.

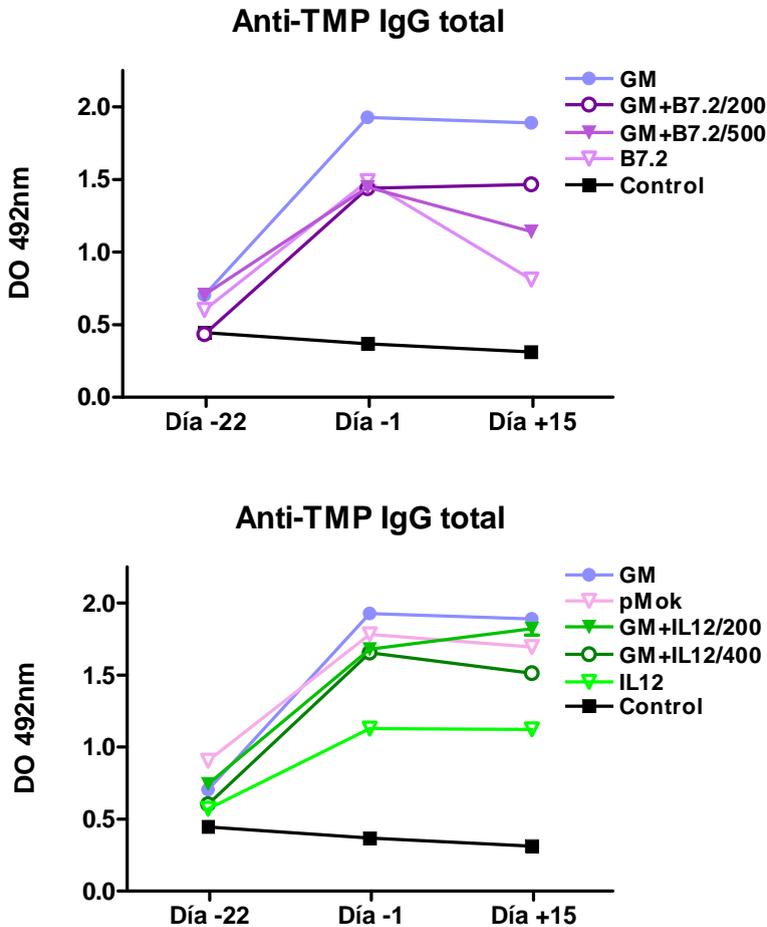
El experimento se comienza con los ratones supervivientes del experimento de vacunación con células transfectadas, por lo tanto con 3 ratones del grupo pMok, 2 ratones de cada uno de los grupos de IL-12, 3 ratones del grupo GM+B7.2/200, 2 ratones del grupo GM+B7.2/500, 1 ratón del grupo B7.2 y 4 ratones del grupo GM. Durante el tiempo transcurrido desde el final del experimento anterior hasta el inicio de éste, murieron algunos animales, por causas ajenas al tumor implantado. Todos los ratones se hallaban libres de tumor en el momento de inicio de este nuevo experimento. Como grupo Control, empleamos nuevos animales (n=5), no tratados previamente, de una edad similar a la de los ratones supervivientes del experimento anterior (aprox. 14 meses de edad).

Únicamente se administró a los ratones tratados una dosis de vacunación de recuerdo, de las mismas características que la de un año atrás, y 14 días después se les volvió a implantar a todos  $10^5$  células B16 tipo salvaje en la pata izquierda (segundo día 0= día 365). Los resultados de supervivencia se reflejan en la **figura 19**.

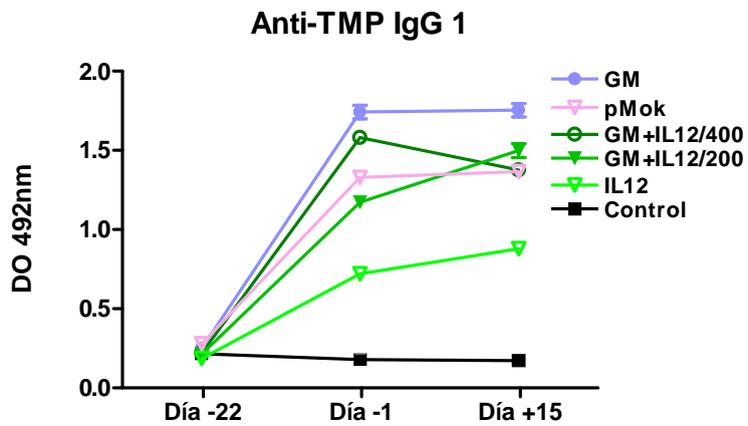
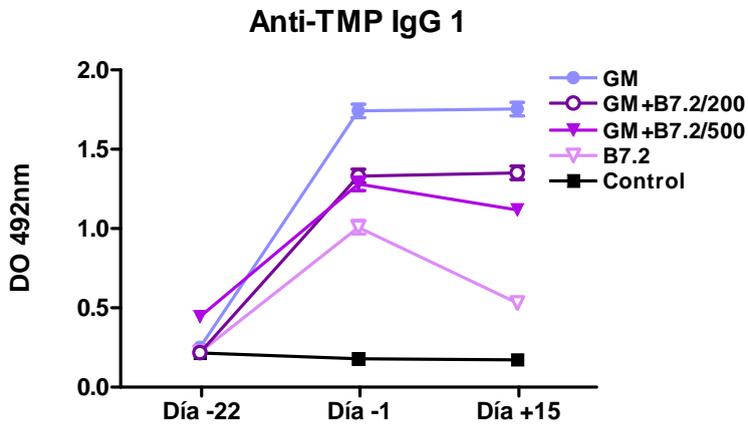


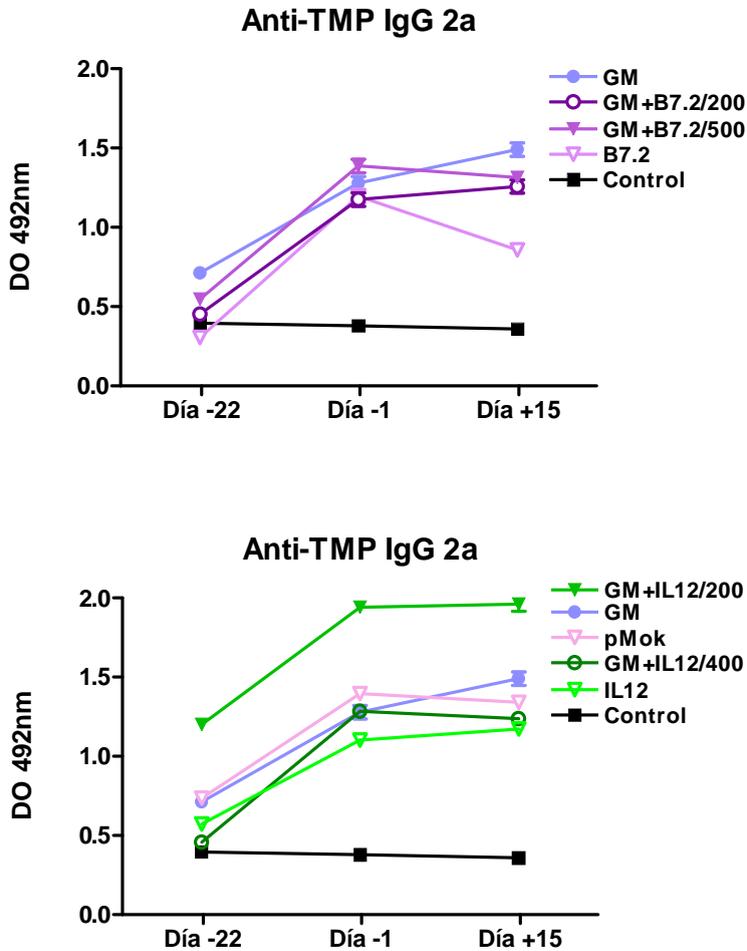
**Figura 19- Reimplantación de tumor B16.** Un año tras la primera vacunación con células transfectadas no seleccionadas, se les administró una dosis de vacuna de recuerdo a los animales supervivientes y se les implantó de nuevo el tumor (día 0 = día 365,  $10^5$  células B16 tipo salvaje). La gráfica muestra la supervivencia de estos animales y de un grupo control de ratones no tratados previamente.

En esta figura podemos observar cómo todos los ratones tratados sobrevivieron a la segunda implantación de tumor. Todos ellos murieron por vejez, practicándoseles necropsia para garantizar que la causa de la muerte no había sido por tumor B16. En este experimento también sometimos a los ratones a las tres recogidas de sangre habituales, para evaluar su producción de IgG totales y subtipos IgG1 e IgG2a. Los resultados se recogen en la **figuras 20 y 21**, respectivamente. La respuesta inmune de los animales supervivientes es más rápida y potente tras la segunda exposición al tumor, lo que demuestra una eficaz respuesta de memoria frente al tumor con que se vacunó a los ratones.



**Figura 20- Producción de IgG totales, específicas frente a TMP en la Reimplantación con la Vacuna con Células Transfectadas.** Los ratones supervivientes de la Vacuna Celular fueron sometidos a una dosis de vacuna recordatoria y a la implantación de tumor 14 días después, extrayéndoles sangre según el patrón habitual (días -22, -1 y +15, respecto a la implantación del tumor, día 0). El plasma obtenido se utilizó en el ELISA para detectar IgG totales anti-TMP, tal y como en la fig.7. El **gráfico superior** muestra la producción en los grupos vacunados con células B16 transfectadas con p2F m-gmcsf, p2F m-gmcsf+mB7.2 a dosis  $2 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$ , p2F m-B7.2 y el grupo Control. El **gráfico inferior** muestra los resultados de los grupos vacunados con B16 transfectadas con p2F m-gmcsf, pMok m-gmcsf, p2F m-gmcsf+m-IL12 a dosis  $2 \times 10^5$  y  $4 \times 10^5$ , p2F m-IL12 y el grupo Control.

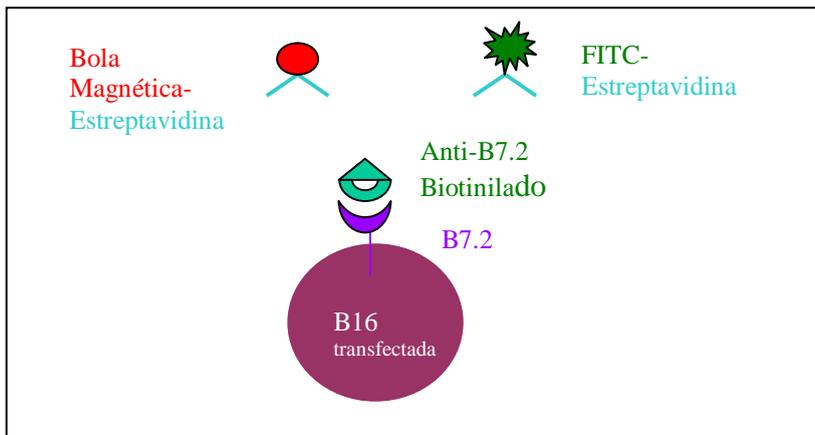




**Figura 21-** Subtipos IgG1 e IgG2a específicos anti-TMP en el **Rechallenge de la Vacunación con Células Transfectadas**. Del mismo modo que en la figura 20, se analizaron las muestras de plasma de los ratones, pero esta vez, para detectar los subtipos de IgG producidos. Las dos **gráficas superiores** muestran la producción de IgG1, con la misma distribución de grupos que en la figura 20, y lo mismo sucede con las dos **gráficas inferiores**, que en este caso expresan la producción de IgG2a.

### 1.5- Vacunas con células transfectadas y seleccionadas mediante bolas magnéticas

Sabiendo que la eficacia de transfección de nuestros procedimientos está en torno al 40 %, el hecho de trabajar con el plásmido bicistrónico p2F m-gmcsf+m-B7.2 nos ofrecía la oportunidad de seleccionar y separar el conjunto de células realmente transfectadas gracias a la expresión en la superficie celular del producto del gen *m-B7.2*, valiéndonos del principio de unión antígeno-anticuerpo. La **figura 22** muestra un esquema de la utilización de B7.2, tanto para la caracterización de las diferentes poblaciones por fluorescencia como para la separación de la población transfectada mediante bolas magnéticas.



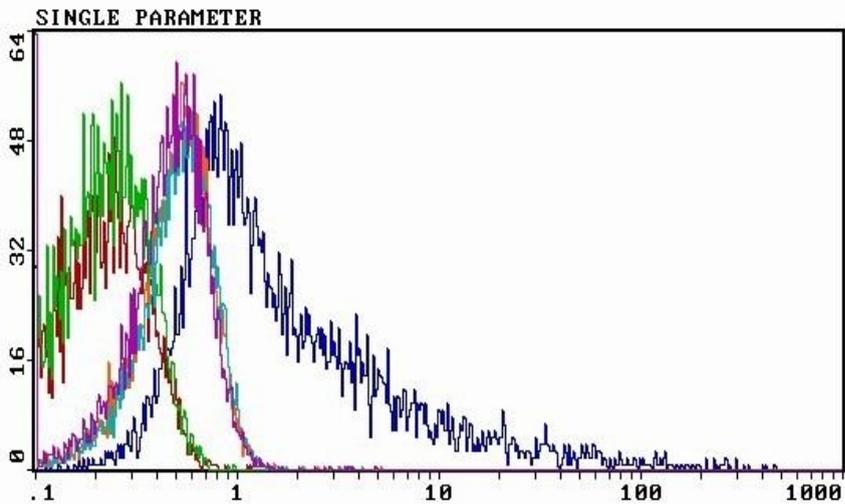
**Figura 22- Estrategias de unión a B7.2.** Las células transfectadas con el plásmido p2F m-gmcsf+m-B7.2, además de secretar GM-CSF al medio, expresarán la proteína B7.2 en su superficie. El anticuerpo anti-B7.2 biotinilado permite bien la unión de estas células a estreptavidina-FITC para visualizarlas en ensayos de citometría, bien la unión a estreptavidina-bola magnética, lo que permite separarlas del resto de células no transfectadas.

### **1.5.1- Eficacia de la transfección *in vitro* del gen *m-B7.2* por citometría de flujo**

La eficiencia de la expresión de *m-B7.2* en la superficie de las células B16, 72 h tras la transfección, fue evaluada por citometría de flujo.

Los resultados están reflejados en la **figura 23**, donde se representa la intensidad de fluorescencia verde en el eje X y las células contadas en el eje Y. Los grupos que componen el pico izquierdo son los correspondientes a los controles de fluorescencia inespecífica de las células sin transfectar, grupos **a)** células B16 tipo salvaje no transfectadas, sin ningún anticuerpo en el medio, en rojo y **b)** células B16 tipo salvaje no transfectadas e incubadas con el anticuerpo y estreptavidina-FITC, en verde. Los grupos que componen el pico central son los controles de fluorescencia inespecífica de las células transfectadas, grupos **c)** células B16 transfectadas con p2F *m-gmcsf* + *m-B7.2*, sin posterior incubación con los reactivos, naranja; **d)** células B16 transfectadas con p2F *m-gmcsf* + *m-B7.2*, incubadas sólo con el anticuerpo primario, azul celeste; **e)** células B16 transfectadas con p2F *m-gmcsf* + *m-B7.2*, incubadas sólo con estreptavidina-FITC, violeta. Finalmente, el pico derecho muestra el marcaje específico y sólo está formado por el grupo **f)** células B16 transfectadas con p2F *m-gmcsf* + *m-B7.2*, incubadas tanto con el anticuerpo primario como con estreptavidina-FITC, azul oscuro.

En esta figura, la máxima fluorescencia, el pico derecho, viene determinada por la unión al complejo estreptavidina-FITC que sufren las células en cuya superficie está la proteína *B7.2*, por tanto, identificamos así las células transfectadas, con expresión específica en superficie celular de *m-B7.2*. Los picos intermedio e izquierdo corresponden a las células control, transfectadas y no transfectadas, respectivamente. El área a la derecha de la intersección entre el pico intermedio y el pico derecho representa la proporción de células transfectadas y fluorescentes, es decir, las células realmente transfectadas, que expresan *m-B7.2* en su superficie. Este área es aproximadamente un 40% del pico derecho, lo que se corresponde con la eficacia de transfección que esperábamos según nuestra metodología.



**Figura 4- Citometría de flujo de células B16 transfectadas con p2F m-gmcsf+mB7.2** . Los siguientes grupos de células B16 fueron pasados por el citómetro y sus gráficos superpuestos en un gráfico único: a) células B16 tipo salvaje no transfectadas y sin incubar con los reactivos (rojo); y b) células B16 tipo salvaje no transfectadas y con el anticuerpo primario y estreptavidina-FITC (verde), estos dos grupos corresponden a los picos izquierdos. Los picos centrales corresponden a los grupos c) B16 transfectadas con p2F m-gmcsf + m-B7.2, sin incubar con los reactivos (naranja), d) B16 transfectadas con p2F m-gmcsf + m-B7.2, sólo con el anticuerpo primario (azul claro), y e) B16 transfectadas con p2F m-gmcsf + m-B7.2, sólo con estreptavidina-FITC (fucsia). Finalmente, el pico derecho corresponde al grupo f) B16 transfectadas con p2F m-gmcsf + m-B7.2, incubadas tanto con el anticuerpo primario como con estreptavidina-FITC (azul oscuro). La figura representa la fluorescencia verde en el eje X versus N° de cuentas x100 en el eje Y.

### **1.5.2- Purificación de células transfectadas mediante bolas magnéticas**

Las células transfectadas y seleccionadas en base a su expresión de B7.2 son también productoras de GM-CSF, lo que se comprobó por ELISA, resultando en niveles de expresión dentro del rango 90-175 ng/10<sup>6</sup> células.

El rendimiento de purificación de las células B16 transfectadas con el plásmido p2F mGMCSF+mB7.2, tras 72 h., desde el número de células de partida con que se inicia el proceso de transfección es de un 4% aproximadamente.

Del 20-40 % de células realmente transfectadas que esperamos tener, se consiguen separar 1/5 de las mismas por este procedimiento.

### **1.5.3- Eficacia de la vacuna antitumoral con células transfectadas y seleccionadas**

Tras el proceso de selección, y habiendo comprobado que las células purificadas producían tanto B7.2 como GM-CSF, iniciamos la utilización de estas células en el modelo de vacunación que había ofrecido resultados satisfactorios, pero en esta ocasión reduciendo la cantidad de células empleadas en la vacuna.

Elegimos una dosis celular equivalente al número de células realmente transfectadas del experimento anterior de células transfectadas no seleccionadas (20% de 200.000 = 40.000), para poder comprobar si ese reducido número de células productoras bastaba para obtener la eficacia máxima, o si por el contrario, era necesaria la presencia de más antígeno en el medio, representado por las células de aquella vacuna que quedaban sin transfectar. Además vacunamos con otra dosis superior, el doble de células seleccionadas, 80.000, lo que nos ayudaría a estudiar no sólo el valor de la cantidad de células presentes como antígeno sino el valor de la cantidad de GM-CSF producido y liberado al medio en la vacuna.

Por otro lado, quisimos aprovechar la oportunidad de trabajar con un reducido número de células, para valorar una nueva opción, que podría ser muy

## Vacunas genéticas contra el melanoma

interesante en la práctica clínica: mezclar nuestras células transfectadas B16, en el papel de productoras de citoquina, con otras células diferentes, no transfectadas, en el papel de antígeno para inmunizar, en este caso las células 3LL.

El experimento por tanto tuvo dos conjuntos diferentes, así para el tumor B16 los grupos de tratamiento fueron: **a)** Control (100 µl DMEM solo), **b)** B16-GMCSF+B7.2/40, empleando 40.000 células seleccionadas (en base a su producción de GM-CSF y B7.2) por dosis, por ratón, en 100 µl DMEM solo; **c)** B16-GMCSF+B7.2/80, como en el grupo anterior pero con 80.000 células seleccionadas; **d)** B16-GMCSF+B7.2/80 + 3LL, en este grupo las dosis de vacuna constaron de una mezcla de 80.000 células B16 seleccionadas y 320.000 células 3LL irradiadas.

Los grupos del segundo conjunto, con implantación de tumor 3LL (10<sup>5</sup> células 3LL tipo salvaje) fueron:

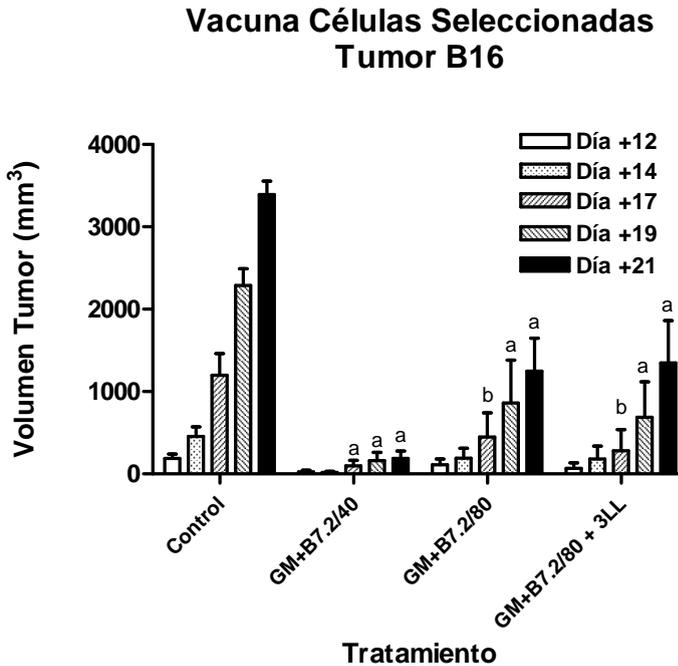
**e)** Control-bis (100 µl DMEM solo) y **f)** B16-GMCSF+B7.2/80 + 3LL, idéntico al grupo **d** pero con implantación de tumor de 3LL.

Los resultados de inhibición de crecimiento tumoral se reflejan en la **figura 20**, en el caso de los grupos con implantación de tumor B16 y en la **figura 21** en el caso de los grupos con implantación de tumor 3LL.

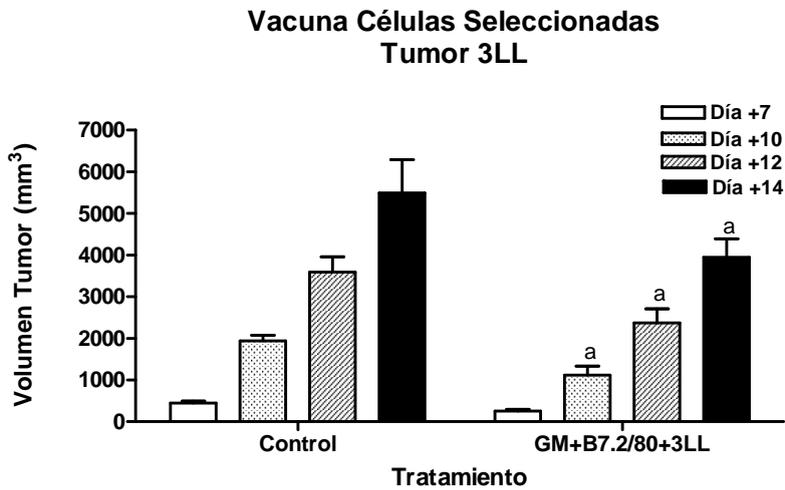
El grupo que logró mayor inhibición del crecimiento tumoral por B16 fue GM+B7.2/40, con un 80 % de inhibición a día +21. Sin embargo, en ninguno de los casos logramos la supervivencia total de ningún animal. Aunque las inhibiciones del volumen tumoral fueron significativas en la mayoría de los casos, no fueron suficientes para lograr la supervivencia. Cabe destacar que entre los grupos GM+B7.2/80 y GM+B7.2/80 + 3LL no hubo diferencia significativa, lo que significa que el hecho de añadir otro tipo diferente de células a la vacuna, además de las propias del tumor a tratar, no parece estar perjudicando el resultado.

En el caso de los ratones con tumor 3LL, el tiempo total de supervivencia fue realmente corto, de 20 días como máximo, ya que 3LL es un tumor altamente agresivo. Aunque el grupo tratado logró una diferencia significativa de

inhibición tumoral respecto al Control, la reducción del volumen fue como máximo de un 20%, lo que no fue suficiente para diferenciar las curvas de supervivencia.

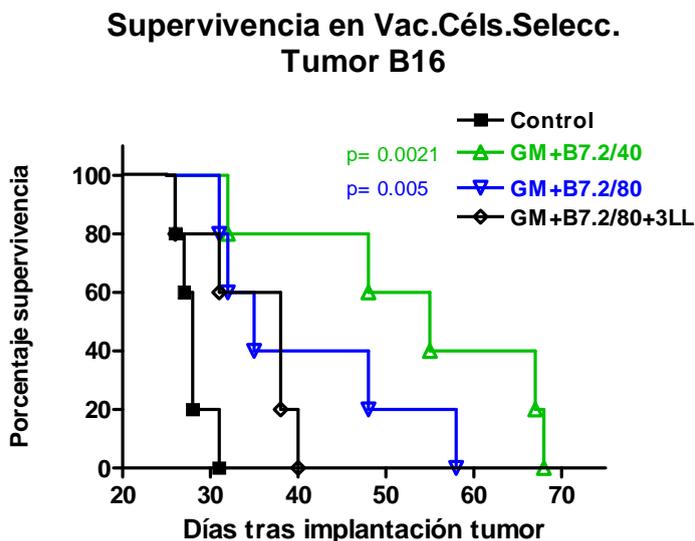


**Figura 20- Inhibición del crecimiento tumoral B16 en la Vacuna con Células Seleccionadas por Bolas Magnéticas.** Inhibición del volumen tumoral vacunando con los grupos GM+B7.2/40, GM+B7.2/80 y GM+B7.2/80+3LL respecto al grupo Control. “a” representa  $P < 0.001$  y “b”  $P < 0.01$ , ambos respecto al Control.



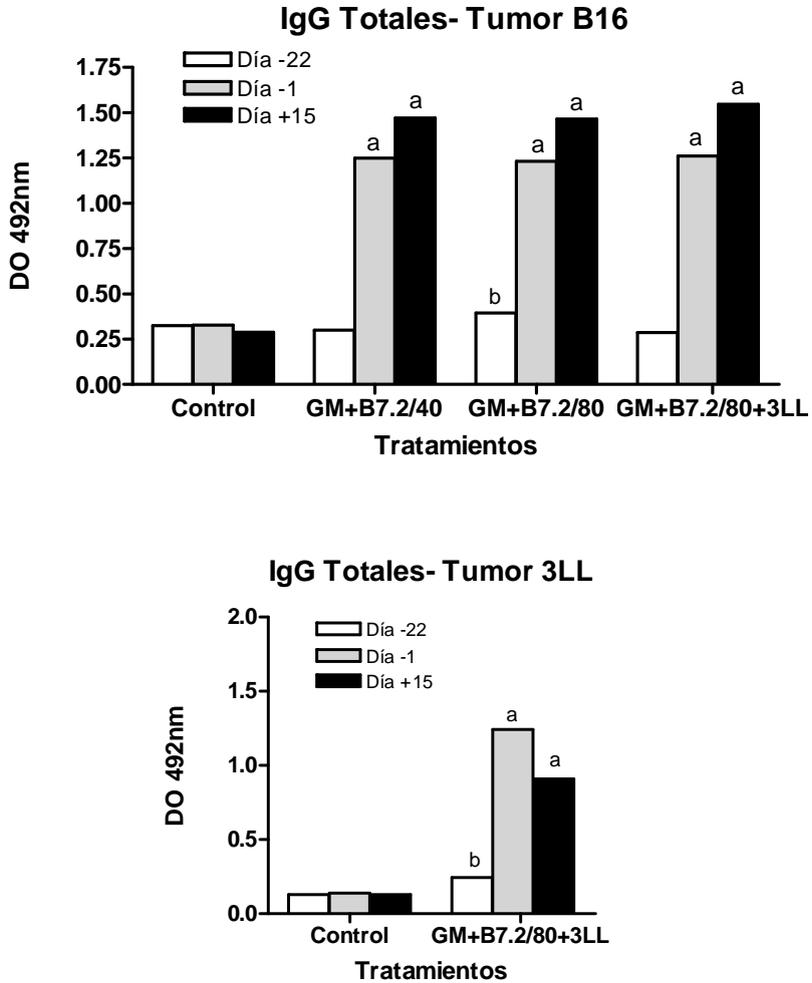
**Figura 21- Inhibición del crecimiento tumoral 3LL en la Vacuna con Células Seleccionadas por Bolas Magnéticas + Células 3LL.** Con el mismo procedimiento empleado en las vacunas anteriores se evaluó el grupo GM+B7.2/80 +3LL (80.000 células B16 seleccionadas+ 320.000 3LL) frente al grupo Control, implantando el día 0, 10<sup>5</sup> células 3LL tipo salvaje. “a” representa P<0.001 respecto al Control.

Los ratones con tumor B16, sí lograron marcar diferencias de supervivencia parcial entre el grupo control y los tratados con GM+B7.2/40 o con GM+B7.2/80, como se puede apreciar en la **figura 22**, aunque entre ellos dos la diferencia no fue significativa. El grupo GM+B7.2/80 + 3LL no logró diferenciarse del Control.

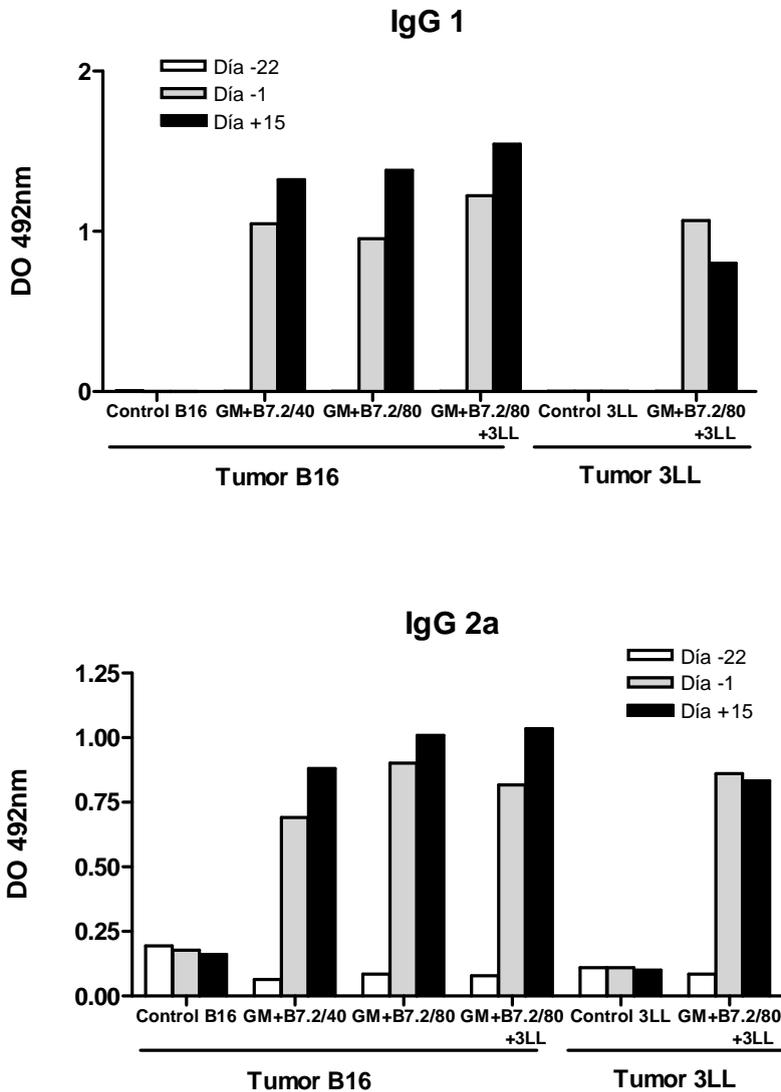


**Figura 22- Supervivencia en Vacuna con Células Seleccionadas frente a tumor B16.** Con las fechas en las que fueron muriendo los animales se confeccionó la gráfica de supervivencia de los grupos con implantación de tumor B16: Control, GM+B7.2/40, GM+B7.2/80 y GM+B7.2/80+3LL. Tras aplicar el test estadístico logrank, quedan expresados los valores p de significatividad respecto al grupo Control.

Los resultados de los estudios de producción de IgG anti-TMP por ELISA se reflejan en las **figuras 23**, IgG totales y **24**, subtipos. En las IgG totales encontramos siempre una mayor producción de Ig en los grupos tratados que en el grupo Control. En el caso de los grupos con tumor B16, no hay diferencias apreciables en la producción de cada grupo y todos presentan el máximo a día +15. Sin embargo, el grupo tratado frente a tumor 3LL presenta su máximo el día -1. El mismo comportamiento se observa en el análisis de subtipos.



**Figura 23- Ig totales anti-TMP.** Tal y como en el resto de experimentos anteriores, se extrajo sangre a los animales los días -22, -1 y +15 respecto a la implantación de tumor en el día 0. Con el plasma se realizaron los ELISA específicos. En el **gráfico superior** aparecen los grupos a los que se implantó tumor B16 y en el **gráfico inferior**, aquellos a los que se implantó tumor 3LL. **a** representa p valor<0.001 y **b**<0.01respecto al Control.



**Figura 24- Subtipos de IgG anti-TMP.** Del mismo modo que en la figura anterior, se procedió a realizar ELISA en los plasmas extraídos, esta vez para detectar la producción de subtipos de IgG, en el **gráfico superior** se reflejan los resultados de las IgG1, donde todos los grupos mostraron  $p < 0.001$  respecto al Control en los días -1 y +15. En el **gráfico inferior** se muestra la producción de IgG2a, donde todos los grupos alcanzaron  $p < 0.001$  en las tres tomas respecto al Control.

## 2- Vacunas terapéuticas

### 2.1- Efecto del acondicionamiento sistémico mediante transfección hidrodinámica, sobre el crecimiento tumoral

Este experimento se realizó vacunando sólo con los plásmidos, sin la participación de antígenos en la vacuna. Esto es así ya que nuestra intención era estudiar de forma aislada la eficacia de las citoquinas empleadas y de la construcción de nuestros plásmidos *per se*, evaluando el efecto sobre el crecimiento tumoral de la transfección con el gen de la citoquina en un lugar distante tanto al habitual de la vacunación como al de implantación de tumor. Para ello empleamos el modelo hidrodinámico, que permite evaluar el ADN desnudo, en un modelo terapéutico, en lugar de preventivo, iniciando el experimento con la implantación de tumor, además con un número elevado de células, 100.000 células B16 tipo salvaje (en lugar de 20.000, como usamos en el resto de vacunas terapéuticas).

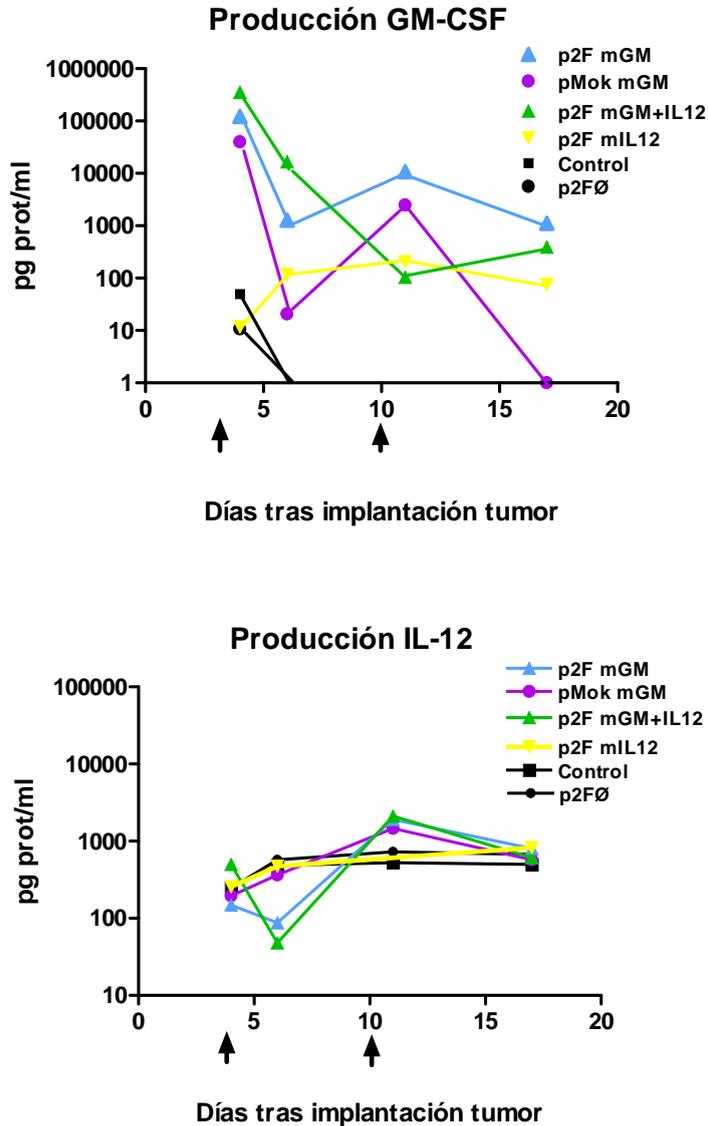
El día de implantación de tumor es como siempre, el **día 0**. Se dieron dos dosis de DNA, una en el **día +3** y otra en el **día +10**, (1 dosis por semana, dos semanas) consistiendo cada una de ellas en una inyección de 80 µg de plásmido en 2 ml de solución salina. Los grupos de tratamiento fueron: **a)** Control (sólo 2 ml de fisiológico), **b)** p2FØ; **c)** pMok m-gmcsf; **d)** p2F m-gmcsf; **e)** p2F m-IL12; **f)** p2F m-gmcsf + m-IL12.

Se tomaron varias muestras de sangre, a lo largo del experimento, para monitorizar tanto la respuesta inmune de los animales como la cinética de expresión de las citoquinas con las que se transfectaba. Dichas tomas se hicieron en los **días +4, +6**

(tras 1 y 3 días desde la inyección de los plásmidos), **+11 y +17** (1 y 7 días tras la segunda inyección de plásmido).

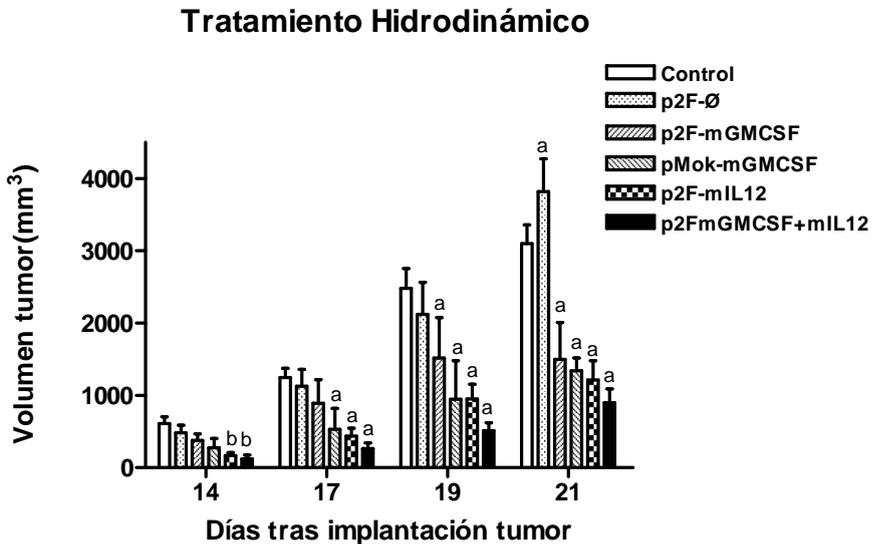
La **figura 25** muestra los resultados de los ensayos de ELISA sobre el plasma de los animales para monitorizar la producción de las citoquinas, una vez efectuadas las inyecciones hidrodinámicas. El **gráfico superior** muestra los resultados de producción de mGM-CSF y el **gráfico inferior** los de mIL-12.

Como cabía esperar, los tres plásmidos que alcanzaron mayor producción de mGM-CSF fueron los que contenían el gen *m-gmcsf*. Curiosamente, la inyección del plásmido que contenía sólo el gen *m-IL12*, indujo también la producción de GM-CSF, aunque en un nivel de producción como mínimo de dos órdenes de magnitud inferior. Los plásmidos p2F- mGMCSF y pMok- mGMCSF, muestran en este experimento cinéticas bastante similares, con niveles de producción siempre superiores en el caso de p2F y además con la particularidad de que tras la caída de producción, que todos los plásmidos presentan tras el día +11, los plásmidos basados en p2F mantienen los niveles de GM-CSF mientras que pMok sufre una caída más brusca. Este resultado parece indicar que *in vivo*, a diferencia de *in vitro*, la transfección con p2F produce mayores niveles de expresión del transgén y además más sostenidos en el tiempo. En cuanto a la producción de mIL12, cabe destacar que los plásmidos que contienen sólo el gen *m-gmcsf* parecen estimular también la producción de IL-12 de forma similar a la observada con la transfección con el plásmido que contiene su gen (p2F m-IL12).



**Figura 25- ELISA GM-CSF e IL-12 en ratones con Tratamiento Hidrodinámico.** La figura superior muestra los resultados del ELISA para mGM-CSF y la inferior los del ELISA sobre las mismas muestras para mL12. El día 0 es el de implantación de tumor (100.000 células B16 tipo salvaje) y las dos flechas en el eje X corresponden a los días en que se administraron las inyecciones hidrodinámicas (días +3 y +10) con 80 µg de plásmido en 2 ml de salino. Las tomas de sangre se realizaron los días + 4, 6, 11 y 17.

Los resultados de inhibición de crecimiento tumoral quedan reflejados en la **figura 26**, donde se observan diferencias estadísticamente significativas prácticamente entre todos los grupos respecto al grupo Control. Los dos plásmidos de *m-gmcsf* se comportaron prácticamente del mismo modo en este experimento, donde la mayor eficacia antitumoral fue lograda por la combinación GM-CSF + IL-12, apuntando a una posible sinergia de las dos citoquinas en este modelo de tratamiento.



**Figura 26- Volúmenes tumorales en el Tratamiento Hidrodinámico.** Los ratones tratados con la inyección hidrodinámica 3 y 10 días tras la implantación de 100.000 células B16 tipo salvaje, mostraron diferentes inhibiciones tumorales. En la figura “a” representa  $P < 0.001$  y “b”  $P < 0.05$ , ambos respecto al Control.

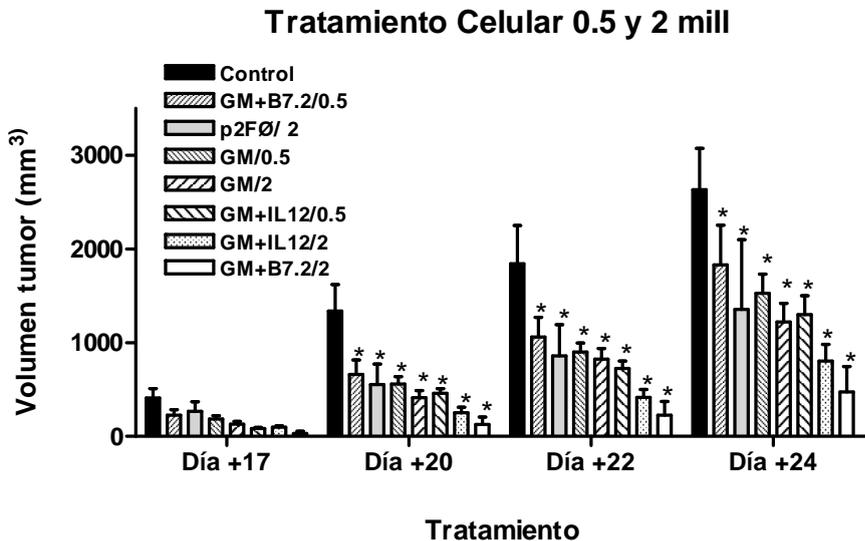
Sin embargo, las inhibiciones del crecimiento tumoral logradas en este tratamiento (aprox. un 60% en el mejor de los casos) no consiguieron prolongar la supervivencia de los animales tratados respecto al grupo Control.

## **2.2- Tratamientos Celulares**

En este grupo de vacunas, volvemos al modelo habitual que hemos venido utilizando: las células B16 se transfectan, irradian y conservan de igual modo que en la Vacuna con Células Transfectadas No Seleccionadas, el tumor se implanta en la pata izquierda y las vacunas en la derecha. Al ser vacunas terapéuticas y no preventivas, el esquema temporal cambia, ya que en estas vacunas se comienza por la implantación del tumor (**día 0**), que además se realiza con una dosis de células tumorales inferior a la de la vacuna preventiva (20.000 células B16 tipo salvaje). Posteriormente el protocolo consiste en tres dosis de vacuna, en los **días +3, +10 y +17** respecto a la implantación de tumor. También en estos experimentos se realizan tomas de sangre, pero un total de 4 en lugar de 3, en los **días -1, +8, +15 y +22**.

### **2.2.1- Eficacia antitumoral terapéutica del tratamiento celular a dosis baja**

Evaluamos dos dosis diferentes de células transfectadas como tratamiento, 500.000 ó 2.000.000 por dosis, por ratón. Los grupos de vacunación fueron: **a)** Control (el mismo volumen de DMEM solo en que se resuspendieron las células de los tratamientos en cada dosis); **b)** B16- p2F Ø, 2 mill.; **c)** B16-GMCSF, 0.5 mill.; **d)** B16-GMCSF, 2 mill.; **e)** B16-GMCSF+B7.2, 0.5 mill.; **f)** B16-GMCSF+B7.2, 2 mill.; **g)** B16-GMCSF+IL12, 0.5 mill.; **h)** B16-GMCSF+IL12, 2 mill.



**Figura 27- Inhibición de crecimiento tumoral en el Tratamiento Celular a Dosis Baja.** Los ratones C57BL/6 (n=5, por grupo) fueron vacunados tras la implantación de tumor (día 0, 20.000 céls. B16 tipo salvaje) los días +3, 10 y 17. Los grupos de tratamiento fueron de 0.5 ó 2 millones de células transfectadas con los plásmidos p2F (∅, GMCSF, GMCSF+B7.2, GMCSF+IL12). Se midió el tamaño de los tumores y se calculó la significatividad estadística como en el resto de experimentos. El símbolo \* representa una diferencia estadística de  $P<0.001$ , respecto al grupo Control.

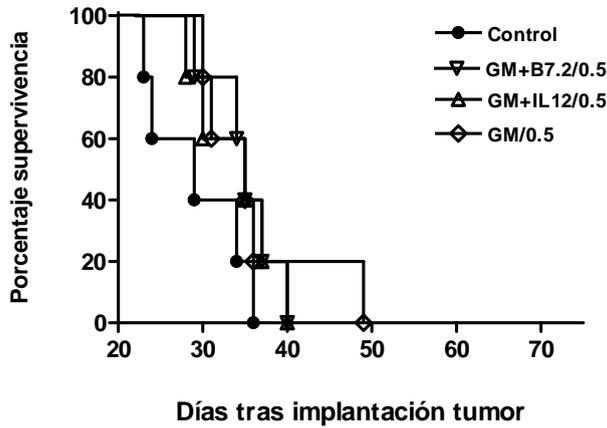
Como puede observarse en la **figura 27**, todos los grupos de tratamiento mostraron diferencia con el mayor grado de significatividad respecto al grupo Control, pero los mejores tratamientos fueron los que combinaban GM-CSF con las otras moléculas, B7.2 o IL-12, con la dosis de 2 millones de células, no habiendo diferencia estadística entre estos dos grupos. Estos dos grupos muestran respecto al grupo Control inhibiciones del crecimiento tumoral iguales o superiores al 60% en el caso de la combinación GM+IL12 y al 80% en GM+B7.2. Además, GM+B7.2/2 se diferencia en los dos últimos días de GM/2 con  $P<0.001$ , si bien GM+IL12/2 no logra esta diferenciación salvo a día +22, con  $P<0.05$ .

## Vacunas genéticas contra el melanoma

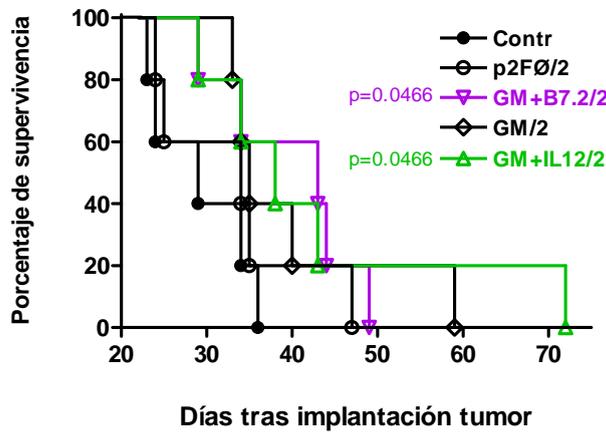
Los resultados de supervivencia aparecen en la **figura 28**, divididos en dos gráficos, el superior para los grupos tratados con 0.5 millones de células y el inferior para los tratados con 2. Ningún animal alcanzó la supervivencia total, pero los resultados de los grupos tratados fueron siempre mejores que los del grupo Control. Los grupos de tratamiento con 0.5 millones de células no fueron muy diferentes entre sí, excepto por el último ratón del grupo GM/0.5 que hizo incrementar la supervivencia final en aproximadamente 15 días respecto al grupo Control.

Los tres grupos de tratamiento de 2 millones de células también mostraron un comportamiento bastante parecido en supervivencia, no reflejando las diferencias marcadas entre grupos que encontrábamos al registrar la inhibición de volumen tumoral. Sus diferencias radicarón únicamente en el último ratón, que fue el que les distanció, dando al grupo GM+IL12/2 una diferencia en supervivencia máxima de 36 días respecto al grupo Control. GM+IL12/2 y GM+B7.2/2 lograron diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control, con un  $p < 0.05$ , aplicando el logrank test. GM/2 sin embargo, no alcanzó esta significatividad, aunque su comportamiento fue muy similar.

## Supervivencia Tratamiento Celular 0.5 mill

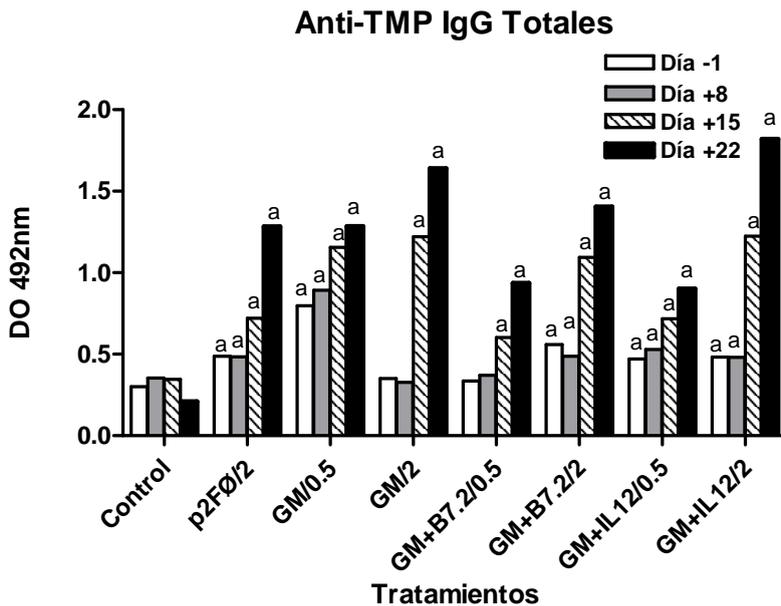


## Supervivencia Tratamiento Celular 2 mill

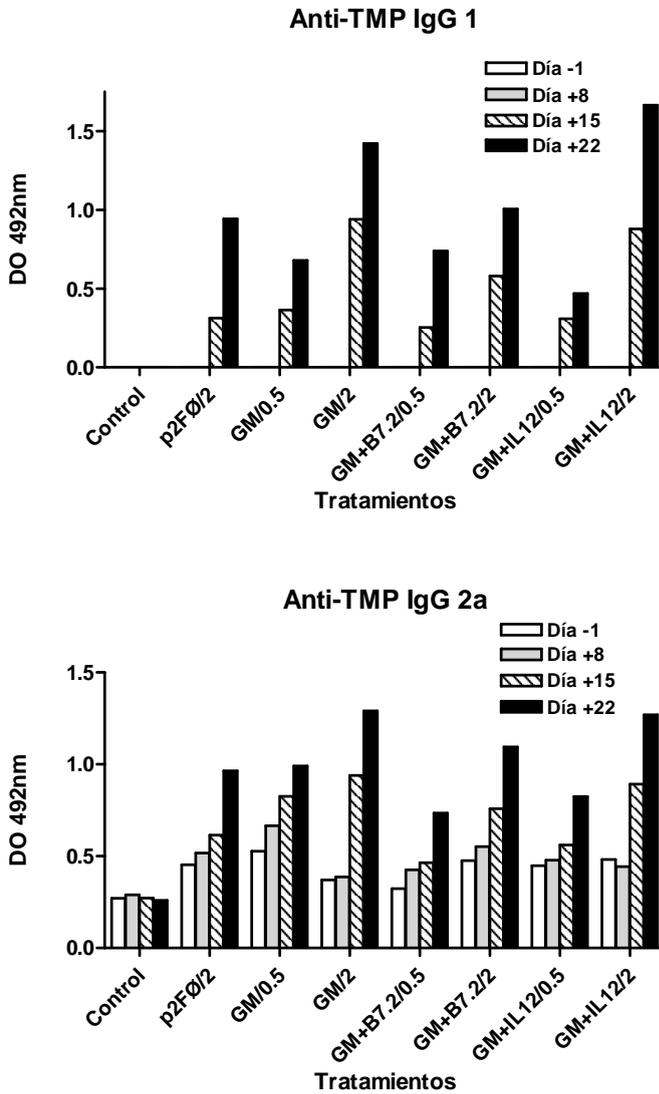


**Figura 28. Supervivencia en el Tratamiento Celular Dosis Baja.** La mortalidad de los ratones tratados según los grupos indicados en la figura 27, fue recogida y plasmada en dos gráficos, el superior con los datos control y de los grupos tratados con 0.5 millones de células transfectadas, y el inferior con los grupos control y tratados con 2 millones.

Las **figuras 29 y 30** muestran la producción de inmunoglobulinas G específicas frente a TMP en los animales de este experimento. En la fig. 29 las IgG totales y en la 30 los subtipos IgG1 e IgG2a. En las totales, los tres grupos que mejor funcionaron en supervivencia, los de tratamiento con 2 millones de células (GM, GM+IL12, GM+B7.2), son los que también muestran una mayor producción de inmunoglobulinas, que aumenta especialmente en las dos últimas tomas de sangre, correspondientes a los días +15 y +22. En los subtipos son los mismos grupos los que muestran las producciones mayores, con la particularidad de que en IgG1, no se detecta producción en las dos primeras tomas de sangre (días -1 y +8).



**Figura 29- Producción de IgG totales específicas frente a TMP en el Tratamiento Celular Dosis Baja.** Tras implantar tumor a los animales en el día 0 con 20.000 céls. B16 tipo salvaje, se les administraron tres dosis de vacunación los días +3, 10 y 17, y se les practicaron 4 extracciones de sangre, en los días -1, +8, 15 y 22. Con el plasma obtenido se realizó el ELISA, ensayando las muestras por duplicado, calculando la media y SD, que no se aprecia en la figura por ser muy pequeña. “a” representa pvalor<0.001 frente al grupo Control.



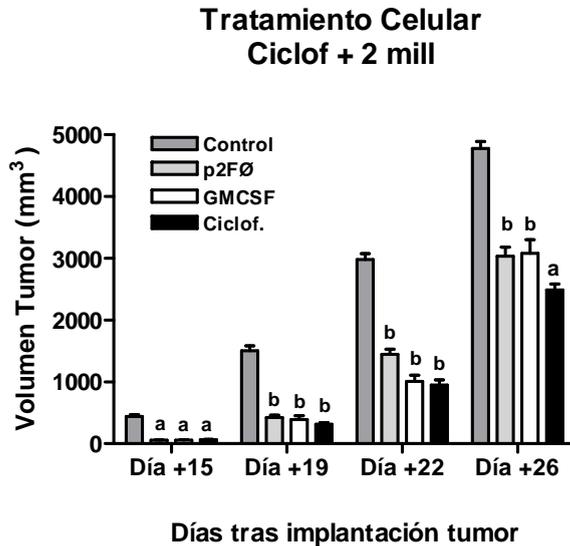
**Figura 30- Producción de subtipos de IgG específicas frente a TMP en el Tratamiento Celular Dosis Baja.** Se procedió a realizar los ELISA para subtipos de IgG anti-TMP con las muestras de plasma recogidas durante la vacuna. En el gráfico **superior** se muestra la producción del subtipo IgG1 y en el **inferior** la de IgG2a. Las muestras se ensayaron por duplicado y se representan la media y SD, inapreciable por ser muy pequeña. Todas las barras presentan  $p$ valor $<0.001$  respecto al grupo Control.

### **2.2.2- Eficacia antitumoral terapéutica del Tratamiento Celular con Ciclofosfamida y Dosis Baja.**

Habiendo obtenido los mejores resultados con 2 millones de células/dosis, realizamos este último experimento de vacunación, con esas características pero además añadiendo un nuevo factor, la ciclofosfamida, con el fin de bloquear la posible respuesta de tolerancia del sistema inmune ante nuestra vacuna.

Los grupos de vacunación fueron **a)** Control (DMEM solo); **b)** Control ciclofosfamida, al que se le inyectó la ciclofosfamida, pero en lugar de vacunas, el DMEM solo; **c)** ciclofosfamida y B16- p2FØ, 2 millones de células/dosis; **d)** ciclofosfamida y B16-GMCSF, 2 millones de células/dosis.

Los resultados de inhibición del crecimiento tumoral están reflejados en la **figura 31**, donde podemos observar que los tres tratamientos lograron una diferencia significativa respecto al grupo control de  $P < 0.001$ . El grupo que mejor inhibición del crecimiento tumoral consiguió fue el tratado sólo con ciclofosfamida (aprox. 50% inhibición respecto a Control en el día +26), y no el tratado con ciclofosfamida + células productoras de GM-CSF, como esperábamos.

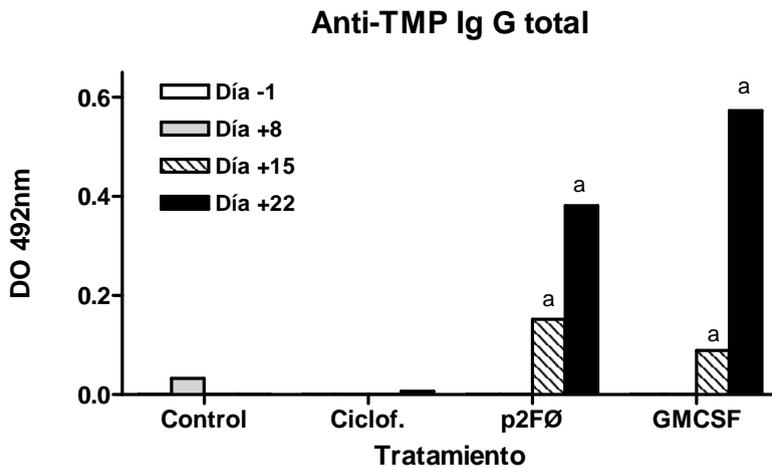


**Figura 31- Inhibición de crecimiento tumoral en el Tratamiento Celular con Ciclofosfamida y Dosis Baja.** Ratones C57BL/6 (n=5/grupo) fueron tratados con Ciclofosfamida (excepto el grupo Control) el día +1 tras la implantación de tumor (20.000 céls. B16 tipo salvaje, día 0). Los días +3, 10 y 17 fueron vacunados sólo con DMEM en los grupos Control y Ciclofosfamida y con 2 millones de células transfectadas con sus plásmidos respectivos, no seleccionadas, en los grupos p2FØ y GM-CSF. Se midió el tamaño de los tumores y se calculó la significatividad estadística como en el resto de experimentos, representándose con “a” una diferencia estadística de  $P < 0.05$  y con “b” de  $P < 0.001$ , respecto al grupo Control.

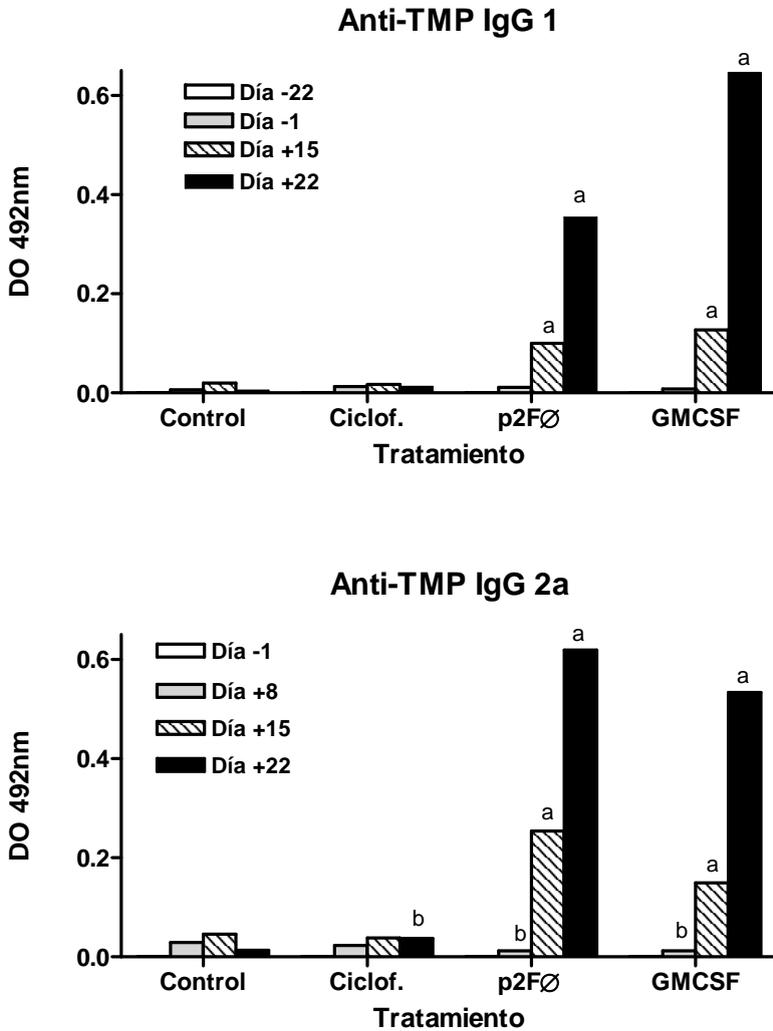
De hecho, los grupos tratados con ciclofosfamida + células transfectadas productoras de GM-CSF o transfectadas con el plásmido vacío no mostraron diferencias significativas entre sí, excepto a día 22, obteniendo ambos menores inhibiciones tumorales que el grupo con ciclofosfamida sola, siendo esta diferencia máxima a día 26, con  $P < 0.001$ .

Del mismo modo, los tres grupos mostraron supervivencias prácticamente iguales, que no fueron significativas respecto al grupo Control en ningún caso.

La producción de IgG específicas frente a TMP, totales y subtipos, se refleja en las **figuras 32 y 33**.



**Figura 32- Producción de IgG totales específicas frente a TMP en el Tratamiento Celular con Ciclofosfamida y Dosis Baja.** Del mismo modo que en la figura 29, las muestras de plasma de los animales, obtenidas en las extracciones de sangre, en los días -1, +8, 15 y 22, se utilizaron para realizar el ELISA, ensayando las muestras por duplicado, calculando la media y SD, que no se aprecia en la figura por ser muy pequeña. “a” representa una diferencia significativa de  $p < 0.001$  respecto al Control.



**Figura 33- Producción de subtipos de IgG específicas frente a TMP en el Tratamiento Celular con Ciclofosfamida y Dosis Baja.** Al igual que en la figura 30, se procedió a realizar los ELISA para subtipos de IgG anti-TMP con las muestras de plasma recogidas durante la vacuna. En el **gráfico superior** se muestra la producción del subtipo IgG1 y en el **inferior** la de IgG2a. Las muestras se ensayaron por duplicado y se representan la media y SD, inapreciable por ser muy pequeña. “a” representa  $p < 0.001$  y “b”  $< 0.05$  respecto a Control.

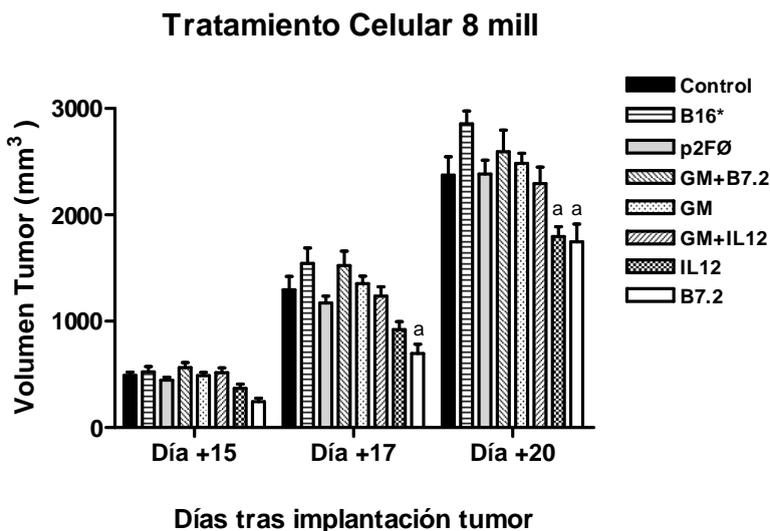
## Vacunas genéticas contra el melanoma

La producción de inmunoglobulinas muestra una clara diferencia entre el control y el grupo tratado con ciclofosfamida respecto a los grupos con ciclofosfamida + células. No sólo porque la producción de Ig totales sea inapreciable en los dos primeros grupos, sino también porque en los subtipos podemos observar que esos grupos no han seroconvertido mientras que los tratados con células sí. Sin embargo, una vez más, esta respuesta específica de IgG no se correlaciona con mejores resultados de inhibición de crecimiento tumoral o supervivencia. En los dos grupos tratados con las células, observamos la producción máxima en el día +22, pero así como las células productoras de GM-CSF muestran una mayor producción del subtipo IgG1, las células que no expresan ninguna citoquina (p2FØ) tienen el máximo de IgG2a.

### 2.2.3- Eficacia antitumoral terapéutica del Tratamiento Celular Dosis Alta

En vista de los resultados de los tratamientos anteriores decidimos seguir incrementando la dosis de células. Por ello, aumentamos la dosis en un factor x 4, como habíamos hecho en el paso de 0.5 a 2 millones, y así nuestros grupos de tratamiento fueron esta vez de 8 millones de células, por ratón, por dosis.

Los grupos de vacunación fueron: **a)** Control (idem. vacunación anterior); **b)** B16\*, células B16 irradiadas; **c)** B16- p2F Ø; **d)** B16-B7.2; **e)** B16-IL12; **f)** B16-GMCSF; **g)** B16-GMCSF+B7.2; **h)** B16-GMCSF+IL12.

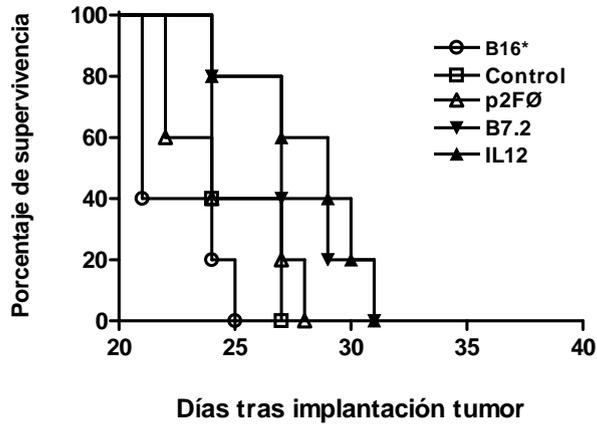


**Figura 34- Inhibición del crecimiento tumoral en el Tratamiento Celular Dosis Alta.** Los ratones C57BL/6 (n=5, por grupo) fueron vacunados tras la implantación de tumor (día 0, 20.000 céls. B16 tipo salvaje) los días +3, 10 y 17, con 8 millones de células transfectadas, no seleccionadas, por dosis (sólo DMEM en el grupo Control o células B16 irradiadas sin transfectar en B16\*), transfectando con los plásmidos p2FØ, p2F-mGMCSF, p2F-mIL12, p2F-mB7.2, p2F-mGMCSF+mIL12 y p2F-mGMCSF+mB7.2, respectivamente. Se midió el tamaño de los tumores y se calculó la significatividad estadística como en el resto de experimentos. El símbolo a representa una diferencia estadística de  $P < 0.001$ , respecto al grupo Control.

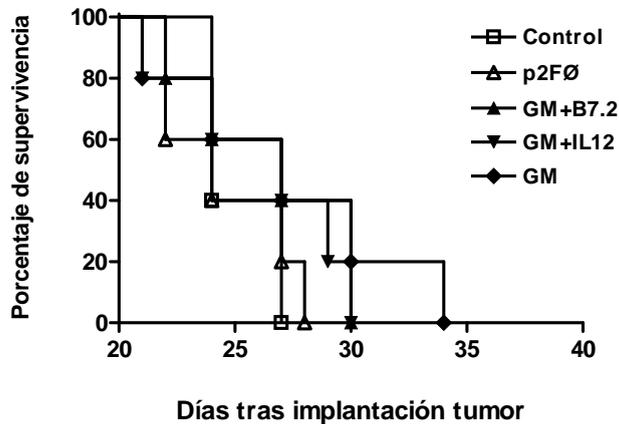
## Vacunas genéticas contra el melanoma

Tal y como se observa en la **figura 34**, la reducción máxima de tamaño tumoral que se logró con los tratamientos de 8 millones de células no superó el 25% respecto al grupo Control, frente al casi 80% logrado en la vacunación anterior con 2 millones de células transfectadas con p2F m-gmcsf +m-B7.2. En este experimento, los grupos que consiguieron una significación estadística respecto al Control ( $P < 0.001$ ) fueron los tratados con células productoras de B7.2 o IL-12, sin diferencias entre ellos, mientras que el grupo tratado con células productoras de GM-CSF o sus combinaciones con las otras dos moléculas, no se diferenciaron del Control. Estas diferencias en inhibición del crecimiento tumoral entre los grupos no fueron suficientes para provocar diferencias en los resultados de supervivencia, como puede apreciarse en la **figura 35**, donde tras aplicar los test Kaplan-Meier y logrank no se halló diferencia significativa entre los tratamientos y el Control.

## Supervivencia Tratamiento Celular 8 mill



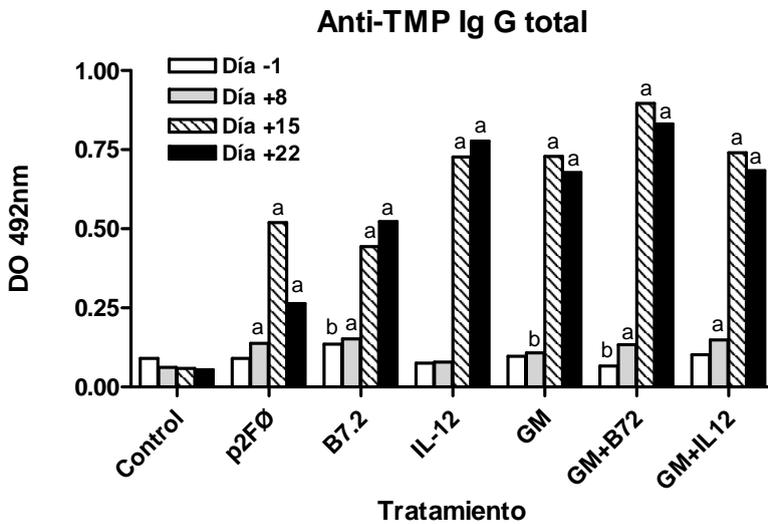
## Supervivencia Tratamiento Celular 8 mill



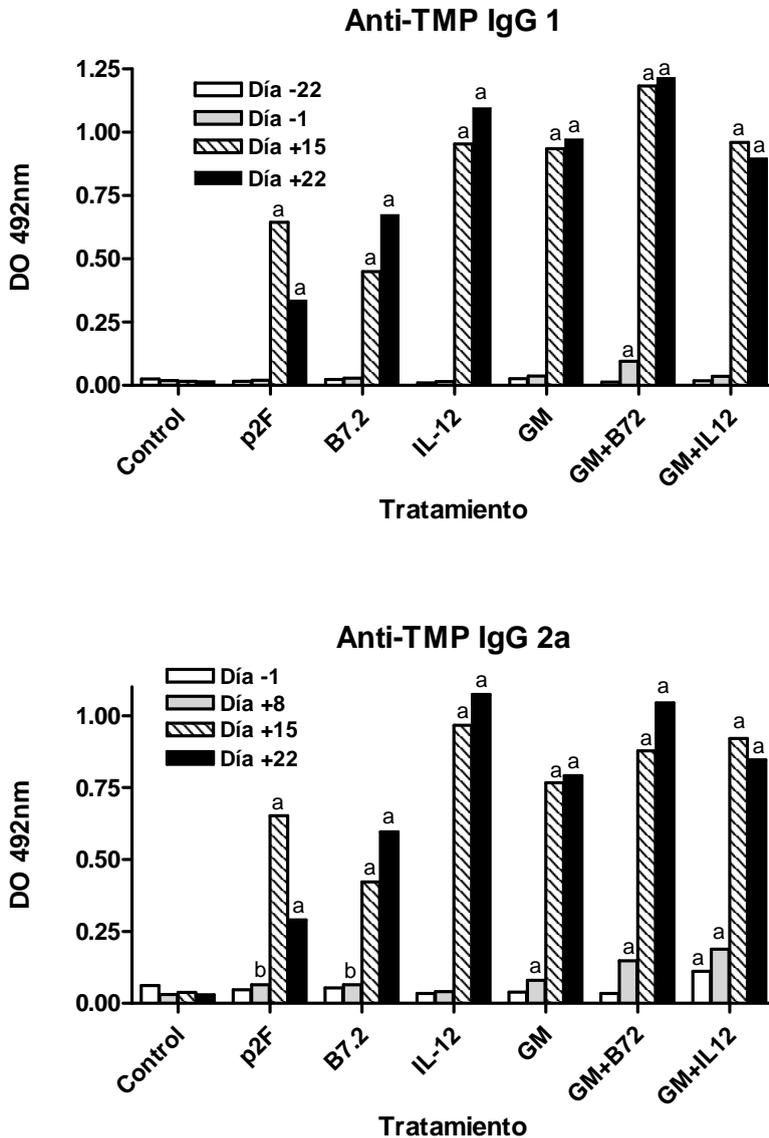
**Figura 35- Supervivencia en el Tratamiento Celular Dosis Alta.** La mortalidad de los ratones fue recogida y plasmada en dos gráficos de supervivencia según el método de Kaplan-Meier, el **superior** con los datos control y los grupos productores de IL-12 y B7.2, y el **inferior** con los grupos control y los productores de GM-CSF y sus combinaciones. Los grupos de tratamiento corresponden con los descritos en la figura 34. Tras aplicar el test estadístico logrank no se hallaron diferencias significativas entre los grupos.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Mientras que los tratamientos celulares con 0.5 y 2 millones de células B16 transfectadas, no seleccionadas, lograron aproximadamente 12 y más de 30 días, respectivamente, de retraso en la mortalidad entre el mejor grupo y el control, al aumentar la dosis celular a 8 millones, encontramos un retraso máximo de unos 5 días, en el mejor de los casos (GM-CSF), que no fue suficiente para lograr diferencia estadísticamente significativa respecto a su grupo control.



**Figura 36- Producción de IgG totales específicas frente a TMP en el Tratamiento Celular Dosis Alta.** Del mismo modo que en la figura 29, las muestras de plasma de los animales, obtenidas en las extracciones de sangre, en los días -1, +8, 15 y 22, se utilizaron para realizar el ELISA, ensayando las muestras por duplicado, calculando la media y SD, que no se aprecia en la figura por ser muy pequeña. “a” representa p valor<0.001 y “b”<0.05 respecto a Control.



**Figura 37- Producción de subtipos de IgG específicas frente a TMP en el Tratamiento Celular Dosis Alta.** Al igual que en la figura 30, se procedió a realizar los ELISA para subtipos de IgG anti-TMP con las muestras de plasma recogidas durante la vacuna. En el gráfico **superior** se muestra la producción del subtipo IgG1 y en el **inferior** la de IgG2a, del mismo modo que en la fig.36.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Los resultados de los ensayos de ELISA específicos anti-TMP de las **figuras 36 y 37** no muestran una fácil correlación con los resultados de inhibición de crecimiento tumoral o supervivencia. En todos los casos, la producción de IgG a día +8 alcanza valores más bajos respecto al máximo en cada grupo, de los que se alcanzaba en el experimento anterior, que obtuvo mejores resultados globales. Así, en el tratamiento celular a dosis alta, el incremento entre el día +8 y el +15 es mucho más brusco.

En la producción de IgG totales, los grupos que peor funcionaron en inhibición del crecimiento tumoral, GM-CSF y sus combinaciones así como el control de p2F Ø, muestran producciones más elevadas en el día +15 que en el día +22, mientras que los que mejor inhibición lograron, B7.2 e IL-12 muestran sus máximos en el día +22.

De nuevo observamos que las máximas producciones de Ig no se correlacionan con las máximas supervivencias, ya que el grupo GM-CSF no tenía los valores máximos de producción en ninguno de los tres gráficos.

En cuanto al estudio por microscopía confocal de las células Treguladoras en sangre periférica de los animales tratados, tras el conteo de los diversos campos escogidos al azar, se lograron identificar todos los tipos celulares buscados, linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, linfocitos T reguladores “clásicos” CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, pero además se identificó una subpoblación adicional que presentaba un marcaje CD4<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>. Éstas últimas eran células que a priori no esperábamos encontrar. Se observan como células de aspecto granuloso, que no se corresponden con la Treg clásica, ya que no son CD4<sup>+</sup>, pero que por sus otros dos marcadores bien podrían ser otro tipo de célula T reguladora.

La siguiente tabla (**tabla 1**) muestra los resultados del conteo mediante los cálculos de porcentaje de cada tipo celular sobre el total de células, y en el caso de las Treg también sobre el total de CD4<sup>+</sup>. El dato queda expresado con el valor medio de porcentaje en los 5-10 conteos que se realizaron de cada muestra, así como su desviación estándar, para cada grupo de tratamiento en

cada una de las tomas posteriores a cada dosis de vacuna, es decir, toma 1: día +8, toma 2: día +15, toma 3: día +22. El valor normal esperado tanto en ratones como en humanos es de un 5-10% de Treg respecto a las células CD4<sup>+</sup> en sangre periférica [37]. Se ha resaltado en color lila aquellos valores en la columna de las células CD4<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> que han resultado especialmente significativos a la vista de los resultados de la **tabla 2**. En ésta se han incluido los resultados de significación estadística tras comparar los resultados de la tabla 1 entre sí mediante el test two-way ANOVA y Bonferroni, representando con a el p valor<0.001, b el p valor< 0.01 y c el p valor<0.05. Al igual que en la tabla anterior, el color verde corresponde a los resultados de comparación de células CD4<sup>+</sup>, el rojo a las CD8<sup>+</sup>, el azul a las Treg clásicas (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) y el lila a la población CD4<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>. A su vez, y mediante otro test two-way ANOVA y Bonferroni cruzado, se representa en la diagonal en azul, las diferencias estadísticas dentro de cada grupo, entre las diferentes tomas, colocando en la casilla 1, la comparación entre toma 1 y toma 2; en la casilla 2, la comparación entre toma 1 y 3; y finalmente, en la casilla 3, la comparación entre toma 2 y 3.

**Tabla 1- Resultados de porcentaje de los diferentes tipos celulares en el experimento de microscopía confocal del tratamiento celular con dosis alta.**

Valores de porcentaje de los diferentes tipos celulares estudiados sobre el total de células por campo, contando entre 5 y 10 campos, escogidos al azar de cada condición de tratamiento de la vacuna con dosis 8 millones de células transfectadas, en las tres tomas de sangre (tomas 1, 2 y 3).

Tratamiento	Toma	%CD8 <sup>+</sup> / Total		%CD4 <sup>+</sup> / Total		%CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup>		%CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> / Total		%CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> /Total	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Control	1	13.8	0.9	35.3	7.7	5.5	3.5	1.9	1.2	0.0	0.0
	2	16.3	3.5	39.1	5.1	8.1	4.6	2.6	1.5	1.3	0.8
	3	13.6	2.6	28.1	3.3	9.3	5.2	2.6	1.5	0.4	0.5
B16*	1	11.8	0.6	24.3	2.4	9.2	2.7	2.2	0.7	0.0	0.0
	2	13.5	8.4	30.9	7.2	9.4	2.7	2.9	0.8	3.2	2.0
	3	13.3	5.9	26.0	5.0	9.3	4.8	2.4	1.2	1.6	1.5
B16-p2F $\emptyset$	1	7.9	1.9	55.2	15.0	5.3	5.2	2.9	2.8	0.0	0.0
	2	11.9	2.8	28.7	5.4	7.9	8.4	2.3	2.4	3.2	4.6
	3	12.1	2.8	23.3	7.3	9.8	6.8	2.3	1.6	0.9	0.7
B16-B7.2	1	14.0	0.9	30.7	4.2	8.7	3.8	2.7	1.2	0.0	0.0
	2	14.5	3.1	30.0	4.5	8.0	2.0	2.4	0.6	2.1	1.6
	3	13.5	3.2	23.0	3.3	9.9	6.5	2.3	1.5	3.0	2.1
B16-IL12	1	14.9	3.1	26.9	5.6	6.7	2.6	1.8	0.7	0.1	0.2
	2	16.5	3.5	33.6	8.4	11.2	3.3	3.8	1.1	2.0	1.6
	3	13.7	4.4	24.2	6.2	11.5	5.2	2.8	1.3	1.4	1.6
B16-GMCSF	1	13.1	1.5	27.0	0.8	6.6	2.2	1.8	0.6	0.1	0.2
	2	14.7	2.9	20.0	1.6	7.8	2.1	1.6	0.4	5.7	2.5
	3	14.7	3.1	20.6	4.6	10.9	4.1	2.2	0.9	4.1	1.8
B16-GM+B7.2	1	14.8	1.5	31.5	7.4	6.2	3.2	1.9	1.0	0.0	0.0
	2	15.9	2.6	20.0	0.2	10.4	4.4	2.1	0.9	3.8	2.4
	3	11.9	2.4	21.6	3.7	11.9	3.7	2.6	0.8	4.1	1.8
B16-GM+IL12	1	17.0	4.7	28.8	1.3	6.9	1.9	2.0	0.5	0.0	0.0
	2	14.0	4.8	32.9	3.8	5.2	3.4	1.7	1.1	1.2	1.5
	3	12.4	2.9	20.3	4.1	13.3	5.7	2.7	1.2	1.7	1.1

Vacunas genéticas contra el melanoma

Tratamiento/ Toma	Control			B16*			B16- p2FØ			B16- B7.2			B16- IL12			B16- GMCSF			B16- GM+B7.2			B16- GM+IL12		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Control				c			a					b				a	a		c	a				c
B16*							a									b	b				b			
B16-p2FØ							a	a		a		c	a			a	c	a	a		a	a	b	
B16-B7.2																b	c							
B16-IL12													c			a	a		c	a			b	
B16-GMCSF																a	a						a	b
B16- GM+B7.2																			a	a			b	b
B16- GM+IL12																								a

**Tabla 2- Significatividad estadística del experimento de microscopía confocal del tratamiento celular con dosis alta.** Los resultados de significación estadística tras aplicar el test two-way ANOVA y el post test de Bonferroni estan representados en la tabla con los símbolos: a, para p valor<0.001, b para p valor <0.01 y c para p valor<0.05. En verde se representan las comparaciones entre porcentajes de células CD4<sup>+</sup>, en rojo las de CD8<sup>+</sup>, en azul las CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> y en lila las de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>. Allá donde no exista símbolo, la diferencia estadística no fue significativa.

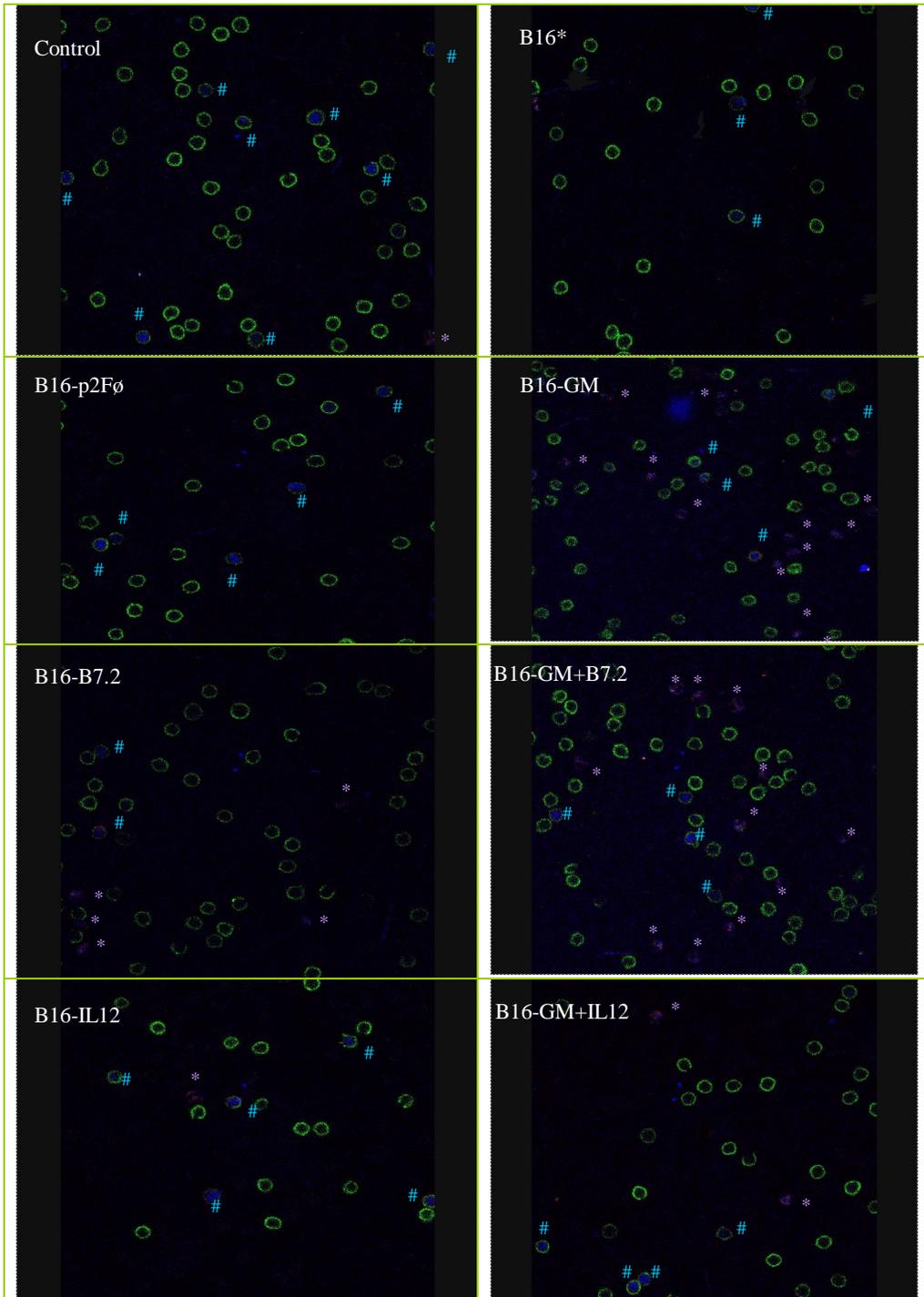
## Vacunas genéticas contra el melanoma

Los resultados de las dos tablas anteriores muestran que no hay diferencia significativa en el porcentaje de células Treg entre los diferentes grupos, excepto en el caso de B16-IL12 comparado con los tres grupos B16-GMCSF, B16-GM+B7.2 y B16-GM+IL12, pero únicamente en la toma 2, donde B16-IL12 muestra un porcentaje mayor de este tipo celular. Por una mayor claridad en la lectura, no se incluyeron en la tabla 2 los datos estadísticos del porcentaje de Treg clásicas respecto a las células CD4<sup>+</sup>, cuyos resultados fueron de significatividad c (p valor<0.05) en la toma 2, comparando B16-IL12 con B16-GM+IL12 y B16-GM+B7.2 con B16-GM+IL12. En cuanto a las variaciones intragrupo, sólo se dieron en este caso en B16-GM+IL12, al compara la toma 2 con la 3, con una significatividad b (p valor<0.01). El tipo celular que realmente mostró más diferencias fue el CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>. A día +8, en la toma 1, estas células fueron prácticamente imperceptibles, apareciendo en las tomas 2 y 3, y alcanzando en los grupos resaltados en lila, valores incluso superiores a las Treg clásicas respecto al total de células.

Las siguientes imágenes de microscopía confocal (**fig. 38**) ilustran de modo representativo los resultados de los diferentes tratamientos en la toma 3. Se han marcado con un símbolo # de color azul las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (Treg clásicas) y con un símbolo \* de color lila, las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>.

**Fig. 38- Imágenes representativas del experimento de microscopía confocal, en la toma 3.**

CD4<sup>+</sup> verde, CD25<sup>+</sup> rojo, Foxp3<sup>+</sup> azul. El símbolo # marca las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, el símbolo \* marca las células CD4<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>.



# DISCUSIÓN

La meta de este trabajo ha sido intentar mejorar los métodos de las vacunas genéticas antitumorales, abarcando un amplio abanico de estrategias, donde nuestro fin era perfeccionar los resultados alcanzados previamente en nuestro grupo además de, en algunos casos, tratar de comprender mejor los mecanismos subyacentes a cada modelo de vacuna. Por ello hemos trabajado desde las vacunas preventivas hasta los tratamientos terapéuticos, pasando por diferentes estrategias que incluyen desde vacunas con antígenos (libres, encapsulados en liposomas o formando complejos con lípidos y polímeros catiónicos) hasta las vacunas genéticas celulares utilizando células tumorales transfectadas, seleccionadas o no, e incluso tratamientos adyuvantes destinados a reducir la respuesta inmunosupresora.

Las células manipuladas genéticamente para secretar citoquinas han demostrado sobradamente ser unas de las candidatas más exitosas para las vacunas antitumorales [12-33, 69], como también hemos comprobado en nuestro grupo [53, 54, 67, 70, 71], pero no podemos olvidar que trabajar con esta aproximación en la práctica clínica es realmente costoso y complicado. La terapia antitumoral con células autólogas modificadas parece a priori la primera opción. Pero obtener células tumorales de un paciente, mantenerlas en cultivo, amplificarlas hasta alcanzar la cantidad necesaria, lograr transfectarlas o transducirlas correctamente y luego devolverlas al mismo paciente, con las garantías de seguridad, esterilidad y producción adecuada del transgén, no es tarea fácil.

Por ello nos planteamos en este trabajo focalizar nuestros esfuerzos en dos grandes frentes, el primero, olvidarnos de las células y volver a los orígenes de las vacunas, los antígenos. Un objetivo que sabíamos que no sería fácil ya que hasta la fecha aún no se han logrado los éxitos obtenidos con las células [59, 61, 72-77]. Este tipo de vacunas, sin embargo supondría un tratamiento bien definido, reproducible y fácil de preparar para ser industrializado, ya que contendría sólo componentes químicos (antígenos tumorales derivados de las proteínas de la membrana celular de las células tumorales y los genes de

## Vacunas genéticas contra el melanoma

citoquinas deseados) que, teóricamente, son los realmente necesarios para activar correctamente la respuesta inmune y nos permitirían prescindir del uso de células vivas completas.

El segundo frente consistiría en seguir trabajando con las células, pero tratando de mejorar los modelos existentes, reduciendo el número de células necesarias para provocar una respuesta inmune adecuada frente al tumor, evitando así gran parte del complejo trabajo de manipulación celular en futuros pacientes. Además, dentro del marco celular, quisimos acercarnos no sólo al enfoque preventivo sino también al terapéutico, y testar en él nuestros avances en el campo preventivo, como las sinergias entre los genes que codifican para GM-CSF e IL-12 o GM-CSF y B7.2, así como estudiar una de las posibles vías que se postula como bloqueante del éxito de estas vacunas, la inmunosupresión mediada por células T reguladoras [37, 38].

## Vacunas Preventivas

### *Vacunas con Antígenos*

En la aproximación antigénica estudiamos la eficacia antitumoral en varios modelos diferentes de vacunación preventiva: TMP solas, TMP encapsuladas en liposomas y lipopoliplosos con TMP y el gen *m-gmscf* en el plásmido p2F *m-gmscf*. De entre los diferentes métodos de preparación de liposomas y las diferentes formulaciones lipídicas, los liposomas que mejores rendimientos de encapsulación proporcionaron fueron los liposomas de PC preparados mediante el método MLV-FT. En la vacunación con TMP libre o encapsulada en liposomas MLV-FT los mejores resultados fueron alcanzados por la TMP libre y la misma encapsulada en liposomas PC: CH, no encontrándose diferencia entre estos dos grupos.

Tras escoger el mejor liposoma, en base a su capacidad de encapsulación y su carga neta (importante en la formación de los lipopoliplosos), se llevaron a cabo los experimentos de vacunación con lipopoliplosos, testando diferentes dosis tanto de TMP como de plásmido y concluimos que, aunque las

inhibiciones del crecimiento tumoral fueron similares a las de proteínas solas o encapsuladas en liposomas, los resultados de supervivencia fueron diferentes y los mejores fueron alcanzados por los lipopoliplos formados por liposomas PC:CH:DP con 20 µg TMP y poliplos PEI/p2F m-gmcsf con 10 µg de plásmido por dosis. Estos resultados se vieron también acompañados de una producción de IgG totales específicas frente a TMP. Cuando pasamos al estudio de los subtipos específicos anti-TMP IgG1 e IgG2a, cabe destacar que los grupos con las dosis mayores (20 µg) de TMP en los lipopoliplos mostraron su máximo de producción IgG2a de forma tardía, en el día +15, mientras que los grupos con la dosis inferior de TMP (2 µg) tuvieron su máximo más temprano, a día -1. Esta diferencia temporal de producción de IgG2a no se correlacionó con la supervivencia, pero la alta o baja dosis de *gm-csf* sí que discriminó entre mejores o peores resultados. El hecho de no encontrar correlación directa entre los grupos más exitosos y las mayores producciones de subtipos de IgG nos sugiere que aunque la seroconversión o “switch” de IgG sea importante para la inducción de memoria celular y activación de la respuesta antitumoral, estos efectos deben ser limitados y otros mecanismos deben estar participando en una regulación negativa del sistema inmune, haciendo que la producción de estos subtipos sea una condición necesaria pero no suficiente para el éxito de la vacuna [78]. El lipopoliplo permite la entrega simultánea de los dos componentes de la vacuna, en el mismo tiempo y en el mismo lugar. A partir de los datos obtenidos con él y los antígenos libres, nos planteamos desglosar los componentes, para tratar de elucidar la dosis más adecuada de cada componente y el momento óptimo de entrada en escena de cada uno de ellos. Esta separación temporal de los componentes, sin renunciar a la producción de la citoquina por parte de las células propias del animal en el entorno de la vacuna, como estaba descrito que era más eficaz [12, 14], nos la proporcionó el acondicionamiento tisular. En estos experimentos inyectamos inicialmente el plásmido desnudo en la zona inguinal del ratón, para transfectar las células del área inyectada y que

## Vacunas genéticas contra el melanoma

fuesen ellas las que produjesen la citoquina. Comprobamos mediante RT-PCR cuantitativa que, efectivamente, la zona de tejido inyectado se transfectaba in vivo y pudimos comparar los niveles de expresión inyectando 10 ó 50 µg de plásmido pMok m-gmcsf y evaluando la expresión local del gen 2 días tras la inyección. Con este experimento concluimos que efectivamente conseguíamos transfectar el tejido tratado y que la mayor producción de GM-CSF se obtenía inyectando 50 µg de plásmido. Por ello iniciamos los experimentos de acondicionamiento tisular con esta dosis de plásmido. Inyectamos el plásmido el primer día de tratamiento y continuamos con la inyección de los antígenos en el momento en el que habíamos comprobado que ya había expresión del gen, así administramos una dosis de TMP a los 2 días de la inyección del plásmido. Con este diseño obtuvimos una buena inhibición del crecimiento tumoral, que en principio resultó dosis dependiente, ya que se alcanzaron inhibiciones del crecimiento tumoral en torno al 25% con una sola dosis de 10µg TMP/semana, que mejoró hasta el 50% de inhibición al aumentar esa dosis a 10+10µg TMP/semana.

Para nuestra sorpresa, al seguir aumentando la dosis de TMP, no conseguimos mejorar aún más el resultado, sino todo lo contrario, sugiriendo que llegamos a un límite y lo traspasamos, de modo que el grupo tratado con 100+100µg TMP/semana funcionó peor que los anteriores, no diferenciándose del grupo Control. Aparentemente, el hecho de administrar una elevada dosis de antígeno posterior a la aparición de la citoquina tenía un efecto negativo y esto nos sugería que quizá de alguna forma estábamos saturando el sistema, proporcionando una activación demasiado potente, o tal vez proporcionada en el momento equivocado, que resultaba contraproducente al provocar fenómenos de inhibición del sistema. De hecho, realizando el mismo experimento, pero con células enteras irradiadas en lugar de TMP (lo que de nuevo representa una elevada dosis de antígeno), obteníamos los mismos resultados negativos (dato no mostrado). Nos planteamos si esa inhibición podía estar causada por una secuencia temporal errónea de administración de las señales al sistema inmunitario y por ello decidimos mantener la dosis

elevada de TMP, pero esta vez, administrada antes que el *gm-csf* y a ese experimento lo llamamos Acondicionamiento Tisular Inverso. Además, quisimos testar si la cantidad de *gm-csf* era la adecuada, ya que su dosis también podía influir en el éxito de la vacunación, provocando posiblemente efectos contraproducentes como ya se había descrito [23, 68]. Efectivamente, en esta ocasión se obtuvieron los mejores resultados en los modelos de vacunas con antígenos: 60-70% de inhibición tumoral respecto a los controles, vacunando con una dosis de 100+100 µg de TMP/semana y 10 µg de pMok m-gmcsf, llevando a cabo la transfección tisular posteriormente al “priming” efectuado por el antígeno.

#### *Vacuna Celular Preventiva- Células No seleccionadas*

En el ámbito de las vacunas celulares, nuestro primer experimento fue una vacunación preventiva con una dosis de  $2 \times 10^5$  células transfectadas con poliplejos PEI/DNA, utilizando diferentes plásmidos para producir GM-CSF, IL-12, B7.2 o combinaciones de los mismos. En este experimento comparamos la construcción plasmídica pMok, con la que se había trabajado previamente en nuestro laboratorio, basada en el plásmido p2F, bicistrónico, que utiliza elementos reguladores diferentes. En esta vacuna demostramos la ventaja de las nuevas construcciones, que permitieron alcanzar el éxito total de la vacuna preventiva con una dosis celular inferior a la de los trabajos previos [53]. Curiosamente, y en concordancia con los datos que hemos venido describiendo, el grupo vacunado con células transfectadas con pMok m-gmcsf, cuya producción neta de GM-CSF fue mayor (como se comprobó por ELISA) que la de las células transfectadas con p2F m-gmcsf, obtuvo peores resultados que este último. Esta diferencia no se vio inicialmente reflejada en la inhibición del crecimiento tumoral, ya que los dos grupos presentaron la misma eficacia durante el periodo de medición, pero sí quedó patente en los resultados finales de supervivencia, donde el grupo B16-GMCSF mantuvo el 100% de supervivencia tras más de 6 meses de seguimiento, mientras que el grupo B16-pMok GMCSF alcanzó un 60% al

## Vacunas genéticas contra el melanoma

final del mismo periodo. Este resultado apoya, una vez más la idea del efecto contraproducente de un exceso de GM-CSF [23, 68].

Por otra parte, el estudio de las combinaciones de moléculas en esta vacuna nos permitió arrojar conclusiones adicionales: GM-CSF en combinación con B7.2 parecían mostrar un efecto sinérgico ya que el grupo de vacunación B16-GM+B7.2/200, con el mismo número de células que B16-GMCSF, pero con la mitad de producción de la citoquina (comprobado por ELISA) alcanzó un 80% de supervivencia, mientras que este efecto no se apreció en la combinación con IL-12 ya que el grupo B16-GM+IL12/200 (aproximadamente con la misma producción de GM-CSF que B16-GM+B7.2/200) no alcanzó más que el 60%, además con unas muertes mucho más tempranas de los animales. En el grupo B16-GM+B7.2/200 no murió ningún animal hasta después del día 90, mientras que en el grupo B16-GM+IL12/200 ya habían muerto 2 animales sobre el día 40.

Al doblar las dosis de células en estos grupos de combinación, donde habrá más células pero aproximadamente la misma cantidad de GM-CSF que en el grupo de referencia B16-GMCSF, encontramos que en el caso de GM-CSF +IL12, la diferencia no es significativa respecto a su equivalente con la mitad de dosis, lo que apunta a pensar que la administración simultánea de los genes de estas dos citoquinas no es adecuada en el contexto de este modelo de vacuna, y a pesar de obtener un resultado del 60% de supervivencia, no se logra un resultado totalmente satisfactorio. En cuanto a la combinación GM-CSF +B7.2, al doblar la dosis se obtuvo una peor respuesta, quedando reducida la supervivencia al 40%, probablemente, una vez más, debido al exceso de GM-CSF y los fenómenos supresores asociados. No obstante, queda pendiente determinar si la cantidad total de antígeno en este experimento desempeña un papel relevante en la eficacia de la respuesta, punto que vendrá parcialmente abordado en el experimento con células seleccionadas.

La producción de inmunoglobulinas específicas frente al tumor desveló una correlación, con los resultados de supervivencia, más clara en el caso de IgG2a, donde los mejores grupos que mejores porcentajes de supervivencia habían alcanzado, B16-GMCSF y B16-GMCSF+B7.2/200, mostraron a día +15 tras la implantación de tumor, los valores de producción más elevados.

El éxito del experimento anterior nos alentó a trabajar un poco más en profundidad con el modelo. Ya que contábamos con la supervivencia prolongada de la mayoría de los animales empleados, quisimos averiguar si nuestra activación del sistema inmunitario había desencadenado correctamente los fenómenos de generación de memoria inmunológica y por ello nos planteamos volver a exponer a los ratones supervivientes al mismo tumor, un año después del inicio del primer experimento. De este modo, a los animales se les administró una única dosis de recuerdo del mismo tipo de vacuna que se les había administrado una año antes y dos semanas después se les implantó el tumor B16 de la forma habitual. Comprobamos que todos los animales vacunados sobrevivieron a esta segunda implantación de tumor, quedando libres de tumor B16 hasta el momento de su muerte natural, efecto que confirmamos en la necropsia de los animales.

Al realizar el estudio de inmunoglobulinas G específicas constatamos que la producción era en todos los casos superior a la del grupo control tanto en IgG totales como en los dos subtipos, IgG1 e IgG2a y que la producción neta de IgG2a alcanza valores más elevados en esta reimplantación de tumor respecto a la primera, un año atrás. Además, los valores máximos, tanto de IgG1 como de IgG2a, se alcanzan prácticamente en todos los grupos, el día -1 en lugar de el día +15, indicando que la respuesta específica se desencadena más tempranamente que en la primera exposición al tumor.

En estos experimentos, además de conseguir la eficacia máxima, es decir, la prevención total del desarrollo del tumor, se han confirmado dos ideas que también están sustentadas por los resultados previos obtenidos y por los de otros grupos: 1) a partir de un cierto umbral, niveles más elevados de

## Vacunas genéticas contra el melanoma

producción de GM-CSF no son necesariamente más eficaces, sino incluso contraproducentes [23, 62, 68, 78]; y 2) existe algún tipo de efecto sinérgico entre GM-CSF y B7.2 [28-31].

### *Vacuna Celular Preventiva- Células Seleccionadas*

El modelo de vacunación preventiva nos había ofrecido resultados exitosos con  $2 \times 10^5$  células en cada una de las tres dosis de vacunación, bien fuese con células productoras de GM-CSF o con menor dosis de esta citoquina pero combinada con B7.2.

Conociendo que no son necesarias enormes cantidades de GM-CSF, que la expresión de B7.2 también había ofrecido ventajas en varios modelos de vacunas antitumorales [28-33] y finalmente, que sólo un 20-40% de las células utilizadas en el experimento anterior estaban realmente transfectadas, la siguiente pregunta era: ¿por qué no probar una vacuna con las mismas características, pero utilizando sólo las células transfectadas?

La reducción del número de células al mínimo necesario para conseguir los efectos terapéuticos, es siempre deseable en los modelos de vacunación celular. Se han realizado muchos esfuerzos en la historia de la terapia génica para lograr la transfección de la totalidad de las células con las que se trabaja y así tener que utilizar menor cantidad total de las mismas. Sin embargo, hasta el momento esto ha resultado muy difícil, especialmente trabajando con vectores no virales, aunque hay algunos métodos que realmente han mejorado las eficacias de transfección de forma espectacular, como el Nucleofector® de Amaxa, si bien esto ha sido sólo en algunos tipos celulares concretos. Ante esta dificultad, nuestra estrategia no ha sido optimizar la eficacia de transfección con las herramientas de que disponíamos y a continuación aislar y purificar las células transfectadas. Es decir, de una mezcla heterogénea de células, transfectadas y no transfectadas, escoger para vacunar únicamente la fracción de células realmente transfectadas. De este modo, en la vacunación

antitumoral todas las células, portadoras de antígenos tumorales, expresarán a su vez los genes exógenos de interés.

Sabiendo que nuestra eficacia de transfección estaba en torno al 40% del total de células y que la eficacia de expresión era la adecuada a las 72 h. de la transfección, tanto por la producción de GM-CSF como por la producción de B7.2 y las condiciones de cultivo, elegimos ese momento para seleccionar las células en base a la expresión de los dos genes y consideramos ese porcentaje como base para el cálculo de las dosis.

Se empleó un procedimiento de marcaje y selección mediante bolas magnéticas, que permitía seleccionar las células realmente transfectadas en base a la expresión de B7.2 en su superficie. El procedimiento requiere la utilización de un anticuerpo anti-B7.2 biotinilado, que a su vez se une a las bolas magnéticas acopladas a estreptavidina. Una vez realizada la transfección y el posterior marcaje, el total de células, con las dos poblaciones, marcada y sin marcar, se pasa a través de un aparato, el Automacs®, que mediante mecanismos magnéticos logra separar unas células de otras, proporcionándolas en dos fracciones de elución diferenciadas.

Se logró purificar un 4% de células viables respecto al total de células de partida. Consideramos que éste es un bajo rendimiento, ya que las células transfectadas representan un 20-40% de las células de partida. Estos resultados pueden deberse a varios motivos y se debe trabajar en ellos para mejorar el rendimiento de este protocolo. Por una parte, el proceso completo de marcaje y purificación ocupa varias horas, durante las cuales las células probablemente acusen la falta de sus condiciones de vida adecuadas, lo que puede resultar en una caída dramática de la viabilidad celular. Por otro lado el protocolo utilizado en el propio Automacs fue el más restrictivo (Posseld 2), en el sentido de que logra purezas excelentes del producto a costa de una pérdida importante de células, reduciendo mucho el número final de las mismas. La optimización de las condiciones para reducir la duración del proceso así como la aplicación de un protocolo de purificación algo menos selectivo podrían contribuir a la mejora del rendimiento final.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

Existe otra posible explicación a tener en cuenta, relacionada con la propia construcción plasmídica con la que se transfecta: el casete de B7.2 empleado proporciona una expresión del gen a largo plazo pero no realmente fuerte, como pudimos comprobar con el experimento de citometría, donde los valores de fluorescencia no son realmente elevados. Probablemente, la utilización de un promotor más potente para este gen podría aumentar la expresión del mismo y así facilitar un mejor reconocimiento y separación en el Automacs.

El diseño experimental de las vacunas genéticas con células seleccionadas fue exactamente igual al de la vacuna con células no seleccionadas, pero siendo esta vez menor el número total de células por dosis de vacunación aunque equivalente a las células realmente transfectadas de aquella vacunación: 40.000 células seleccionadas (equivalente a un 20% de las 200.000 empleadas en la vacunación anterior) ó 80.000 células seleccionadas (un 40% de las 200.000).

Se pretendió dar un paso más en este modelo, aprovechando el hecho de estar trabajando con un número realmente reducido de células: mezclar las células productoras de GM-CSF y B7.2, con otras células tumorales diferentes (3LL), en un modelo de implantación de este nuevo tipo de tumor. Así, éstas últimas harían el papel de antígeno inmunógeno, mientras que las células transfectadas seleccionadas serían “meras” productoras de las citoquinas y estimuladoras de respuesta inmune inespecífica, células “bystander”, que generarían el entorno adecuado para que las otras despertasen la correcta respuesta inmune. De este modo, se añadió al experimento un grupo que sería tratado con 80.000 células B16 seleccionadas mezcladas con 320.000 células 3LL irradiadas, con implantación de tumor 3LL. Este tipo de estrategia proporcionaría información sobre la eficacia de una vacuna de células tumorales alogénicas transfectadas, mezcladas con células tumorales singénicas con el tumor a tratar (o autólogas, del paciente) pero siendo éstas simplemente irradiadas para que actúen como antígenos. Este tipo de vacunas sería muy útil ya que, teniendo una línea celular con capacidad de transfección

fácil y bien caracterizada, sólo habría que mezclarla con células del tumor a tratar para poder vacunar sin tener apenas que manipular esas últimas células, lo cual supondría un nuevo proceso difícil de optimizar. Incluso se podría llevar a cabo con fibroblastos del propio paciente modificados genéticamente, como célula “productora”, ya que son células de relativa fácil obtención en cada individuo, y que suelen transfectarse con bastante facilidad.

Aproximaciones similares a ésta ya se han puesto en práctica en algunos modelos [10, 12, 27]. Finalmente, se añadió un último grupo equivalente al anterior, pero con implantación de tumor B16, en un intento de controlar que la mezcla de las células efectoras con otras células no afectase al rendimiento de las primeras.

Los resultados alcanzados fueron de un 90% de inhibición de crecimiento tumoral en el grupo B16-GM+B7.2/40 frente al tumor B16, alcanzando la significatividad máxima ( $p > 0.001$ ) en los días +17, +19 y +21. Los grupos vacunados con B16-GM+B7.2/80 y B16-GM+B7.2/80 + 3LL, que contaban con la dosis doble de antígeno celular, GM-CSF y B7.2, sorprendentemente lograron eficacias menores, alcanzando ambos alrededor del 60% de inhibición tumoral. De nuevo, como otros autores habían señalado [23, 51, 68, 78-81], estos resultados pueden indicar un exceso de GM-CSF que resulta desventajoso en nuestro sistema.

Esta observación podría verificarse en un experimento de vacunación que explorase el efecto dosis-dependiente de estas células seleccionadas, donde quizá se alcanzaran mejores resultados disminuyendo aún más la dosis de células empleadas. En los últimos años ha habido un gran número de trabajos dedicados a explicar resultados de estas características como fenómenos de inmunosupresión para poder entender este aparente efecto paradójico de ciertas citoquinas, como GM-CSF, que pueden actuar tanto activando el sistema inmune como suprimiéndolo. Discutiremos este punto más adelante. Los resultados de supervivencia se correlacionan con los de inhibición de crecimiento tumoral B16: a pesar de que no se logró supervivencia total en

## Vacunas genéticas contra el melanoma

ningún caso, los mejores resultados se obtuvieron en el grupo B16-GM+B7.2/40, que dobló el tiempo total de supervivencia respecto de su grupo control. Los otros dos grupos con implantación de B16, mostraron resultados de supervivencia diferentes a pesar de que mostraron inhibiciones tumorales sin diferencias significativas entre ellos durante el periodo de medición. El que peor funcionó de los dos fue el que contenía las células 3LL, lo que puede hacer pensar que quizá esas células “extra” generasen una respuesta inmune en exceso que se traduce en fenómenos de supresión frente al tumor B16.

En cuanto al grupo tratado frente al tumor 3LL, B16-GM+B7.2/80 + 3LL, se logró una inhibición del crecimiento tumoral significativa de aproximadamente un 25%, que no fue suficiente para proporcionar ninguna supervivencia diferente del grupo control. El tumor 3LL es muy agresivo y de desarrollo rápido, probablemente ajustando mejor los tiempos y las dosis se podrían obtener mejores resultados en un futuro experimento

Al estudiar la producción de IgG específicas, siempre se encontraron mayores niveles de producción en los grupos tratados respecto a sus controles.

Curiosamente, los grupos con implantación de tumor B16, cuyos resultados fueron algo más exitosos, mostraron valores más elevados tanto de IgG totales como de los subtipos, el día +15, mientras que el grupo con tumor 3LL, con peores resultados, mostró valores más elevados a día -1. Esto podría ser debido a que el tumor 3LL, siendo de desarrollo más rápido que B16, necesitaría otros tiempos de acción y respuesta del sistema inmune, que no logramos con esta vacuna y ello se ve reflejado en un diferente “aspecto” de su producción de inmunoglobulinas. Es decir, hay un switch diferente, que es reflejo de una diferente acción sobre la respuesta inmune y que resulta en una tasa muy diferente de éxito [62].

Aunque los resultados de la vacuna con células seleccionadas no fueron tan prometedores como los de las células no seleccionadas, no se pueden

establecer paralelismos completos sin hacer un estudio dosis dependiente, donde también resultaría de gran utilidad conocer la cantidad exacta de GM-CSF que participa en los animales, mediante estudios de ELISA en muestras de plasma, como sugieren algunos autores [23, 68, 78-81]. No se puede excluir la posibilidad de que la diferencia haya estado marcada por una falta neta de antígeno debida a la reducción en el número de células, aunque los resultados del grupo vacunado con 40.000 células parecen mostrar que no es así. Del mismo modo, tampoco podemos excluir que este resultado sea debido a un exceso de GM-CSF, como ya se ha apuntado. Futuros experimentos considerando estas posibilidades ayudarán a esclarecer las necesidades de cada componente para optimizar una vacuna con aplicación clínica.

### *Vacunas Terapéuticas*

Una vez alcanzado el éxito con las vacunas preventivas (prevención total de la aparición de tumor en animales vacunados), el siguiente paso consistía en enfrentarse a un modelo más parecido a la situación real de la práctica clínica, la vacuna terapéutica. No es frecuente que existan protocolos de vacunación preventiva para los tumores, entre otras causas, porque los riesgos poblacionales son difíciles de estimar y los gastos serían muy elevados, pero lo que sí sucede a diario es enfrentarse al tratamiento de un paciente que acude a la consulta siendo ya portador de un tumor. Estas vacunas son una aproximación a los tratamientos que habría que proporcionar cuando el tumor ya está presente, y es por lo tanto mucho más difícil de vencer.

En nuestro afán por delimitar adecuadamente el potencial de los plásmidos con los que trabajamos, así como las citoquinas GM-CSF e IL-12 y sus combinaciones, decidimos llevar a cabo una nueva exploración, sin contar con

## Vacunas genéticas contra el melanoma

la parte antigénica, es decir, sin las células. Únicamente con los plásmidos desnudos, para no tener otros efectores en el sistema que pudieran enmascarar el potencial de estos genes. El modelo hidrodinámico nos ofreció esta oportunidad y fue empleado en unas condiciones bastante difíciles, ya que se testó en un modelo terapéutico, y no preventivo, que se inició con un número de células tumorales elevado, 100.000 células B16 tipo salvaje, en lugar de 20.000, como se usó en el resto de vacunas terapéuticas. Los ELISAS realizados sobre las muestras de plasma mostraron un comportamiento diferencial entre los plásmidos p2F *m-gmcsf* y pMok *m-gmcsf*, donde, al contrario de lo que sucede *in vitro*, parece que *in vivo* es el plásmido p2F el que consigue mayores niveles de expresión de la citoquina. Curiosamente, como ya hemos venido remarcando en las vacunas anteriores, los resultados de inhibición frente al crecimiento del tumor B16 fueron inversamente proporcionales a la cantidad de GM-CSF que generaba la transfección de los plásmidos. Así el tratamiento más exitoso fue el del plásmido que combinaba GM-CSF e IL-12, que es a su vez, el plásmido que alcanza menor producción de GM-CSF en los animales a partir de la segunda dosis hidrodinámica, de entre los tres productores de la citoquina. Le sigue en eficacia, aunque sin diferencia suficiente para ser estadísticamente significativa, pMok y finalmente p2F *m-gmcsf*, el que mayor expresión del transgén alcanzó.

### *Vacunas celulares terapéuticas*

Con los resultados obtenidos hasta el momento, quisimos comenzar los experimentos de vacunación terapéutica con células transfectadas, manteniendo no sólo el estudio con GM-CSF sino también el de sus combinaciones con IL-12 y con B7.2, ya que tanto una molécula como otra habían mostrado posibles efectos ventajosos en uno u otro modelo. El primer experimento se realizó implantando 20.000 células B16 salvajes en la pata izquierda de los animales, el día 0, continuando con tres dosis de vacuna, los días + 3, 10 y 17, que fueron de 0.5 o de 2 millones de células. Todos los grupos mostraron en este caso la máxima diferencia estadística

respecto al grupo control, siendo los grupos B16-GM+B7.2/2 y B16-GM+IL12/2 los que mayor inhibición del crecimiento tumoral lograron aparentemente. Sin embargo no hubo diferencias estadísticas reales entre los últimos cinco grupos del gráfico (B16-GM, B16-GM+IL12, B16-GM+B7.2; a dosis de 0.5 y 2 millones de células).

Los grupos que obtuvieron los mejores resultados de inhibición del crecimiento tumoral (hasta un 80% respecto al grupo control) consiguieron también una diferencia significativa en la supervivencia de los animales (B16-GM+B7.2/2 y B16-GM+IL12/2) no siendo así en los demás casos. Aún así, y siendo mejores los resultados de supervivencia en los grupos tratados con 2 millones de células, en ningún caso se logró una supervivencia total.

Estos resultados y el hecho de que otros grupos de tratamiento estuviesen cerca de lograr la significatividad, nos hizo pensar de nuevo que quizá la respuesta provocada por la vacuna estaba siendo frenada por algún sistema que inhibía la respuesta inmune. Muchos han sido los estudios publicados a este respecto en los últimos años [27, 37, 38, 39-51], con los que se ha llegado a definir un grupo de nuevos protagonistas que podrían ser los implicados en este tipo de fenómenos: las células T reguladoras o inmunosupresoras. Según estos estudios, las células Treg, que tienen su papel fisiológico normal como mantenedoras de la tolerancia inmune a los antígenos propios, se expandirían de forma anormal en ciertos estadios del cáncer, favoreciendo el escape al sistema inmune por parte de las células tumorales, mediante la inhibición de los procesos de reconocimiento y/o ataque a las células cancerosas. Por lo tanto, la depleción de estas células en el estudio del cáncer se ha convertido en un tema de gran interés. Aquí es donde entra en juego la ciclofosfamida, un agente antineoplásico que se viene utilizando en vacunas ya desde los años 70 [47] y que sigue en uso en nuestros días. Muchos agentes antineoplásicos poseen inherentes funciones inmunomoduladoras además de su capacidad para causar linfopenia. El más usado es la ciclofosfamida [27, 40], con innumerables estudios de laboratorio en los que se ha usado previamente a una vacunación. El pretratamiento con este agente depleciona no sólo la

## Vacunas genéticas contra el melanoma

población de células T supresoras sino todo el compartimento linfoide, por lo que permite una proliferación diferencial de células T antígeno-específicas en respuesta a una exposición a ese antígeno [40].

En un intento por aumentar la eficacia de las vacunas, evitando la limitación que supone la tolerancia creada, se ha optado en muchos trabajos por deplecionar de forma inespecífica, con ciclofosfamida, o selectiva, con anticuerpos monoclonales específicos (anti CD25 [82-84], anti GITR [85], anti CTLA4 [86]) las células Treg en numerosos modelos tumorales. Estas estrategias también se han trasladado a humanos, donde además se ha sintetizado un compuesto específico para la depleción selectiva de las Treg humanas, el ONTAK (Dinileukin difitox), un conjugado de la toxina diftérica e IL-2 (CD25 es parte del receptor de IL-2) [44, 45]. Sin embargo, los intentos de depleción, no sólo con antineoplásicos como la ciclofosfamida, sino también con anticuerpos específicos, incluido el ONTAK, no siempre han logrado la depleción total y los resultados finales frente al cáncer son ambiguos [37, 44, 45] por lo que todavía queda mucho por investigar en este campo.

A la vista de toda esta información, decidimos abordar un experimento de tratamiento con la dosis que mejor resultado nos había proporcionado (2 millones de células B16 transfectadas) pero además con una inyección de ciclofosfamida, en un intento de desbloquear la posible tolerancia que se hubiese generado frente a las células tumorales, para lograr así una mejor respuesta antitumoral con la vacuna. Al ser un estudio de aproximación a un nuevo modelo, trabajamos solamente con los grupos control necesarios y como tratamiento, únicamente con B16-GMCSF. Para nuestra sorpresa, los mejores resultados de inhibición tumoral se alcanzaron tratando sólo con ciclofosfamida, logrando una inhibición de al menos un 50% en el crecimiento tumoral. El grupo tratado con ciclofosfamida + B16-GMCSF, por su parte, se diferenció de ciclofosfamida + B16-p2F $\emptyset$  (excepto en el último día de medición) y también significativamente respecto del control, pero su

respuesta fue significativamente peor que la de la ciclofosfamida sola, y además los resultados fueron peores si los comparamos con los valores de inhibición tumoral logrados en el experimento anterior con la células B16-GMCSF solas (donde se alcanzó más del 50% de inhibición). En el estudio de supervivencia, ningún grupo se diferenció del control y se comportaron de forma similar. El estudio de IgG muestra que realmente la ciclofosfamida ha funcionado de manera aislada, ya que la producción de IgG que desencadena es bajísima, prácticamente igual a la del grupo control, no tratado. Sin embargo, al combinarla con las células, se han obtenido respuestas de IgG más elevadas, que además son predominantemente de tipo IgG1 con B16-GMCSF y de tipo IgG2a con B16-p2FØ, sobretodo tras la tercera dosis de vacunación.

Estos resultados, aparentemente contradictorios, ya han sido explorados por otros grupos, tanto en modelos animales como en algunos recientes ensayos clínicos como el de M-Vax [34, 39, 46, 87] y parecen explicarse por la crítica importancia de la administración de la ciclofosfamida en relación al momento de exposición al antígeno: mientras que en modelos pre-vacuna, la administración de la ciclofosfamida potenció la inmunidad antitumoral, la administración post-vacuna la abrogó. Cómo trasladar estos hallazgos a los modelos de vacuna terapéutica es todavía difícil, ya que siguen apareciendo resultados contradictorios en la literatura, incluso en los casos de depleción selectiva con anticuerpos específicos. Los datos publicados son un verdadero maremagno de éxitos y fracasos, que aún así, no dejan de sugerir que las células reguladoras, de uno u otro tipo, son un elemento clave en la lucha antitumoral, cuyo estudio y comprensión se hace cada día más necesario [27, 37, 38].

A la vista de toda esta información, quisimos realizar un último estudio que, de forma también preliminar, nos acercase un poco más a la comprensión de estos fenómenos inmunosupresores en nuestro modelo, para poder diseñar en el futuro una vacuna terapéutica preparada para superar este escollo. Para ello

## Vacunas genéticas contra el melanoma

diseñamos una vacunación terapéutica siguiendo el mismo modelo del primer experimento pero con una dosis de 8 millones de células. Con esta dosis comprobaríamos, por un lado, si nuestro problema de éxito residía en una falta de dosis, bien de antígeno, bien de citoquinas; o por otro lado, si por el contrario, esta dosis elevada resultaba tóxica, nos serviría para comprobar si realmente eran las células Treg las que estaban implicadas en la inhibición de la respuesta en el modelo, mediante un estudio con microscopía confocal. Según los resultados obtenidos, la segunda opción planteada parecía ser la correcta: los resultados de inhibición tumoral fueron inferiores con 8 millones de células respecto a los obtenidos con 2 millones. No hubo ninguna diferencia estadística en cuanto a supervivencia respecto al grupo control y los resultados de producción de IgG específicas, volvían a ser de difícil correlación con el resto de resultados.

Con las muestras de sangre recogidas en los días habituales para medición de IgG, procedimos al estudio por microscopía confocal de células Treg. Tras recoger los linfocitos y proceder al marcaje de los mismos, estos fueron inspeccionados, se obtuvieron las imágenes de microscopía, se procesaron y se realizó todo el proceso de conteo y estadística para analizar los datos.

El gran volumen de resultados obtenidos nos llevó a dos conclusiones principales, centrándonos en los tipos de células reguladoras. La primera conclusión fue que, aparentemente, no son las células Treg clásicas ( $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ ) las que ven variar sus porcentajes en nuestro modelo. Por el contrario, ningún grupo se diferenció de los grupos control (Control, B16\*, B16-p2FØ) en el análisis de ninguna de las tres tomas de sangre (1 toma tras cada dosis de vacunación). Únicamente parece haber una tendencia a la activación de esta ruta en los grupos que contienen IL-12, bajo los datos de % de Treg clásicas sobre el total de  $CD4^+$ .

La segunda conclusión fue que las células visualizadas en el experimento con marcaje  $CD4^- CD25^+ Foxp3^+$ , sí muestran unos porcentajes diferenciables entre los distintos grupos, apareciendo especialmente en mayor proporción en los grupos B16-GMCSF, B16-B7.2 y B16-GM+B7.2, con diferencias

significativas respecto a los demás grupos. Parece mostrarse una tendencia de GM-CSF a provocar el aumento en esta población celular de forma más temprana (en la toma 2 presenta significatividad máxima frente al grupo Control), mientras que B7.2 lo hace de forma más tardía y suave (significatividad media en toma 3 respecto a Control) y al unir GM-CSF + B7.2, la influencia de GM-CSF hace que entonces, con la mitad de GM-CSF, se consiga significatividad en la toma 2 y significatividad máxima en la toma 3. Este tipo de células podría pertenecer al subconjunto de células T reguladoras CD8<sup>+</sup> [37], o bien a otro tipo de poblaciones reguladoras como por ejemplo las células mieloides supresoras que proponen varios grupos, especialmente el de Iván Borrello [49, 50, 51, 80, 81]. Para definir correctamente esta población sería necesario realizar nuevos experimentos centrándonos en otros tipos de marcaje que nos ayudaran a identificar claramente esta población que parece ser la responsable de los fenómenos supresores en nuestro modelo.

#### *Futuro de nuestros experimentos*

A día de hoy, ya estamos trabajando en la continuidad de los experimentos que forman parte de esta tesis doctoral.

En el ámbito de las vacunas preventivas, pretendemos mejorar el rendimiento de purificación de células seleccionadas, para lograr reducir el número de células necesarias que logre la eficacia máxima que se alcanzó con 200.000 células no seleccionadas. Para ello, tratamos de conseguir una construcción plasmídica que permita la expresión de B7.2 de forma más eficiente y así mejorar el rendimiento de purificación de las células. Además, el ajuste del protocolo de separación en el Automacs, será de vital importancia.

En el ámbito de las vacunas terapéuticas, nuestra siguiente meta pretende combinar estrategias de depleción de diferentes tipos de células reguladoras. De este modo, estamos preparando la cantidad necesaria de anticuerpo monoclonal para la depleción selectiva de las Treg clásicas. Este anticuerpo se

## Vacunas genéticas contra el melanoma

está obteniendo a partir del cultivo de una hibridoma productor del anticuerpo, lo que resulta una tarea lenta de acumulación, cuyo producto además, purificamos posteriormente por cromatografía y analizamos por proteómica. Una vez obtengamos la cantidad suficiente, testaremos este producto en nuestro modelo de vacuna terapéutica celular, con nuestras combinaciones de GM-CSF, IL-12 y B7.2, pero además investigaremos otra de las vías de supresión, la del linaje mielóide, con un bloqueo del mismo mediante sildenafil (Viagra<sup>®</sup>), como ya ha sido publicado [50]. Así, esperamos confirmar cuál es la ruta de bloqueo de nuestro modelo y si es posible, esperamos sobrepasarla.

No cabe duda de que la multimodalidad, el uso combinado de diferentes estrategias inmunoterapéuticas complementarias, es la mejor arma con la que contamos hoy en día en la lucha contra el cáncer. Como en cualquier campo de la ciencia, no podemos mirar en una sola dirección, debemos abrir nuestro campo de visión a otras herramientas que nos ayuden e integrar los conocimientos de diferentes ámbitos para llegar a una buena Ciencia.

## CONCLUSIONES

1- La eficacia de la vacunación preventiva antitumoral con antígenos depende de la secuencia de administración de los componentes. En nuestro modelo, mediante la inversión de la secuencia clásica, administrando en primer lugar el antígeno y posteriormente transfectando con acondicionamiento genético tisular *gm-csf* (a dosis 10 $\mu$ g) se ha logrado reducir el crecimiento tumoral en un 70%.

2- En la vacunación preventiva antitumoral con células modificadas genéticamente se alcanzó el máximo éxito: 100% de supervivencia de los animales vacunados con células no seleccionadas productoras de GM-CSF. Esta vacunación con un número reducido de células (200.000), generó una potente memoria inmunológica que permitió que una dosis de recuerdo un año después, fuese suficiente para proteger a los mismos animales frente a una segunda exposición al tumor.

3- Utilizando plásmidos bicistrónicos, las células transfectadas son susceptibles de selección y purificación en base a la expresión del gen *m-B7.2*. Lo que permite reducir significativamente el número de células necesarias para la vacunación. Así, en la vacuna preventiva antitumoral, la dosis de 40.000 células medió un 90% de inhibición de crecimiento tumoral e incrementos significativos de supervivencia, aunque este procedimiento debe ser perfeccionado.

4- En la vacunación terapéutica antitumoral con células modificadas genéticamente se alcanzan inhibiciones del crecimiento tumoral del 50%, tratando a los animales con células productoras de GM-CSF no seleccionadas. La limitación de la eficacia terapéutica antitumoral probablemente sea debida a mecanismos inmunosupresores desencadenados por la implantación del tumor. En nuestro caso, las

## Vacunas genéticas contra el melanoma

células T reguladoras clásicas no parecen desempeñar un papel relevante y sin embargo observamos otra población, Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, que podría estar implicada y cuyo significado funcional está por clarificar.

**BIBLIOGRAFÍA**

- 1- Li Z. et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*, 2002 296:497
- 2- Hacein-Bey-Abina S. et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*, 2003 Jan 16; 348:2
- 3- Cavazzana-Calvo M. et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 2000 288:669-72
- 4- Kustikova OS. et al. Retroviral vectors insertion sites associated with dominant hematopoietic clones mark “stemness” pathways. *Blood*, 2007 109:1897-907
- 5- Baum C. Insertional mutagenesis in gene therapy and stem cell biology. *Curr. Opin. Hematol.*, 2007 14:337-42
- 6- Thornhill SI. et al. Self inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Mol. Ther.*, 2008 16:590-8
- 7- Almarza E. et al. Characteristics of lentiviral vectors harboring the proximal promoter of the vav proto-oncogen: a weak and efficient promoter for gene therapy. *Mol. Ther.*, 2007 15:1487-94.
- 8- Cattoglio C. et al. Hotspots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood*, 2007 110:1704
- 9- Gene therapy clinical trials worldwide.  
[www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical](http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical)
- 10- Simon J. Hall et al. *An Introduction to Molecular Medicine and Gene Therapy*.  
Chapter 10: Gene therapy in the treatment of cancer; Edited by Thomas F. Kresina. 2001 Wiley-Liss, Inc.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

**11-** Brostoff, Male, Roitt. Inmunología. Capítulo 20: Inmunología tumoral. 4ª ed, 1997, Harcourt Brace

**12-** Dranoff, G. Cancer Vaccines 2001.

<http://pco.ovid.com/lrpbooks/ccbi/textbook/chapters/ch0033.htm>

**13-** Botella R., Moret I. et al. Vacunas celulares en el Melanoma Obtenidas Mediante Terapia Génica: Experiencia y Perspectivas. Oncología, 2001; 24 (6): 313-3

**14-** Shi F.S., S. Weber, J. Gan, A. Rakhmievich, D. M. Mahvi. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF. Cancer Gene Therapy, 1999, Vol 6, 81-88.

**15-** Schneeberger A, Luhrs P, Kutil R et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-based melanoma cell vaccines immunize syngeneic and allogeneic recipients via host dendritic cells. J Immunol 2003; 171:5180-7

**16-** Soiffer R, Lynch T, Mihm M et al. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95:13141-6.

**17-** Luiten RM, Kueter EW, Mooi W et al. Immunogenicity, including vitiligo, and feasibility of vaccination with autologous GM-CSF-transduced tumor cells in metastatic melanoma patients. J Clin Oncol 2005; 23:8978-91.

**18-** Moller P, Moller H, Sun Y et al. Increased non-major histocompatibility complex-restricted lytic activity in melanoma patients vaccinated with cytokine gene-transferred autologous tumor cells. Cancer Gene Ther 2000;7:976-84.

**19-** Sun Y, Jurgovsky K, Moller P et al. Vaccination with IL-12 gene-modified autologous melanoma cells: preclinical results and a first clinical phase I study. Gene Ther 1998;5:481-90.

- 20-** Schreiber S, Kampgen E, Wagner E et al. Immunotherapy of metastatic malignant melanoma by a vaccine consisting of autologous interleukin 2-transfected cancer cells: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 1999;10:983-93
- 21-** Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D et al. A phase I clinical trial of immunotherapy with interferon-gamma gene-modified autologous melanoma cells: monitoring the humoral immune response. *Cancer* 1997; 80:401-12
- 22-** Berinstein NL. Enhancing cancer vaccines with immunomodulators. *Vaccine*, 2007: B72-B88.
- 23-** Borrello I and Pardoll D. GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2002; 13:185-93.
- 24-** Jaffee E.M., Abrams R, Cameron J et al. A phase I clinical trial of lethally irradiated allogeneic pancreatic tumor cells transfected with the GM-CSF gene for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Human Gene Therapy*, 1998, 9, 1951-1971.
- 25-** Ojima T, Iwahashi M, Nakamura M et al. The boosting effect of co-transduction with cytokine genes on cancer vaccine therapy using genetically modified dendritic cells expressing tumor-associated antigen. *Int J Oncol* 2006; 28:947-53.
- 26-** Hansson L, Abdalla AO, Moshfegh A et al. Long-term idiotype vaccination combined with IL-12, or IL-12 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor, in early-stage multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res*, 2007; 13:1503-10.
- 27-** Terando AM. Et al. Vaccine therapy for melanoma: current status and future directions. *Vaccine*, 2007 25:B4-B16.
- 28-** Chong H, Todryk S et al. 1998. Tumor cell expression of B7 costimulatory molecules and interleukin-12 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces a local antitumor response and may generate systemic protective immunity. *Gene Therapy*, 5: 223-232.

- 29-** Kim k-Y, Kang M-A, Nam M-J. 2001. Enhancement of natural killer cell-mediated cytotoxicity by coexpression of GM-CSF/B70 in hepatoma. *Cancer Letters*, 166: 33-40.
- 30-** Mukherjee S, Nelson D, et al. 2001. The immune anti-tumor effects of GM-CSF and B7-1 gene transfection are enhanced by surgical debulking of tumor. *Cancer Gene Therapy*, 8: 580-588.
- 31-** Parney IF, Farr-Jones MA et al. 2002. Human autologous in vitro models of glioma immunogene therapy using B7-2, GM-CSF and IL-12. *Can J Neurol Sci*, 29: 267-275.
- 32-** Zajac P, Oertli W et al. 2003. Phase I/II Clinical trial of a nonreplicative vaccinia virus expressing multiple HLA-A0201-restricted tumor-associated epitopes and costimulatory molecules in metastatic melanoma patients. *Human Gene Therapy*, 14: 1497-1510.
- 33-** Pizzoferrato E. 2004. B7-2 expression above a threshold elicits anti-tumor immunity as effective as interleukin-12 and prolongs survival in murine B-cell lymphoma. *Int J Cancer*, 110: 61-69.
- 34-** Berd D, Maguire Jr HC, Mastrangelo MJ. Induction of cell-mediated immunity to autologous melanoma cells and regression of metastases after treatment with a melanoma cell vaccine preceded by cyclophosphamide. *Cancer Res*, 1986;46:2572-7.
- 35-** Mitchell MS, Kan-Mitchell J, Kempf RA et al. Active specific immunotherapy for melanoma: phase I trial of allogeneic lysates and a novel adjuvant. *Cancer Res*, 1988; 48:5883-93.
- 36-** Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and IL-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*, 1998; 319: 1676-80.
- 37-** Zou W. 2006. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6: 295-307.
- 38-** De Visser K, Eichten A, Coussens L. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6: 24-37

- 39-** Berd D, Mastrangelo MJ. Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: depletion of CD4+, 2H4+ suppressor-inducer T-cells. *Cancer Res*, 1988; 48: 1671-75.
- 40-** Terando A and Mulé JJ. On combining antineoplastic drugs with tumor vaccines. *Cancer Immunol Immunother*, 2003; 52: 680-5.
- 41-** Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ et al. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100:4712-7.
- 42-** Shimizu J, Yamazaki S and Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*, 1999; 163:5211-8.
- 43-** Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25+ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*, 2001; 194: 823-32.
- 44-** Attia P, Maker AV, Haworth LR et al. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL2-ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother*, 2005; 28: 582-92.
- 45-** Dannull J, Su Z, Rizzieri D et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*, 2005; 115:3623-33.
- 46-** Berd D, Maguire Jr HC, Mastrangelo MJ. Potentiation of human cell-mediated and humoral immunity by low-dose cyclophosphamide. *Cancer Res*, 1984; 44: 5439-43.
- 47-** Polak L, Geleick H, Turk JL. Reversal by cyclophosphamide of tolerance in contact sensitization. Tolerance induced by prior feeding with DNCB. *Immunology*, 1975; 28: 939-42.

- 48-** Luznik L, Slansky JE, Jalla S et al. Successful therapy of metastatic cancer using tumor vaccines in mixed allogeneic bone marrow chimeras. *Blood*, 2003; 101: 1645-1652.
- 49-** Horna P, Cuenca A, Fengdong C, et al. In vivo disruption of tolerogenic cross-presentation mechanisms uncovers an effective T-cell activation by B-cell lymphomas leading to antitumor immunity. *Blood*, 2006; 107:2871-2878.
- 50-** Serafini P, Meckel K, Kelso M, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of Experimental Medicine*, 2006; 203: 2691-2702
- 51-** Serafini P, Borrello I, Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in Cancer Biology*, 2006; 16:53-65.
- 52-** [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)
- 53-** Moret-Tatay et al. 2003. Complete tumor prevention by engineered tumor cell vaccines employing nonviral vectors. *Cancer Gene therapy*, 10: 887-897.
- 54-** Botella R et al. Antitumor effect of B16 melanoma cells genetically modified with the angiogenesis inhibitor RNasin. *Cancer Gene Ther*, 2001; 8: 278-84.
- 55-** Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem*. 1981, 25, 1604-1607.
- 56-** Guillem VM & Aliño SF. Transfection pathways of nonspecific and targeted PEI-polyplexes. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 2004, Vol 8, 369-384.
- 57-** Walde P & Ichikawa S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular Engineering*, 2001, 18, 143-177.
- 58-** Moret I, Peris JE, Guillem VM, Benet M, Revert F, Dasí F, Crespo A, Aliño SF. Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum. *Journal of controlled Release*, 2001, 76, 169-181.

- 59-** Massó O, Aliño SF et al. Specific serological response by active immunization with GD3-bearing liposomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996, 278(3), 1114-1120.
- 60-** Guillem VM, Tormo M, et al. Targeted oligonucleotide delivery in human lymphoma cell lines using a polyethyleneimine based immunopolyplex. *Journal of controlled release*, 2002, 83, 133-146.
- 61-** Aliño SF, Lejarreta M et al. Antimetastatic effect of immunization with liposome-encapsulated tumor cell-membrane proteins obtained from experimental tumors. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 1995, 17 (3), 419-436.
- 62-** Herrero MJ, Botella R, Dasí F, Algás R, Sánchez M, Aliño SF. Antigens and cytokine genes in antitumor vaccines: the importance of the temporal delivery sequence in antitumor signals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006, 1091, 412-424.
- 63-** Botella-Estrada R., F.Dasí, D. Ramos, E. Nagore, MJ. Herrero, J. Giménez, C. Fuster, O. Sanmartín, C. Guillén, S.F. Aliño. Cytokine expression and dendritic cell density in melanoma sentinel nodes. *Melanoma Research*, 2005, Abril, 99-106.
- 64-** Crespo A, Peydró A, Dasí F, Benet M, Calvete JJ, revert F, Aliño SF. Hydrodynamic liver gene transfer involves transient sinusoidal blood stasis and massive hepatocyte endocytic vesicles. *Gene Ther*, 2005; 12: 927-35
- 65-** Aliño SF, Herrero MJ, Noguera I, Dasí F, Sánchez M. Pig liver gene therapy by noninvasive interventionist catheterism. *Gene Ther*, 2007; 14: 334-43.
- 66-** Herrero MJ, Dasí F, Noguera I, Sánchez M, Moret I, Sanmartín I, Aliño SF. Mouse & pig nonviral liver gene therapy: success and trials. *Gene Ther and Mol Biol* 2005;9:169-80.
- 67-** Herrero MJ, Botella R, Algás R, et al. 2008. Nonviral cancer vaccines: from free antigens to engineered cells. In Gustafsson WB ed. *New gene therapy and cancer research*. New York: Nova Publishers.

## Vacunas genéticas contra el melanoma

- 68-** Serafini P, Carbley R, Noonan KA et al. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res*, 2004; 64: 6337-6343.
- 69-** Dunussi-Joannopoulos K, Dranoff G et al. Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines. *Blood*, 1998, Vol 91, No 1, 222-230.
- 70-** Moret-Tatay I, Sanmartín I, Marco FM, et al. Nonviral therapeutic cell vaccine mediates potent antitumor effects. *Vaccine*, 2006; 24: 3937-3945.
- 71-** Herrero MJ, Botella R, Algás R, Marco FM, Aliño SF. Bead-selected antitumor genetic cell vaccines. *Clinical Medicine: Oncology*, 2008; 2: 257-265.
- 72-** Bettinotti MP, Panelli MC, Ruppe E et al. Clinical and immunological evaluation of patients with metastatic melanoma undergoing immunization with the HLA-Cw\*0702-associated epitope MAGE-A12:170-178. *Int J Cancer*, 2003; 105: 210-6
- 73-** Pullarkat V, Lee PP, Scotland R et al. *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 1301-12.
- 74-** Phan GQ, Touloukian CE, Yang JC et al. Immunization of patients with metastatic melanoma using both class I- and class II-restricted peptides from melanoma-associated antigens. *J Immunother*, 2003; 26: 349-56.
- 75-** Rafiee M, Kanwar JR, Berg RW et al. Induction of systemic antitumor immunity by gene transfer of mammalian heat shock protein 70.1 into tumors in situ. *Cancer Gene Ther*, 2001; 8: 974-981.
- 76-** Castelli C, Ciupitu AM, Rini F et al. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res*, 2001; 61: 222-7.
- 77-** Janetzki S, Palla D, Rosenhauer V et al. Immunization of cancer patients with autologous cancer-derived heat shock protein gp96 preparations: a pilot study. *Int J Cancer*, 2000; 88: 232-8.

- 78-** Rodríguez-Lecompte JC, Kruth S et al. Cell-based cancer gene therapy: breaking tolerance or inducing autoimmunity? *Anim Health Res Rev.*, 2004; 5: 227-234
- 79-** Parmiani G, Castelli C, Pilla L. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Ann Oncol*, 2007; 18: 226-32.
- 80-** Frey AB. Myeloid suppressor cells regulate the adaptive immune response to cancer. *J Clin Invest*, 2006. 116:2587-90.
- 81-** Filipazzi P, Valenti R, Huber V et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a GM-CSF-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol*, 2007; 25: 2546-53.
- 82-** Onizuka S et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor  $\alpha$ ) monoclonal antibody. *Cancer Res*, 1999; 59: 3128-3133.
- 83-** Steitz J, Bruck J, Lenz J et al. Depletion of CD4+CD25+ T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the IFN  $\alpha$ -induced CD8+ T cell dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res*, 2001; 61: 8643-8646.
- 84-** Nagai H et al. In vivo elimination of CD25+ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with IL-12 gene transfer. *Exp Dermatol*, 2004; 13: 613-20.
- 85-** Shimizu et al. Stimulation of CD4+CD25+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature Immunol*, 2002; 3: 135-142.
- 86-** Leach DR, Krummel MF and Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 1996; 271: 1734-1736.
- 87-** Machiels JP et al. Cyclophosphamide, doxorubicin and paclitaxel enhance the antitumor response of GM-CSF-secreting whole cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res*, 2001; 61: 3689-97.

## Bead-Selected Antitumor Genetic Cell Vaccines

Herrero MJ<sup>1</sup>, Botella R<sup>2</sup>, Algás R<sup>3</sup>, Marco FM<sup>4</sup> and Aliño SF<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gene Therapy Group, Dpto. Farmacología, Fac. Medicina, Univ.Valencia, Valencia, España.

<sup>2</sup>Servicio Dermatología, Instituto Valenciano Oncología, Valencia, España. <sup>3</sup>Servicio Radioterapia, Hospital Clínico Universitario, Valencia, España. <sup>4</sup>ASAC Pharmaceutical International, Alicante, España.

**Abstract:** Cancer vaccines have always been in the scope of gene therapy research. One of the most successful approaches has been working with genetically modified tumor cells. However, to become a clinical reality, tumor cells must suffer a long and risky process from the extraction from the patient to the reimplantation as a vaccine. In this work, we explain our group's approach to reduce the cell number required to achieve an immune response against a melanoma murine model, employing bead-selected B16 tumor cells expressing GM-CSF and B7.2.

**Keywords:** cancer vaccines, gene therapy, bead selection, GM-CSF, B7.2

### Introduction

Genetically modified tumor cells are a very interesting approach with high potential in the field of cancer vaccines (Dunussi-Joannopoulos et al. 1998; Kim et al. 2000; Mastrangelo and Lattime, 2002). In order to fight any type of cancer, the most reasonable strategy seems to be the use of the same tumor cells that we want to eliminate. Indeed, the transfection of these cells with immune-stimulating molecules as the cytokine GM-CSF (granulocyte and macrophage colony stimulating factor) has also been employed (Dunussi-Joannopoulos et al. 1998; Jaffee et al. 1998; Shi et al. 1999; Borrello and Pardoll, 2002; Moret-Tatay et al. 2003; Serafini et al. 2004; Herrero et al. 2006; Moret-Tatay et al. 2006). However the signalling pathways of the immune system are very complex and in the last few years many studies have tested different combinations of cytokines with other molecules in order to improve antigen presentation, as for instance the membrane surface costimulatory molecule B7.2 (Chong et al. 1998; Kim, 2001; Mukherjee et al. 2001; Parney et al. 2002; Zajac et al. 2003; Pizzoferrato, 2004).

Working with autologous tumor cells to prepare an antitumor vaccine is quite a difficult task, since usually there are several critical stages to overcome: extracting cells from the patient, genetically modifying the cells, keep them in culture safely and expand them to the desired amount to ensure sufficient antigen and transgene for the treatment to work. For all these reasons, minimizing the quantity of tumor cells required in cancer vaccines is a great challenge (Farray and Clark, 2006; Herrero et al. 2006; Copier et al. 2007; Herrero et al. 2008).

In this technical note we describe the tumor cell vaccine approach of our group employing magnetic bead selection of nonviral transfected tumor cells. We have previously achieved total survival of B16 melanoma-bearing mice in a preventive vaccine model using freshly GM-CSF transfected (non-selected) B16 cells (Moret-Tatay et al. 2003; Herrero et al. 2006; Herrero et al. 2008). Now we wanted to take advantage of the fact that membrane surface B7.2 molecule has also already demonstrated its usefulness in some antitumor vaccine models. We therefore transfected B16 cells with a bicistronic plasmid containing both *m-gmcsf* and *m-B7.2* genes. Thus, we expect that the truly transfected cells, expressing B7.2 on their surface, would also express GM-CSF. This would allow bead selection of the B7.2 transfected cells from the heterogeneous population of transfected and non-transfected cells following a usual transfection procedure. With this new approach, we could study the possibility of reducing the number of cells required for a successful antitumor vaccine.

**Correspondence:** María Jose Herrero Cervera, Dpto. Farmacología, Fac. Medicina, Univ. Valencia. Av. Blasco Ibañez, 15. 46010 Valencia. España. Tel: 0034963864621; Email: maria.jose.herrero@uv.es



Copyright in this article, its metadata, and any supplementary data is held by its author or authors. It is published under the Creative Commons Attribution By licence. For further information go to: <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

## Materials and Methods

### Plasmids

The p2F m-gmcsf+m-B7.2 plasmid was derived from the pVITRO2 base plasmid (Invivogen, Toulouse, France), with the *m-gmcsf* plus *m-B7.2* genes. pVITRO2 allows the coexpression of two genes and contains two human ferritin composite promoters, FerH (heavy chain) and FerL (light chain), combined to the SV40 and CMV enhancers respectively, and the resistance gene to hygromycin.

All plasmids were amplified in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , in selective LB broth (Pronadisa, Madrid, Spain) and extracted with the Qiagen Giga Endo-free kit (Izasa SA, Barcelona, Spain), quantified by spectrophotometry and tested by electrophoresis to confirm their integrity and purity.

### Cells and transfection procedure

B16 murine melanoma cells have been used in all of the experiments. These cells are syngeneic with the animals used for vaccination, i.e. C57BL/6 mice (Harlan, Gannat, France).

B16 cells are adherent cells that are grown in flasks with DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma, Madrid, Spain), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biomedica, Boussens, France), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml). The cells are cultured in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C, and are detached from the flasks with Trypsin-EDTA.

Lewis lung carcinoma, 3LL, cells were also employed, cultured under the same conditions as described.

The B16 cells employed for the vaccines were transfected by means of a chemical procedure based on PEI 25 KDa (polyethyleneimine. Sigma, Madrid, Spain) polyplexes (DNA:PEI, 1:1.41) with 20  $\mu$ g/ml p2F plasmids, as previously described (Moret-Tatay et al. 2003; Guillem and Aliño, 2004; Herrero et al. 2006; Moret-Tatay et al. 2006). The transfection percentage with this method lies between 20%–40% of total cells (data not shown), as observed using the reporter EGFP gene. Cells were transfected when more than 80% confluence was reached in their flasks. Tumor cells were irradiated 72 hours post-transfection with 150 Gy, and then frozen in DMSO 5% in FBS and kept at –80 or –150 °C until use.

3LL cells employed as vaccine were irradiated with 50 Gy dose.

### ELISA of m-GMCSF

GM-CSF production of the transfected B16 cells is determined by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), performed on supernatant samples of the culture media taken 72 hours post-transfection and prior to cell detachment and irradiation, having changed the media every 24 hours. The BD OptEIA ELISA kit for m-GMCSF (Pharmingen, BD Biosciences, Madrid, Spain) was used. The time-point of 72 hours was chosen on the basis of prior experimental results, assessed to study cytokine production over time, and using the referred transfection conditions (Moret-Tatay et al. 2003; Guillem and Aliño, 2004; Herrero et al. 2006; Moret-Tatay et al. 2006), in order to achieve adequate production according to the literature (Borrello and Pardoll, 2002, Serafini et al. 2004).

### Cytometry of m-B7.2 expression

Flow cytometry was performed to confirm the presence of m-B7.2 on the surface of the transfected cells. At 72 h post-transfection, cells were harvested and pelleted in aliquots of 500,000 cells, washed and incubated in ice for at least 30 min. in 200  $\mu$ l PBS-FBS (2.5%) -azide (0.01%) solution of primary antibody (1  $\mu$ g/million cells of biotin-conjugated rat anti-mouse CD86 monoclonal antibody (Pharmingen, BD, Madrid, Spain). Then, cells were washed twice in 1 ml PBS-azide and incubated in ice and darkness with the secondary antibody (0.5  $\mu$ g/million cells): Streptavidin-Fluorescein Isothiocyanate Conjugate (FITC) (Pharmingen, BD, Madrid, Spain).

Finally, cells were washed twice and resuspended in 500  $\mu$ l PBS to be passed through the cytometer (Coulter Epics, XL; Beckman Coulter, Madrid, Spain) in order to analyze fluorescence in the populations, to discriminate the truly transfected cells. To avoid considering autofluorescence or nonspecific binding as positive results, several controls were tested. The groups were: a) non-transfected wild type B16 cells, without any antibody; b) non-transfected wild type B16 cells incubated with both antibodies; c) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, without any antibody; d) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, incubated only with primary antibody; e) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells,

incubated only with secondary antibody; and finally f) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, incubated with both primary and secondary antibody.

### Bead selection and purification of transfected cells

This process is carried out by means of the Automacs device for magnetic cell separation (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain), according to the manufacturer's instructions and employing the Automacs columns. At 72 h post-transfection, cells are harvested and the Streptavidin Microbeads protocol is then followed (Miltenyi Biotec, Madrid, Spain). Briefly, cells are incubated with the primary biotinylated antibody, as described for flow cytometry. Then, cells are incubated with streptavidin magnetic beads, as secondary antibody and finally they are passed through the Automacs column, using "Posseld 2" program, which gives us two eluted fractions, one containing the transfected cells, expressing B7.2 on their surface and thus also GM-CSF, and the other containing the non-transfected cells. Lastly, positive cells are counted and frozen until the time of the vaccination experiments.

### Vaccination procedure

C57BL/6 mice (8–10 weeks old) kept under standard laboratory conditions were housed 5 mice per cage. All the experiments were approved by the Biological Research Committee of the University of Valencia (Valencia, Spain). In all cases, mice were vaccinated (right leg) with a single dose per week, in weeks -3, -1 and +1 (days -21, -7 and +7), with respect to tumor injection (day 0) with  $10^5$  wild type B16 cells in the left leg or  $10^5$  wild type 3LL cells, where indicated.

The number of cells employed in each vaccine dose represented only the truly transfected cells of previous experiments with non-selected cells, where total survival of the treated animals was achieved (Moret-Tatay et al. 2003; Herrero et al. 2006; Herrero et al. 2008). Thus, we had to vaccinate only with 20% of the previous doses (this being our expected percentage of truly transfected cells in that case). This meant vaccinating with 40,000 selected cells per mouse, per dose, in 100  $\mu$ l DMEM. We also vaccinated with the double dose, 80,000 selected cells, and since this was still a reduced number of cells, we took the

opportunity of exploring how these cells would work in a model where another type of tumor cells constituted the real target and B16 were just the bystander cytokine-producing cells. To this effect, we vaccinated with 80,000 B16 selected cells + 320,000 3LL cells.

In all vaccination experiments, blood samples were taken from all the animals, pooling blood from the animals from the same group at each time-point. The samples were taken on days -22 (before any manipulation of the animals, serving as base level or control in each group), -1 (the day before tumor implantation), and +15 (one week after the third and last dose was administered). Plasma was obtained by centrifugation at 3000 rpm for 5 min. and kept at -20 °C until use.

### Tumor growth measurement and survival

Tumor growth in mice was monitored visually and measured with a caliper in two dimensions: A, the long diameter and B, the short diameter. Tumor volume was calculated with the formula  $V = (A \times B^2)/2$ , and expressed in  $\text{mm}^3$ . Animals were collected at their death date to construct the survival curves.

### Specific anti-TMP IgG ELISA

Measurement of IgG and IgG1 and IgG2a subclass antibodies to TMP (Tumor Membrane Proteins) was performed in serum samples by specific ELISA, as previously described (Herrero et al. 2006; Herrero et al. 2008). TMP is an extract of the hydrophilic membrane proteins of the irradiated B16 cells; thus, so with this ELISA, we test the specific response to our vaccine treatment, discarding any other non-specific immune responses (Bordier, 1981; Herrero et al. 2006; Herrero et al. 2008).

Plates were coated by overnight incubation of TMP at 0.8  $\mu$ g/ml in carbonate buffer, pH 9.6. The next day, plates were neutralized with 1% BSA solution before addition of serum samples. For analysis, sera were diluted in dilution buffer (PBS-BSA 1%-Tween 20 0.1%) at 1/1000 for total IgG and IgG1 subclass and at 1/100 for IgG2a. Bound antibodies were detected with goat antisera to total IgG (Biocheck, Foster City, USA) at 1/10000 or mouse IgG subclasses at 1/1000 (Sigma, Mouse monoclonal isotyping reagents, Madrid, Spain),

followed by 1/5000 dilution of biotinylated rabbit antiserum to goat IgG (Sigma, Madrid, Spain) and streptavidin coupled to horseradish peroxidase (Sigma, Madrid, Spain). Plates were developed with a mixture of orthophenylenediamine (OPD, Sigma, Madrid, Spain) and hydrogen peroxide (Fluka-Sigma, Madrid, Spain), and read at 492 nm. All samples were assayed in duplicate, allowing estimation of mean OD value and standard deviation.

### Statistical analysis

To statistically compare the results of tumor growth inhibition in the different treatment groups, a two-way ANOVA was employed, with Bonferroni post hoc testing (95% confidence interval, 95%CI), expressing statistically significant differences on the basis of  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ . The same test was applied to the results of ELISA assays.

For survival significance, we used the Kaplan-Meier survival curves and logrank non-parametric test.

All the tests and graphs were performed with Graph Pad Prism 4 software®.

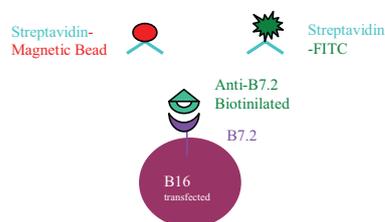
## Results

### Determination of m-B7.2 production

The strategies for the detection of B7.2 expression are illustrated in Figure 1. We employed a biotinylated anti-B7.2 antibody as the first step for two kinds of experiments: first, to check the transfection efficacy by flow cytometry, using streptavidin-FITC as second step; second, to separate the positive (transfected) cells by magnetic beads selection, using streptavidin beads.

The efficiency of m-B7.2 expression on B16 cell surface, 72 h after transfection, was evaluated by flow cytometry. The results are summarized in Figure 2, which plots counts (Y) versus fluorescence (X), and where we can identify specific surface expression of m-B7.2 in the right peak of the figure, whereas the middle and left peaks correspond to the transfected and non-transfected control cells, respectively.

The right area of the right peak, beyond the intersection with the middle peak, represents the proportion of transfected cells that are also fluorescent, i.e. the cells that express m-B7.2 on their

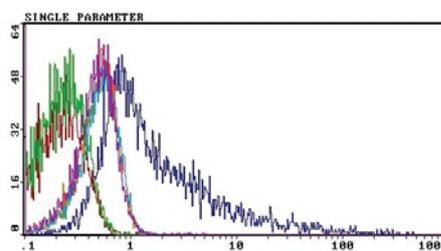


**Figure 1. Binding strategies to B7.2.** B16 cells transfected with the plasmid p2F m-gmcsf+m-B7.2, will secrete GM-CSF into the medium and will also express B7.2 protein on their surface. The biotinylated anti-B7.2 antibody allows not only binding of the cells to streptavidin-FITC to visualize them in cytometry assays, but also binding to streptavidin-magnetic beads, what let us separate these cells from the non-transfected ones.

surface. This area is approximately 40%–50% of the right peak, which was our expected transfection efficacy, according to our previous experiments (data not shown).

### Purification of transfected cells by means of magnetic beads

As explained above, 72 h after transfection with p2F m-gmcsf + m-B7.2, the cells were incubated with biotinylated anti-B7.2 and later with streptavidin beads, according to the manufacturer's protocol. The selected cells also produced GM-CSF, as tested by ELISA, approximately ranging from 90 to 175 ng/10<sup>6</sup> cells.



**Figure 2. Flow cytometry of B16 cells transfected with p2F m-gmcsf+mB7.2.** The following B16 cell groups were passed through the cytometer and their graphs overlaid in a single one: a) B16 wild type cells, non-transfected and with no reagents incubation; and b) B16 wild type cells, non-transfected and with both the primary antibody and streptavidin-FITC. These two groups form the left peak. The central peak is formed by c) B16 transfected cells with p2F m-gmcsf + m-B7.2, without the reagents incubation, d) B16 transfected cells with p2F m-gmcsf + m-B7.2, incubated only with the primary antibody and e) B16 transfected cells with p2F m-gmcsf + m-B7.2, only with streptavidin-FITC. Finally, f) B16 transfected cells with p2F m-gmcsf + m-B7.2, incubated with both primary antibody and streptavidin-FITC, corresponds to the right peak. The graph represents the green fluorescence in X versus count number in Y.

The efficiency of the transfected B16 cell purification is about 4% of the number of starting cells before transfection. From the 20%–40% of expected transfected cells, we purify 1/5 by this procedure.

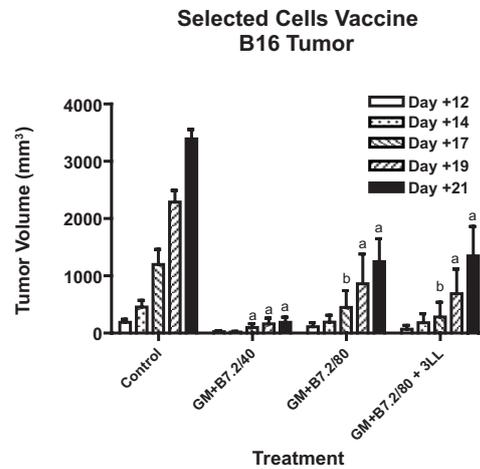
### Efficacy of the antitumor vaccine with transfected and selected cells

According to our previous results, total survival of vaccinated animals was obtained with 200.000 non-selected GM-CSF transfected cells. Now, having purified only the B7.2 and GM-CSF producing cells, we vaccinated with a cell dose representing only the expected truly transfected cells, i.e. 40.000 cells (the equivalent of 20% of 200.000), per mouse, per dose. Moreover, we also vaccinated with the double number of cells (80.000) and, since this cell number was still quite reduced, we prepared a mixture of 3LL irradiated cells plus the GMCSF+B7.2 -B16 producing cells to determine whether the procedure could also promote an efficient 3LL antitumor immune response. The treatment groups were: a) Control (100  $\mu$ l DMEM), to challenge with B16 tumor; b) Control-bis (100  $\mu$ l DMEM), to challenge with 3LL tumor; c) B16-GMCSF+B7.2/40, employing 40.000 B16 selected cells per dose, in 100  $\mu$ l DMEM; d) B16-GMCSF+B7.2/80, the same as before but with 80.000 B16 selected cells; e) B16-GMCSF+B7.2/80 + 3LL, each dose being 80.000 B16 selected cells and 320.000 irradiated 3LL cells, with B16 tumor challenge; f) B16-GMCSF+B7.2/80+3LL, the same as before but with 3LL tumor challenge.

The results of tumor growth inhibition are shown in Figure 3, for the groups with B16 tumor and in Figure 4, for the groups with 3LL tumor.

The three treatment groups of mice bearing B16 tumor were statistically different from the control, with differences equal or bigger than  $P < 0.01$  from day +17. The best B16 tumor inhibition was achieved by the B16-GM+B7.2/40 group, with 90% tumor growth inhibition, versus the control group, on day +21. It is remarkable that no significant differences in tumor growth inhibition were observed between B16-GM+B7.2/80 and B16-GM+B7.2/80 + 3LL groups, suggesting that adding a different type of tumor cell to a bystander cytokine-producing line, does not impair the results.

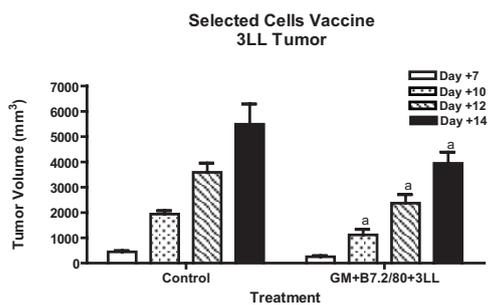
These observations also correlate with the survival curves, in Figure 5, where B16-GM+B7.2/40



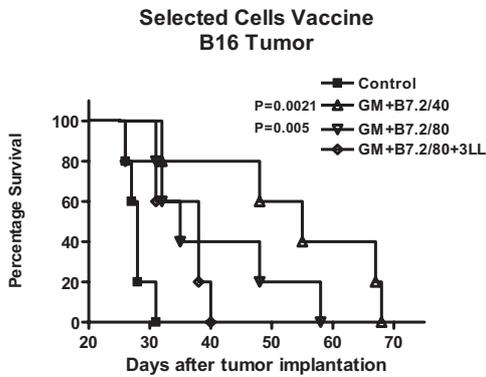
**Figure 3. B16 Tumor growth inhibition in the selected cells vaccine.** Tumor growth inhibition vaccinating with the groups B16-GM+B7.2/40, B16-GM+B7.2/80, B16-GM+B7.2/80 + 3LL and control. Tumor was implanted on day 0 with  $10^5$  B16 wild type cells in the left leg and vaccine doses were injected in the right leg on days -21, -7 and +7. "a" represents  $P < 0.001$  and "b"  $P < 0.01$ , versus control.

achieved the best survival results, doubling the survival period achieved by the control group, with a significant difference of  $P = 0.0021$  with the logrank test. Despite this, no total survival was obtained in any of the mice.

Interestingly, although the same tumor growth inhibition was obtained in both B16-GM+B7.2/80 and B16-GM+B7.2/80+3LL groups, their survival curves show a differentiation of nearly 20 days delayed end-point in the group where no cell



**Figure 4. 3LL Tumor growth inhibition in the selected cells vaccine.** Employing the same procedure as in Figure 3, the preventive treatment B16-GM+B7.2/80+3LL (80.000 B16 selected cells + 320.000 3LL irradiated cells) was evaluated versus control, challenging the mice on day 0 with  $10^5$  3LL wild type cells. "a" represents  $P < 0.001$  versus control.



**Figure 5. Survival in the selected cells vaccine against B16 tumor.** With the death dates of the animals, survival curves were constructed with Kaplan-Meier method in the groups with B16 tumor: Control, B16-GM+B7.2/40, B16-GM+B7.2/80 and B16-GM+B7.2/80+3LL. Logrank statistical test was performed and Pvalues are included were significant difference was achieved regarding Control group.

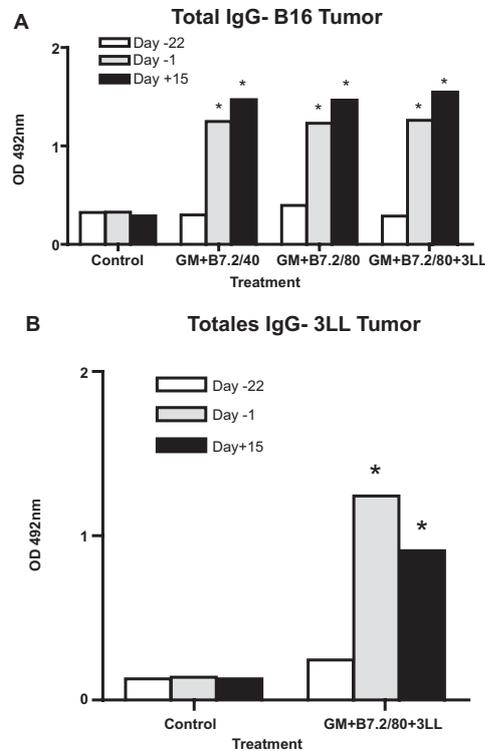
mixture had been performed. B16-GM+B7.2/80 achieved a significant difference of  $P = 0.005$  regarding Control group while B16-GM+B7.2/80+3LL showed no statistical difference.

B16-GM+B7.2/40 and B16-GM+B7.2/80 do not show any statistical difference between them.

In the case of mice bearing 3LL tumor, the total time of survival was very short, 20 days maximum, since 3LL is a highly aggressive tumor. Although the treated group achieved significant tumor growth inhibition with  $P < 0.001$  from day +10, versus its control, the volume reduction was about 20% maximum, which was not enough to differentiate the survival curves of the two groups (data not shown).

### Specific anti-TMP IgG production

The findings from the anti-TMP ELISA studies in measuring specific total IgG production are summarized in Figure 6-A, for results in the B16 tumor groups and Figure 6-B, for 3LL tumor groups. In the total specific IgG studies, we always found higher productions in the treated groups compared with the controls. In the B16 tumor groups, there were no remarkable differences and all of them peaked on day +15. However, the group treated against 3LL showed its maximum on day -1. In all cases, the SD was less than 5% of the OD mean value, and therefore the SD is not appreciable in



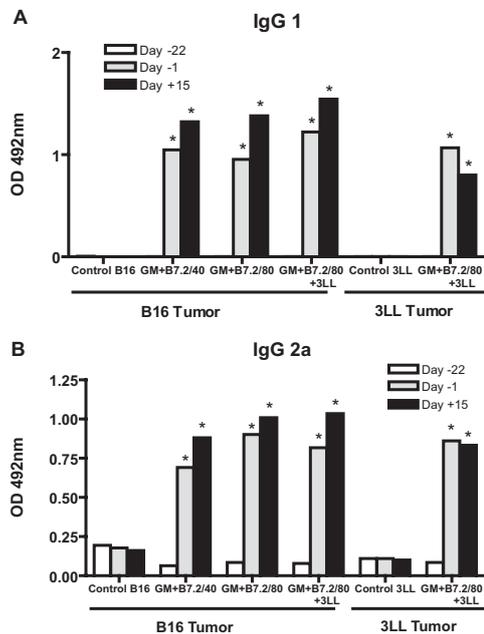
**Figure 6. Total anti-TMP IgG.** Blood was extracted from the tail vein on days -22, -1 and +15 regarding tumor implantation on day 0. ELISA assays were performed in the plasma obtained. Figure 6-A shows the results in the groups challenged with B16 tumor and Figure 6-B, those for 3LL tumor. The samples were analyzed by duplicate with representation of the mean OD and SD, though SD cannot be appreciated since it was very small. Two-way ANOVA was performed, \* $P < 0.001$ .

the graphs. After performing the two-way ANOVA test, all the treatments were statistically different from the Control group at days -1 and +15, with  $P < 0.001$ .

The same results were observed in the IgG subtypes IgG1 (Fig. 7-A) and IgG2a (Fig. 7-B) analysis.

### Discussion

Engineered cells secreting cytokines have demonstrated to be a very interesting approach in cancer vaccines (Dunussi-Joannopoulos et al. 1998; Jaffee et al. 1998; Shi et al. 1999; Kim et al. 2000; Mastrangelo and Lattime, 2002; Borrello and Pardoll, 2002; Serafini et al. 2004), as we have also



**Figure 7. Anti-TMP IgG subtypes.** In the same way as in Fig. 6, the plasma samples were tested with ELISA for IgG subtypes, IgG1 in Figure 7-A and IgG2a in Figure 7-B. Two-way ANOVA was performed, \* $P < 0.001$ .

seen (Moret-Tatay et al. 2003; Herrero et al. 2006; Moret-Tatay et al. 2006; Herrero et al. 2008), though we are aware of the great difficulty of working with this approach in actual clinical practice. In fact, tissue or cell samples from the patients must be kept in culture, amplified to a larger number, transfected and then returned to the same patient. In this context, guaranteeing strict handling conditions for clinical use, an acceptable number of cells, as well as cytokine production, is not an easy task. This is why we decided to try to reduce the cell number required to start a proper immune response against the tumor, thus avoiding very complex cell work in future patients.

In our hands, the best results of preventive antitumor vaccines were obtained in a murine melanoma model with a vaccine dose of  $2 \times 10^5$  transfected cells. The vaccination protocol was exactly the same as described in this manuscript. With that vaccine we achieved 100% and 80% survival levels employing genetically modified cells to produce mGM-CSF and mGMCSF+mB7.2, respectively. In those experiments we confirmed

two points, supported also by the findings of other groups: 1) The idea that larger levels of GM-CSF production are not necessarily better (Borrello and Pardoll, 2002; Rodríguez-Lecompte et al. 2004; Serafini et al. 2004; Herrero et al. 2006) but are sometimes worse; and 2) There is some kind of synergistic effect between GM-CSF and B7.2. Thus, we knew that we did not really need an enormous quantity of GM-CSF, and that B7.2 also offered some advantages in several tumor vaccine models. Finally, we knew that only 20%–40% of our cells were really functional, because this was the true transfection efficacy. Thus, the question is: Why not try a vaccine with only the truly transfected cells? Many efforts have been made in the course of gene therapy history to achieve transfection of the totality of the cells. However, to date this has been nearly impossible, particularly when working with non-viral vectors, although the different methods have been greatly improved (i.e Amaxa's Nucleofector). Our approach is not to enhance the transfection process, but to isolate and purify the transfected cells that we obtain. We employed the Automacs (Miltenyi Biotec, Spain) to select our cells producing both GM-CSF and B7.2, using the magnetic streptavidin microbeads protocol.

Following this protocol, 72 h after cell transfection, we purified 4% viable cells from the total cells that we started with. We think that this is quite a low yield, since the transfected cells are supposed to represent 20%–40% of the starting cells (Herrero et al. 2008). These results could be due to several reasons. On one hand, the whole purification process is time consuming (several hours), during which the cells probably suffer from not being in their appropriate culture conditions. This results in a dramatic drop in viability. Therefore, optimized protocol conditions for reducing the length of the process or the kind of selection protocol in the device would contribute to improve the cell selection yield. Another reason to take in consideration is that probably, our B7.2 cassette, which provides long term expression, is not really strong since the fluorescence values in Figure 2 are not really high. Probably, using a more potent promoter could boost B7.2 expression and then easier cell recognition and separation in the Automacs would be achieved.

We studied two different purified cell doses in a preventive vaccine model, 40.000 selected cells (20% of  $2 \times 10^5$ ) and 80.000 selected cells

(40% of  $2 \times 10^5$ ), in an attempt to reproduce the successful model that we achieved with preventive non-selected genetically modified cells but this time employing only the number of truly transfected cells that we expected to have in the previous assays. With this new approach, we reached a maximum of 90% tumor growth inhibition in the group treated with B16-GM+B7.2/40 against B16 melanoma tumor. The groups treated with B16-GM+B7.2/80 and B16-GM+B7.2/80 + 3LL, contributing double dose of cell antigen, GM-CSF and B7.2, surprisingly only reached about 60% tumor growth inhibition. As other authors have pointed out (Borrello and Pardoll, 2002; Serafini et al. 2004), this suggests that here we probably have an excess of GM-CSF, which proves disadvantageous in our system. A vaccine assay exploring dose-dependent effects of our selected cells would help us verify this point. Phenomena of immune suppression have been described in the last few years to explain results of this kind and the apparent paradoxical effect of certain cytokines as GM-CSF, that can act as immune activators or, contrarily, as suppressors of the immune response. This is most probably due to immune cells such as regulatory T cells (De Visser et al. 2006; Zou, 2006) or the recently described Myeloid Derived Suppressor Cells (Serafini et al. 2004; Horna et al. 2006; Serafini et al. 2006a, b). The survival results correlate with those of tumor growth inhibition: although no total survival was achieved, the best results were obtained with B16-GM+B7.2/40, doubling the survival period of the control group. The other two groups challenged with B16 tumor had different survival results despite similar tumor growth inhibitions. This could also be due to the suppressor phenomena that have been mentioned above, where the "extra" irradiated cells could be generating an extra immune response that impairs the action against B16 tumor.

We also wanted to take advantage of working with a reduced number of cells, to test a new possibility, that could be very interesting in the clinical practice: mixing our transfected and purified B16 cells, in the role of cytokine producers and non specific immune stimulants, with other different cells, 3LL in this case, in the role of specific immunizing antigen, for combating a 3LL tumor. This first approach could also be intended for other bystander cytokine producing non-tumor cells, as for instance fibroblasts, which would be easier to remove and reintroduce to a clinical patient.

We achieved a significant tumor reduction (approximately 25%) in the treated group, though this was not good enough to elicit any kind of survival. 3LL tumor is a very aggressive and a rapidly progressing malignancy; as a result, by better adjusting the doses and times, we probably would obtain better results.

Regarding specific IgG productions, we always found higher levels in treated groups than in controls, though interestingly, in the groups challenged with B16 tumor, which worked better, we recorded the highest values on day +15, while in groups challenged with 3LL tumor, which worked worse, the highest values appeared on day -1. Again, these results suggest a different kind of immunoglobulin switch and therefore, a different sequence of immune responses, resulting in very different rates of success (Herrero et al. 2006).

Although the overall results were not as good as those with the non-selected cells vaccine, no conclusions can be drawn before a dose-dependent study is performed with these selected cells. It remains to be elucidated how synergistic effects between antigens, GM-CSF and costimulatory B7.2 molecules cooperate in the generation of efficient antitumor response or toxicity. We cannot exclude a lack of net antigen contribution due to the reduction in cell number or, contrarily, an excess in GM-CSF production which could result in a loss of vaccine efficacy. These experiments will focus our future attention, and will contribute to clarify the exact need for each component in a cell vaccine that could become suitable for use in clinical practice.

## Acknowledgements

This work has been supported by the FIS PI 021740 from *Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Educación y Ciencia* SAF 2004-08161 and SAF 2007-64492 and the *Generalitat Valenciana* GVA-COMP 2006-217.

## References

- Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.*, 25:1604-7.
- Borrello, I. and Pardoll, D. 2002. GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 13:185-93.
- Chong, H., Todryk, S. et al. 1998. Tumor cell expression of B7 costimulatory molecules and interleukin-12 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces a local antitumor response and may generate systemic protective immunity. *Gene Therapy*, 5:223-32.
- Copier, J., Ward, S. and Dalglish, A. 2007. Cell based cancer vaccines: regulatory and commercial development. *Vaccine*, 25S:B.35-B.46.

- De Visser, K., Eichten, A. and Coussens, L. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6:24–37.
- Dunussi-Joannopoulos, K., Dranoff, G., Weinstein, H.J. et al. 1998. Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines. *Blood*, 91:222–30.
- Farray, D. and Clark, J. 2006. Vaccine therapy of malignant melanoma. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 6:217–30.
- Guillem, V.M. and Aliño, S.F. 2004. Transfection pathways of nonspecific and targeted PEI-polyplexes. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 8:369–84.
- Herrero, M.J., Botella, R., Dasi, F. et al. 2006. Antigens and cytokine genes in antitumor vaccines: the importance of the temporal delivery sequence in antitumor signals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1091:412–24.
- Herrero, M.J., Botella, R., Algás, R. et al. 2008. Nonviral cancer vaccines: from free antigens to engineered cells. In Gustafsson W.B. ed. *New gene therapy and cancer research*. New York: Nova Publishers.
- Horna, P., Cuenca, A., Fengdong, C. et al. 2006. In vivo disruption of tolerogenic cross-presentation mechanisms uncovers an effective T-cell activation by B-cell lymphomas leading to antitumor immunity. *Blood*, 107:2871–8.
- Jaffee, E.M., Abrams, R., Cameron, J. et al. 1998. A phase I clinical trial of lethally irradiated allogeneic pancreatic tumor cells transfected with the GM-CSF gene for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Human Gene Therapy*, 9:1951–71.
- Kim, k-Y., Kang, M-A. and Nam, M-J. 2001. Enhancement of natural killer cell-mediated cytotoxicity by coexpression of GM-CSF/B70 in hepatoma. *Cancer Letters*, 166:33–40.
- Kim, S., Carew, J.F., Kooby, D.A. et al. 2000. Combination gene therapy using multiple immunomodulatory genes transferred by a defective infectious single-cycle herpes virus in squamous cell cancer. *Cancer Gene Therapy*, 7:1279–85.
- Mastrangelo, M.J. and Lattime, E.C. 2002. Virotherapy clinical trials for regional disease: in situ immune modulation using recombinant poxvirus vectors. *Cancer Gene Therapy*, 9:1013–21.
- Moret-Tatay, I., Diaz, J., Marco, F.M. et al. 2003. Complete tumor prevention by engineered tumor cell vaccines employing nonviral vectors. *Cancer Gene therapy*, 10:887–97.
- Moret-Tatay, I., Sanmartín, I., Marco, F.M. et al. 2006. Nonviral therapeutic cell vaccine mediates potent antitumor effects. *Vaccine*, 24:3937–45.
- Mukherjee, S., Nelson, D. et al. 2001. The immune anti-tumor effects of GM-CSF and B7-1 gene transfection are enhanced by surgical debulking of tumor. *Cancer Gene Therapy*, 8:580–8.
- Parney, I.F., Farr-Jones, M.A. et al. 2002. Human autologous in vitro models of glioma immunogene therapy using B7-2, GM-CSF and IL-12. *Can. J. Neurol. Sci.*, 29:267–75.
- Pizzoferrato, E. 2004. B7-2 expression above a threshold elicits anti-tumor immunity as effective as interleukin-12 and prolongs survival in murine B.-cell lymphoma. *Int. J. Cancer*, 110:61–9.
- Rodríguez-Lecompte, J.C., Kruth, S. et al. 2004. Cell-based cancer gene therapy: breaking tolerance or inducing autoimmunity? *Anim. Health Res. Rev.*, 5:227–34.
- Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K.A. et al. 2004. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Research*, 64:6337–43.
- Serafini, P., Borrello, I. and Bronte, V. 2006a. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Seminars in Cancer Biology*, 16:53–65.
- Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M. et al. 2006b. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *The Journal of Experimental Medicine*, 203:2691–702.
- Shi, F.S., Weber, S., Gan, J. et al. 1999. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF. *Cancer Gene Therapy*, 6:81–8.
- Zajac, P., Oertli, W. et al. 2003. Phase I/II Clinical trial of a nonreplicative vaccinia virus expressing multiple HLA-A0201-restricted tumor-associated epitopes and costimulatory molecules in metastatic melanoma patients. *Human Gene Therapy*, 14:1497–510.
- Zou, W. 2006. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 6:295–307.

# Antigens and Cytokine Genes in Antitumor Vaccines

## The Importance of the Temporal Delivery Sequence in Antitumor Signals

MARÍA JOSÉ HERRERO,<sup>a</sup> RAFAEL BOTELLA,<sup>b</sup> FRANCISCO DASÍ,<sup>a</sup>  
ROSA ALGÁS,<sup>c</sup> MARÍA SÁNCHEZ,<sup>a</sup> AND SALVADOR F. ALIÑO<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Gene Therapy Group, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,  
University of Valencia, 46010 Valencia, Spain*

<sup>b</sup>*Dermatology Unit, Instituto Valenciano de Oncología, 46009 Valencia, Spain*

<sup>c</sup>*Radiotherapy Unit, Hospital Clínico Universitario, 46010 Valencia, Spain*

**ABSTRACT:** Studies against cancer, including clinical trials, have shown that a correct activation of the immune system can lead to tumor rejection whereas incorrect signaling results in no positive effects or even anergy. We have worked assuming that two signals, GM-CSF (granulocyte and macrophage colony-stimulating factor) and tumor antigens are necessary to mediate an antitumor effective response. To study which is the ideal temporal sequence for their administration, we have used a murine model of antimelanoma vaccine employing whole B16 tumor cells or their membrane protein antigens (TMPs) in combination with *gm-csf* transfection before or after the antigen delivery. Our results show that: (i) When *gm-csf* transfection is performed before TMP delivery, a tumor growth inhibition is observed, but with a limit effect when administering high antigen doses; in contrast, when signals are inverted, the limited effect is lost and greater antitumor efficacy is obtained. (ii) A similar behavior, but with stronger positive results, is observed employing *gm-csf* transfection and whole tumor cells as antigens. While negative results are obtained with *gm-csf* before cells, the best results (total survival of treated mice) are obtained when GM-CSF is administered in transfected cells. We conclude that optimal antitumoral response can be obtained when the antigen signal is given before (or simultaneous with) GM-CSF production, while the inversion of the signals could result in the undesired inhibition or anergy of the immune response.

**KEYWORDS:** cell vaccine; tumor antigen; gene transfer; GM-CSF; melanoma

Address for correspondence: María José Herrero, Gene Therapy Group, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez, 15, 46010 Valencia, Spain. Voice: +34-9-6-3864621; fax: +34-9-6-3864972.  
e-mail: mariajoseherrero@ono.com

Ann. N.Y. Acad. Sci. 1091: 412–424 (2006). © 2006 New York Academy of Sciences.  
doi: 10.1196/annals.1378.084

## INTRODUCTION

Genetically modified tumor cells have been demonstrated to be very efficient in various models of antitumoral vaccines.<sup>1-3</sup> Still the main problem in these models is the great difficulty of obtaining tumor cells that we also would have to keep in culture, transfect and then return to the same patient, which is not easy, even employing other proposed methods, not only with tumor cells, but also with syngenic or allogenic cells.<sup>4,5</sup> All these efforts made for many years in the field of cancer vaccine research have converged, in the idea that the best results are obtained by vaccinating not only with the tumor antigens, but also with the genes that the immune system would itself use to achieve a good response: the cytokines. However, the functioning of the immune system is very complex and combining these two components has not always been successful,<sup>6,7</sup> leading to immune suppression or even anergy. It has not been established yet which is the correct temporal order to supply the two signals. The most effective way of administering these two components is by introducing cells, tumoral or not, that produce the cytokine themselves,<sup>8</sup> and since then, many studies have achieved promising results and clinical trials have been set up. However, the right sequence for injection if we want to separate the two components remains to be elucidated.

To understand what kind of antigens work best and how they invoke a really effective response, we wanted to work with the tumor cell antigens instead of whole cells. We tested the different combinations regarding cytokine temporal administration, studying which is the best dose of each component and which is the best temporal sequence for its injection. We have worked in a murine model of melanoma, using the two mentioned components to make an antitumoral vaccine. As antigens, we have used irradiated whole tumor cells (B16 cells) or an extract of its hydrophilic antigens (tumor membrane proteins, TMP). As cytokine, we have used the m-GMCSF encoding gene, which has largely been shown to be a very useful antitumoral tool.<sup>1,4,6,9</sup> In this work, these three possibilities have been combined in order to understand better in which sequence these signals must be given to the immune system to achieve good antitumoral results, thereby avoiding the signals' order that lead to the inhibition or anergy of the immune response. Our experiments show that the best results are obtained when *gm-csf* is administered after or simultaneously with the antigen signal.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cells and Transfection*

B16 murine melanoma cells, syngenic in C57BL/6 mice, were used in all our experiments as a source of antigen to vaccinate, either as whole cells or

used to get an extract of its membrane proteins (TMP). B16 cells were also used in every case to inoculate the tumors in vaccinated and control groups of mice, injecting  $10^5$  freshly detached cells in its usual culture medium.

Cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma, Madrid, Spain), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Biomedica, Barcelona, Spain), penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100  $\mu$ g/mL). They were kept in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. B16 are adherent cells that are detached from flasks with trypsin-EDTA. When whole cells are used for vaccinating, they are irradiated with a 150-Gy dose after being detached from their flasks and then frozen in DMSO 5% in FBS to be kept at -80 or -150°C until their use.

The fresh (no selection) transfection procedure for the experiments with GM-CSF (granulocyte and macrophage colony-stimulating factor)-producing B16 cells was chemical, preparing PEI 25 KDa (polyethyleneimine; Sigma, Spain) polyplexes or DOTAP (Roche, Valencia, Spain) lipoplexes with 7.5  $\mu$ g/mL plasmid dose.<sup>10</sup> Cells were transfected when more than 80% confluence was reached in their flasks and they were irradiated with 150-Gy dose, frozen in DMSO 5% in FBS, and kept at -80 or -150°C until their use.

### *Plasmids*

pcDNA3 plasmid from Invitrogen (Barcelona, Spain) was used in some of the experiments, with cytomegalovirus promoter and resistance to neomycin and ampicillin.

pMok m-gmcsf was generously given by Dr. A. Koenig (Mologen, Berlin, Germany), containing the murine *gm-csf* gene, controlled by cytomegalovirus promoter and with resistance to kanamycin. The plasmids were amplified in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  in selective LB broth (Pronadisa, Valencia, Spain) and extracted with the Qiagen Giga Endofree kit (Quiagen, Barcelona, Spain), quantified by spectrophotometry and tested by electrophoresis to confirm integrity.

### *Obtaining TMPs*

The mixture of hydrophilic membrane proteins from B16 cells was performed following a protocol based on C. Bordier's work.<sup>11</sup> In brief: after the irradiated cells are detached and counted, the pellet was resuspended in 1 mL of extraction buffer, for every 10 million cells, containing Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> was 2 mM, 0 Triton X-114 0.5% (Sigma, Spain) and PMSF 0.1 mM (Sigma, Spain), pH 7.2. The mixture was incubated in ice for 45 min, shaking gently every 10 min. Then it was centrifuged at 5,300 rpm, for 15 min at 4°C. The supernatant was recovered and put

750  $\mu\text{L}$  above 250  $\mu\text{L}$  of centrifuge buffer (sucrose 10% in extraction buffer) in microcentrifuge tubes. After incubating for 3 min at 37°C, it was centrifuged again for 5 min at 2,100 rpm. Supernatant (750  $\mu\text{L}$ ) was recovered and Triton X-114 added to a final concentration of 0.5% before putting the tube in ice again over 250  $\mu\text{L}$  of centrifuge buffer. After incubation 3 min more at 37°C and centrifugation 5 min more at 2,100 rpm, two different phases were obtained in the microcentrifuge tube, the upper one containing the hydrophilic proteins, which are kept in aliquots at  $-20^\circ\text{C}$  until their use.

The proteins were quantified with the CBQCA protein quantitation kit (Molecular Probes-Invitrogen, Barcelona, Spain), following the manufacturer's instructions.

#### ***Determination of m-GMCSF Production***

For the GM-CSF production of the transfected B16 cells, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out on a supernatant sample of the culture medium, 72 h post transfection and prior to the cells Madrid detachment and irradiation, using BD OptEIA ELISA kit for m-GMCSF (Pharmingen, BD Biosciences, Madrid, Spain). The time point of 72 h was chosen on the basis of a prior experiment made studying cytokine production over time, using the referred transfection conditions,<sup>9,10</sup> in order to achieve the adequate production level according to the literature.<sup>4</sup> Then B16 cells were transfected in their flasks after reaching more than 80% confluence with PEI/DNA polyplexes or DOTAP/DNA lipoplexes, with a final concentration of 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pMok m-gmcsf dose. Supernatant samples were taken every 24 h over 6 days, cleaned by centrifugation (3,000 rpm, 5 min), and used for ELISA with BD OptEIA ELISA kit for m-GMCSF.

For the tissue transfection experiments, a previous assay was carried out assay injecting only the plasmid pMok m-gmcsf at two different doses, 10 or 50  $\mu\text{g}$  per animal, in 200  $\mu\text{L}$  saline in the same way it would be done in the vaccination experiments. The animals were sacrificed and tissue samples of the injected area were analyzed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to confirm mGM-CSF production. The pieces of tissue were homogenized in Trizol (Invitrogen, Spain) according to the manufacturer's protocol in order to obtain the RNA from the samples, which was later quantified by spectrophotometry, confirming a good purity level. A total of 5 ng of each RNA was taken to obtain the reverse transcriptase reaction and later to perform the quantitative PCR, using Applied Biosystems' conditions and reagents, TaqMan RTreagents, Taq Man Assay on Demand for *m-gmcsf*, Abi Prism 7700 Software (Applied Biosystems, Barcelona, Spain). The results of the qPCR are expressed in  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , as already described in the literature.<sup>12</sup>

### *Vaccination Procedures*

C57BL/6 mice (Harlan, Ibérica, Barcelona, Spain) were used in all experiments. The animals were kept under standard laboratory conditions and housed five mice per cage. All the experiments were approved by the Biological Research Committee of the Faculty of Medicine of the University of Valencia (Spain).

All the vaccinations followed the same pattern: animals were vaccinated at weeks  $-3$ ,  $-1$ , and  $+1$  regarding the tumor implantation (day 0), when  $10^5$  wild-type freshly detached B16 cells were injected in the left leg of the animals in 100  $\mu\text{L}$  DMEM. The vaccinations were always performed in the right leg.

For experiments of tissue transfection, 50  $\mu\text{g}$  of the naked pMok m-gmcsf plasmid or pcDNA3 plasmid were injected in 200  $\mu\text{L}$  saline (only saline in controls), before or after the antigens, depending on the experiment, in the right groin area. Two antigen doses (in 100  $\mu\text{L}$  PBS  $1\times$ ) were administered 24 and 72 h after plasmid injection. As antigens we have used whole B16 irradiated cells ( $2 \times 10^6$  cells/dose) or the corresponding TMP (from 20 to 200  $\mu\text{g}$ /dose, divided in the two injections).

For the inverse tissue transfection, the inverse process is performed, injecting first one dose of antigen, the second 48 h later, and plasmid 72 h later. Two different doses of plasmid were tested in this experiment, 10 and 50  $\mu\text{g}$  pMok m-gmcsf.

For experiments with GM-CSF-producing B16 cells,  $2 \times 10^5$  freshly transfected B16 cells (with PEI/pMok m-gmcsf polyplexes, 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were injected per dose, per mouse, in 100  $\mu\text{L}$  DMEM, in the right leg in weeks  $-3$ ,  $-1$ , and  $+1$  with respect to tumor implantation, day 0 ( $10^5$  wild-type B16 cells in left leg). The transfection percentage of the cells is between 20 and 40% of total cells (data not shown). Control and B16\* group followed the same pattern, but only with 100  $\mu\text{L}$  DMEM or  $2 \times 10^5$  B16 wild-type irradiated cells in 100  $\mu\text{L}$  DMEM, respectively.

### *Tumor Growth Measurement and Statistical Analysis*

Tumor growth in mice was monitored visually and measured with a caliper in two dimensions, A, the long diameter and B, the short one. The tumor volume was calculated with the formula  $V = (A \times B^2)/2$  and expressed in  $\text{mm}^3$ . To statistically compare the results of the different treatment groups, two-way ANOVA statistical analysis were performed (FIGS. 3, 4, and 5), with Bonferroni post tests (95% confidence interval), expressing the statistically significant differences with  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  when comparing with control group, and the same but with +, ++, +++ when comparing with saline (no-plasmid) group.

## RESULTS

### *qRT-PCR of GM-CSF*

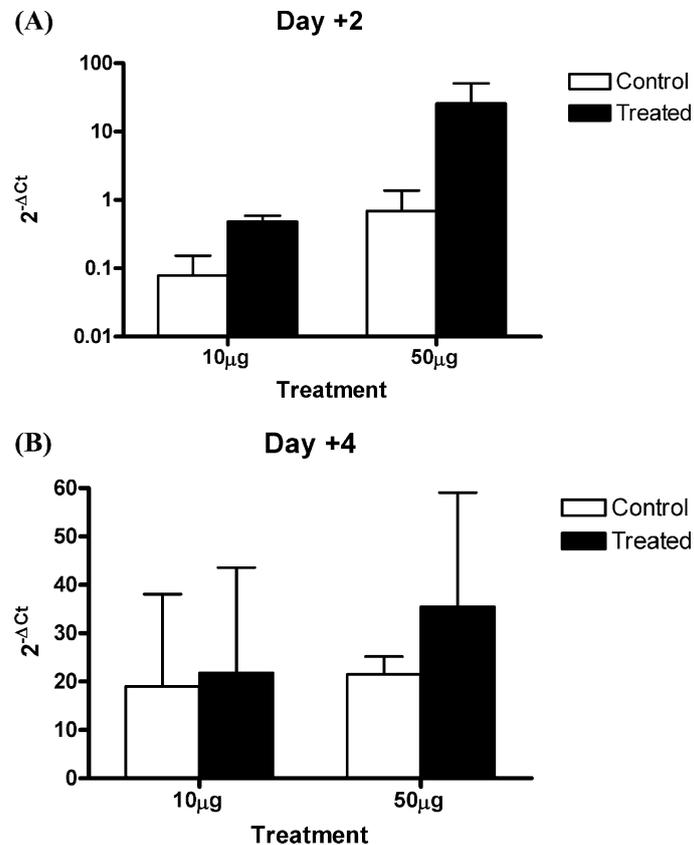
After injecting 10  $\mu\text{g}$  ( $n = 4$ ) or 50  $\mu\text{g}$  ( $n = 4$ ) pMok m-gmcsf ( $n = 4$ , per group) in 200  $\mu\text{L}$  saline in the right groin area of C57BL/6 mice, the animals were sacrificed, two at once, and the others on day +2 and day +4. Tissue samples of the injected area and the equivalent in the contralateral leg (as control) were homogenized in Trizol to obtain RNA and perform the qRT-PCR assay to detect mGM-CSF expression, using Applied Biosystems Assay on Demand for *m-gmcsf* and their protocols and other reagents. The Ct results in FIGURE 1 are expressed in  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  ( $2 \exp(-[\text{Ct from mGMCSF} - \text{Ct from 18S ribosomal}])$ ), as previously used in the literature.<sup>12</sup> The differences between treated and control tissue are bigger at day +2 (FIG. 1A), reaching about one order of magnitude, while at day +4 the two groups still show a difference, but a smaller one (FIG. 1B). In both graphs, the different GM-CSF production is higher when injecting 50  $\mu\text{g}$  of pMok m-gmcsf, which means that in those groups a higher net production of *m-gmcsf* has been achieved.

### *ELISA of m-GMCSF*

B16 cells were transfected with PEI/DNA polyplexes or DOTAP/DNA lipoplexes, using 7.5  $\mu\text{g/mL}$  final concentration of pMok m-gmcsf and 80% culture confluence conditions. Samples were taken from culture medium every 24 h over 6 days, centrifuged at 3,000 rpm for 5 min to remove any cells or debris, and then used for ELISA assays to measure mGM-CSF production employing BD OptEIA Kit. The results in FIGURE 2 are expressed in nanograms of mGM-CSF protein secreted per  $10^6$  cells per 24 h. The comparison of the two transfection complexes shows that PEI/pMok m-gmcsf polyplexes are much more effective than DOTAP/pMok m-gmcsf lipoplexes, which is the reason why PEI/pMok m-gmcsf polyplexes were chosen for the following experiments, discarding DOTAP. In the vaccination experiments, at 72 h post-transfection cells are detached and irradiated, because at 72 h the recommended level in the literature<sup>4</sup> for GM-CSF production was reached and it was a reasonable time to keep cells in culture safely (FIG. 2).

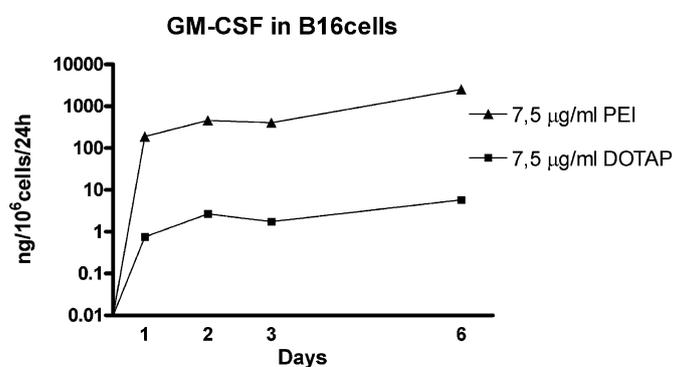
### *TMP-Based Vaccines*

The results of tumor growth in vaccinated mice, employing two different protocols, based on a different temporal sequence of TMP and *gm-csf* delivery, are presented in FIGURES 3 and 4. C57BL/6 mice ( $n = 5$ ) were treated with 50  $\mu\text{g}$  plasmid in 200  $\mu\text{L}$  saline solution in the right groin area (only saline in control groups) and then treated 24 and 72 h later with 10  $\mu\text{g}$  TMP (FIG. 3A)



**FIGURE 1.** qRT-PCR of mGM-CSF. C57BL/6 mice ( $n = 4$ ) were injected with 10 or 50  $\mu$ g pMok m-gmcsf in 200  $\mu$ L saline in the right groin area and their tissue samples were homogenized in Trizol to obtain RNA and perform the qRT-PCR to detect m GM-CSF expression, values in  $2^{-\Delta Ct}$ . (A) results of the mice sacrificed 48 h after plasmid injection and (B) results of those sacrificed 96 h after transfection.

or 100  $\mu$ g TMP (FIG. 3B). This treatment pattern was performed in weeks  $-3$ ,  $-1$ , and  $+1$ , with respect to tumor implantation on day 0 ( $10^5$  wild-type B16 cells), in the left leg. The tumor size was calculated by measuring two tumor dimensions, A, the long diameter and B, the short one, with a caliper, using the formula  $V = (A \times B^2)/2$ . FIGURE 3 shows the results when *gm-csf* was administered before TMP. At low doses of TMP (FIG. 3A), significant inhibition of tumor growth was obtained with at least  $P < 0.01$ , while no significant inhibition was observed when TMP was injected alone or associated with the control plasmid (pcDNA3). However, the antitumor efficacy of *gm-csf* was lost when higher doses of TMP were employed (FIG. 3B); thus we observe that the best inhibitory effect was obtained employing TMP alone or associated with the empty plasmid (pcDNA3). Interestingly, when the inverse treatment was purposed, *gm-csf* after TMP (FIG. 4), again the best tumor growth inhibition



**FIGURE 2.** ELISA of mGM-CSF. B16 cells were transfected with PEI/DNA polyplexes or DOTAP/DNA lipoplexes, using 7.5 µg/mL final concentration of pMok m-gmcsf. Medium samples were taken every 24 h over 6 days, centrifuged at 3,000 rpm for 5 min to remove any cells or debris, and used to perform ELISA assays to quantify mGM-CSF production with Pharmingen's OpTEIA Kit.

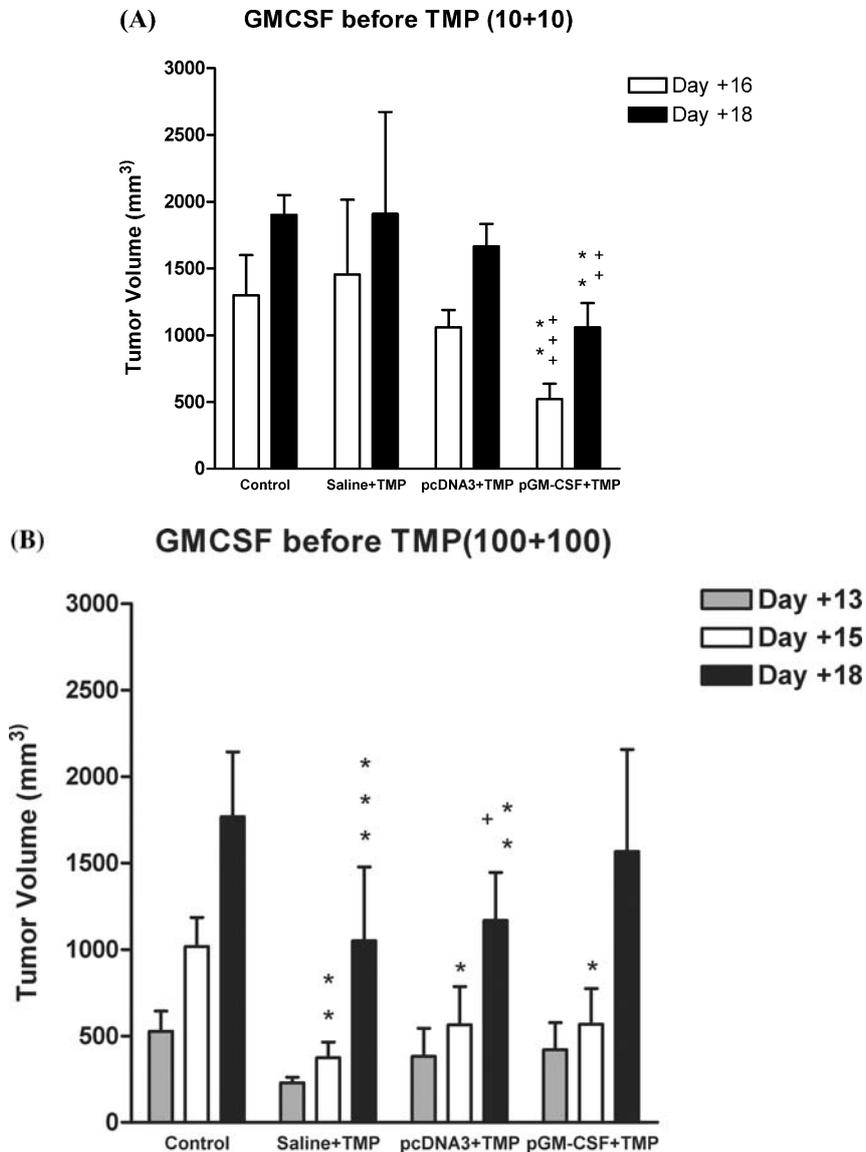
was obtained administering pMok m-gmcsf, this time after the TMP doses and specially when reducing the plasmid dose from 50 to 10 µg (FIG. 4,  $P < 0.001$  at day +20 in TMP+pGM-CSF 10 group).

### *Cell-Based Vaccines*

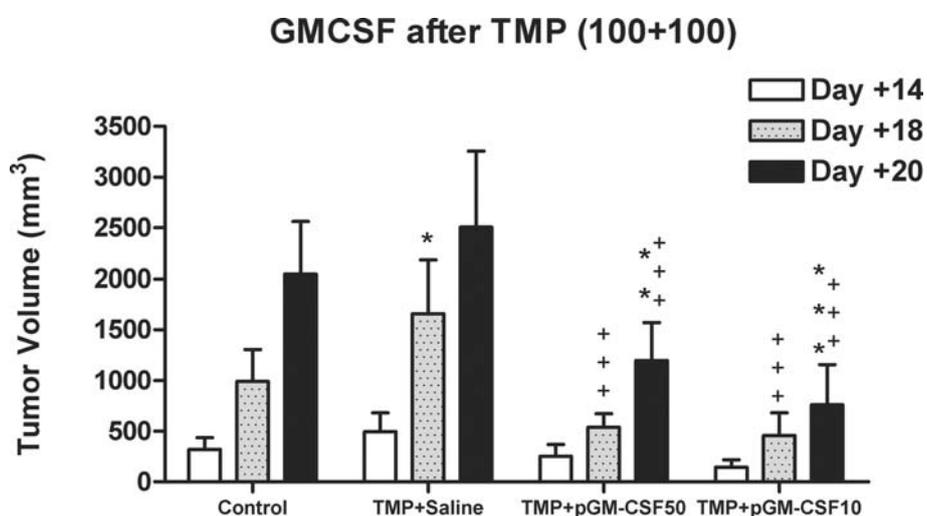
The aim of these experiments was to compare the tumor growth inhibition efficacy when administering GM-CSF before (FIG. 5A) or after (FIG. 5B) cell administration. The results obtained are comparable to those obtained with TMP. In FIGURE 5A, C57BL/6 mice ( $n = 5$ ) were treated following the same pattern as for FIGURE 3, but administering  $2 \times 10^6$  B16 wild-type irradiated cells instead of TMP. Here, when pMok m-gmcsf is administered before the cells, which represents a high antigen dose, the tumor growth inhibition results are worse than those obtained using B16 irradiated cells alone (FIG. 5A, at least  $P < 0.01$ ), as already seen in FIGURE 3B, where high TMP dose was injected. In FIGURE 5B, on the contrary, when GM-CSF were administered via transfected cells, thus, after or simultaneously to the cells, the best results of all the experiments were obtained: no tumor was observed at least in the following month.

## DISCUSSION

Our experimental model combining GM-CSF and antigen signals in different doses and different order of administration shows that the best results in an antitumor vaccine are obtained when GM-CSF is administered after the antigen signal.

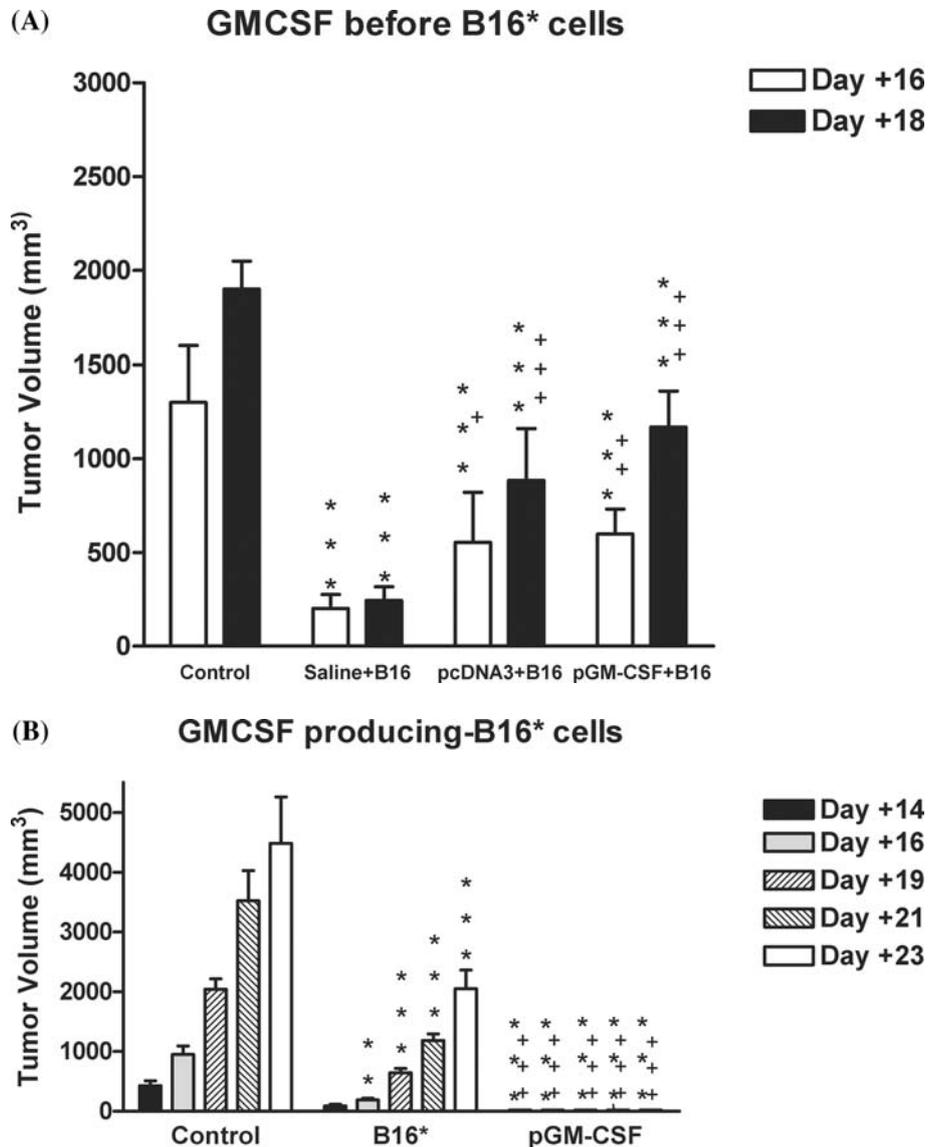


**FIGURE 3.** Tissue transfection plus TMP-based vaccines. C57BL/6 mice were treated with 50  $\mu\text{g}$  plasmid in 200- $\mu\text{L}$  saline solution in the right groin area (only saline in control groups) and then treated 24 and 72 h after plasmid injection with 10  $\mu\text{g}$  TMP (A) or 100  $\mu\text{g}$  TMP (B). This treatment pattern was performed in weeks -3, -1, and +1, with respect to tumor implantation on day 0 ( $10^5$  wild-type B16 cells, implanted in left leg). Tumor volume results from measuring the tumor with a caliper in two dimensions—A, the long diameter and B, the short one—and applying the formula  $V = (A \times B^2)/2$ . Two-way ANOVA statistical analysis was performed, with a Bonferroni post test (95% CI), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  when comparing with control group, and the same but with +, ++, +++ when comparing with saline (without plasmid) group.



**FIGURE 4.** TMP-based vaccines plus tisular transfection. C57BL/6 mice received the same treatment as in FIGURE 3 but with two differences, the sequence of the pattern was inverted, thus, it began with antigen treatment, 100  $\mu\text{g}$  TMP, on first day and day 48 h later, and then plasmid injection (or saline in control groups) was performed after 72 h. Another difference was the plasmid dose: two doses were tested, 10 and 50  $\mu\text{g}$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  when comparing with control group, and the same but with +, ++, +++ when comparing with saline (no plasmid) group.

Antitumor vaccines are very powerful tools, especially genetic vaccines, which have reached the best results, even in clinical trials.<sup>1-5</sup> However, in some cases the vaccines have not mediated immune activation, but rather anergy.<sup>6,7</sup> The immune system can limit its response if a threshold level of stimulation is exceeded and that is why it is very important to know how cytokine genes and antigens can cooperate in a synergistic way in an activation or, on the contrary, in the anergy of a immune response. We have evaluated the efficiency of the temporal sequence for the signal delivery in the system, following two different models: antigens plus gene or gene plus antigen. In both cases, the vaccinations were performed using isolated TMP as antigens or the tumor cells bearing these antigens themselves. In the experiments in which GM-CSF was administered before TMP for vaccination purpose, we observed that a good tumor growth inhibition was obtained. The effect was dose-dependent, achieving good results with a single 10  $\mu\text{g}$  TMP/dose (data not shown) and improving with 10 + 10  $\mu\text{g}$  TMP. When we keep on increasing the TMP dose, we arrive at a limit effect, obtaining the opposite result—worse tumor inhibition when administering the cytokine. Interestingly, we observed that this limited antitumor effect at higher antigen dose (100 + 100  $\mu\text{g}$  TMP) can be broken by inverting the signal sequence of the vaccination components. Thus, the highest tumor growth inhibition was obtained when injecting TMP



**FIGURE 5.** Cell-based vaccines, tissue transfection, and GM-CSF-producing B16 cells. Comparison of the tumor growth inhibition efficacy when administering GM-CSF before (A) or after (B) the cell administration. In (A) C57BL/6 mice were treated in the same way as in FIGURE 3, but giving  $2 \times 10^6$  B16 wild-type irradiated cells as antigens in the vaccine. In (B)  $2 \times 10^5$  wild-type freshly transfected B16 cells (with PEI/pMok m-gmcsf polyplexes,  $7.5 \mu\text{g/mL}$ ) were injected per dose (in  $100 \mu\text{L}$  DMEM), per mouse, in the right leg in weeks  $-3$ ,  $-1$ , and  $+1$ , with respect to tumor implantation, day 0 ( $10^5$  wild-type B16 cells in left leg). Control and B16\* group followed the same pattern, but only with  $100 \mu\text{L}$  DMEM or  $2 \times 10^5$  B16 wild-type irradiated cells in  $100 \mu\text{L}$  DMEM, respectively. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  when comparing with control group, and the same but with +, ++, +++ when comparing with B16\* group.

first, 100 + 100  $\mu$ g, and then *m-gmcsf*, especially at 10  $\mu$ g plasmid dose. The limited effect is lost when we invert the order of signal sequence, recovering and even improving the tumor inhibitory effect. So, the synergy is probably established when the first signal to arrive is the antigen and the second, GM-CSF. In order to confirm these results, additional experiments were performed in which tumor cells were employed as antigen signals. Our model, translated to cells, also confirmed the previous results employing TMP as antigens. Genetically modified cells have been demonstrated to be the most effective<sup>8</sup> and that is the reason why we wanted to corroborate our hypothesis by also working with them. In the experiments in which GM-CSF was administered before B16 nontransfected irradiated cells, the highest tumor growth inhibition was obtained using the cells alone, indicating that the previous tissue transfection of *m-gmcsf* decreases the cell vaccine efficacy, as already observed in TMP experiments. In addition, the small inhibitory effects seen in both pcDNA3 and pMok *m-gmcsf* groups were not significantly different, suggesting that the low tumor inhibition was not cytokine-dependent, and was most probably due to the lack of antigen signal in the first moments of interaction with the immune system. In contrast, when we worked with genetically modified cells that produce GM-CSF themselves, we achieved the best results. In this case, no tumor development was observed in any mouse, at least for 1 month, and 60% of the treated mice survived (data not shown). These data are consistent with the rest of TMP experiments, as the first signal is the antigen, and immediately after, GM-CSF is produced.

To summarize, in the context of a GM-CSF-based antitumor vaccine, the results obtained with TMP and also with cells suggest that the optimal sequence for achieving the best efficacy in tumor growth inhibition is presenting the antigen prior to the GM-CSF signal, whereas the inversion of these signals could result in inhibition or even anergy of the immune system.

## ACKNOWLEDGMENTS

The present work has been partially supported by Projects FIS PI 021740 from Instituto de Salud Carlos III and SAF 2004–08161 from MEC.

## REFERENCES

1. DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K., G. DRANOFF, H.J. WEINSTEIN, *et al.* 1998. Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines. *Blood* **91**: 222–230.
2. MASTRANGELO, M.J. & E.C. LATTIME. 2002. Virotherapy clinical trials for regional disease: *in situ* immune modulation using recombinant poxvirus vectors. *Cancer Gene Ther.* **9**: 1013–1021.

3. SE-HEON, K., J.F. CAREW, D.A. KOOBY, *et al.* 2000. *Cancer Gene Ther.* **7**: 1279–1285.
4. BORRELLO, I. & D. PARDOLL. 2002. *Cytokine and Growth Factor Rev.* **13**: 185–193.
5. JAFFEE, E.M., R. ABRAMS, J. CAMERON, *et al.* 1998. A phase I clinical trial of lethally irradiated allogeneic pancreatic tumor cells transfected with the GM-CSF gene for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Human Gene Ther.* **9**: 1951–1971.
6. SERAFINI, P., R. CARBLEY, K.A. NOONAN, *et al.* 2004. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res.* **64**: 6337–6343.
7. RODRÍGUEZ-LECOMPTE, J.C., S. KRUTH, *et al.* 2004. Cell-based cancer gene therapy: breaking tolerance or inducing autoimmunity? *Anim. Health Res. Rev.* **5**: 227–234.
8. SHI, F.S., S. WEBER, J. GAN, *et al.* 1999. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF. *Cancer Gene Ther.* **6**: 81–88.
9. MORET-TATAY, I., J. DIAZ, F.M. MARCO, *et al.* 2003. Complete tumor prevention by engineered tumor cell vaccines employing nonviral vectors. *Cancer Gene Ther.* **10**: 887–897.
10. GUILLEM, V.M. & S.F. ALIÑO. 2004. Transfection pathways of nonspecific and targeted PEI-polyplexes. *Gene Ther. Mol. Biol.* **8**: 369–384.
11. BORDIER, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **25**: 1604–1607.
12. BOTELLA-ESTRADA, R., F. DASÍ, D. RAMOS, *et al.* 2005. Cytokine expression and dendritic cell density in melanoma sentinel nodes. *Melanoma Res.* April: 99–106.

## NONVIRAL CANCER VACCINES: FROM FREE ANTIGENS TO ENGINEERED CELLS

Herrero MJ<sup>1</sup>; Botella R<sup>2</sup>; Algás R<sup>3</sup>; Marco F<sup>4</sup>; Lledó S<sup>5</sup>; Aliño SF<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>- Unidad de Terapia Génica, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia

<sup>2</sup>- Servicio de Dermatología, Instituto Valenciano de Oncología (IVO), Valencia

<sup>3</sup>- Servicio de Radioterapia, Hospital Clínico Universitario, Valencia

<sup>4</sup>- ASAC Pharmaceutical International, Alicante

<sup>5</sup>- Servicio de Cirugía, Hospital clínico Universitario, Valencia

<sup>6</sup>- Unidad de Farmacología Clínica, Hospital Universitario La Fe, Valencia (Spain)

### ABSTRACT

In the present work we have developed several models of cancer vaccines, employing a murine melanoma and nonviral procedures for gene transfer. Many efforts have been made in relation to cancer vaccines, attempting to elucidate the best way to induce correct activation of the immune system in order to achieve proper antitumor response. Engineered cells seem to be the most successful approach, since they better reproduce the processes that occur in real patients, including events that today still escape our understanding. However, purified antigens represent an easier approach in terms of their preparation, reproducibility and facility to become a commercial medicine. This is why they continue to center attention, though their results are still not particularly satisfactory. In an attempt to establish the best approach for stimulating the immune response and also securing the simplest treatment, we have tested different preventive vaccination models such as: a) purified antigens from irradiated B16 melanoma tumor cells (Tumor Membrane Proteins, TMP); b) such antigens encapsulated in liposomes; c) lipopolyplexes formed by cationic liposomes bearing antigens plus the cationic polymer polyethyleneimine (PEI), carrying DNA; d) freshly transfected and irradiated B16 cells, producing cytokines; and e) a very reduced number of transfected cells, selected by means of magnetic bead procedures. The results obtained show different rates of tumor growth inhibition - performance improving when adjusting the combinations of plasmid bearing the cytokine gene and TMP antigens in the lipopolyplexes. The best inhibition (total) was obtained with freshly transfected (not selected) cells, which allowed us to perform further experiments consisting of a vaccine with only the truly transfected (cytokine-producing) cells. On this occasion, reducing the cell number to only 20% that of the prior doses, we achieved about 80% of tumor growth inhibition. All these results encourage the conduction of further studies of this kind, with the purpose of increasing accuracy and optimizing cancer vaccine procedures.

## INTRODUCTION

Genetically modified tumor cells have been shown to be very efficient in various models of antitumor vaccines [1, 2, 3]. Still, the main problem with these models is the great difficulty of obtaining tumor cells from patients and that moreover must be kept in culture, amplified to a larger number, transfected and then returned to the same patient. This is not easy, even when employing other proposed methods - not only with tumor cells, but also with syngenic or allogenic cells [4, 5]. All these efforts in the field of cancer vaccine research have converged on the idea that the best results are obtained vaccinating not only with the tumor antigens, but also with the genes that the immune system itself would use to achieve a good response: the cytokine genes. However, the functioning of the immune system is very complex, and combining these two components has not always been successful [6, 7], leading to immune suppression or even anergy. Our group has also made efforts to elucidate the correct time order to supply the two signals [8]. At present, the most effective way of administering these two components is the introduction of cells, or a neoplastic nature or otherwise, that produce the cytokine themselves [8, 9, 10]. In this context, many studies have achieved promising results, and clinical trials have been set up [11, 12]. To understand what kind of antigens work best and how they awaken a truly effective response, we also wanted to work with tumor cell antigens instead of whole cells - since they offer the advantage of being easier to prepare and standardize as commercial medicines [13]. In this sense, we have worked in a murine model of melanoma, using the two above mentioned components to develop an antitumor vaccine, antigens and cytokine genes, adopting two different approaches: purified antigens or cells. As antigens, we have used irradiated whole tumor cells (murine melanoma B16 cells) or an extract of their hydrophilic membrane antigens (tumor membrane proteins, TMP). As cytokines, we have used the m-GMCSF encoding gene (Granulocytes and Macrophages Colony Stimulating Factor), which has largely demonstrated great usefulness as an antitumor tool [1, 4, 6, 10]. However, in later experiments, our tumor cells have also been transfected with the m-B7.2 encoding gene.

The first set of experiments is based on TMP encapsulated in liposomes or lipopolyplexes, and there we have explored the best liposome type and formulation, and the quantity of TMP and quantity of GM-CSF suitable for achieving an antitumor response.

Liposomes and lipopolyplexes also have a long trajectory in the field of vaccines, and have been shown to be good adjuvants in many different settings [14-17].

Nevertheless, being aware of the more solid results obtained with whole cells instead of purified antigens, in the second set of experiments we have worked with freshly transfected B16 cells, producing GM-CSF and B7.2.

B7.2 (also called CD86) is a costimulatory molecule of the immune system, naturally expressed only at the surface of professional Antigen Presenting Cells (APCs). This molecule has been widely employed in different antitumor approaches [18-24], as it enhances the immune response by participating in the activation of T cells: after the first signal of antigen recognition in the APC, the major histocompatibility complex (MHC) molecules present the antigenic peptides to the TCR (T Cell Receptor); however, only if the second signal (costimulation) is also present, will the T cells correctly begin sustained cell proliferation, effector or memory cell generation, and the prevention of anergy or apoptosis. It is in relation to this second signal where B7.2 plays its role by positively stimulating T cells through CD28. Our aim in employing B7.2 has been to increase the T cell response against the transfected B16 cells, but we have also taken advantage of such transfection to select and purify only the truly transfected cells from a total population of freshly transfected cells and to perform a vaccination experiment with a very reduced cell number - again attempting to define the minimum number of cells required to secure good results, and thus start with "easier to prepare" cell vaccines.

## **MATERIALS AND METHODS**

### Plasmids

p2F m-gmcsf, p2F m-B7.2, p2F m-gmcsf + m-B7.2 and p2F Ø, were derived from the pVITRO2 base plasmid (Invivogen, France), with the *m-gmcsf* gene, *m-B7.2*, *m-gmcsf* plus *m-B7.2* genes or the empty plasmid, respectively. pVITRO2 allows the coexpression of two genes and contains two human ferritin composite promoters, FerH (heavy chain) and FerL (light chain), combined to the SV40 and CMV enhancers respectively, and the resistance gene to Hygromycin. To eliminate the iron regulation, their 5'UTRs have been replaced by the 5'UTR of the mouse and chimpanzee EF1 $\alpha$  genes.

All plasmids were amplified in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , in selective LB broth (Pronadisa, Spain) and extracted with the Qiagen Giga Endofree kit (Izasa SA, Spain), quantified by spectrophotometry and tested by electrophoresis to confirm their integrity and purity.

#### TMP obtainment

The mixture of hydrophilic membrane proteins from B16 cells was performed following a protocol based on the work of Bordier work [25]. Briefly, after detaching and counting the irradiated cells, their pellet is resuspended in 1 ml of extraction buffer for every 10 million cells, containing Tris 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, Triton X-114 0.5% (Sigma, Spain) and phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 0.1 mM (Sigma, Spain), pH 7.2. The mixture is incubated in ice for 45 min., shaking gently every 10 min. Then, centrifugation is carried out at 5300 rpm, 4°C, for 15 min. The supernatant is recovered and 750 µl placed above 250 µl of centrifuge buffer (sucrose 10% in extraction buffer) in microcentrifuge tubes. After incubating 3 min. at 37°C, it is centrifuged again for 5 min. at 2100 rpm. Supernatant (750 µl) is recovered and Triton X-114 added to a final concentration of 0.5% before placing the tube in ice again over 250 µl of centrifuge buffer. After incubating for 3 min. more at 37°C and centrifuging for 5 min. more at 2100 rpm, two different phases are obtained in the microcentrifuge tube: the upper one contains the hydrophilic proteins, that will be kept in aliquots at -20°C until use.

The proteins are quantified with the CBQCA protein quantitation kit (Molecular Probes-Invitrogen, Spain), following the manufacturer's instructions.

#### Liposomes and lipopolyplexes

Three different types of liposome production were tested: Multilamellar Vesicles (MLV), Dehydration-Rehydration Vesicles (DRV), and Freeze-Thawed Multilamellar Vesicles (MLV-FT), proceeding according to the literature for manufacture [26, 27]. Also, four different lipidic compositions were evaluated, employing Phosphatidylcholine (PC), Sphingomyelin (SM), Cholesterol (CH) and Dicetylphosphate (DP), all from Sigma (Spain), being PC:CH and SM:CH at 6:4 molar ratio and PC:CH:DP and SM:CH:DP at 5:4:1. All were formed in Milli Q water. The liposomes chosen for lipopolyplex formation were PC:CH:DP (5:4:1), which were later coupled with PEI 25 KDa (polyethyleneimine, Sigma, Spain) linked to the plasmid in use, at a ratio of 1.41:1, PEI:DNA (polyplex, also made in Milli Q) [27, 28]. To test the quantity of protein encapsulated in each type of liposome, the CBQCA protein quantitation kit (Molecular Probes-Invitrogen, Spain) was employed, following the manufacturer's instructions.

#### Cells and transfection procedures

B16 murine melanoma cells have been used in all of the experiments. These cells are syngenic with the animals used for vaccination, i.e., C57BL/6 mice (Harlan, France). B16 cells were also used as source of antigen for vaccination, either as whole cells or employed to obtain an extract of their membrane proteins (TMP). To inoculate the tumors in vaccinated and control groups of mice,  $10^5$  freshly detached B16 cells were injected in their usual simple culture medium into the left leg of the animals, while the vaccines were injected subcutaneously into the right leg.

B16 cells are adherent cells that are grown in flasks with DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma, Spain), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biomedica, France), Penicillin (100 U/ml) and Streptomycin (100 µg/ml). They are cultured in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, and are detached from the flasks with Trypsin-EDTA. When whole cells are used for vaccinating, they are irradiated with a 150 Gy dose, after being detached from their flasks, and are later frozen in FBS with 5% DMSO to be kept at -80 or -150°C until use.

The cells were transfected by means of a chemical procedure based on PEI 25 KDa (polyethyleneimine. Sigma, Spain) polyplexes with 20 µg/ml p2F plasmids, as previously described [8, 26]. The transfection percentage with this method lies between 20-40% of total cells (data not shown), as observed using the reporter EGFP gene. Cells were transfected when more than 80% confluence was reached in their flasks, irradiated 72 hours post-transfection with 150 Gy, and then frozen in DMSO 5% in FBS and kept at -80 or -150°C until use.

#### Determination of m-GM-CSF production

The GM-CSF production of the transfected B16 cells is determined by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), performed on supernatant samples of the culture media taken 72 hours post-transfection and prior to cell detachment and irradiation, having changed the media every 24 hours. The BD OptEIA ELISA kit for m-GM-CSF (Pharmingen, BD Biosciences, Spain) was used. The time-point of 72 hours was chosen on the basis of prior experimental results, assessed to study cytokine production over time, and using the referred transfection conditions [8, 10, 26], in order to achieve adequate production according to the literature [4].

#### Determination of m-B7.2 production

Flow cytometry was performed to confirm the presence of m-B7.2 in the surface of the transfected cells. At 72 h post-transfection, cells were harvested and pelleted in aliquots of 500,000 cells, washed and incubated in ice for at least 30 min. in 200  $\mu$ l PBS-FBS (2.5%) - Azide (0.01%) solution of primary antibody (1  $\mu$ g/million cells): Biotin-conjugated rat anti-mouse CD86 monoclonal antibody (Pharmingen, BD, Spain). Then, cells were washed twice in 1 ml PBS-Azide and incubated in ice and dark with the secondary antibody (0.5  $\mu$ g/million cells): Streptavidin-Fluorescein Isothiocyanate conjugate (FITC) (Pharmingen, BD, Spain).

Finally, cells were washed twice and finally resuspended in 500  $\mu$ l PBS to be passed through the cytometer (Coulter Epics, XL; Beckman Coulter, Spain) and for analysis of the fluorescence in the populations, in order to discriminate the truly transfected cells. To avoid taking autofluorescence or nonspecific binding as positive results, several controls were tested. The groups were: a) non-transfected wild type B16 cells, without any antibody; b) non-transfected wild type B16 cells incubated with both antibodies; c) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, without any antibody; d) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, incubated only with primary antibody; e) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, incubated only with secondary antibody; and finally f) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, incubated with both primary and secondary antibody.

#### Selection and purification of transfected cells

This process is carried out by means of the Automacs device for magnetic cell separation (Miltenyi Biotec, Spain), according to the manufacturer's instructions and employing the Automacs columns. At 72 h post-transfection, cells are harvested and incubated with the first antibody, in PBS, under the same conditions as in the flow cytometry experiments; the Streptavidin Microbeads protocol is then followed (Miltenyi Biotec, Spain), and transfected cells are separated and purified employing the "Posseld 2" program. Lastly, cells are counted and frozen until the time of the vaccination experiments.

#### Preventive vaccination procedures

C57BL/6 mice (8-10 weeks old) kept under standard laboratory conditions were housed 5 mice per cage. All the experiments were approved by the Biological Research Committee of the University of Valencia (Spain). In all cases, mice were vaccinated (right leg) with a single dose per week, in weeks -3, -1 and +1 (days -21, -7 and +7), with respect to tumor injection (day 0) in the form of  $10^5$  wild type B16 cells in the left leg.

For experiments with liposomes and lipopolyplexes, 100  $\mu$ l of liposomes or lipopolyplexes in Milli Q water were injected at each dose, the treatment groups for the liposomes containing TMP vaccine being: a) 10  $\mu$ g of TMP alone; b) PC:CH liposomes containing 10  $\mu$ g of TMP; c) SM:CH liposomes containing 10  $\mu$ g of TMP; and d) Control group (100  $\mu$ l saline solution). For the lipopolyplexes vaccine, the complexes were prepared with 10 or 50  $\mu$ g of p2F *m-gmcsf* plasmid (GM10 or GM50) and 2 or 20  $\mu$ g of TMP (TMP2 or TMP20), being GM10/TMP2, GM10/TMP20, GM50/TMP2, GM50/TMP20.

For experiments with freshly transfected B16 cells (non-selected), cells were thawed and counted for  $2 \times 10^5$  B16 cells (previously transfected, irradiated and frozen) per dose (groups p2F $\emptyset$ , B7.2, GM, GM+B7.2/200) per mouse, in 100  $\mu$ l DMEM. For p2F *m-gmcsf* + m-B7.2 treatment, two different cell doses were studied: one with the usual cell dose ( $2 \times 10^5$ ), GM+B7.2/200; and another with cells sufficient to reach the same GM-CSF production as in the GM group, according to previous ELISA experiments of GM-CSF production (data not shown), i.e., group GM+B7.2/500. In the B16\* group,  $2 \times 10^5$  wild type irradiated B16 cells (150 Gy) were injected in 100  $\mu$ l DMEM, while in the Control group only 100  $\mu$ l DMEM was injected, at every three vaccination dose.

For experiments with transfected and selected B16 cells (beads selection), we chose a vaccine dose that represented only the truly transfected cells of the “non-selected cells vaccine”. Thus, we had to vaccinate only with 20% of the previous doses, since in this case all of the employed cells would be transfected cells. Our two groups were: Control (100  $\mu$ l DMEM) and GM+B7.2/40, employing only 40,000 selected cells per mouse, per dose, in 100  $\mu$ l DMEM.

In all vaccination experiments, blood samples were taken from all the animals, pooling blood from the animals from the same group at each time-point. The samples were taken on days -22 (before any manipulation of the animals, serving as base level or control in each group), -1 (the day before tumor implantation, day 0, with two vaccination doses already performed), and +15 (one week after the third and last dose was administered). Plasma was obtained by centrifugation at 3000 rpm for 5 min. and kept at -20°C until use.

#### Tumor growth measurement, survival and statistical analysis

Tumor growth in mice was monitored visually and measured with a caliper in two dimensions, A, the long diameter and B, the short diameter. Tumor volume was calculated with the formula  $V = (A \times B^2) / 2$ ,

and expressed in mm<sup>3</sup>. Total or partial survival was achieved in some of the treated groups; animals were collected at their death date to construct the survival curves. To statistically compare the results of the different treatment groups, a two-tailed ANOVA was used, with Bonferroni post hoc testing (95% confidence interval, 95%CI), expressing statistically significant differences on the basis of P<0.05, P<0.01 and P<0.001.

#### *Specific anti-TMP IgG ELISA*

Measurement of IgG and IgG subclass antibodies to TMP was performed in serum samples by specific ELISA, as previously described [13]. Plates were coated by overnight incubation of TMP at 0.8 µg/ml in carbonate buffer, pH 9.6. The next day, plates were neutralized with 1% BSA solution before addition of serum samples. For analysis, sera were diluted in dilution buffer (PBS-BSA 1%-Tween 20 0.1%) at 1/1000 for total IgG and IgG1 subclass and at 1/100 for IgG2a. Bound antibodies were detected with goat antisera to total IgG (Biocheck, USA) at 1/10000 or mouse IgG subclasses at 1/1000 (Sigma, Mouse monoclonal isotyping reagents, Spain), followed by 1/5000 dilution of biotinylated rabbit antiserum to goat IgG (Sigma, Spain) and streptavidin coupled to horseradish peroxidase (Sigma, Spain). Plates were developed with a mixture of orthophenylenediamine (OPD, Sigma, Spain) and hydrogen peroxide (Fluka, Spain), and read at 492 nm. All samples were assayed in duplicate, allowing the estimation of mean OD value and standard deviation.

## **RESULTS**

#### *Efficacy of protein encapsulation in liposomes*

The different procedures of liposome preparation revealed a very different ability for encapsulating BSA Protein (Bovine Serum Albumin), as seen in Figure 1-A. The freeze and thaw cycles performed during the formation of MLV-FT liposomes enable these vesicles to entrap nearly 90% of the protein present in the medium. These results made us continue with this kind of liposomes, as our purpose was to use them simply as a delivery vehicle for our tumor antigens (TMP), so the more effective the better, in the sense that we would be able to deliver more antigen with less lipid.

As we wanted to simultaneously transport proteic antigens (TMP) and DNA encoding cytokine genes (GM-CSF) in two independent compartments, we prepared a lipopolyplex complex in which TMP were encapsulated in anionic liposomes, whereas DNA was prepared as a PEI/DNA polyplex. For this reason,

we were interested in obtaining good encapsulation of TMP in anionic liposomes - in our case liposomes containing the anionic DP lipid. In Figure 1-B, the best encapsulation percentages are achieved with PC:CH, for the simple formulations, and are equivalent in PC:CH:DP and SM:CH:DP. The best encapsulation was achieved when liposomes incorporated 10% DP, which is why we used the more classical PC:CH:DP liposomes for the following lipopolyplex experiments.

#### Liposomes and lipopolyplexes vaccine

With the aim of evaluating the efficacy of TMP vaccines employing liposomes or lipopolyplexes as carriers, C57BL/6 mice (n=5 per group) were vaccinated in the right leg at a single dose per week, on weeks -3, -1 and +1 (days -21, -7 and +7), with respect to tumor injection (day 0) with  $10^5$  wild type B16 cells in left leg. Liposomes or lipopolyplexes (100  $\mu$ l) were injected at each dose in the following groups: a) 10  $\mu$ g of TMP alone; b) PC:CH liposomes containing 10  $\mu$ g of TMP; c) SM:CH liposomes containing 10  $\mu$ g of TMP; and d) Control group (100  $\mu$ l saline solution), as seen in Figure 2. For the lipopolyplexes vaccine, in Figure 3, complexes made of 10 or 50  $\mu$ g of p2F *m-gmcsf* plasmid (GM10 or GM50) and 2 or 20  $\mu$ g of TMP (TMP2 or TMP20) were employed, according to the following groups: a) GM10/TMP2, b) GM10/TMP20, c) GM50/TMP2, and d) GM50/TMP20. Tumor growth was monitored in mice, measuring the long diameter (A) and the short diameter (B) with calipers. The tumor volume was calculated with the formula  $V = (A \times B^2) / 2$ , and expressed in  $\text{mm}^3$ . Statistical tests were performed by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc testing. In Figure 2, “a” represents a statistically significant difference of  $P < 0.05$  regarding the TMP Lp SM group; “b” the same, but regarding the Control group; and “c” is  $P < 0.01$  compared also with the Control group. Tumor growth is inhibited (40-50%) with statistically significant differences on day +22 after tumor implantation (Day 0), when comparing TMP 10  $\mu$ g or TMP Lp PC versus TMP Lp SM or Control, and no differences were found within the two couples. These results led us to continue working with PC liposomes.

In Figure 3, “a, b, c, d” represent a statistically significant difference of  $P < 0.001$  comparing GM10/TMP20 with each following group in the figure, respectively. The figure shows statistically significant differences in tumor growth inhibition on days +20 and +23, regarding tumor implantation, achieved only by group GM10/TMP20 (40-50%) when compared with all other treatments, and reaching the maximum degree of significance. The other groups did not show any difference between each other. Thus, the best combination in this experiment was vaccinating with a lipopolyplex that contained the

lowest DNA and the highest antigen quantities.

Although similar growth inhibition was achieved in liposomes and lipopolyplex vaccines, differences were observed in the survival results. While in the Liposome Vaccine experiment we did not observe any differential survival between treated and control groups (data not shown), better survival results were observed in the Lipopolyplex Vaccine experiment (Figures 4-A and B). In Fig. 4-A, the groups with the lower DNA doses are represented, both of them achieving longer survival periods than the control group. According to the results of tumor growth inhibition, the longest survival was reached with 10 DNA  $\mu\text{g}$  of GM-CSF, while the groups treated with higher than 50  $\mu\text{g}$  DNA doses (Fig. 4-B) performed worse than the control group.

Blood samples were taken from all the animals during the experiment, pooling blood from the animals from the same group at each time-point, with respect to the tumor transplant day (day 0). The samples were taken on days -22 (before any manipulation of the animals, which serves as base level or control in each group), day -1 and day +15. The total anti-TMP IgG found by ELISA in the vaccinated mice and control group is shown in Figure 5. The measurements were made in duplicate, and means and standard deviations (SD) were calculated and represented, although SD is inappreciable, since it was less than 5% of the mean value, which also happened in the rest of the vaccine experiments in this work. In this figure, the treatments with higher antigen doses (20  $\mu\text{g}$  TMP) show the maximum IgG response on day +15, whereas the two groups with the lower TMP dose (2  $\mu\text{g}$ ), show their maximums on day -1, and these levels are always lower than those recorded for the other two groups. In order to know the immunoglobulin switch induced by vaccination, specific subtypes IgG1 and IgG2a were also studied, and the results were summarized in Figures 6-A and B, respectively. The same pattern as for total IgG is observed, with more relevant differences between the two TMP conditions in IgG1. On the other hand, optimal responses in IgG2a are achieved when 20  $\mu\text{g}$  TMP and 10  $\mu\text{g}$  DNA GM-CSF were employed, since higher DNA doses did not offer any advantages. Also, GM50/TMP2 increased IgG2a response, but mainly limited to day-1.

#### Determination of m-B7.2 production

The efficiency of m-B7.2 expression on B16 cell surface 72 h after transfection was evaluated by flow cytometry. The results are summarized in Figure 7, which plots counts versus F1 Log, and where we can identify specific surface expression of m-B7.2 in the right peak of the figure, whereas the middle and left peaks correspond to the transfected and non-transfected control cells, respectively. The intersection area

between the middle peak and the right peak represents the proportion of transfected cells that are also fluorescent, i.e., the cells that express m-B7.2 at their surface. This area is approximately 20-40% of the right peak, which was our expected transfection efficacy, according to our previous experiments (data not shown).

#### Cell vaccine employing non-selected freshly transfected cells

The aim of this experiment was to evaluate the efficacy of the antitumor vaccine with genetically engineered tumor cells, expressing cytokines such as mGM-CSF and mB7.2. Thus,  $2 \times 10^5$  B16 cells previously transfected (p2F $\emptyset$ , B7.2, GM, GM+B7.2/200), irradiated (150 Gy) and frozen, were injected on days -21, -7 and +15 with 100  $\mu$ l DMEM. For p2F m-gmcsf + m-B7.2 treatments, two different cell doses were studied: one with the usual cell dose ( $2 \times 10^5$ ), GM+B7.2/200; and another with cells sufficient to reach the same GM-CSF production as in the GM group, according to the ELISA experiments of GM-CSF production (data not shown), i.e., group GM+B7.2/500 ( $5 \times 10^5$  cells). In the B16\* group,  $2 \times 10^5$  irradiated wild type B16 cells (150 Gy) were injected, and in the Control group, only DMEM was injected for each dose. The best results (Figure 8) were obtained employing GM+B7.2/200 and GM alone groups, since no tumor development was observed (marked with arrows in the figure) in any of the animals with those treatments 23 days after tumor implantation, when animals from other groups had started to die. In the figure, "a" corresponds to the maximum statistically significant difference,  $P=0.001$ , and "b" represents  $P=0.01$ , both versus the Control group. The survival curves of these groups are shown in Figure 9, and were consistent with the tumor inhibition results. In group GM, 100% mice survival was observed more than three months after tumor transplant. The GM+B7.2/200, GM+B7.2/500 and B7.2 groups achieved 80, 40 and 20% survival, respectively. Groups B16\* and p2F  $\emptyset$  failed to increase survival versus the control group.

Figure 10 shows the total specific IgG found in the plasma of the animals from this experiment, as explained also for Figure 5. All the groups showed the highest production on day +15, the best performance corresponding to the groups containing GM-CSF in the transfection. In addition, the study of IgG1 and IgG2a subtypes supports the same idea. GM-CSF transfection must contribute to the efficacy of the antitumor response in a significant way, while B7.2 exerts a more limited effect, and no synergistic effect was observed with GM-CSF gene.

#### Expression-selected cell vaccine

Since the maximal efficacy of our non-viral transfection procedure was 20-40% of the cells, we must expect that the non-transfected cells (80-60%) contribute poorly to vaccine efficacy. Therefore, we thought that our previous procedure, employing non-selected transfected cells, could be improved if only the cytokine-expressing cells, selected by magnetic beads purification, were used in the vaccine. For this purpose, we designed the experiments employing both GM-CSF and B7.2, due to their contribution to antitumor vaccine success and the B7.2 protein membrane location serving for cell magnetic selection. Thus, two groups were established: Control (100  $\mu$ l DMEM) and GM+B7.2/40, employing only 40,000 selected cells per dose, in 100  $\mu$ l DMEM.

The tumor growth inhibition results of the Selected Cells Vaccine are shown in Figure 12. The results on each measurement day were maximally significant ( $\alpha = P < 0.001$ ), achieving reductions of more than 80% in tumor volume. These results are consistent with increased survival (Figure 13) in the GM+B7.2/40 group.

The total specific anti-TMP IgG and the IgG1 and IgG2a subtypes are shown in Figures 14-A and B, respectively. The immunoglobulin levels are again consistent with the tumor growth inhibition and survival data.

## CONCLUSION

The aim of this work has been to try to improve the antitumor vaccine methods in order to establish the easiest and most efficient protocol. Engineered cells secreting cytokines have been widely demonstrated to be the most effective vaccines [1-7, 9, 11], as we have also seen [8,10, 12], though we are aware of the great difficulty of working with this approach in actual clinical practice. In effect, taking cells from the patients that also must be kept in culture, amplified to a larger number, transfected and then returned to the same patient, guaranteeing sterility, no contamination, an acceptable number of cells, as well as cytokine production, is not an easy task. This is why we decided to focus effort on two different fronts. The first involved an attempt to reduce the cell number required to start a proper immune response against the tumor, thus avoiding very complex cell work in future patients. The second front focusing our effort is more difficult, because not so good results have been achieved with this kind of procedure to date [13, 16], i.e., forgetting about cells and returning to the origins: vaccines made only of components supposed to be necessary, i.e., tumor antigens derived from cell membrane proteins (TMP) and plasmids containing the *gm-csf* and *B7.2* genes.

For the antigens approach, we studied the antitumor efficacy of several models: TMP alone, TMP encapsulated in liposomes, and finally lipopolyplexes bearing both TMP antigens and the GM-CSF cytokine gene. After choosing the best liposome type, we performed two vaccination experiments and conclude that although the tumor growth inhibitions were similar in the best groups from the three models, the best survival results were obtained with the lipopolyplexes comprising liposomes PC:CH:DP and polyplex PEI:p2F *m-gmcsf*, containing 20 µg TMP and 10 µg of the plasmid per dose. These results were also reflected in mice IgG production, not only in terms of total production but also in terms of the IgG1 and IgG2a subtypes. It should be noted that the groups with the higher TMP dose in the lipopolyplexes showed a later maximum production of IgG2a (day +15), while the groups with the lower TMP dose peaked earlier (day-1). However, this difference is apparently not correlated to survival. In contrast, high and low GM-CSF doses, which discriminated between better or worse survival results, did not have significant effect upon IgG2a plasma levels, suggesting that while IgG switching should be interesting for cell memory induction and antitumor response activation, this effect must be limited and other mechanisms must be involved in a negative regulation [7].

The best results were obtained with the cell vaccine approach on vaccinating with  $2 \times 10^5$  transfected cells, 100% and 80% survival levels were achieved in GM and GM+B7.2/200 groups, respectively. This cell vaccine also confirms the idea that higher amounts of GM-CSF production are not necessarily better [4,6,7]; on the contrary, GM+B7.2/500 induced poorer survival results than GM+B7.2/200, which had half the GM-CSF production. However, we think that synergistic effects between GM-CSF and B7.2 must exist, due to the good survival response promoted by the GM+B7.2/200 group. Again, the GM-CSF transfected cell groups showed the highest IgG productions. In this vaccine, a good correlation was observed between IgG response and survival, mainly in relation to the IgG2a subtype. Finally, from all these experiments, we must consider that in some cases the humoral response may not show a good correlation to survival, probably due to other phenomena such as regulatory T cell immune suppression. Since the survival results suggest that cell vaccines achieve significant antitumor effects, we made additional efforts to improve the efficacy of the procedure by reducing the cell number required for each vaccine dose. In this respect, we knew that only 20–40% of the cells that we had employed in cell vaccination were transfected, and for this reason we designed new vaccine experiments employing only the cytokine-expressing cells. Thus, we made use of the B7.2 surface membrane expression strategy because it has been shown in our experiments and in the literature [18–24] to be helpful and even

synergistic with GM-CSF in some cases. Moreover, its location in the cell could help us select the cells expressing the protein on their membranes, i.e., only the transfected cells. The aim of the experiment was to determine whether only the transfected cells (20% of  $2 \times 10^5 = 40,000$  cells) were able to mediate the same successful results as those obtained in nonselected-cell vaccines. The selected cells vaccine showed a very significant tumor growth reduction employing only 40,000 cells, and this reduction correlated to a longer survival and good IgG response of the treated mice. Although the results were not as good as those with the non-selected cells vaccine, no conclusions can be drawn before a dose-dependent study is made. It remains to be elucidated how synergistic effects between antigens, GM-CSF and costimulatory B7.2 molecules cooperate in the generation of efficient antitumor response or toxicity. We cannot exclude a lack of net antigen contribution due to the reduction in cell number or, contrarily, an excess in GM-CSF production which could result in a loss of vaccine efficacy. These experiments will focus our future attention, and will contribute to clarify the exact need of each component in a cell vaccine that could become suitable for use in clinical practice.

**Acknowledgements:** This work has been partially supported by the *Ministerio de Educación y Ciencia* SAF 2004-08161 and SAF 2007-64492 and the *Generalitat Valenciana* GVACOMP 2006-217.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1- A- BSA protein encapsulation in liposomes.** Ability for encapsulating BSA protein in different procedures of liposome preparation: Multilamellar Vesicles (MLV), Dehydration-Rehydration Vesicles (DRV) and Freeze-Thawed Multilamellar Vesicles (MLV-FT). **B- TMP encapsulation in Lp MLV-FT.** Percentage of TMP encapsulation in MLV-FT liposomes with different lipidic compositions: Phosphatidylcholine (PC), Sphingomyelin (SM), Cholesterol (CH) and Dicetylphosphate (DP).

**Figure 2- Liposomes with TMP vaccine.** C57BL/6 mice (n=5 per group) were vaccinated in the right leg on days -21, -7 and +7 with respect to tumor injection on day 0 ( $10^5$  wild type B16 cells) in the left leg. Treatments: a) 10  $\mu$ g of TMP alone; b) PC:CH liposomes containing 10  $\mu$ g of TMP; c) SM:CH liposomes containing 10  $\mu$ g of TMP; d) Control group (100  $\mu$ l saline solution). Tumor volume was calculated from  $V = (A \times B^2)/2$ , where A is the long diameter and B the short diameter, with volume expression in  $\text{mm}^3$ . Statistical tests were performed by two-way ANOVA and Bonferroni post hoc testing. Statistically significant difference of  $P < 0.05$  regarding TMP Lp SM group = a, b is the same but regarding Control group, and c is  $P < 0.01$  likewise versus the Control group.

**Figure 3- Lipopolyplexes vaccine.** The same vaccination pattern as in Fig. 2 was followed, but treatments were lipopolyplexes prepared with 10 or 50  $\mu$ g of p2F *m-gmcsf* plasmid: PEI polyplexes (GM10 or GM50) linked with 2 or 20  $\mu$ g of TMP (TMP2 or TMP20) in PC:CH:DP liposomes, being GM10/TMP2, GM10/TMP20, GM50/TMP2, GM50/TMP20. Volume formula and statistical analysis were the same as in Fig. 2. Statistically significant difference of  $P < 0.001$  comparing GM10/TMP20 with each following group in the figure is represented by a, b, c and d, respectively.

**Figure 4- Survival in lipopolyplexes vaccine.** Animal death dates were collected to construct survival curves. **A-** Results of Control and groups treated with lipopolyplexes containing 10  $\mu$ g p2F *m-gmcsf*. **B-** Results of Control and groups treated with lipopolyplexes containing 50  $\mu$ g p2F *m-gmcsf*.

**Figure 5- Total Anti-TMP IgG in lipopolyplex vaccine.** Blood samples were taken from all the animals on days -22, -1 and +15, pooling the blood of the animals from the same group at each time-point, with

respect to the tumor transplant day (day 0). Plasma was obtained by blood centrifugation at 3000 rpm during 5 min. Specific anti-TMP IgG were measured in plasma by ELISA: Plates were coated by overnight incubation of TMP at 0.8 µg/ml in carbonate buffer, pH 9.6. The next day, plates were neutralized with 1% BSA solution before addition of serum samples. For analysis, sera were diluted in dilution buffer (PBS-BSA 1%-Tween 20 0.1%) at 1/1000 for total IgG and IgG1 subclass and at 1/100 for IgG2a. Bound antibodies were detected with goat antisera to total IgG (Biocheck, USA) at 1/10000 or mouse IgG subclasses at 1/1000 (Sigma, mouse monoclonal isotyping reagents, Spain), followed by 1/5000 dilution of biotinylated rabbit antiserum to goat IgG (Sigma, Spain) and streptavidin coupled to horseradish peroxidase (Sigma, Spain). Plates were developed with a mixture of orthophenylenediamine (OPD, Sigma, Spain) and hydrogen peroxide (Fluka, Spain), and read at 492 nm. All samples were assayed in duplicate, allowing the estimation of mean OD value and standard deviation.

**Figure 6- Specific anti-TMP IgG subclasses in lipopolyplexes vaccine.** The same protocol as described in Fig. 5 was used, this time for IgG1 subclass (A) and IgG2a subclass (B).

**Figure 7- Flow cytometry of p2F m-gmcsf+mB7.2 transfected B16 cells.** Groups of B16 cells were passed through the cytometer: a) non-transfected wild type B16 cells, without antibodies; and b) non-transfected wild type B16 cells incubated with both antibodies, both corresponding to the left peaks. Corresponding to the middle peak: c) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, without antibodies, d) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, only with primary antibody, e) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, only with secondary antibody. Finally, f) B16-p2F m-gmcsf + m-B7.2 transfected cells, with both primary and secondary antibody, corresponding to the right peak. The figure plots counts versus FL1 log.

**Figure 8- Cell vaccine.** The freshly transfected (non-selected) cell vaccine followed the same pattern as in Fig. 2. Treatment groups were  $2 \times 10^5$  B16 cells (previously transfected, irradiated and frozen, then thawed and counted) per dose (groups p2F∅, B7.2, GM, GM+B7.2/200) per mouse, in 100µl DMEM. For p2F m-gmcsf + m-B7.2 treatment, two different cell doses were studied: one with the usual cell dose ( $2 \times 10^5$ ), GM+B7.2/200; and the other with cells sufficient to reach the same GM-CSF production as in group GM, i.e., GM+B7.2/500. In the B16\* group,  $2 \times 10^5$  wild type irradiated B16 cells (150 Gy) were

injected in 100  $\mu$ l DMEM, while in the Control group only 100  $\mu$ l DMEM, at every three vaccination dose. Arrows show the position in the figure of groups GM, GM+B7.2/200, which developed no tumors at all. The symbol “a” represents  $P < 0.001$ , and “b”  $P < 0.01$ , statistically significant difference versus the Control group.

**Figure 9- Survival in cell vaccine.** As in Fig. 4, the figure plots the survival curves of mice from the Cell Vaccine experiment. In group GM, 100% mice survival was observed more than 3 months after tumor transplant. The GM+B7.2/200, GM+B7.2/500 and B7.2 groups achieved 80, 40 and 20% survival, respectively. The groups B16\* and p2F  $\emptyset$  failed to increase survival versus the Control group.

**Figure 10- Total anti-TMP IgG production in cell vaccine.** As in Fig. 5, this figure shows the specific anti-TMP total IgG from the different groups. Data were obtained from ELISA made with the plasma obtained on days -21, -1 and +15, with respect to tumor injection (day 0).

**Figure 11- Specific anti-TMP IgG subclasses in cell vaccine.** Following the same protocol as in Fig. 5, IgG1 analysis (A) and IgG2a (B) were performed.

**Figure 12- Selected cells vaccine.** The tumor growth inhibition obtained in this vaccine is represented. Control and GM+B7.2/40 group, which is 40,000 selected by expression transfected B16 cells. The selection is made by Streptavidin microbeads, thanks to m-B7.2 surface expression. The symbol “a” represents  $P < 0.001$ , statistically significant difference versus the Control group, where only DMEM was injected at each dose.

**Figure 13- Survival in selected cells vaccine.** As in Fig. 4, the survival curves are plotted.

**Figure 14- Specific anti-TMP IgG in selected cells vaccine.** As in Fig. 5, the total IgG production (A) and the subclasses IgG1 and IgG2a (B) are represented in the graphs.

## REFERENCES

- [1]- Dunussi-Joannopoulos K, Dranoff G, Weinstein HJ, Ferrara JLM, Bierer BE, Croop JM. Gene immunotherapy in murine acute myeloid leukemia: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor tumor cell vaccines elicit more potent antitumor immunity compared with B7 family and other cytokine vaccines. *Blood*, 1998, Vol 91, No 1, 222-230.
- [2]- Mastrangelo MJ & Lattime EC. Virotherapy clinical trials for regional disease: *in situ* immune modulation using recombinant poxvirus vectors. *Cancer Gene Therapy*, 2002, 9, 1013-1021.
- [3]- Se-Heon K, Carew JF, Kooby DA, Shields J, Entwisle C, Patel S, Shah JP, Fong Y. *Cancer Gene Therapy*, 2000, Vol 7, No 9, 1279-1285.
- [4]- Borrello I & Pardoll D. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2002, 13, 185-193.
- [5]- Jaffee EM, Abrams R, Cameron J et al. A phase I clinical trial of lethally irradiated allogeneic pancreatic tumor cells transfected with the GM-CSF gene for the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *Human Gene Therapy*, 1998, 9, 1951-1971.
- [6]- Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Research*, 2004, 64, 6337-6343.
- [7]- Rodríguez-Lecompte JC, Kruth S et al. Cell-based cancer gene therapy: breaking tolerance or inducing autoimmunity? *Anim Health Res Rev.*, 2004, Dec; 5(2), 227-234.
- [8]- Herrero MJ, Botella R, Dasí F, Algás R, Sánchez M, Aliño SF. Antigens and cytokine genes in antitumor vaccines: the importance of the temporal delivery sequence in antitumor signals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006, 1091, 412-424.
- [9]- Shi FS, Weber S, Gan J, Rakhmievich A, Mahvi DM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF. *Cancer Gene Therapy*, 1999, Vol 6, 81-88.
- [10]- Moret-Tatay I, Diaz J, Marco FM, Crespo A, Aliño SF. Complete tumor prevention by engineered tumor cell vaccines employing nonviral vectors. *Cancer Gene therapy*, 2003, 10, 887-897.
- [11]- Wiley, J and sons, Ltd. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. 2007. Available from: [www.wiley.co.uk/genmed/clinical](http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical)
- [12]- Moret-Tatay I, Sanmartín I, Marco FM, Díaz J, Aliño SF. Nonviral therapeutic cell vaccine mediates potent antitumor effects. *Vaccine*. 2006, 24, 3937-3945.

- [13]- Aliño SF, Lejarreta M et al. Antimetastatic effect of immunization with liposome-encapsulated tumor cell-membrane proteins obtained from experimental tumors. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 1995, 17 (3), 419-436.
- [14]- Guillem VM, Tormo M, et al. Targeted oligonucleotide delivery in human lymphoma cell lines using a polyethyleneimine based immunopolyplex. *Journal of controlled release*, 2002, 83, 133-146.
- [15]- Guillem VM, Tormo M, et al. Polyethyleneimine-based immunopolyplex for targeted gene transfer in human lymphoma cell lines. *The Journal of Gene Medicine*, 2002, 4, 170-182.
- [16]- Massó O, Aliño SF et al. Specific serological response by active immunization with GD3-bearing liposomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1996, 278(3), 1114-1120.
- [17]- Garcia L, Bunuales M, Duzgunes N, Tros de Ilarduya C. Serum-resistant lipopolyplexes for gene delivery to liver tumor cells. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007.
- [18]- Zajac P, Oertli W et al. Phase I/II Clinical trial of a nonreplicative vaccinia virus expressing multiple HLA-A0201-restricted tumor-associated epitopes and costimulatory molecules in metastatic melanoma patients. *Human Gene Therapy*, 2003, 14, 1497-1510.
- [19]- Chong H, Todryk S et al. Tumor cell expression of B7 costimulatory molecules and interleukin-12 or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces a local antitumor response and may generate systemic protective immunity. 1998, *Gene Therapy*, 5, 223-232.
- [20]- Pizzoferrato E. B7-2 expression above a threshold elicits anti-tumor immunity as effective as interleukin-12 and prolongs survival in murine B-cell lymphoma. *Int J Cancer*, 2004, 110, 61-69.
- [21]- Kim k-Y, Kang M-A, Nam M-J. Enhancement of natural killer cell-mediated cytotoxicity by coexpression of GM-CSF/B70 in hepatoma. *Cancer Letters*, 2001, 166, 33-40.
- [22]- Grosenbach DW, Barrientos JC, et al. Synergy of vaccine strategies to amplify antigen-specific immune responses and antitumor effects. *Cancer Research*, 2001, 61, 4497-4505.
- [23]- Parney IF, Farr-Jones MA et al. Human autologous in vitro models of glioma immunogene therapy using B7-2, GM-CSF and IL-12. *Can J Neurol Sci*, 2002, 29(3), 267-275.
- [24]- Mukherjee S, Nelson D, et al. The immune anti-tumor effects of GM-CSF and B7-1 gene transfection are enhanced by surgical debulking of tumor. *Cancer Gene Therapy*, 2001, 8, 580-588.
- [25]- Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem*. 1981, 25, 1604-1607.

- [26]- Guillem VM & Aliño SF. Transfection pathways of nonspecific and targeted PEI-polyplexes. *Gene Therapy and Molecular Biology*, 2004, Vol 8, 369-384.
- [27]- Walde P & Ichikawa S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomolecular Engineering*, 2001, 18, 143-177.
- [28]- Moret I, Peris JE, Guillem VM, Benet M, Revert F, Dasí F, Crespo A, Aliño SF. Stability of PEI-DNA and DOTAP-DNA complexes: effect of alkaline pH, heparin and serum. *Journal of controlled Release*, 2001, 76, 169-181.

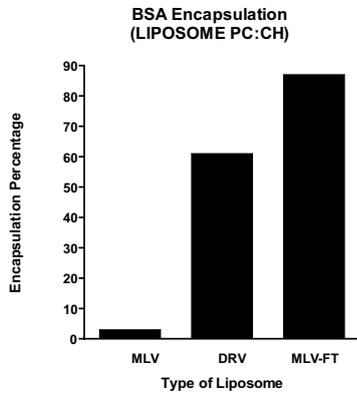


Fig 1-A

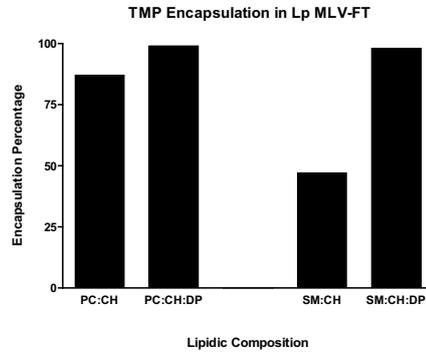


Fig 1-B

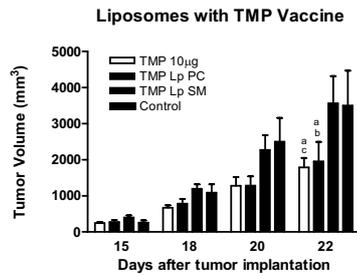


Fig 2

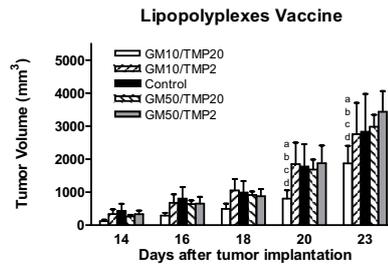


Fig 3

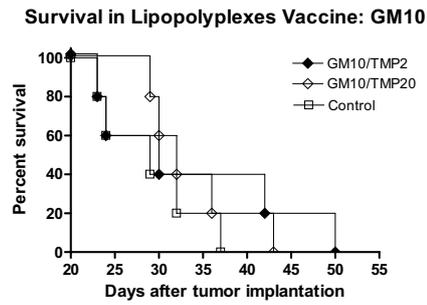


Fig 4-A

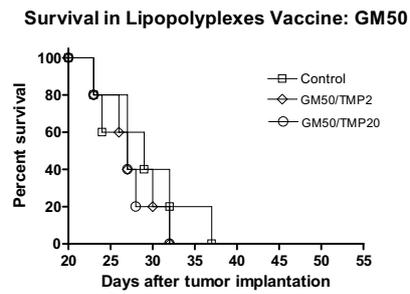


Fig 4-B

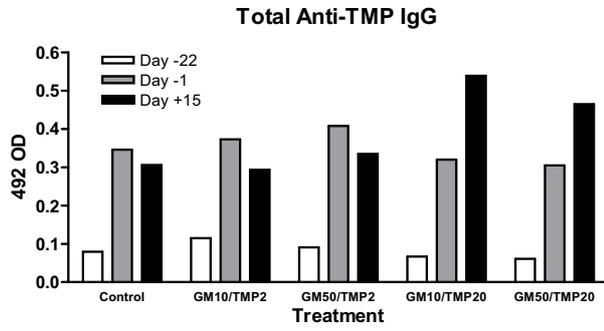


Fig 5

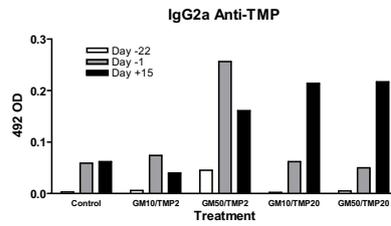
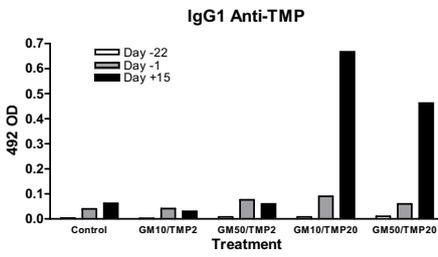


Fig 6-A

Fig 6-B

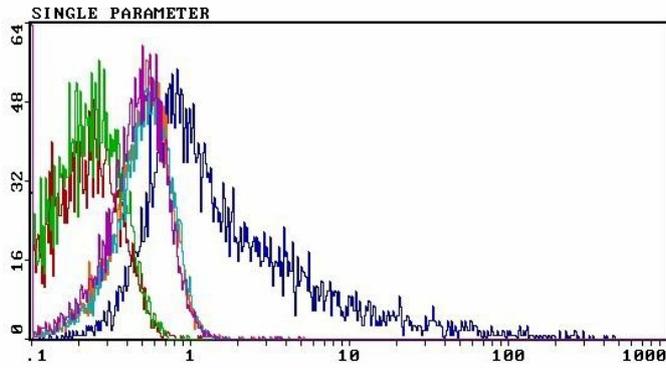


Fig 7

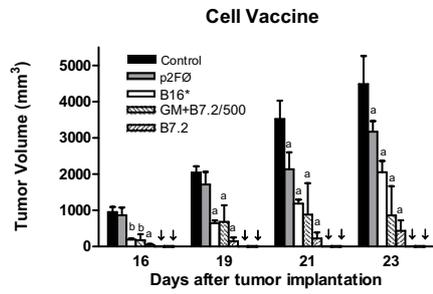


Fig 8

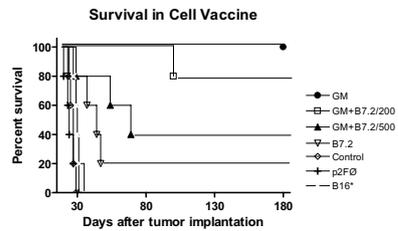


Fig 9

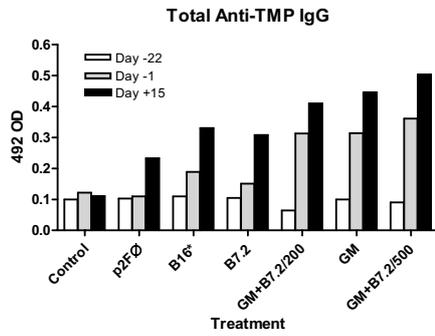


Fig 10

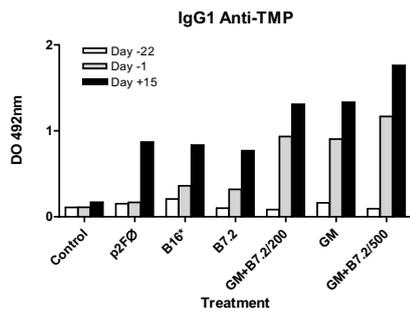


Fig 11-A

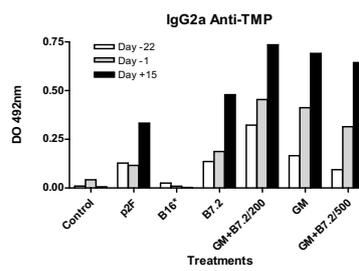


Fig 11-B

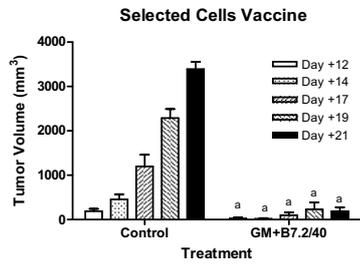


Fig 12

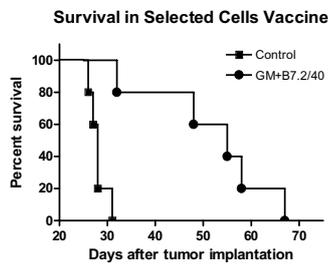


Fig 13

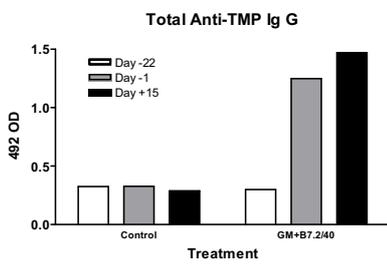


Fig 14-A

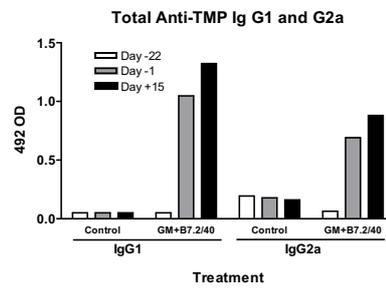


Fig 14-B