

**DESARROLLO Y EFECTO ANTITUMORAL DE  
VACUNAS GÉNICAS CELULARES Y  
SILENCIAMIENTO GÉNICO**

**TESIS DOCTORAL  
ANTONIO MIGUEL MATAS**



**FACUTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**Programa de doctorado en Biomedicina y Farmacia**

**Valencia, Enero 2015**



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA

D. Salvador F. Aliño Pellicer, Catedrático de Farmacología de la Universitat de València y Dña. María José Herrero Cervera, del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo presentado por el Ldo. **Antonio Miguel Matas**, titulado *“Desarrollo y efecto antitumoral de vacunas génicas celulares y silenciamiento génico”*, para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado en la Universitat de València en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universitat de València, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia, a 8 de Enero de 2015

D.

Dña.

La realización de esta tesis no habría sido posible sin el apoyo que directamente o indirectamente me han brindado muchas personas durante estos años. Por ello quiero dar las gracias:

En primer lugar, a Salvador F. Aliño, por haberme contagiado el entusiasmo y la fe por la terapia génica y por concederme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en su grupo. Tu devoción a tu trabajo y el siempre respetuoso trato hacia los demás son de admirar.

Por supuesto, agradecer también a María José Herrero, mi predecesora en el campo de las vacunas antitumorales con células modificadas genéticamente, su apoyo y tutela. Siempre con una sonrisa y dispuesta a ayudar, es una pena que no hayamos podido compartir más tiempo de trabajo juntos, porque tu cariñosa forma de relacionarte es algo que escasea en los tiempos que vivimos y se echa de menos. Gracias por además de ser una gran directora de tesis ser una excelente compañera.

Quería dar las gracias también a Maruja (María Sánchez), quién me ayudó en los comienzos de esta andadura y quién entre otras cosas me enseñó que querer es poder.

Agradecer también al personal del servicio de animalario de la UCIM el buen trato que siempre me han prestado, y especialmente a Ana Díaz, quién con mucha paciencia me ayudó y enseñó a manejarme con los ratones.

A los miembros del servicio de radioterapia del Hospital Clínico y en particular a Rosa Algás y a Cristobal por su colaboración.

A mis compañeros del departamento de farmacología, con quien he compartido tantas charlas de sobremesa.

Gracias a mi amigo y compañero de laboratorio Luis, tu llegada al grupo marcó un antes y un después para mí. Hemos compartido muchas cosas en estos años. Te deseo mucha suerte.

Gracias a ti Laura, qué pacientemente has tratado de entender el esfuerzo de estos años. Gracias por estar a mi lado y transmitirme tu alegría y cariño.

Gracias a toda mi familia por todo su amor que junto con Laura consiguen hacerme tan feliz. Con vosotros todo es mucho más fácil.

Y por último quería dar las gracias a mis padres, Antonio y Encarnita, por habérmelo dado todo.

# ÍNDICE

ÍNDICE	Página	1
ABREVIATURAS		5
INTRODUCCIÓN		7
1. Terapia génica		8
- Vectores virales		
- Vectores no virales		
2. Rol de la terapia génica en cáncer		11
3. Inmunoterapia en cáncer		14
4. Vacunas antitumorales		16
- Inmunología en cáncer		
- Silenciamiento génico		
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		27
MATERIAL Y MÉTODOS		29
1. Células		30
2. Plásmidos		31
3. Desarrollo de complejos celulares		34
3.1 Formación de complejos celulares		34
3.2 Caracterización de los complejos celulares		34
3.2.1 Citometría de flujo		34
3.2.2 Microscopía óptica		35
3.2.3 Microscopía fluorescencia y confocal		36
3.3 Prueba de viabilidad celular		37
4. Transfección celular <i>in vitro</i> mediante poliplejos		38
5. ELISA de mGM-CSF e mL-12		39
6. Diseño de ASO y PPRH		39
7. Entrada de los ASO y los PPRH al interior de la célula		42
8. Silenciamiento <i>in vitro</i> utilizando ASO y PPRH		42
9. Farmacocinética de los ASO y PPRH en ratones		43
10. Estudio de expresión de los genes CTLA4, Foxp3 y		

CD25 tras la implantación del tumor	43
11. Vacunas antitumorales con células modificadas genéticamente	44
11.1 Vacunas preventivas con complejos celulares vs. células libres	44
11.2 Vacunas terapéuticas con células tumorales modificadas genéticamente y silenciamiento génico de moléculas inmunosupresoras	46
12. Medida del tamaño tumoral, número de metástasis y supervivencia	48
13. Control de efectos adversos: peso del animal, despigmentación y diarrea	49
14. Cuantificación de ARNm de CTLA4, CD25 y Foxp3 mediante RT-PCR cuantitativa	49
15. Obtención de proteínas hidrosolubles de membrana tumoral (TMP) y de membrana del fibroblasto (FMP)	50
16. ELISA específico de IgG anti-TMP y anti-FMP	51
17. Citometría de células B16 y fibroblastos marcados con IgG1	52
18. Análisis estadístico	52
RESULTADOS	53
1. Desarrollo de complejos celulares	54
1.1 Caracterización de complejos celulares	54
1.2 Viabilidad celular de los complejos	61
1.3 Expresión de citoquinas en los complejos	63
2. Vacunación preventiva complejos celulares vs. células tumorales libres	67
2.1 Crecimiento del tumor	69
2.2 Respuesta inmune antitumoral: Producción de IgG específicas frente a TMP y FMP	70
2.3 Supervivencia de los animales vacunados	76
3. Silenciamiento génico de moléculas inmunosupresoras: ASO vs. PPRH	78
3.1 Evaluación de la entrada de ASO y PPRH a la célula	78
3.2 Silenciamiento <i>in vitro</i> de los genes CTLA4, Foxp3 y CD25: ASO vs. PPRH	81
3.3 Toxicidad celular de los ASO y PPRH	84
3.4 Farmacocinética de los ASO y PPRH	85
4. Expresión de CTLA4 y Foxp3 en ratones tras implantación de tumor	87

4.1	Expresión de CTLA4 y Foxp3 en ratones vacunados	87
5.	Vacunación terapéutica con células modificadas con el gen de GM-CSF y silenciamiento génico de moléculas inmunosupresoras	91
5.1	Crecimiento del tumor	92
5.2	Supervivencia de los animales	94
5.3	Expresión de CTLA4 y Foxp3 en animales con vacunación terapéutica + silenciamiento génico	95
5.4	Estudio de poblaciones linfocitarias Treg y CTLA4 mediante citometría de flujo	98
	DISCUSIÓN	101
	CONCLUSIONES	118
	BIBLIOGRAFÍA	119

**ABREVIATURAS**

APC	Célula presentadora de antígenos
APC	En los experimento de inmunotinción: Alocianina
ASO	Oligonucleótido antisentido
B7	Molécula coestimuladora
CD28	Molécula coestimuladora
CD25	Receptor IL-2
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMV	Citomegalovirus
Cplex	Complejos celulares
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DMEM	Medio de cultivo, <i>Dulbeco's modified eagle medium</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EF1 $\alpha$	<i>Elongation factor 1 <math>\alpha</math></i>
eGFP	<i>Enhanced Green fluorescent protein</i>
Fc	Fracción constante de anticuerpos
FDA	Agencia americana de fármacos y comida, <i>Food and drug administration</i>
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
FMP	Proteínas de membrana del fibroblasto
Foxp3	Factor de transcripción <i>Forkhead box P3</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced tumor-necrosis factor receptor</i>
HBS	Tampón Hepes Salino
hhTF-AT	PPRH formador de triplex anti <i>template</i>
hhTF-AC	PPRH formador de triplex anti <i>coding</i>
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenasa
IGS	Secuencias guías internas
IP	Yoduro de propidio
NK	Células asesinas naturales, <i>Natural Killer cell</i>
PBS	Tampón fosfato salino

## Vacunas y silenciamiento génico antitumoral

PD1	Molécula coestimuladora de muerte celular, <i>Programmed death 1</i>
PD1-L	Ligando PD1
PE	Ficoeritrina
PEI	Polietilenimina
PPRH	<i>Polipurine reverse hairpin</i>
SBF	Suero bovino fetal
TCR	Receptor célula T
TF-AT	Oligonucleótido formador de triplex anti <i>template</i>
Th1	Linfocito T de ayuda 1, <i>T helper cell</i>
TMP	Proteínas de membrana tumoral
Treg	Linfocitos T reguladores
2-OMe	2-Orto-Metil

# **INTRODUCCIÓN**

## 1.- TERAPIA GÉNICA

La terapia génica es una estrategia terapéutica que tiene como objetivo el tratamiento de enfermedades utilizando ácidos nucleicos (ADN o ARN) como medicamentos. La terapia génica pertenece al grupo de terapias avanzadas y es posible gracias al gran desarrollo en los últimos años en campos como la etiopatogenia molecular, el conocimiento del genoma humano y la ingeniería genética. En sus inicios la terapia génica despertó un gran entusiasmo, ya que parecía ser la solución para todas las enfermedades de origen genético que permanecen aún sin cura. En un principio los mayores avances se lograron en enfermedades monogénicas hereditarias como en la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X (SCID-X) (1). De los 16 niños tratados en dos estudios se consiguió curar la enfermedad en 13 de ellos, sin embargo 3 de los 16 niños tratados desarrollaron leucemia y uno de ellos murió. Estos desafortunados sucesos pusieron de manifiesto los riesgos de la terapia génica. En realidad, los graves efectos adversos observados en este ensayo están asociados al vector de transferencia génica empleado, un retrovirus que tiende a insertarse en regiones del genoma que provocan la activación de oncogenes (2-6). En la actualidad, sin embargo, se dispone de vectores mucho más seguros que no se integran en el genoma o bien no tienden a hacerlo en regiones oncogénicas. La terapia génica tiene un gran potencial y a medida que se vayan haciendo avances en el origen molecular de las enfermedades y en la ingeniería genética irán surgiendo nuevas estrategias para ella.

La terapia génica tiene las siguientes funciones principales:

- Implementar la dotación génica de un organismo. Esta implementación génica puede ser para:
  - o Recuperar una función perdida. Esta estrategia es de utilidad, por ejemplo, en determinadas enfermedades monogénicas hereditarias como la hemofilia en las que una mutación provoca la pérdida de expresión de la proteína funcional, en este caso el Factor IX de coagulación (7-9).

- Aumentar la expresión de un gen que se expresa poco. Podemos utilizar esta estrategia, por ejemplo, para introducir genes de citoquinas inmunoestimuladoras en ciertas células para aumentar la respuesta inmunitaria (10-24).
- Introducir una nueva función. En determinados tipos de cáncer una estrategia terapéutica es introducir toxinas o genes suicidas en células tumorales (25-27).
- Silenciar genes que se encuentran relacionados con una enfermedad. Por ejemplo, en ciertas células tumorales podemos silenciar oncogenes que se encuentran sobreexpresados (28-29).
- Reparar genes. El desarrollo de la ingeniería genética en los últimos años ha permitido que podamos reemplazar genes defectuosos por genes funcionales. Por ejemplo, la deficiencia de la alfa-1-antitripsina es una enfermedad monogénica hereditaria en la que la mutación del gen que codifica para la alfa-1-antitripsina provoca la expresión de una proteína anómala no funcional que no puede ser secretada a la sangre, acumulándose en el hígado. En este caso, mediante la reparación génica se podría reemplazar el gen mutado por el funcional, resolviendo los problemas relacionados tanto con la acumulación de la proteína mutada como los relacionados con la falta de la proteína en sangre (30-32).

El ADN y el ARN pueden ser degradados por nucleasas, ADNasas y ARNasas respectivamente, presentes en los tejidos y fluidos de nuestro organismo. Con el fin de proteger el ADN y ARN de la degradación por las nucleasas y facilitar su entrada en la célula se utilizan vectores de transferencia génica. Algunos vectores de transferencia génica permiten además dirigir la entrada de ADN o ARN a un determinado tipo celular. Existen dos principales tipos de vectores de transferencia génica: vectores virales y vectores no virales.

### Vectores virales

Los vectores virales aprovechan el tropismo y la capacidad infectiva de los virus para entrar en la célula. Los vectores virales proceden de virus a los que se les ha eliminado ciertos genes que permiten su replicación y se han sustituido por genes de interés terapéutico. Algunos virus tienen tropismo para un determinado tipo celular, permitiendo la entrega selectiva de genoma. La principal ventaja de los vectores virales es su alta eficacia de entrega de ADN. Por el contrario, su principal desventaja es su potencial peligrosidad, pudiendo provocar mutagénesis insercional, activación de oncogenes y respuestas inmunitarias frente al vector (immunogenicidad). Los principales tipos de vectores virales son: adenovirales (AdV), retrovirales (RtV), lentivirales, adenoasociados (AAV) y derivados del Virus del Herpes Simple (HSV).

### Vectores no virales

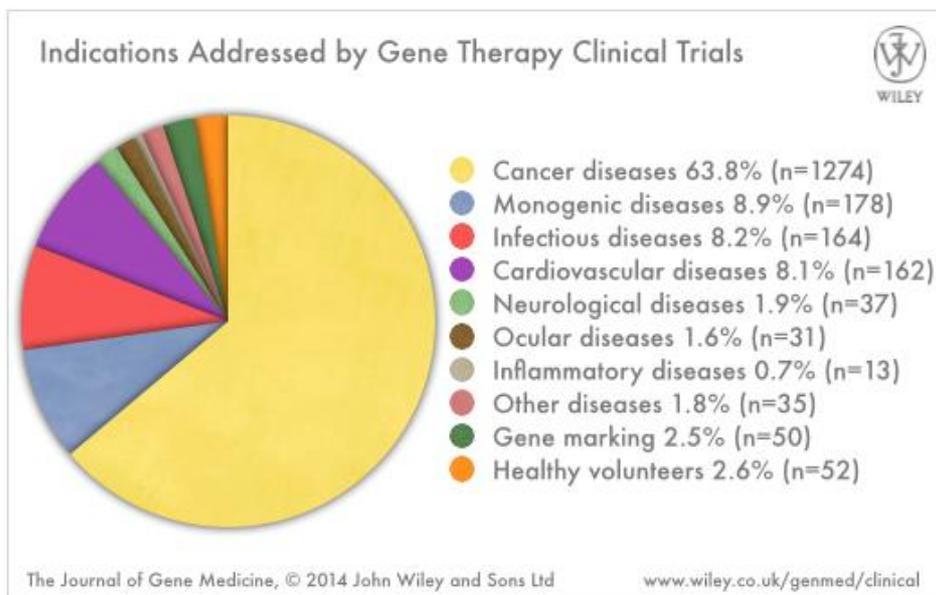
Los vectores no virales son sistemas sintéticos. Las principales ventajas de los vectores no virales son su seguridad y que por lo general permiten transportar genes de mayor tamaño. Su principal desventaja es su baja eficacia de entrega de ADN o ARN. Los principales tipos de vectores no virales son: liposomas (formados por lípidos), lipoplejos (formados por lípidos catiónicos que se unirán al ADN) y poliplejos (formados por polímeros catiónicos que se unirán al ADN). Los lipoplejos han sido los vectores no virales más utilizados en los ensayos clínicos.

La terapia génica puede tratar tanto enfermedades genéticas hereditarias como adquiridas. En la actualidad está muy extendida la idea de que la terapia génica es útil fundamentalmente para el tratamiento de enfermedades monogénicas hereditarias recesivas como la hemofilia o la fibrosis quística pero en realidad la terapia génica puede tratar también cualquier enfermedad adquirida, como

por ejemplo el cáncer. De hecho la gran mayoría de los ensayos clínicos que se realizan utilizando terapia génica son estudios en cáncer.

## 2.- ROL DE LA TERAPIA GÉNICA EN CÁNCER

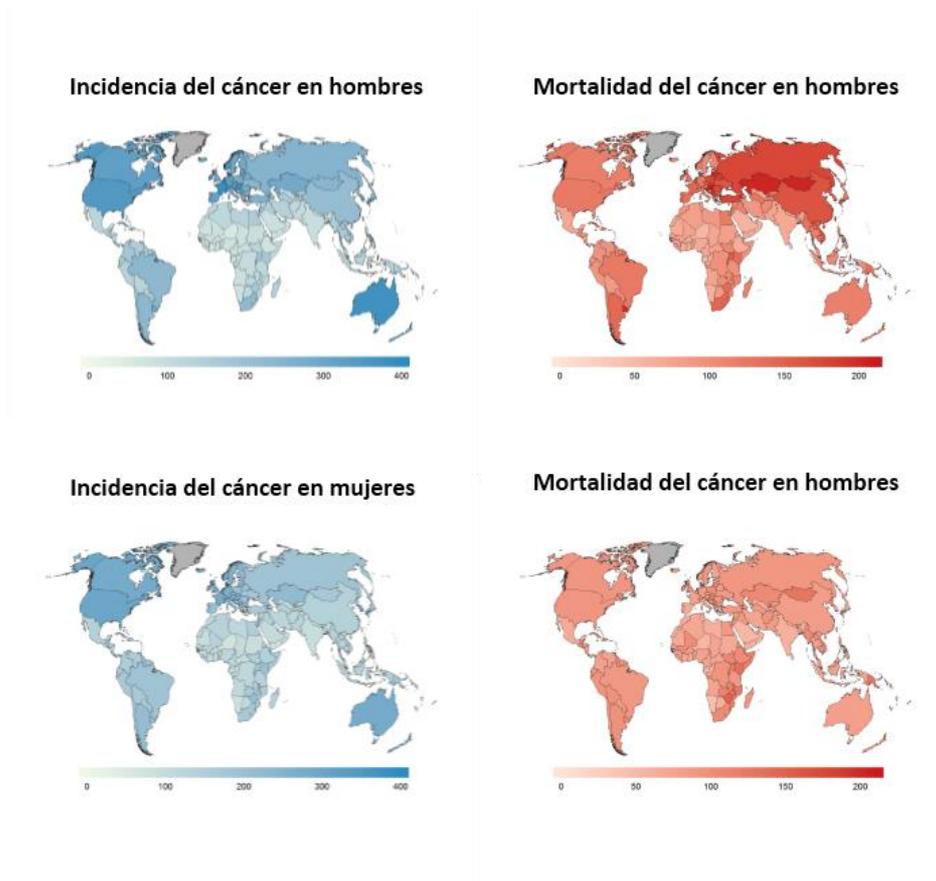
En la actualidad el 63,8% de los ensayos clínicos que utilizan terapia génica se realizan en cáncer, seguidos muy de lejos de enfermedades monogénicas (8,9%), infecciosas (8,2%) y enfermedades cardiovasculares (8,1%). En la gráfica de la figura 1 podemos ver representada la distribución mundial de estudios clínicos de terapia génica en función de la indicación.



*Figura 1. Ensayos clínicos de terapia génica en función de las enfermedades en las que se aplica.*

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud para el cáncer (2012) indican que hay 14,1 millones de nuevos casos de cáncer al año en el mundo, con una mortalidad de 8,2 millones. En España se presentan 215.534 nuevos casos al año (128.550 en hombres y 86.984 en mujeres). En la figura 2 se

representa la incidencia y mortalidad mundial del cáncer en hombres y en mujeres.



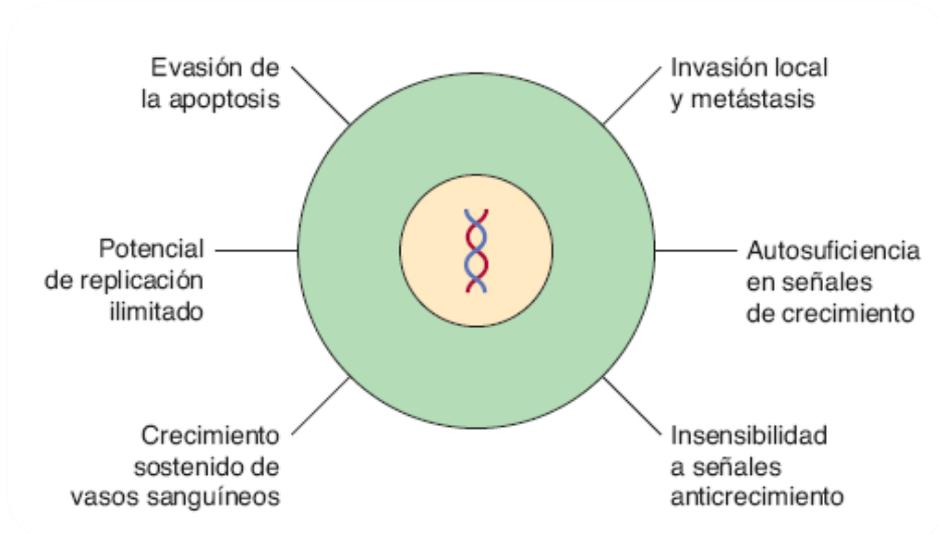
*Figura 2. Incidencia y mortalidad mundial del cáncer en hombres y mujeres.*

Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.

Principalmente el cáncer presenta un grave problema en los países desarrollados. En los países no desarrollados el cáncer no se encuentra ni siquiera entre las primeras 10 causas de muerte, mientras que en los países desarrollados varios cánceres aparecen en esta lista.

El cáncer es una enfermedad provocada por un cúmulo de mutaciones que acaban transformando una célula normal en una célula tumoral. Estas mutaciones suelen estar relacionadas con genes reguladores del ciclo de

división celular y muerte celular programada o apoptosis. Generalmente estas mutaciones implican la pérdida de expresión de genes supresores de tumores y la activación de oncogenes. Acaban conduciendo a la dediferenciación celular y a la proliferación incontrolada de estas células. Actualmente existe consenso en las características que definen una célula tumoral. Estas características fueron propuestas por Hanahan D, Weinberg R en el año 2000 y se recogen en la figura 3.



*Figura 3. Principales características de una célula tumoral.* Fuente: Harper, Bioquímica ilustrada 29ª edición, Mc Graw Hill.

Las actuales estrategias terapéuticas para el tratamiento del cáncer se basan fundamentalmente en cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo en muchos casos estas terapias resultan poco eficaces y los pacientes acaban muriendo por el avance de la enfermedad. Además la quimioterapia y radioterapia tienen importantes efectos adversos como: depleción de otros tipos de células en división e inmunodeficiencia. En este contexto la terapia génica se presenta como una alternativa atractiva a las terapias convencionales del cáncer. Las principales estrategias de terapia génica en cáncer son las siguientes:

- Introducción de genes supresores de tumores. Por ejemplo, introducir el gen de la proteína p53 en células tumorales (33-35).
- Silenciamiento de oncogenes sobreexpresados. Por ejemplo, silenciar genes como c-myc en células cancerígenas (28).
- Introducción de genes suicidas. Con el término “gen suicida” se conoce a la estrategia terapéutica mediante la cual se introduce en las células tumorales un gen que codifica para un enzima que tras la administración de un profármaco lo metabolizará a una sustancia tóxica para la célula tumoral produciendo su destrucción. El sistema de gen suicida/profármaco más utilizado es el de la timidina quinasa del virus del herpes simple (Tk-HSV) y el ganciclovir (25-27).
- La viroterapia o uso de virus oncolíticos. Los virus oncolíticos son virus que por lo general han sido modificados genéticamente para que únicamente puedan replicarse en células tumorales, provocando la muerte selectiva de éstas (36-38).
- La inmunomodulación génica y las vacunas. Introducir genes de citoquinas inmunoactivadoras o vacunas basadas en ADN o ARN que codifiquen antígenos tumorales o bien vacunas con células tumorales modificadas genéticamente con genes de moléculas inmunoactivadoras (10-24).

En este trabajo la inmunomodulación génica, concretamente el uso de vacunas antitumorales con células modificadas genéticamente, es la estrategia empleada para intentar conseguir una respuesta antitumoral eficaz.

### **3.- INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER**

La inmunoterapia es una estrategia antitumoral que tiene como objetivo aumentar la respuesta inmunitaria frente al tumor y/o reducir la proliferación de las células tumorales. Se basa en la utilización de anticuerpos, citoquinas o vacunas como medicamentos.

**Anticuerpos.** Los anticuerpos monoclonales se utilizan en la inmunoterapia del cáncer con diferentes fines:

- Marcar las células cancerosas para que éstas sean destruidas por el sistema inmunitario.
- Bloquear receptores de factores de crecimiento en la superficie de la célula tumoral, evitando la proliferación de éstas.
- Transportar medicamentos selectivamente a las células cancerosas.
- Bloquear moléculas inmunosupresoras de la superficie celular, favoreciendo la respuesta inmune de activación frente al tumor. Una serie de anticuerpos anti-PD1 y anti-PD1-L han sido probados en ensayos clínicos con resultados prometedores (39-47) y un anticuerpo anti-PD1 llamado pembrolizumab (Keytruda®) ha sido aprobado recientemente (Septiembre 2014) para el tratamiento del melanoma metastásico avanzado (47). En 2011 la FDA (Food and Drug Administration) y la Agencia Europea del Medicamento aprobaron el anticuerpo anti-CTLA4 llamado ipilimumab (Yervoy®) para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico. El ipilimumab demostró en varios ensayos clínicos ser capaz de alargar la vida media de estos pacientes (48-49). Estos estudios ponen de manifiesto que la molécula CTLA4 es una diana terapéutica clave en la lucha contra el cáncer. En este trabajo se sustituye el uso de anticuerpos por el silenciamiento génico como estrategia de bloqueo de la molécula CTLA4. Además proponemos silenciar también el gen Foxp3, que al tratarse de un factor de transcripción nuclear no puede ser bloqueado mediante anticuerpos.

**Citoquinas.** Se utilizan como un tipo de inmunoterapia no específica y ayudan al sistema inmunitario a destruir las células tumorales. Las principales citoquinas utilizadas en el tratamiento del cáncer ya sean como adyuvante o tratamiento principal son el INF- $\alpha$ 2 y la IL-2. Estas dos citoquinas fueron aprobadas por la FDA en 1995 y en 1998 respectivamente, para su uso en determinados tipos de cáncer. Otras citoquinas que han demostrado en estudios

preclínicos y clínicos tener un papel importante en la respuesta inmune antitumoral son GM-CSF (10, 13, 14, 17, 50, 51) e IL-12 (12, 19, 20, 23, 52, 53). GM-CSF es secretado por varios tipos celulares como linfocitos T, linfocitos B, células NK, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales. GM-CSF promueve la proliferación de macrófagos y monocitos, facilitando así la respuesta inmune celular. IL-12 es secretado por monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. IL-12 actúa sobre linfocitos T y células NK aumentando su actividad citotóxica y promoviendo la secreción de otras citoquinas como INF- $\gamma$ . IL-12 es la máxima responsable de la activación y proliferación de linfocitos Th1, facilitando la respuesta inmune celular.

**Vacunas.** Las vacunas activan específicamente la respuesta inmunitaria para reconocer y destruir células tumorales. Existe una vacuna llamada Sipuleucel-T (Provenge®) que fue aprobada en 2010 en Estados Unidos por la FDA para el tratamiento de cáncer de próstata metastásico (54). Esta vacuna está basada en células polimorfonucleares de sangre periférica (PPBC) que contienen células dendríticas. Éstas son activadas *ex vivo* con una proteína de fusión compuesta por el factor estimulador de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el ácido prostático fosfatasa (PPA). En este trabajo la búsqueda de vacunas antitumorales eficaces es uno de los objetivos principales.

#### 4.- VACUNAS ANTITUMORALES

Las vacunas antitumorales son el principal objeto de estudio de este trabajo. El objetivo de una vacuna antitumoral es estimular al sistema inmunitario para que reconozca de forma eficaz los antígenos tumorales y se desencadene una respuesta inmune antitumoral. Las vacunas antitumorales preventivas ya han demostrado su eficacia antitumoral logrando la supervivencia completa de los animales en modelos murinos (17, 50, 51, 55-56), sin embargo las vacunas terapéuticas han conseguido solo éxitos parciales como retrasar el crecimiento del tumor y alargar la vida media de los animales, pero no han demostrado la total eficacia observada con las vacunas preventivas (50, 51, 57). Para entender

a qué se debe esta diferencia de eficacia observada entre la vacunación preventiva y terapéutica conviene conocer primero la inmunología del cáncer.

### Inmunología en cáncer

Las células cancerosas tienen ciertos antígenos que podrían ser reconocidos como extraños por el sistema inmunitario. La inmunovigilancia es una teoría según la cual el sistema inmunitario nos protege de la aparición de tumores y sólo cuando éste falla aparece el cáncer. Los linfocitos T son las principales células implicadas en la respuesta inmune antitumoral (58). Para que se genere una respuesta inmune antitumoral han de darse dos señales simultáneamente: el reconocimiento del antígeno antitumoral y la interacción de moléculas coestimuladoras. Las células presentadoras de antígenos (APC) presentan en su superficie el antígeno tumoral asociado a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) que es reconocido por el receptor T de los linfocitos T. La segunda señal necesaria para la activación de la respuesta antitumoral es la interacción entre las moléculas coestimuladoras B7 (B7.1/B7.2), presentes en la superficie de las APC y CD28, presente en la superficie de los linfocitos T. En ausencia de estas moléculas coestimuladoras se produce anergia o tolerancia (59). Existen otras moléculas expresadas por los linfocitos, como CTLA4 que también se unen a la molécula B7 pero en este caso causan una respuesta reguladora de carácter supresor, evitando el daño tisular y la activación desmesurada del sistema inmunitario (contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis). Existen unos linfocitos llamados linfocitos T reguladores (Treg) con actividad inmunosupresora que ejercen un papel crucial en el mantenimiento de dicha homeostasis. Estos linfocitos Treg expresan constitutivamente la molécula de superficie CTLA4 (60). CTLA4 puede mediar inmunosupresión tanto a través de un mecanismo intrínseco mediante el cual se genera una señal negativa sobre el receptor TCR (61-63), como de un mecanismo extrínseco que consiste en la transendocitosis de moléculas B7.1 y B7.2 (62-64).

Las células cancerosas poseen una serie de mecanismos que les permiten burlar al sistema inmunitario, lo que conduce a su proliferación incontrolada. Los mecanismos que les permiten escapar de la inmunovigilancia son pérdida de expresión de antígenos tumorales, enmascaramiento de antígenos, pérdida de expresión de moléculas coestimuladoras y del CMH, inducción de apoptosis de linfocitos T activados y secreción de citoquinas inmunosupresoras. La mayoría de los antígenos que presentan las células tumorales están presentes también en las células sanas del organismo por lo que el sistema inmunitario los reconoce como propios y como consecuencia se produce una respuesta de anergia o tolerancia frente al tumor. Existen unos pocos antígenos específicos del tumor, que pueden ser reconocidos como extraños por las células del sistema inmunitario. Sin embargo, el tumor puede ir cambiando su carga antigénica dificultando la respuesta inmune antitumoral frente a un determinado antígeno, a este fenómeno se le conoce como inmunoedición y está influenciado por la acción del sistema inmunitario sobre el tumor (65). Además las células tumorales generan un entorno inmunosupresor (66) compuesto por una alta población de células inmunoregulatoras como linfocitos Treg, células mieloides supresoras (MDSC) y células dendríticas tolerogénicas y ciertos factores solubles inmunosupresores como IL-10 o TGF- $\beta$ , IDO y VEGF que favorecen la progresión del tumor (65). Las células Treg expresan moléculas inmunosupresoras como los receptores de superficie CTLA4, GITR y PD1 y el factor de transcripción nuclear Foxp3. Hoy día se caracteriza fenotípicamente a las células Treg como CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>. Foxp3 es esencial para la diferenciación de Treg y la función supresora y define a las Treg (67). Las células Treg pueden mediar inmunosupresión mediante contacto directo con los linfocitos T o mediante la secreción de ciertas citoquinas como IL-10 o TGF- $\beta$  (véase figura 4). El silenciamiento de los genes que codifican para las moléculas inmunosupresoras CTLA4 y Foxp3 y la evaluación de su efecto sobre la respuesta antitumoral es uno de los objetivos de este trabajo.

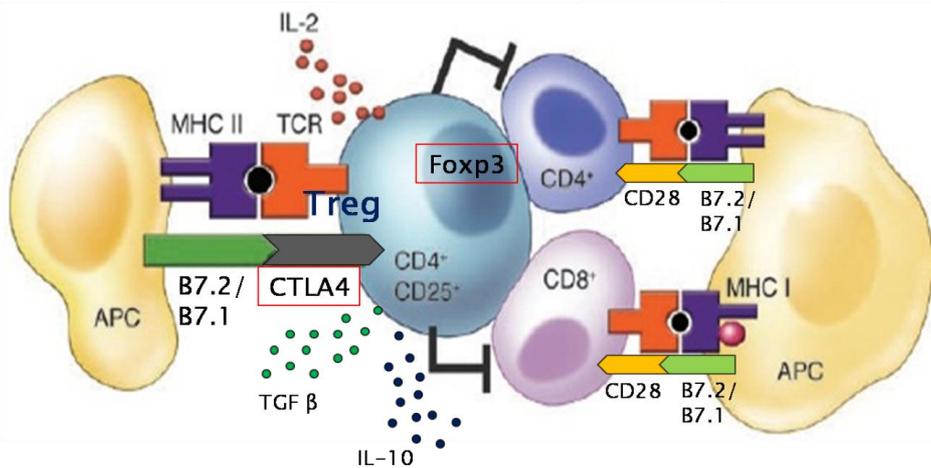


Figura 4. Respuesta supresora mediada por células Treg.

Las vacunas antitumorales pueden estar basadas en virus, bacterias o levaduras, antígenos o péptidos tumorales, células tumorales enteras (modificadas o no genéticamente), lisado de células tumorales y ADN o ARN que codifiquen para antígenos o péptidos tumorales (véase figura 5). Sea cual sea la vía de presentación de los antígenos tumorales, éstos son procesados por APC y presentados en su superficie asociadas a moléculas del CMH. Las principales APC son las células dendríticas. Las células dendríticas migran de los tejidos a los nódulos linfáticos dónde los linfocitos T reconocerán a los antígenos tumorales y en presencia de moléculas coestimuladoras como CD28 y B7 se producirá una respuesta inmune de activación. Los linfocitos activados migrarán de los nódulos linfáticos a los tejidos a través del torrente circulatorio hasta alcanzar a las células tumorales dónde reconocerán sus antígenos y mediante la secreción de ciertas sustancias y citoquinas provocarán la muerte de la célula tumoral.

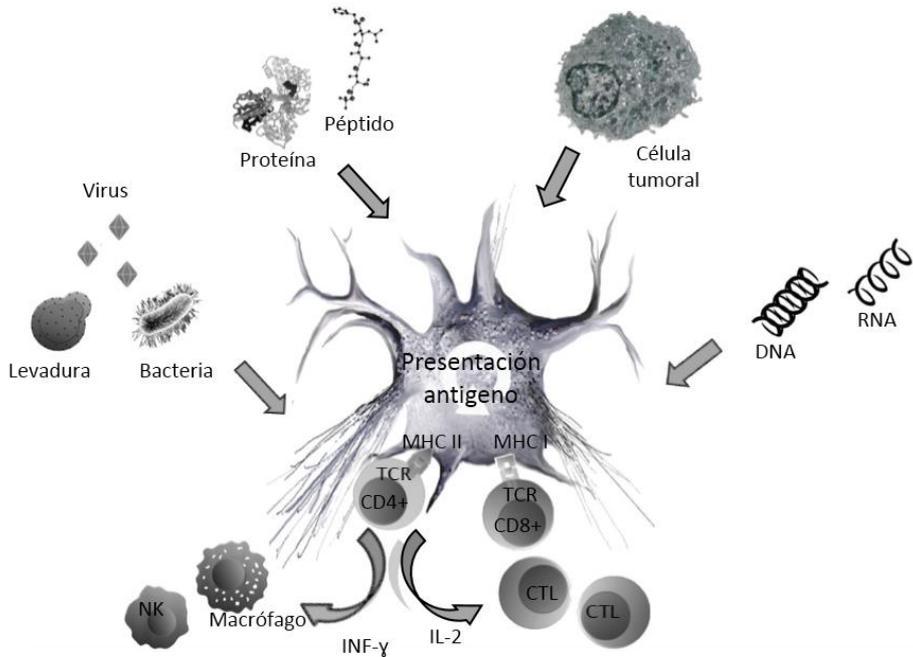


Figura 5. Estrategias de vacunación antitumoral (imagen adaptada de Matteo Vergati, 2006).

La vacunación con células tumorales autólogas modificadas con genes de citoquinas inmunoactivadoras como GM-CSF o IL-12 parece la mejor opción. Sin embargo, obtener células tumorales suficientes de un paciente para cultivarlas, expandirlas, modificarlas genéticamente y devolverlas al mismo paciente con las garantías de seguridad y producción adecuada del transgen resultaría muy complicado. Por este motivo, parte de este trabajo se centra en el desarrollo de vacunas antitumorales basadas en complejos celulares formados por fibroblastos transfectados (más fáciles de conseguir) con genes de citoquinas inmunoactivadoras y células tumorales (requeridas en menor cantidad, como mera fuente de antígenos tumorales). En estos complejos celulares son los fibroblastos las células transfectadas ya que son células de fácil obtención y su transfección es muy reproducible. Una vez modificados los fibroblastos se forman complejos celulares con éstos y las células tumorales mediante la adición del polímero catiónico polietilenimina (PEI). Las cargas positivas del PEI interactúan con las negativas de las membranas celulares

permitiendo la formación de complejos celulares. Más tarde evaluaríamos la eficacia antitumoral de estos complejos celulares en una vacunación preventiva.

Existen dos principales tipos de vacunas en función del momento de tratamiento: preventivas y terapéuticas. En este sentido, nuestro grupo ha realizado importantes esfuerzos utilizando modelos murinos de melanoma. Nuestros estudios preliminares ponían de manifiesto que:

i) la vacunación con células modificadas por procedimientos no virales con el gen GM-CSF media una respuesta 100% eficaz en la prevención del desarrollo del tumor y este efecto es dependiente de un nivel mínimo de expresión del gen dentro de un rango óptimo (17); ii) la vacunación preventiva con células modificadas recientemente (“en fresco”), resulta igualmente eficaz (100%) para proteger a los animales del crecimiento del tumor y además, la disociación y el orden temporal en que los antígenos tumorales (proteínas de membrana tumoral o células enteras) y el gen de citoquinas son administrados durante la vacunación, determinan en gran medida la eficacia antitumoral de la misma (21); iii) tras una segunda exposición al tumor los animales vacunados muestran tener memoria inmunológica (50); iv) la vacunación terapéutica iniciada días después de la implantación del tumor, utilizando vectores no virales bicistrónicos pone de manifiesto los efectos sinérgicos antitumorales de los genes GM-CSF+IL12 (51); v) la vacunación terapéutica, inhibe energicamente el crecimiento del mismo, lo que conduce a un incremento en la vida media de los animales pero no de la supervivencia final de los mismos (50, 51, 68).

A pesar de los éxitos alcanzados con modelos de vacunación preventiva, la vacunación terapéutica se encuentra más cerca de la práctica clínica. En algunos ensayos con vacunaciones terapéuticas llevados a cabo por otros grupos se consiguió la supervivencia de una parte de los animales vacunados (10). La diferencia de eficacia observada entre los modelos de vacunación parece ser debida a que si ésta se realiza cuando el organismo no ha tenido contacto previo con antígenos tumorales (caso de la vacunación preventiva), es

extraordinariamente eficaz, sin embargo cuando ya ha tenido contacto previo con los antígenos tumorales, es decir, el tumor ya está en el cuerpo cuando se aplica la vacuna (caso de la vacunación terapéutica), se instaura una respuesta inmune supresora. En la actualidad está bastante sustentado que el reconocimiento del antígeno unido a moléculas del CMH en presencia de las moléculas coestimuladoras CD28 y B7 genera una serie de señales intracelulares que conducen tanto a la activación del linfocito como a la sobreexpresión en superficie de la molécula CTLA4. La molécula inmunosupresora CTLA4 tiene entre 500 y 2500 veces más afinidad por B7 que la molécula CD28 (69), de este modo paulatinamente se va pasando de una respuesta inmune activadora a una de supresión. La sobreexpresión de CTLA4 tras la activación del linfocito dura de 2 a 4 días (69-71). El bloqueo de CTLA4 ha demostrado *in vivo* aumentar la activación y proliferación de linfocitos T (72). Además el bloqueo de CTLA4 mediante anticuerpos ha demostrado ser útil en reducir la respuesta inmunosupresora logrando la eliminación o reducción del tumor (71, 73, 74). Anticuerpos anti-CTLA4 han mostrado tener eficacia terapéutica en diferentes modelos de tumor en ratón (75). Como ya se ha comentado, hoy día existe en la clínica un anticuerpo anti-CTLA4, ipilimumab, que está logrando buenos resultados en el tratamiento de pacientes con estados avanzados de melanoma. Sin embargo, no todos los pacientes con melanoma avanzado pueden ser tratados con ipilimumab (caso de pacientes con metástasis en tránsito) y de los tratados sólo un 20% responden positivamente al tratamiento. Además, el empleo de anticuerpos presenta una serie de limitaciones como, posibilidad de activar parcialmente al receptor, unión inespecífica a otros receptores, inmunogenicidad y la imposibilidad de utilizar anticuerpos para dianas intracelulares como Foxp3. Ésta es una molécula que se ha visto sobreexpresada en muchos cánceres y en ciertos linfocitos (Treg) de pacientes portadores de tumores. Foxp3 es un factor de transcripción nuclear que activa o bloquea la expresión de ciertos genes promoviendo una respuesta inmune supresora. Además el acúmulo de linfocitos Treg en el tumor se ha asociado con un mal pronóstico o metástasis en muchos tipos de cáncer (76). Por éstas razones proponemos evaluar el silenciamiento génico de CTLA4 y

Foxp3 como una alternativa al uso de anticuerpos para modular la respuesta inmune antitumoral. Puesto que el bloqueo mediante anticuerpos de la molécula de superficie CD25 (receptor de IL2), que se encuentra altamente expresada en los linfocitos Treg, ha demostrado favorecer la respuesta inmune antitumoral en modelos murinos (77, 78), proponemos silenciar también el gen CD25 como alternativa a la terapia con anticuerpos.

### Silenciamiento génico

El objetivo del silenciamiento génico es inhibir la expresión de ciertos genes que son causantes de una enfermedad. Las principales herramientas de las que se dispone hoy día para silenciar genes son: oligonucleótidos antisentido (ASO), ribozimas y ARN interferente pequeño (siRNA).

**Oligonucleótidos antisentido (ASO).** Son secuencias cortas de ácidos nucleicos (21 nucleótidos aproximadamente) que se unen a secuencias específicas complementarias del ADN o ARN bloqueando así su expresión. Las uniones entre un ARNm y un ASO son de tipo Watson y Crick, mientras que cuando el ASO se une al ADN forma una triple hélice mediante enlaces tipo Hoogsteen, diferentes de los clásicos de Watson y Crick. Cuando el ASO que se utiliza es ADN, éste se une al ARNm formando un heterodúplex ADN/ARNm. Este heterodúplex es degradado por la H-RNasa. Los ASO son degradados por las nucleasas presentes en los fluidos biológicos, por ello para ser utilizados *in vivo* es necesario modificarlos para aumentar su estabilidad y facilitar su entrada en la célula. Las modificaciones más utilizadas son la introducción de grupos fosforotioato en el oxígeno libre y la modificación de los nucleótidos de los extremos con grupos 2-OMe. Ensayos clínicos han demostrado que los ASO pueden ser fácilmente sintetizados y administrados como medicamentos (79-90). Dos ASO llamados fomivirsen y mipomersen fueron aprobados por la FDA en 1998 para el tratamiento de reinitis y en 2013 para la hipercolesterolemia familiar, respectivamente (89, 90). En este trabajo los ASO son la herramienta elegida para silenciar los genes CTLA4, CD25 y

Foxp3 que están relacionados con el fracaso de la respuesta inmune antitumoral. Además de ASO también utilizaremos otra herramienta de silenciamiento más novedosa, los *hairpins* (horquillas). Éstos son cadenas complementarias o palindrómicas de ADN que se unen entre sí formando una horquilla. Un loop (bucle) de 5 timinas separa las dos secuencias palindrómicas permitiendo su plegamiento, formando así una horquilla. La unión de estas dos cadenas que forman el hairpin se produce mediante enlaces de Watson y Crick, en el caso de cadenas complementarias, o mediante enlaces de Hoogsteen en el caso de las cadenas palindrómicas. Los hairpins que utilizamos en este trabajo son polipurine reverse Hoogsteen (PPRH). Los PPRH son cadenas palindrómicas de polipurinas. Las dos cadenas de ADN de los PPRH son antiparalelas y cada purina se une a otra purina igual que ella mediante enlaces *Reverse* Hoogsteen. En la figura 6a podemos ver el esquema de un PPRH. El PPRH se une al ARNm o al ADN mediante enlaces de Watson y Crick, formando una triple hélice y bloqueando así la expresión de la molécula que codifica. En la figura 6b podemos ver cómo se aparean las bases en los enlaces de Hoogsteen y *Reverse* Hoogsteen. Los PPRH han demostrado ser estables frente a la degradación por las nucleasas no siendo necesaria su modificación química y se han mostrado eficaces en el silenciamiento de ciertos genes en modelos *in vitro* e *in vivo* (91-94).



Figura 6a

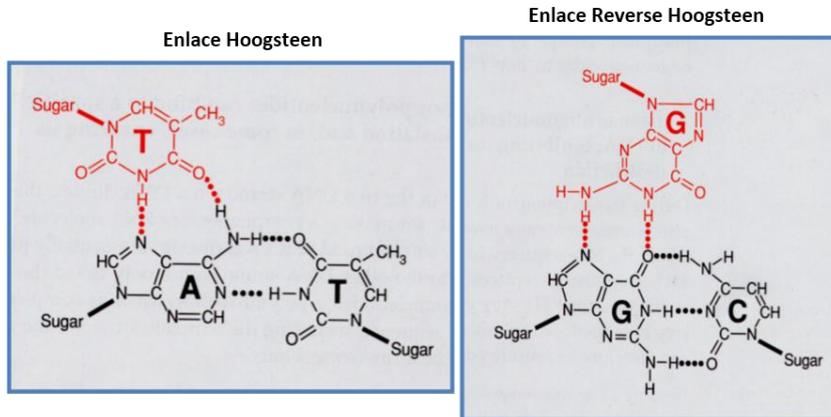


Figura 6b

Figura 6. Figura 6a: Estructura de un hairpin PPRH. Figura 6b: Tipos de enlaces Hoogsteen. Fuente de Almagro MC, et al (91).

**Ribozimas.** Son ARN catalíticos que pueden actuar como una endorribonucleasa secuencia específica. Utilizan unas Secuencias Guía Internas (IGS) que les permiten unirse a secuencias complementarias de un ARNm específico. Modificando las IGS es posible dirigir el ribozima hacia cualquier ARNm que se desee hidrolizar. Los ribozimas están siendo utilizados en ensayos clínicos (95, 96).

**siRNA.** Es una estrategia basada en el uso de cortas secuencias de ARN de doble cadena de gran interés en clínica (97-99) por disponer de mayor potencia que los ASO y los ribozimas para hidrolizar ARNm específicos. Sin embargo, se debe mejorar la entrega eficiente, segura y tejido/célula específica. El siRNA es degradado por una enzima de escisión dentro del complejo proteico RISC (Argonata 2) que hidroliza el ARNm diana y evita así su posible traducción a proteína.

En este trabajo se utilizan los ASO modificados químicamente como principal herramienta de silenciamiento porque pueden ser utilizados *in vitro* e *in vivo* sin necesidad de vectores y ya han demostrado en ensayos clínicos que pueden ser administrados como medicamentos. También se emplean los PPRH para comparar la eficacia de silenciamiento de éstos con los ASO ya que los PPRH son mucho más económicos que los ASO modificados.

En este trabajo uno de los principales objetivos es evaluar la respuesta antitumoral provocada por la combinación de la vacunación terapéutica con células modificadas con genes de citoquinas inmunoactivadoras como GM-CSF y el silenciamiento de genes inmunosupresores como CTLA4 y Foxp3. La combinación de anticuerpos anti-CTLA4 con vacunación con células B16 modificadas genéticamente con GM-CSF ha demostrado tener actividad antitumoral en melanoma murino (100). El modelo de estudio utilizado para la realización de este trabajo es precisamente ese. El melanoma es uno de los mejores candidatos para el tratamiento con vacunas antitumorales ya que es un cáncer muy inmunogénico, llegándose a registrar incluso casos de remisión espontánea (101-103).

En la actualidad se diagnostican unos 160.000 casos de melanoma al año en todo el mundo (79.000 hombres y 81.000 mujeres). Representa aproximadamente el 1,5% de los tumores en ambos sexos. En Europa es más frecuente entre las mujeres, al contrario que en el resto del mundo. En España se diagnostican unos 3.600 casos al año. Como en el resto de Europa, es un tumor más frecuente entre las mujeres (2,7% de los cánceres femeninos) que entre los hombres (1,5%). La incidencia en nuestro país se puede considerar alta, con un ascenso muy importante en los últimos años. La supervivencia tras un melanoma en España es similar a la media europea, que se sitúa en torno al 75% para los hombres y 84% para las mujeres.

## HIPÓTESIS

- La vacunación preventiva con complejos celulares formados por fibroblastos modificados genéticamente con genes de citoquinas inmunoactivadoras como GM-CSF y células tumorales puede generar una respuesta inmune antitumoral equivalente a la vacunación con células tumorales libres en un modelo murino de melanoma.
- El silenciamiento génico con PPRH puede ser igual de efectivo que el silenciamiento con ASO pero con la ventaja de no ser necesaria ninguna modificación química, abaratando así el coste.
- El silenciamiento génico de las moléculas inmunosupresoras CTLA4 y/o Foxp3 incrementa la respuesta inmune activadora frente al tumor generada por la vacunación terapéutica con células tumorales modificadas con el gen de GM-CSF.

## OBJETIVOS

- Desarrollar complejos celulares formados por células tumorales y fibroblastos modificados genéticamente con genes de citoquinas inmunoactivadoras.
- Evaluar la eficacia antitumoral de estos complejos celulares como vacuna preventiva en un modelo de melanoma murino.
- Diseñar oligonucleótidos antisentido (ASO) y *hairpins* PPRH para el silenciamiento de los genes CTLA4, Foxp3 y CD25.
- Evaluar la entrada a la célula de ASO y PPRH marcados con fluorocromo.
- Comparar la eficacia de PPRH y ASO en el silenciamiento *in vitro* de los genes CTLA4, Foxp3 y CD25.
- Estudio farmacocinético de un ASO y un PPRH modelo, marcados con fluorocromo, tras su administración por diferentes vías parenterales.
- Evaluar el efecto antitumoral del silenciamiento génico de CTLA4 y Foxp3 sobre la vacunación terapéutica antitumoral con células

## Vacunas y silenciamiento génico antitumoral

tumorales B16 modificadas con el gen de GM-CSF en un modelo murino de melanoma.

- Dilucidar la relación entre la respuesta antitumoral y la expresión de los genes CTLA4 y Foxp3.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1.- CÉLULAS

La línea celular de melanoma murino B16 ha sido la principal utilizada en los experimentos de vacunación. Estas células son singénicas con los animales que utilizamos, ratones C57BL/6 (Charles River). 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 células B16, además de como modelo de tumor en sí, se han usado en nuestros experimentos como fuente de antígeno para la vacunación. Las células B16 que se han utilizado como vacuna han sido previamente irradiadas con una dosis de 150Gy, 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 (17, 104). 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 suero bovino fetal (SBF) con un 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Panreac), para ser congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

En el caso de la utilización de las células B16 como fuente de tumor experimental, se inyecta un número determinado de células no irradiadas, salvajes, recién despegadas de sus frascos, en su medio habitual de cultivo sin suplementar, en la pata izquierda de los animales.

Otras células utilizadas en este trabajo son fibroblastos de ratón obtenidos a partir de explantes de piel y tráquea de un ratón C57BL/6.

También se han utilizado las células 3LL, procedentes de un carcinoma pulmonar de ratones C57BL/6. Esta línea es también conocida como carcinoma pulmonar de Lewis. Es un carcinoma anaplásico de alta malignidad.

Además también se utilizaron células HeLa procedentes de cáncer de cuello de útero humano.

Todas estas células son células adherentes, que crecen bien en frascos de cultivo con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (Sigma), suplementado con un 10% de SBF, inactivado por calor (55°C durante 40 minutos), (Biomedía), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL). Son cultivadas en incubadores humidificados con 5% de CO<sub>2</sub> y a 37°C. Se despegan de sus frascos con Tripsina-EDTA a 37°C o PBS-EDTA y se cuentan en las cámaras de recuento celular estándar (cámaras de Neübauer), diluidas con azul tripán para discriminar las células viables de las muertas. El azul tripán es un colorante que únicamente entra en las células muertas.

Por último, en este trabajo también se han utilizado linfocitos de ratón de sangre periférica y células de la línea celular EL4.BU.OU6 procedentes de linfoma linfoblástico murino. Las células EL4.BU.OU6 crecen en suspensión en medio de cultivo DMEM suplementado con 2-Mercaptoetanol (2ME) 50 µM, además de SBF y antibiótico.

La manipulación de los cultivos y la preparación de las soluciones se ha realizado en condiciones de asepsia, trabajando en una campana de flujo laminar vertical.

## **2.- PLÁSMIDOS**

Para la realización de este trabajo se han utilizado los siguientes plásmidos: p3C eGFP, p2F mGM-CSF, p2F mGM-CSF/m-IL12 y pMok mGM-CSF. El plásmido p3C eGFP procede del plásmido pcDNA3 y posee el gen de resistencia a la ampicilina y el gen de la proteína fluorescente verde "aumentada" (eGFP), regulado por el promotor del citomegalovirus (CMV). Este plásmido lo utilizamos en los experimentos en los que se ha requerido un gen marcador.

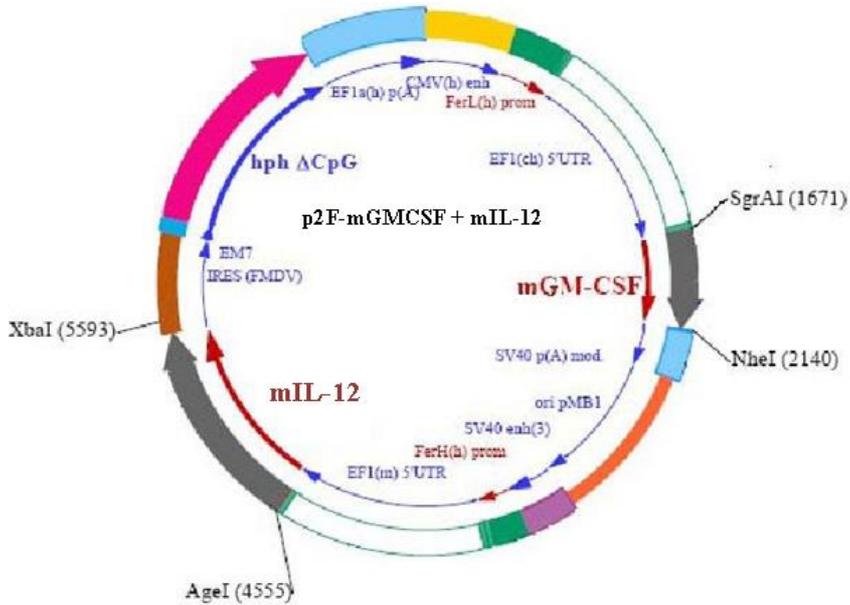


Figura 7. Estructura del plásmido p2F GM-CSF/IL-12.

Los plásmidos p2F mGM-CSF y p2F mGM-CSF/mIL12 fueron obtenidos a partir del plásmido base pVITRO2 (Invivogen), conteniendo los genes murinos de la citoquina GM-CSF o la combinación de ésta con IL-12. 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 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 los promotores, sus regiones 5’UTRs han sido reemplazadas por las de los genes EF1 $\alpha$  de ratón y chimpancé. En la figura 7 podemos ver el esquema del plásmido p2F mGM-CSF/mIL-12.

El plásmido pMok mGM-CSF fue generosamente proporcionado por el Dr. A. Koenig (Mologen) y contiene el gen murino de GM-CSF controlado por el promotor del CMV y el gen de resistencia a la kanamicina. En la figura 8 podemos ver el esquema de este plásmido.

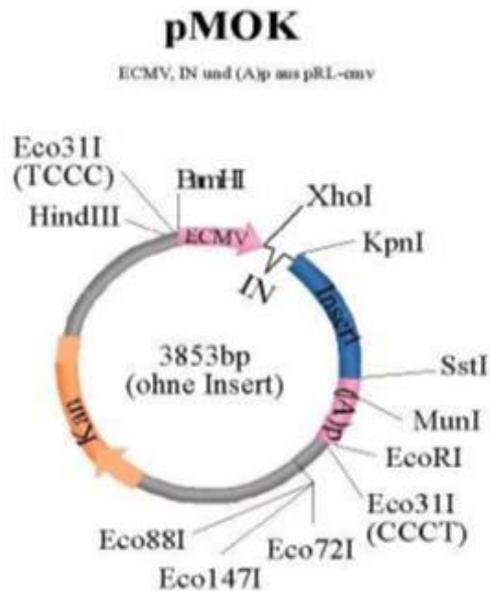


Figura 8. Estructura del plásmido pMok.

Todos los plásmidos fueron introducidos por choque térmico y amplificados en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen), en su correspondiente medio de cultivo selectivo Luria Bertani, (LB, Pronadisa). Posteriormente, los plásmidos fueron extraídos a gran escala y con alto grado de pureza con el kit comercial Qiagen Giga Endofree (Izasa SA), 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 negativas 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.- DESARROLLO DE COMPLEJOS CELULARES**

#### **3.1.- Formación de complejos celulares**

Entendemos por complejos celulares la unión o tendencia (natural o inducida) de dos tipos celulares distintos a agregarse. Para formar los complejos celulares empleamos polietilenimina (PEI, 800KDa, Sigma) y células de diferentes tipos: Fibroblastos, B16, 3LL y HeLa. Las concentraciones de PEI ensayadas van de 10µg/mL a 1mg/mL. Para la formación de los complejos se ha seguido el siguiente protocolo:

- 1.- En pocillos de una placa de 96 pocillos se añaden 50µL de una suspensión de células tumorales (2.000.000cél/s/mL) en HEPES 25mM, repartiendo en cada pocillo 100.000 células.
- 2.- Se añade a cada pocillo 50µL de una solución de PEI a diferentes concentraciones.
- 3.- Se dejan incubar las células en contacto con el PEI durante 15 minutos.
- 4.- Trascurridos los 15 minutos se añaden 100µL de fibroblastos a una concentración de 1.000.000cél/s/mL y se incuba otros 15 minutos.

Trascurrido el tiempo se preparan las muestras para la caracterización de los complejos mediante citometría de flujo o microscopía óptica.

#### **3.2.- Caracterización de los complejos celulares**

##### *3.2.1.- Citometría de flujo*

Para caracterizar los diferentes tipos de complejos por tamaños se llevaron suspensiones de los complejos formados a diferentes concentraciones de PEI a analizar con el citómetro de flujo (BD FACS Canto, Beckton Dickinson).

Además fibroblastos transfectados con el gen eGFP se despegaron del frasco de cultivo y se resuspendieron en PBS a una concentración de 1.000.000cél/s/mL para posteriormente ser analizados con el citómetro de flujo y poder determinar el porcentaje de células transfectadas.

Con la misma suspensión de células se formaron complejos entre estos fibroblastos marcados y B16 con PEI para, mediante citometría de flujo, determinar el porcentaje de fibroblastos presentes en los complejos.

### 3.2.2.- *Microscopia óptica*

La caracterización de los complejos por tamaños mediante citometría de flujo no fue posible ya que la suspensión de células debía ser filtrada con filtros de 30 $\mu$ m de diámetro de poro antes de pasar por el citómetro, para evitar que éste se obstruyese, perdiendo así la mayor parte de los complejos celulares. Por este motivo decidimos realizar la caracterización de los complejos observando muestras entre porta y cubre con el microscopio óptico invertido (Axiovert 135M, Zeiss).

Para el estudio de la tendencia de agregación de los diferentes tipos celulares se hacen series de fotografías a 10 aumentos a 3 campos distintos por cada muestra y se hace un recuento de las células por cada fotografía tomada, obteniendo los siguientes datos: %células libres, %células agregadas, media del número de células por complejo, mediana del número de células por complejo, rango de células por complejo. Además clasificamos los complejos en tres tamaños:

- pequeños: de 4 a 15 células,
- medianos: de 16 a 30 células,
- grandes: más de 30 células.

A las agrupaciones de menos de 4 células no se les consideró complejos por estar también presentes con relativa frecuencia en los controles (células sin PEI).

Se procedió así para cada fotografía tomada a cada concentración de PEI y después se hizo una media de los datos obtenidos para cada concentración.

### 3.2.3.- *Microscopia de fluorescencia y confocal*

Para dilucidar los mecanismos de formación de los complejos y confirmar la distribución de las células tumorales y los fibroblastos en éstos, se observaron con el microscopio de fluorescencia (Axiovert 135M, Zeiss) y el confocal (Olympus FV1000) muestras de complejos formados a partir de B16 marcadas con IP (yoduro de propidio) y fibroblastos marcados con ésteres de calceína (calceín AM special packaging, Applied Biosystems). Los ésteres de calceína son hidrolizados por las células vivas emitiendo fluorescencia verde. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- 1.-Se incuban los fibroblastos con calceína-AM a una concentración final de  $1,25\mu\text{M}$  durante 10 minutos.  $[\text{Fibro}]=1.000.000\text{cél}/\text{mL}$ .
- 2.-A continuación se centrifugan y se les elimina el sobrenadante para eliminar así la calceína que no haya entrado en el fibroblasto y se resuspende en un volumen de HEPES 25mM hasta quedar las células a una concentración de  $1.000.000\text{cél}/\text{mL}$ .
- 3.-En tres pocillos de una placa de 96 se añade  $25\mu\text{L}$  de PEI a diferentes concentraciones.
- 4- Se añade  $25\mu\text{L}$  de células B16 ( $C=2.000.000\text{cél}/\text{mL}$ ,  $50.000\text{cél}$ s) a cada uno de los anteriores pocillos quedando estos a una  $[\text{B16}]=1.000.000\text{cél}/\text{mL}$ .
- 5.- Se deja incubar 15 minutos.
- 6.- Se añade  $50\mu\text{L}$  de la suspensión de fibroblastos ( $1.000.000\text{cél}/\text{mL}$ ,  $50.000\text{cél}$ s) marcados con calceína-AM a cada uno de los tres pocillos.
- 7.- Se incuba otros 15 minutos.
8. Se añade a cada pocillo  $35\mu\text{L}$  de HEPES y  $15\mu\text{L}$  de IP de modo que queda a una concentración final de  $1\mu\text{M}$ .
- 9.- Se incuba 10 minutos.
- 10.- Se prepara una muestra por cada pocillo entre un porta y un cubre para tomar imágenes con el microscopio confocal.

Durante todo el proceso la placa debe permanecer protegida de la luz.

Este protocolo posteriormente se optimizó marcando previamente las B16 con IP a una concentración de  $1\mu\text{M}$  y transfectando los fibroblastos con el gen eGFP en lugar de marcarlos con calceína-AM.

### 3.3.- Prueba de viabilidad celular

Tras caracterizar la tendencia de agregación de cada tipo celular con PEI se hicieron ensayos de viabilidad celular mediante marcaje de células con calceína-AM. El protocolo utilizado es el siguiente:

#### *Preparación de recta estándar o patrón*

- 1.- Añadir en 6 pocillos de una placa de 96, diferentes cantidades de células: 5.000, 20.000, 40.000, 80.000, 110.000 y 150.000 respectivamente. Todos los pocillos se preparan por triplicado.
- 2.- Se enrasan los pocillos con HEPES  $25\mu\text{M}$  hasta un volumen de  $150\mu\text{L}$ .
- 3.- Se añaden  $50\mu\text{L}$  de calceína-AM  $5\mu\text{M}$  de forma que su concentración final en el pocillo es de  $1,25\mu\text{M}$ .
- 5.- Lectura de la placa con un fluorímetro (CytoFluor 2350, Millipore) a los 40 minutos.

#### *Preparación de pocillos con PEI*

- 1.- Se añade en 5 pocillos diferentes de una placa de 96,  $25\mu\text{L}$  de PEI a diferentes concentraciones. Todos los pocillos se preparan por triplicado.
- 2.- Se añade a cada pocillo  $25\mu\text{L}$  de una suspensión de células tumorales (100.000 células por cada pocillo).
- 3.- Se deja incubar 15 minutos.
- 4.- Transcurrido los 15 minutos se añaden  $50\mu\text{L}$  de fibroblastos a una concentración de  $1.000.000\text{cél}/\text{mL}$  y se incuba otros 15 minutos.
- 5.- Trascendido el tiempo se añade  $25\mu\text{L}$  calceína-AM a  $5\mu\text{M}$  (concentración final en el pocillo es de  $1,25\mu\text{M}$ ).

6.- Se deja incubar la placa a oscuras 40 minutos y posteriormente se lee la placa con un fluorímetro.

#### **4.- TRANSFECCIÓN CELULAR *IN VITRO* MEDIANTE POLIPLEJOS**

Para la transfección *in vitro* de los fibroblastos y las células tumorales se utilizó un procedimiento de transfección no viral, basado en poliplejos, es decir, complejos ADN/polímero catiónico. En nuestro caso utilizamos el polímero catiónico PEI (PEI 25KDa ramificado, Sigma). 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. El protocolo de transfección se detalla a continuación.

Se preparan dos tubos. Uno con PEI 25KDa, preparado a 2 mg/mL, y la cantidad de tampón *Hepes Buffer Saline* (HBS) necesaria. El otro tubo con el plásmido que se desee transfectar, preparado a 1mg/mL, con la cantidad de ADN requerida para alcanzar la concentración necesaria que previamente se ha optimizado para la transfección. Ambos tubos se ajustan con HBS para igualar los volúmenes. La relación de masas 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 agita vigorosamente y la mezcla se deja en el incubador de células (37°C y 5% CO<sub>2</sub>) durante 30 minutos. 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 (DMEM) solo, sin SBF ni antibióticos. 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 necesario para completar su volumen habitual de cultivo, pero esta vez suplementado con el porcentaje de SBF (17%) y antibióticos (1,7%) que no se incorporaron con el primer DMEM (solo), para que al final quede a una concentración final de 10% y 1% respectivamente.

Antes de transfectar los fibroblastos y las células tumorales con los genes de

IL-12 y GM-CSF se realizó un estudio dosis-respuesta para determinar la concentración de plásmido en la que la eficacia de transfección era máxima. Para ello se sembraron las células en una placa de 24 pocillos y se transfectaron con diferentes concentraciones del plásmido p3C eGFP. Se tomaron imágenes con el microscopio de fluorescencia y se hicieron lecturas midiendo la intensidad de fluorescencia con un fluorímetro a las 24 y a las 48 horas y se realizaron curvas dosis respuesta de concentración de ADN frente intensidad de fluorescencia.

### **5.- 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 24h se retira el medio de cultivo por completo y se sustituye por medio fresco. El medio retirado se centrifuga a 3000rpm durante 5 minutos, para 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 (fibroblastos o B16) 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 (Pharmingen, BD Biosciences).

### **6.- DISEÑO DE ASO Y PPRH**

En este trabajo utilizamos ASO y PPRH con la intención de silenciar los genes CTLA4, CD25 y Foxp3. Los ASO utilizados poseen modificaciones 2-OMe en los nucleótidos de sus extremos y un esqueleto central de nucleótidos

fosforotioatos. Por su parte los PPRH no necesitan ser modificados químicamente ya que su estructura les confiere resistencia a las nucleasas. Para diseñar los diferentes ASO y PPRH utilizamos el programa informático *Triplex-Forming Oligonucleotide Target Sequence Search* accesible en la página del *MD Anderson Cancer Center*. Este programa permite localizar secuencias ricas en purinas del ADN que permiten la formación de triples cadenas de ADN mediante enlaces de Hoogsteen, que no son los convencionales para el apareamiento entre las bases de los nucleótidos (enlaces de Watson y Crick). De este modo diseñamos para cada uno de los genes a silenciar dos ASO y dos PPRH que se unen a secuencias exónicas del ADN y otros dos ASO y dos PPRH que se unen a secuencias intrónicas. Por cada ASO diseñado se diseñó también un PPRH que se unía a la misma secuencia del ADN, con el fin de poder determinar cuál de las dos herramientas de silenciamiento resultaba más eficaz. Los hhTF-AT son PPRH anti cadena *template* del ADN y los hhTF-AC son PPRH anti cadena *coding* del ADN. Los TF-AT son ASO formadores de triples hélices anti cadena *template* del ADN. Los ASO y PPRH diseñados se especifican a continuación.

*CTLA4:*

ASO 1 (Intrón 3): 5' GGAGGAGTAGGAAGAGTAAG 3'

ASO 2 (Exón 1): 5' GAAGAGTGAGCAGGG 3'

ASO 9 (TF-AT, Intrón 3): 5' GAATGAGAAGGATGAGGAGG 3'

ASO 10 (TF-AT, Exón 1): 5' GGGACGAGTGAGAAG 3'

PPRH 1 (hhTF-AC, Intrón 3): 5'

GAAAGAGAAGGAAGAGGAGGTTTTTGGAGGAGAAGGAAGAGAAAG  
3'

PPRH 2 (hhTF-AC, Exón 1):

5' GGGAAGAGAGAGAAGTTTTTGAAGAGAGAGAAGGG 3'

PPRH 5 (hhTF-AT, Intrón 3): 5'

GGGAAAGGAAGGAAGAGGAATTTTTAAGGAGAAGGAAGGAAAGGG  
3'

PPRH 6 (hhTF-AT, Exón1): 5'

AGAGGAGAGAGGAAGTTTTTGAAGGAGAGAGGAGA 3'

*CD25*:

ASO 5 (Intrón 4): 5' GAGGAAAGAATGGGAAGG 3'

ASO 6 (TF-AT, Intrón 4): 5' GGAAGGGTAAGAAAGGAG 3'

ASO 7 (Exón 8): 5' GTAGGGAGGAGAGGGGAG 3'

ASO 8 (TF-AT, Exón 8): 5' GAGGGGAGAGGAGGGATG 3'

PPRH 7 (hhTF-AT, Intrón 4): 5'

GGAAGAAGGAGAGAGGAAGATTTTTAGAAAGGAGAGAGGAAGAAGG  
3'

PPRH 10 (hhTF-AC, Intrón 4): 5'

GGAAGGGAAAGAAAGGAGTTTTTGAGGAAAGAAAGGGAAGG 3'

PPRH 11 (hhTF-AT, Exón 8): 5'

GAAAGGAGGAAAGGAAAAGGGTTTTTGGGGAAAAGGAAAGGAGG  
AAAG 3'

PPRH 12 (hhTF-AC, Exón 8): 5'

GAGGGGAGAGGAGGGAAGTTTTTGAAGGGAGGAGAGGGGAG 3'

*Foxp3*:

ASO 3 (Exón 13): 5' AGGAGATAGAGTGGAGGGG 3'

ASO 4 (Intrón 1): 5' GGGGAAGCACGGAAGGG 3'

ASO 11 (TF-AT, Exón 13): 5' GGGGAGGTGAGATAGAGGA 3'

ASO 12 (TF-AT, Intrón 1): 5' GGGAAGGCACGAAGGGGG 3'

PPRH 3 (hhTF-AC, Exón 13): 5'

GGGGAGGAGAGAAAGAGGATTTTTAGGAGAAAGAGAGGAGGGG 3'

PPRH 4 (hhTF-AC, Intrón 1): 5'

GGGAAGGAAAGAAGGGGGTTTTTGGGGGAAGAAAGGAAGGG 3'

PPRH 8 (hhTF-AT, Exón 13): 5'

GAGGGAAGAGAGAGAGGAGAGTTTTTGAGAGGAGAGAGAGAAGGG  
AG 3'

PPRH 9 (hhTF-AT, Intrón 1): 5'

AAGAGGGGAAGAAGGGGGTTTTTGGGGGAAGAAGGGGAGAA 3'

## **7.- ENTRADA DE LOS ASO Y LOS PPRH AL INTERIOR DE LA CÉLULA**

Para evaluar la entrada de ASO y PPRH en el interior de la célula se diseñó un ASO y un PPRH de tamaño promedio a los que utilizaríamos para silenciar los genes de interés. Además estos ASO y PPRH iban marcados con el fluorocromo FAM, que emite fluorescencia verde. Las secuencias de estos ASO-FAM y PPRH-FAM son las siguientes:

ASO-FAM: 5' AGGAGGACAGGAGAGTAGA 3'

PPRH-FAM:

5' AGGAGGAAAGGAGAGAAGATTTTTAGAAAGAGAGGAAAGGAGG 3'

Las células EL4 y linfocitos de ratón de cultivo primario fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de ASO-FAM y PPRH-FAM a diferentes tiempos. Tras la incubación las células se pasaron por el citómetro de flujo (FACS Verse) para determinar el porcentaje de células marcadas y la intensidad de fluorescencia. Una vez confirmado que las células se marcan con los ASO-FAM y PPRH-FAM, éstas se analizan con un citómetro AMNIS. El citómetro AMNIS además de determinar células marcadas con fluorescencia y su intensidad, toma imágenes de las células y posee una herramienta que permite determinar si el fluorocromo se ha internalizado o permanece en la membrana.

## **8.- SILENCIAMIENTO *IN VITRO* UTILIZANDO ASO Y PPRH**

Los linfocitos de ratón (EL4 y linfocitos de cultivo primario) se incuban en presencia de los diferentes ASO y PPRH diseñados a diferentes tiempos (1-48h) y concentraciones (1 nM-1 µM). Transcurrido el tiempo de incubación se extrae el ARN de las células y se evalúa el número de copias del ARNm de cada uno de estos genes mediante RT-PCR cuantitativa. La eficacia del silenciamiento se obtiene comparando la cantidad de copias de ARNm de estos genes en los grupos tratados con respecto a células sin tratar (control). Además

se ha evaluado la toxicidad celular de los oligonucleótidos mediante la prueba de metabolización de ésteres de calceína.

## **9.- FARMACOCINÉTICA DE LOS ASO Y PPRH EN RATONES**

Para el estudio farmacocinético en sangre de los ASO y PPRH se inyectaron oligonucleótidos (ASO y PPRH) marcados con una sonda fluorescente (FAM) a ratones C57BL/6 por diferentes vías (intraperitoneal e intravenosa, n=3) y se evaluó su cinética en sangre recogiendo muestras de sangre a diferentes tiempos. Se realizó una curva de concentraciones conocidas de ASO-FAM y PPRH-FAM frente a intensidad de fluorescencia. Las tomas de sangre (50µL vena safena) se realizaron 15min, 30min, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h y 48h después de la inyección de los oligonucleótidos. Se midió la fluorescencia presente en sangre mediante un fluorímetro y se determinó su concentración mediante la ecuación de la curva.

## **10.- ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES CTLA4 Y FOXP3 TRAS LA IMPLANTACIÓN DEL TUMOR**

Se realizó un estudio de expresión de los genes CTLA4 y Foxp3 tras implantar el tumor en ratones sin ningún tratamiento, en ratones con vacunación terapéutica con células modificadas con el gen de GM-CSF y en ratones supervivientes de una vacunación preventiva. A los ratones de la vacunación terapéutica se les administra  $2 \times 10^4$  células B16 irradiadas y transfectadas con el plásmido p2F GM-CSF los días 3, 10 y 17 tras implantar el tumor (día 0). A los ratones supervivientes de la vacunación preventiva que fueron vacunados con  $10^5$  células B16 irradiadas y transfectadas con el plásmido p2F GM-CSF los días -21, -7 y 7 respecto a la implantación del tumor (día 0) se les reimplanta el tumor 4 meses después y se toman muestra de sangre.

Se extrae unos 50µL sangre por punción de la vena safena con ayuda de un capilar a cada grupo de ratones a diferentes tiempos y se purifica el ARN

mediante un kit comercial (Quiagen). Posteriormente se evalúa el número de copias del ARNm de cada uno de estos genes mediante RT-PCR cuantitativa.

## **11.- VACUNAS ANTITUMORALES CON CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE**

Para los experimentos de vacunación se han utilizado ratones C57BL/6 (Harlan) 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 Ético 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 células salvajes B16 son implantadas en la pata izquierda de los animales. Como vacuna se utilizan células B16 irradiadas a 150Gy que se almacenan congeladas a -80°C (y fibroblastos en alguno de los experimentos). Las dosis de vacuna y días de vacunación varían según el experimento sea de vacunación preventiva o terapéutica. En todos los experimentos se midió el volumen tumoral y se realizaron curvas de supervivencia de los animales. Cuando el volumen tumoral alcanzó 1.500mm<sup>3</sup> los animales fueron eutanizados por dislocación cervical bajo anestesia con isofluorano. A continuación se describen los procedimientos experimentales de vacunación preventiva con complejos celulares vs. células libres y el de vacunación terapéutica y silenciamiento génico.

### **11.1.-Vacunas preventivas con complejos celulares vs. células libres**

Con este experimento pretendemos comprobar si los complejos celulares desarrollados en nuestro laboratorio, formados por fibroblastos modificados genéticamente y células tumorales pueden provocar una respuesta antitumoral

similar a la observada con células tumorales libres modificadas genéticamente en un modelo de vacunación preventiva frente a melanoma.

Para implantar el tumor se inyectaron subcutáneamente en la pata izquierda de cada ratón  $10^5$  células B16 el día 0. Las dosis de vacunación se suministran los días -21, -7 y 7 (semanas -3, -1 y 1, respectivamente), de forma subcutánea, en el lomo del ratón.

Las extracciones de sangre para monitorizar la producción de inmunoglobulinas, se llevaron a cabo en el día -15 (tras la implantación de la primera dosis de vacuna) y tras 15 días desde la implantación del tumor, después de las tres dosis de vacuna.

Las tomas de sangre se realizan a todos los animales del experimento, mediante punción de la vena safena y recogida de  $50\mu\text{L}$  de sangre por ratón mediante capilares de vidrio que previamente han sido heparinizados. La sangre procedente de ratones de un mismo grupo se agrupa y se centrifuga a 2500rpm, para separar el plasma del resto de los componentes sanguíneos. Se recoge el plasma de cada grupo y se congela a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Éste se utiliza posteriormente para determinar la producción de IgG específicas frente al tumor y frente al fibroblasto.

En este experimento, las células B16 o los fibroblastos transfectados, 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 ( $200\ \mu\text{L}$ ), por ratón. En el caso de los ratones vacunados con complejos celulares (Cplex) la dosis de vacuna es de  $2 \times 10^5$  células B16 y  $2 \times 10^5$  fibroblastos.

Los grupos de tratamiento fueron: a) B16 p2F, células B16 transfectadas con p2F GM-CSF; b) B16 pMok, células transfectadas con pMok GM-CSF; c) Cplex25 p2F, complejos celulares formados con PEI  $25\mu\text{g}/\text{mL}$ , células B16 y con fibroblastos transfectados con p2F GM-CSF y; d) Cplex50 p2F, complejos celulares formados con PEI  $50\mu\text{g}/\text{mL}$ , células B16 y con fibroblastos

transfectados con p2F GM-CSF ; e) Cplex25 pMok, complejos celulares formados con PEI 25µg/mL, células B16 y con fibroblastos transfectados con pMok GM-CSF; f) Cplex50 pMok, complejos celulares formados con PEI 50µg/mL, células B16 y con fibroblastos transfectados con pMok GM-CSF. El grupo control utilizado fue g) Control, en el que se inyectaron sólo 200µL DMEM en cada dosis de vacunación.

### **11.2.- Vacunas Terapéuticas con células tumorales modificadas genéticamente y silenciamiento génico de moléculas inmunosupresoras**

La vacunación 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 recibir la primera dosis de vacuna. Por tanto, se espera que los mecanismos de autorregulación de la respuesta inmune que limitan la eficacia de la vacuna se encuentren ya instaurados. Por ello en este experimento proponemos combinar la vacunación terapéutica con genes de citoquinas inmunoactivadoras con el silenciamiento génico de moléculas inmunosupresoras. De este modo pretendemos activar la respuesta inmune activadora frente al tumor a la vez que bloqueamos la respuesta supresora.

Al igual que en el experimento de vacunación preventiva, en la vacunación terapéutica los animales fueron vacunados con células irradiadas y transfectadas y se inyectaron en el lomo de los ratones pero a razón de  $2 \times 10^6$  células por dosis. Sin embargo en este caso se inyectaron subcutáneamente  $2 \times 10^4$  células tumorales en la pata izquierda de los ratones para implantar el tumor, en lugar de las  $10^5$  inyectadas en el experimento de vacunación preventiva.

El esquema temporal de vacunación fue el siguiente: primero se implanta el tumor (día 0) y posteriormente se administran tres dosis de vacuna, en los días 3, 10 y 17 respecto a la implantación de tumor. Además se inyectaron ASO control, ASO anti-CTLA4 o ASO anti-Foxp3 los días 2, 4, 7 y 9. Las tomas de sangre se realizan con el mismo procedimiento que el descrito en la vacunación

preventiva. En este caso las tomas de sangre se realizan en los días -7, 2, 4, 8, 11, 15, 18 y 22. Se estudia la expresión de ARNm de los genes CTLA4 y Foxp3 en sangre.

Los grupos de animales que se incluyeron en este experimento son los siguientes: a) Vac+ASOctla4, vacunados con células B16 productoras de GM-CSF y a los que se les administró ASO anti-CTLA4; b) Vac+ASOfoxp3, vacunados con células B16 productoras de GM-CSF y a los que se les administró ASO anti-Foxp3; y c) Vac+ASOctla4+foxp3, vacunados con células B16 productoras de GM-CSF y a los que se les administró ASO anti-CTLA4 y anti-Foxp3. Se incluyeron dos grupos de animales como controles: d) Vac+ASOcont, ratones vacunados con células B16 productoras de GM-CSF y a los que se les administró un ASO control; y e) Control no vacunado, sólo se les inyectó 200µL de DMEM. (N=5 por grupo).

Cuando el volumen tumoral alcanzó los 1.500mm<sup>3</sup> los animales fueron sacrificados y se les extrajeron los pulmones para estudiar la posible presencia de metástasis y se les extrajo la sangre por la vena cava para hacer un estudio de los linfocitos Treg y CTLA4 presentes en sangre periférica.

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

La sangre recién extraída de cada ratón, tras su sacrificio, se procesa con Ficoll-Paque Plus<sup>®</sup> (Amersham Biosciences). Este reactivo nos permite la separación de los linfocitos del resto de células sanguíneas. Siguiendo las instrucciones del fabricante se obtuvieron los linfocitos de sangre periférica. Con estos linfocitos se llevó a cabo la caracterización de poblaciones linfocitarias, principalmente de linfocitos Treg y linfocitos CTLA4.

#### *Caracterización de Células T Reguladoras, CD4 y CTLA4 por Citometría de flujo*

En este experimento quisimos determinar si la proporción de linfocitos Treg y linfocitos CTLA4 presentes en la sangre periférica de los animales variaba a

causa de nuestro tratamiento. Para ello, una vez separados los linfocitos de cada grupo de animales tratados, en las tomas de sangre del día de sacrificio, se procedió al marcaje de los mismos. El total de linfocitos de cada grupo es dividido, tras ser contado, en dos partes, una para la tinción CD4, CTLA4 y Foxp3, y la otra para la tinción de los linfocitos Treg (CD4CD25Foxp3). Para determinar CD4 se utilizó el anti-mouse CD4 marcado con FITC, y para determinar los linfocitos CTLA4 se utilizó el anticuerpo de cabra anti-mouse CTLA marcado con PE, todos de eBioscience. Para determinar el número de linfocitos 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 evitar marcajes inespecíficos. Siguiendo las instrucciones del fabricante, se efectuaron los marcajes, para, una vez terminados, llevar las muestras a analizar con un citómetro de flujo (FacsVerse).

## **12.- MEDIDA DEL TAMAÑO TUMORAL, NÚMERO DE METÁSTASIS Y SUPERVIVENCIA**

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 sacrificarse por alcanzar el tumor el tamaño de 1500mm<sup>3</sup>. Para evitar el sufrimiento innecesario de los animales éstos se sacrificaron mediante dislocación cervical bajo anestesia con isofluorano cuando el tumor era mayor de 1500mm<sup>3</sup>. Con un 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 mm<sup>3</sup>.

Tras su sacrificio se extrajo los pulmones de los animales y se observó la posible aparición de metástasis.

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.

### **13.- CONTROL DE EFECTOS ADVERSOS: PESO DEL ANIMAL, DESPIGMENTACIÓN Y DIARREA**

A los animales incluidos en el experimento de vacunación terapéutica combinada con silenciamiento génico de moléculas inmunosupresoras se les vigiló para controlar la posible aparición de efectos adversos relacionados con inmunosupresión descritos en experimentos con anticuerpos anti-CTLA4, tales como despigmentación, diarrea y pérdida de peso. Para ello se evaluó visualmente a los animales y se pesaron 3 días por semana.

### **14.- CUANTIFICACIÓN DE ARNm DE CTLA4, CD25 Y FOXP3 MEDIANTE RT-PCR CUANTITATIVA**

Para cuantificar el ARNm de CTLA4, CD25 y Foxp3, se extrae el ARN de linfocitos en cultivo o de sangre periférica mediante un kit comercial (NuceloSpin® *RNA-Blood*, Machery-Nagel) de acuerdo con las instrucciones del mismo. El ARN se transforma a ADN complementario (ADNc) utilizando *random* hexámeros y la enzima reversotranscriptasa. La RT y PCR cuantitativa permiten cuantificar el número de copias de de ARNm del gen utilizando un equipo de PCR a tiempo real (7900HT *Fast Real-Time PCR System*, Applied Biosystems). Los productos amplificados generan cantidades crecientes de ADN de doble cadena los cuales se unen a las sondas generando incrementos proporcionales de fluorescencia en función del número de ciclos. El valor Ct es la medida en ciclos de PCR en el cual la emisión de fluorescencia se encuentra inmediatamente por encima del valor umbral basal. A partir de curvas dosis-respuesta de Ct frente al número de copias de ADN se puede obtener el número de copias de ARNm. Los análisis se realizaron por duplicado. Los juegos de

oligonucleótidos cebadores que se han empleado nos permiten amplificar tanto el ADN genómico como el ADNc.

Para amplificar el ADN de los genes CTLA4 y Foxp3 se han utilizado cebadores y sonda TaqMan de *Applied Biosystems* y para amplificar el ADN del gen CD25 se han utilizado unos cebadores diseñados por nosotros utilizando la base de datos del NCBI.

Las secuencias de cebadores para CD25 son:

Primer Forward: 5' CACTGCAGGGAGCCACCTCCT 3'

Primer Reverse: 5' TGAGCTGGGGCTGAGTCCACC 3'

Las secuencias de los cebadores para los genes CTLA4 y Foxp3 de *Applied Biosystems* no las conocemos pero sabemos que los cebadores para CTLA4 se encuentran en el exón 4 y los cebadores para Foxp3 en el exón 5.

## **15.- OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS HIDROSOLUBLES DE MEMBRANA TUMORAL (TMP) Y DE MEMBRANA DE FIBROBLASTO (FMP)**

La mezcla de proteínas hidrofílicas de membrana de las células B16 (*Tumor Membrane Proteins*, TMP) y la mezcla de proteínas hidrofílicas de membrana de fibroblastos (*Fibroblast Membrane Protein*, FMP) empleadas en los ELISAs específicos frente a TMP y FMP respectivamente, para detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas frente a estas proteínas en los sueros de los animales vacunados, han sido obtenidas según un protocolo basado en el trabajo de C. Bordier (105). El protocolo es el siguiente: tras despegar las células de los frascos y contarlas, su pellet es resuspendido en 1mL de “tampón de extracción” por cada 10 millones de células. Este tampón está compuesto por Tris 10mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, Triton X-114 0.5% (Sigma) y un inhibidor de proteasas, el fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 0.1mM (Sigma), pH 7.2. La mezcla se incuba en hielo durante 45 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos. Después se centrifuga a 5300rpm, 4°C, durante 15 minutos. 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 incuba 3 minutos a 37°C y se centrifuga 5 minutos a 2100rpm. De nuevo el sobrenadante se recupera y esta vez a las alícuotas de 750 $\mu$ L se les añade Triton X-114 hasta una concentración final del 0.5% antes de ponerlos en hielo sobre 250 $\mu$ L de tampón de centrifugación. Tras otros 3 minutos a 37°C y una última centrifugación de 5 minutos a 2100rpm, se obtienen dos fases, la superior contiene las proteínas hidrofílicas de las membranas celulares, que será retirada y guardada alícuotada a -20°C hasta su uso.

Para cuantificar la mezcla de proteínas obtenida se empleó el CBQCA *protein quantitation kit* (*Molecular Probes-Invitrogen*), 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.

## **16.- ELISA ESPECÍFICO DE IgG ANTI-TMP Y ANTI-FMP**

La medida de los anticuerpos específicos del tipo IgG (total y subclases) que los animales generan frente a TMP gracias a la vacuna, fue hecha en las muestras de plasma de los diferentes experimentos. Básicamente, las placas de ELISA (Costar) son cubiertas con TMP a 0.8 $\mu$ g/ml (100 $\mu$ L) en tampón carbonato/bicarbonato 50mM, pH 9.6, e incubadas durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se bloquean con 1% PBS-BSA, durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavan con PBS-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*), seguidos de dilución 1/5.000 de anti-IgG cabra biotinilado de conejo (Sigma) y estreptavidina acoplada a peroxidasa de rábano picante (Sigma). Las placas son finalmente reveladas con una mezcla de ortofenilendiamina (OPD, Sigma) 30mg/mL y peróxido de hidrógeno (Fluka), y la reacción detenida con HCl 1N, para leer la absorbancia a 492nm. Todas las muestras fueron ensayadas por duplicado, para permitir el cálculo de la absorbancia media y la desviación estándar (SD).

## **17.- CITOMETRÍA DE CÉLULAS B16 Y FIBROBLASTOS MARCADOS CON IgG1**

Para comprobar que las IgG presentes en la sangre procedente de los grupos de la vacunación preventiva son capaces de unirse a células B16 y fibroblastos se incuban estas células durante 1h en presencia del suero de los animales de los diferentes grupos de vacunación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo las células se lavan con PBS y se incuban con un anticuerpo anti-IgG1 de ratón marcado con Alexa Fluor 488 durante 2h. Estas muestras se analizan mediante citometría de flujo.

## **18.- ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

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 log-rank y comparar las curvas dos a dos.

Tanto para los cálculos estadísticos como para las representaciones gráficas se utilizó el programa Graph Pad Prism v.5.

# **RESULTADOS**

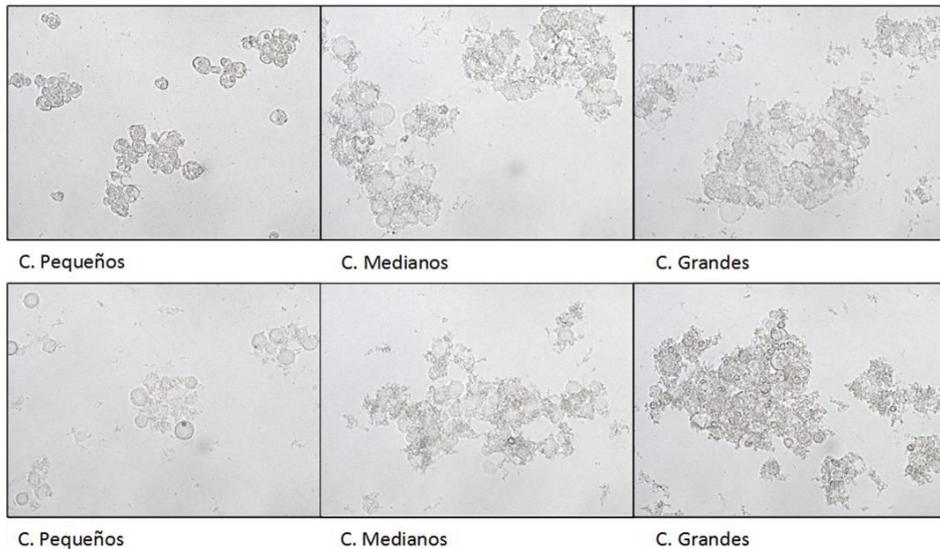
## **1.- DESARROLLO DE COMPLEJOS CELULARES**

### **1.1.- Caracterización de complejos celulares**

Uno de los principales objetivos de esta tesis es el desarrollo de complejos celulares formados por células tumorales y fibroblastos transfectados con genes inmunoactivadores, para posteriormente ser evaluados como vacuna antitumoral preventiva. Estos complejos tienen la ventaja de que son los fibroblastos y no las células tumorales las que se modifican genéticamente ya que en la práctica clínica la obtención de células tumorales en cantidad suficiente y su posterior transfección es en muchas ocasiones complicado, mientras que los fibroblastos ofrecen menos dificultades.

Para la formación de los complejos celulares se añadieron diferentes cantidades de PEI a fibroblastos y células tumorales. En primer lugar se obtuvieron fibroblastos de ratón a partir de explantes obtenidos de la piel de un ratón C57BL/6. Para ello, los explantes se colocaron cuidadosamente en una placa de 6 pocillos con DMEM suplementado en el incubador y se observaron periódicamente utilizando un microscopio óptico. Durante aproximadamente 8 semanas crecieron muy lentamente y se les cambiaba el medio una vez cada 7-10 días. A partir de este momento empezaron a crecer a mayor velocidad y a expandirse, por lo que el medio se les empezó a cambiar cada 2 ó 3 días. En este momento se retiraron los tejidos restantes del explante de los frascos de cultivo. Tras sucesivos pases logramos obtener una línea celular estable de fibroblastos de ratón. Las células tumorales que se utilizaron para formar los complejos fueron B16, 3LL (melanoma y carcinoma de pulmón de ratón, respectivamente) y HeLa (cáncer de cuello de útero humano). Para formar los complejos entre fibroblastos y células tumorales se incubaron éstas en presencia de PEI 800KDa. Las concentraciones de PEI ensayadas fueron de 10µg/mL a 1mg/mL. Se colocaron entre porta y cubre muestras (15µL) de complejos celulares formadas a cada una de las concentraciones de PEI y se observaron al microscopio óptico. Se clasificaron los complejos según fuesen

pequeños (4-15 células), medianos (16-30 células) o grandes (más de 30 células). La figura 9 muestra una imagen representativa de ellos. En cada imagen se contaron las células libres y formando complejos y se calcularon las medias, medianas y rangos de número de células por complejo. A continuación se comentan los resultados obtenidos con cada uno de los tipos de células tumorales con los que se formaron los complejos.



*Figura 9. Complejos celulares pequeños, medianos y grandes. En esta figura podemos ver imágenes representativas correspondientes a complejos celulares (Fibroblastos-B16/PEI) de tamaños pequeños (4-15 células), medianos (16-30 células) y grandes (más de 30 células).*

- Complejos B16-Fib/PEI: Tras la formación de complejos entre fibroblastos y células B16 mediante la adición de concentraciones crecientes de PEI (10 $\mu$ g/mL-1mg/mL) y su posterior observación al microscopio, comprobamos que hay un efecto dosis dependiente del PEI en la capacidad de las células para formar complejos (figura 10A). Hay una concentración de PEI a la que se alcanza la máxima agregación (50 $\mu$ g/mL) y por encima de la cual cada vez aparecen menos células formando complejos. En la gráfica de distribución de complejos vemos que prácticamente sólo se forman complejos de gran tamaño a las concentraciones de PEI circundantes al punto de máxima agregación.

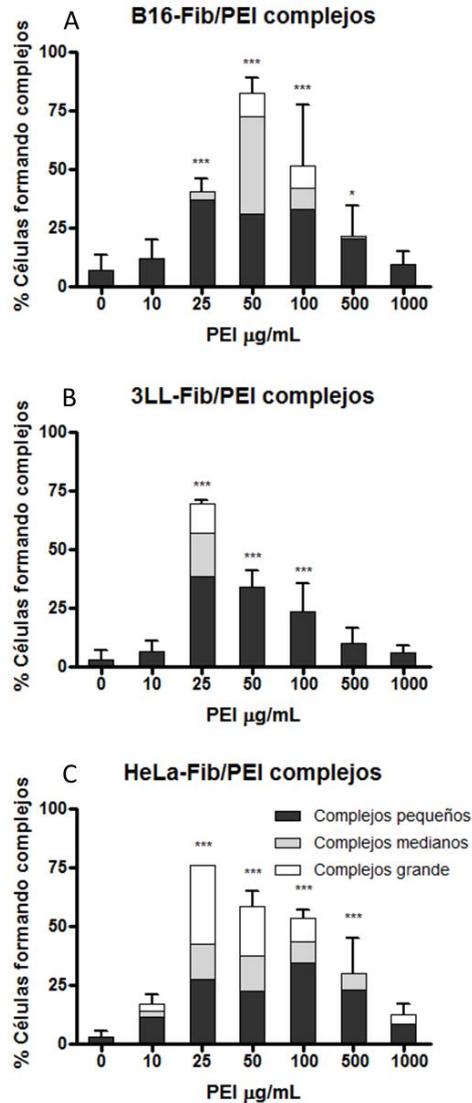


Figura 10. Distribución de complejos por tamaños. Las células tumorales (B16 en figura A, 3LL en figura B y HeLa en figura C) se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de PEI en HEPES 25mM durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se añadieron los fibroblastos y se dejaron incubar otros 15 minutos antes de observarse al microscopio. Los complejos se clasificaron según fuesen pequeños (4-15 células), medianos (16-30 células) o grandes (más de 30 células). Significación estadística respecto a la dosis de PEI de 0: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. (N=5).

- Complejos 3LL-Fib/PEI: La concentración de PEI a la que observamos mayor porcentaje de células formando complejos constituidos por fibroblastos y células 3LL es 25 $\mu$ g/mL (figura 10B). A concentraciones de PEI por encima de ésta aparecen cada vez más células libres hasta llegar a ser comparable con el control. Únicamente aparecen complejos tanto medianos como grandes a la concentración de PEI de 25 $\mu$ g/mL.

- Complejos HeLa-Fib/PEI: la concentración de PEI a la cual se observa mayor porcentaje de células formando complejos es 25 $\mu$ g/mL (figura 10C). A todas las concentraciones de PEI ensayadas aparecen complejos pequeños y a las concentraciones de entre 10 y 100 $\mu$ g/mL aparecen también medianos y grandes aunque con una mayor frecuencia a la concentración de 25 $\mu$ g/mL.

La concentración de PEI a la que se observa una mayor cantidad de células formando complejos es entre 25-50 $\mu$ g/mL dependiendo del tipo celular. La población de complejos observados no es homogénea a pesar de que dependiendo de la concentración de PEI predominan un determinado tamaño de complejos. A las concentraciones de PEI a las que se observa mayor porcentaje de células formando complejos aparecen también los complejos de mayor tamaño, pudiendo llegar a 100 células aproximadamente.

Para comprobar si los complejos eran estables se observaron éstos al microscopio óptico a las 0, 24 y 48h después de su formación (las células se mantuvieron en nevera). Tras su observación a los diferentes tiempos no se apreciaron diferencias en el tamaño y cantidad de éstos (datos no mostrados).

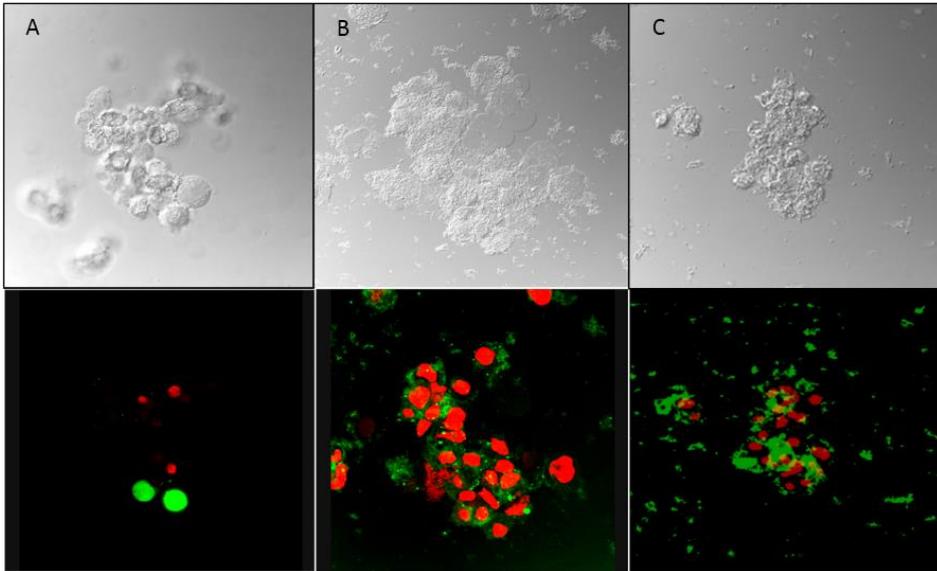
Tras caracterizar los complejos celulares mediante microscopía óptica, estudiamos la estructura y composición de los complejos mediante microscopía confocal. Para ello, en primer lugar marcamos las células tumorales B16 y los fibroblastos con calceína-AM (las células que conservan su actividad metabólica emiten fluorescencia verde) y observamos en microscopio óptico de fluorescencia para ver si las células vivas se encuentran también presentes en los complejos. Vemos fluorescencia verde tanto en el interior de los complejos

como en las células libres. Esto nos confirma que las células que forman parte de los complejos mantienen su viabilidad.

Para verificar que tanto las células tumorales como los fibroblastos se encuentran formando parte de los complejos, se marcaron las B16 con IP que se une al ADN de las células que no conservan su membrana intacta, como es el caso de éstas al ser tratadas con PEI (fluorescencia roja) y los fibroblastos con calceína-AM. Tras el marcaje se formaron los complejos y se llevaron muestras al microscopio confocal. Pudimos ver que los complejos estaban formados tanto por células con fluorescencia verde como con fluorescencia roja, lo cual indica que tanto los fibroblastos como las B16 se encuentran formando parte de los complejos.

Las imágenes tomadas con el microscopio confocal mostraron que la calceína lograba salir del fibroblasto y entraba también en la célula tumoral de forma que se observaban células con fluorescencia verde y roja y además la fluorescencia verde era muy tenue. Para comprobar hasta qué punto la membrana celular permitía el paso de moléculas, en lugar de marcar los fibroblastos con calceína-AM, se transfectaron con el gen de la proteína fluorescente verde (eGFP) que, al ser una proteína, es de mayor tamaño y le cuesta más difundir a través de la membrana. También en esta ocasión vimos que a ciertas concentraciones de PEI la eGFP (fluorescencia verde) difundía al exterior celular.

En la figura 11 se muestra una imagen representativa de cada una de las concentraciones de PEI ensayadas en este experimento.



*Figura 11. Aspecto de los complejos celulares mediante microscopia confocal.* Las células tumorales B16 se marcaron con IP y los fibroblastos se transfectaron con el gen eGFP. Se formaron complejos con estas células añadiendo PEI y se observaron al microscopio confocal. Podemos ver una imagen representativa con luz transmitida y con fluorescencia de los complejos formados con PEI a 25µg/mL (A), 50µg/mL (B) y 100µg/mL (C).

Concentración de PEI= 25µg/mL (figura 11A): podemos ver fluorescencia que delimita células muy bien definidas. Siempre las células marcadas únicamente en rojo o en verde. La fluorescencia verde es muy intensa.

Concentración de PEI= 50µg/mL (figura 11B): hay una pérdida notable de intensidad de fluorescencia verde (hemos de subir la ganancia para poder ver la fluorescencia verde). Vemos que la fluorescencia verde se distribuye de manera homogénea y difusa en los complejos, mientras que la roja permanece más localizada.

Concentración de PEI= 100µg/mL (fig 11C): La fluorescencia roja se vuelve muy tenue, apenas se ve. La fluorescencia verde también ha perdido cierta intensidad. Hay que subir la intensidad del láser para que se vea fluorescencia. Vemos que la fluorescencia verde ha difundido al medio extracelular.

A bajas dosis de PEI la fluorescencia verde es muy intensa porque los fibroblastos se conservan casi totalmente intactos manteniendo la integridad de su membrana. Se observan más células con fluorescencia roja (B16 marcadas con IP) que verde (fibroblastos transfectados con eGFP) porque tan sólo un porcentaje de entorno al 40% de los fibroblastos ha sido transfectado.

A la dosis intermedia la pérdida de intensidad de la fluorescencia verde junto con su difusión en el complejo podría indicar que las células se encuentran formando sincitios por fusión de sus membranas en algunos puntos con intercambio de material citoplasmático (eGFP). El aumento de la intensidad y del número de células con fluorescencia roja indica que las células tienen sus membranas más dañadas permitiendo así la entrada del IP a su interior.

A la dosis más alta la pérdida de la intensidad de la fluorescencia tanto verde como roja podría ser debida a que el polímero se encuentra recubriendo la superficie de las células, enmascarando así la fluorescencia, o bien que a esta concentración el PEI es tan tóxico que daña tanto las membranas celulares que el interior celular (eGFP o IP) difunde por todo el medio extracelular diluyéndose así la fluorescencia.

Para determinar la concentración de ADN óptima de transfección se realizaron previamente curvas dosis-respuesta con el gen eGFP. Para ello fibroblastos sembrados en una placa de 24 pocillos se transfectaron mediante poliplexos ADN/PEI con diferentes concentraciones del plásmido p3C eGFP. La gráfica de la figura 12 representa el promedio de resultados de una serie de ensayos tipo dosis respuesta (n=4) en los que se trató de encontrar la concentración de plásmido en la que había una mayor eficacia de transfección y por tanto una mayor expresión del gen evaluada en una mayor intensidad de fluorescencia.

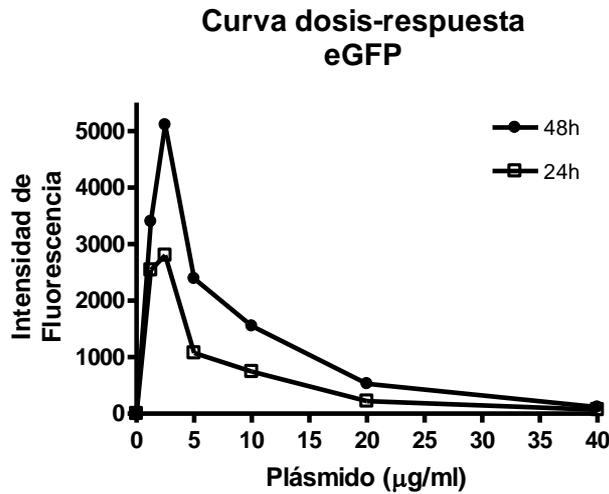


Figura 12. Curvas dosis-respuesta para el plásmido p3C eGFP.

En la gráfica se observa cómo los fibroblastos transfectados con eGFP/PEI a una concentración de plásmido de 2,5µg/mL son los que mayor intensidad de fluorescencia emiten. Concentraciones por debajo de ésta son menos efectivas y concentraciones por encima también porque empiezan a ser tóxicas para la célula ya que hay también mayor concentración de PEI que es tóxico. Vemos también que la expresión del gen es máxima a las 48 horas.

### 1.2.- Viabilidad celular de los complejos

La viabilidad celular de los complejos se determinó realizando la prueba de metabolización de calceína-AM (ésteres de calceína). En primer lugar hicimos un experimento para determinar la cinética de metabolización de la calceína-AM en células B16 y en fibroblastos y observamos que a partir de los 40 minutos se perdía la linealidad y la fluorescencia variaba muy poco (figura 13), por lo que determinamos ese tiempo como el adecuado para hacer las siguientes mediciones de fluorescencia.

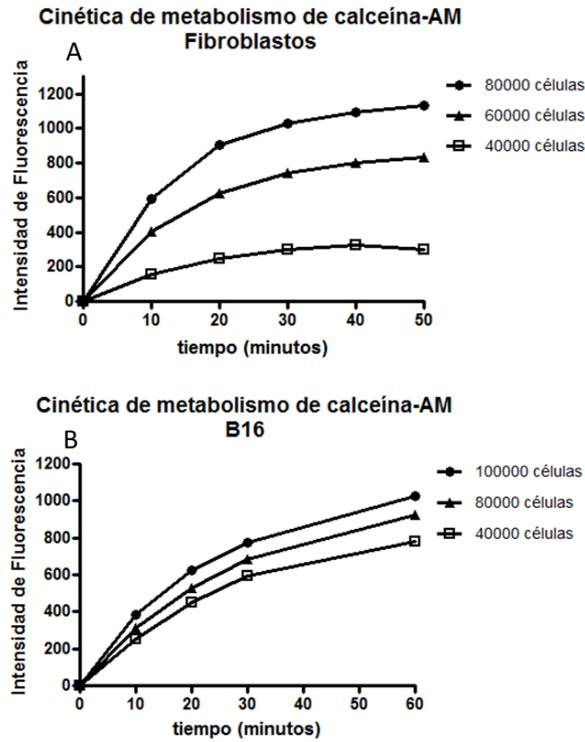
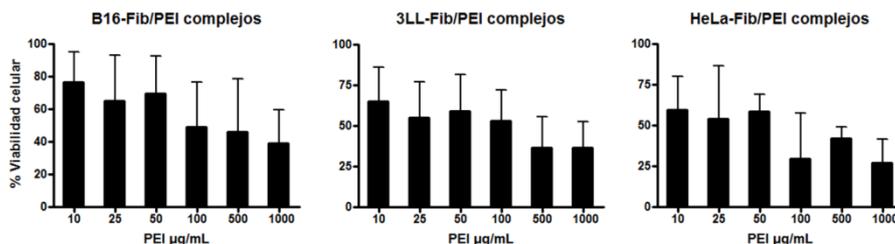


Figura 13. Cinética de metabolismo de calceína-AM. Intensidad de fluorescencia a diferentes tiempos tras añadir calceína-AM a Fibroblastos (A) y células B16 (B). Las células se resuspendieron en PBS y se les añadió calceína-AM. A continuación se midió la intensidad de fluorescencia a varios tiempos para establecer el tiempo adecuado de medición de fluorescencia en los ensayos de viabilidad.

En las gráficas de la figura 14 vemos representado el porcentaje de viabilidad celular de las diferentes células tumorales junto con los fibroblastos frente a diferentes concentraciones de PEI.



*Figura 14. Efecto del PEI sobre la viabilidad celular de los complejos.* Las células se resuspendieron en HEPES 25mM. Las células tumorales se incubaron 15 minutos en presencia de diferentes concentraciones de PEI. Transcurrido el tiempo se añadieron los fibroblastos y se incubó otros 15 minutos. A continuación se añadió calceina-AM y se midió la intensidad de fluorescencia a los 40 minutos. (n=5).

Podemos ver cómo va disminuyendo la viabilidad celular conforme vamos aumentando la concentración de PEI hasta llegar a la concentración de  $100\mu\text{g/mL}$ . La concentración más tóxica de PEI se encuentra por encima de  $100\mu\text{g/mL}$  para todos los complejos celulares con aproximadamente un 40% de células viables para los complejos B16-Fib/PEI, un 37% para los complejos 3LL-Fib/PEI y alrededor del 27% para los complejos HeLa-Fib/PEI. A los 40 minutos no parece haber grandes diferencias de toxicidad entre esta dosis y dosis superiores. Los complejos formados por fibroblastos y HeLa parecen ser algo más sensibles a concentraciones de PEI superiores a  $100\mu\text{g/mL}$ , llegando a caer el porcentaje de células viables hasta el 50% con la dosis de PEI de  $1000\mu\text{g/mL}$ .

### 1.3.-Expresión de citoquinas en los complejos

Tras caracterizar los complejos desde el punto de vista de composición, estructura y viabilidad y establecer una concentración de plásmido adecuada para conseguir una buena eficacia de transfección nos dispusimos a evaluar la expresión de las citoquinas en los fibroblastos que forman parte de los complejos.

En primer lugar se determinó la cantidad de mGM-CSF producida por fibroblastos transfectados con dos plásmidos que poseen construcciones génicas distintas, p2F mIL-12/mGM-CSF (plásmido bicistrónico que posee dos promotores distintos) y pMok mGM-CSF (con el potente promotor del citomegalovirus). Además, en las células transfectadas con el primer plásmido, también se cuantificó la producción de mIL-12. Tras la transfección de los fibroblastos se recogió el medio de cultivo cada 24h durante 5 días para posteriormente determinar mediante ELISA la cantidad de cada citoquina. Cada muestra proviene de un promedio de dos pocillos y los resultados mostrados son el promedio de 3 ensayos (n=3).

La producción de IL-12 y GM-CSF por parte de fibroblastos transfectados con p2F mIL-12/mGM-CSF y pMok mGM-CSF se recoge en las gráficas de la figura 15. Los datos de cada gráfica representan la producción de proteína/10<sup>6</sup> células para cada plásmido. Vemos que la producción de GM-CSF es mayor en los fibroblastos transfectados con el plásmido pMok mGM-CSF que en los transfectados con p2F mIL-12/mGM-CSF. Además podemos ver como la producción de IL-12 es menor que la de GM-CSF. Por último, observamos cómo la producción de las citoquinas va cayendo a lo largo del tiempo.

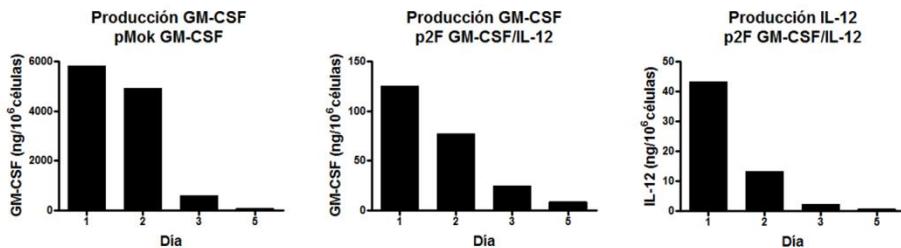


Figura 15. Producción de citoquinas en fibroblastos transfectados a lo largo del tiempo. Se transfectaron fibroblastos con los plásmidos pMok mGM-CSF (A) o p2F mIL-12/mGM-CSF (B y C) en frascos de 75cm<sup>2</sup> y se recogió el medio de cultivo cada 24 horas durante 5 días. La producción de proteína se determinó mediante ELISA. (n=3)

En las gráficas de la figura 16 se representa la producción de IL-12 y GM-CSF por parte de los fibroblastos transfectados con los diferentes plásmidos ensayados, pero en este caso transcurridas 2 horas tras la transfección, se despegan los fibroblastos del frasco y se cuentan para sembrarlos en pocillos de una placa de 24 para tratarlos de la siguiente manera: 1) fibroblastos (control), 2) fibroblastos + B16 (control), 3) fibroblastos + B16 + PEI 25µg/mL, 4) fibroblastos + B16 + PEI 50µg/mL.

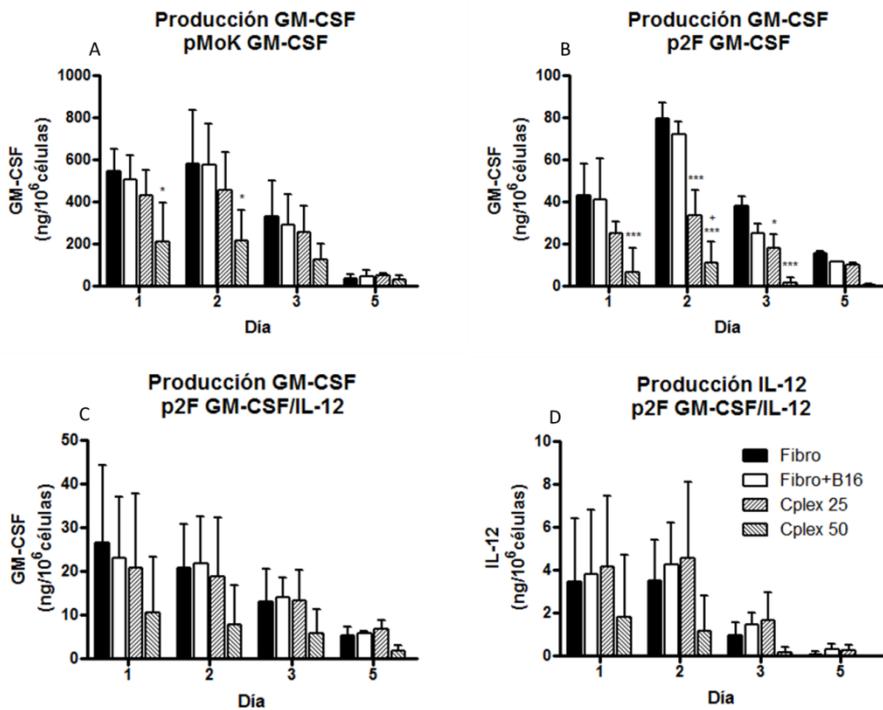


Figura 16. Producción de citoquinas a lo largo del tiempo por fibroblastos transfectados y tratados para formar complejos. Fibroblastos sembrados en un frasco de 75cm<sup>2</sup> fueron transfectados con el plásmido pMok mGM-CSF (A) o el p2F mL-12/mGM-CSF (B-D) y se despegaron a las 2 horas para tratarlos de la siguiente manera: fibroblastos transfectados, como control (Fibro); fibroblastos transfectados + B16, también como control, (Fibro+B16); fibroblastos transfectados+B16+PEI 25µg/mL (Cplex 25) y fibroblastos transfectados+B16+PEI 50µg/mL (Cplex 50). Se recogió el medio de cultivo cada 24 horas durante 5 días para después cuantificar mediante ELISA la producción de citoquina (n=3). Significación estadística respecto a Fibro: \* p<0,05, \*\*

$p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . Significación estadística entre Cplex25 y Cplex 50: +  $p < 0,05$ . (N=5).

La producción de GM-CSF por fibroblastos transfectados con pMok mGM-CSF se representa en la gráfica de la figura 16A. Vemos que no hay diferencia significativa entre los tratados con PEI 25 $\mu$ g/mL y los controles, mientras que cuando los tratamos con PEI 50 $\mu$ g/mL se produce una caída significativa los dos primeros días ( $p < 0,05$ ) en la producción de la citoquina. La producción de GM-CSF por parte de los fibroblastos transfectados con p2F mGM-CSF y p2F mIL-12/mGM-CSF se representa en las gráficas de la figura 16B y 16C, respectivamente. En estas gráficas vemos que ocurre lo mismo que en la anterior pero con una producción de GM-CSF menor desde el primer día. En la gráfica 16B podemos ver cómo hay una disminución significativa de la producción de GM-CSF con respecto al grupo Fibro en el grupo Cplex 25 los días 2 ( $p < 0,001$ ) y 3 ( $p < 0,05$ ) y en el grupo Cplex 50 los días 1, 2 y 3 ( $p < 0,001$ ). Además el día 3 el grupo de Cplex 50 la producción de citoquina es significativamente menor ( $p < 0,5$ ) que el Cplex 25.

En la gráfica 16C observamos que cuando se transfecta con p2F mIL-12/mGM-CSF la producción de GM-CSF se reduce entorno a la mitad con respecto a cuando se transfecta con p2F mGM-CSF.

La producción de IL-12 por fibroblastos transfectados con el plásmido p2F mIL-12/mGM-CSF se representa en la gráfica de la figura 16D. Con la producción de IL-12 ocurre lo mismo que en la gráfica anterior pero en este caso la producción de citoquina es mucho menor en todos los grupos en comparación a la producción de GM-CSF.

Tras determinar mediante ELISA la producción de GM-CSF e IL-12 por parte de los fibroblastos en presencia de B16 y diferentes concentraciones de PEI para formar complejos, confirmamos que la concentración de PEI a partir de la cual empieza a ver una pérdida considerable de viabilidad celular con respecto al control es 50 $\mu$ g/mL ya que a esta concentración se observa una notable caída de la producción de citoquinas, mientras que a la concentración de 25 $\mu$ g/mL la caída es prácticamente nula.

Además vemos cómo conseguimos una expresión mantenida de GM-CSF tras los dos primeros días de la transfección de los fibroblastos y posterior formación de complejos con B16 y PEI. A partir del tercer día, la producción va cayendo hasta que el quinto día es prácticamente nula.

La producción de GM-CSF es mucho mayor cuando transfectamos con el plásmido pMok mGM-CSF que cuando transfectamos con p2F mL-12/mGM-CSF. La producción de IL-12 tras transfectar con el plásmido p2F mL-12/mGM-CSF es menor que la de GM-CSF.

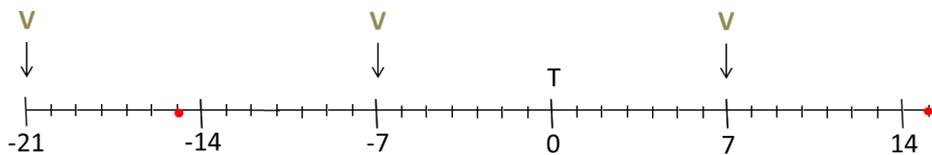
## **2.- VACUNACIÓN PREVENTIVA COMPLEJOS CELULARES VS. CÉLULAS TUMORALES LIBRES**

Nos propusimos evaluar la eficacia antitumoral de los complejos celulares B16-Fib/PEI desarrollados y compararla con la de las células tumorales libres en un modelo de vacunación preventiva frente a melanoma murino. Las concentraciones de PEI elegidas para formar los complejos entre células B16 y fibroblastos fueron 25 y 50 $\mu$ g/mL. A pesar de que esta última concentración había mostrado peores resultados de producción de citoquina *in vitro*, mantuvimos este grupo de vacunación para confirmar si *in vivo* el resultado era equivalente. Las células B16 (en el modelo de células tumorales libres) o los fibroblastos (en el modelo de complejos) fueron transfectados con dos plásmidos conteniendo el gen de GM-CSF, uno alto expresador (pMok) y otro bajo expresador (p2F). Las células B16 transfectadas se incubaron 24h tras su transfección y se despegaron de sus frascos de cultivo para irradiarlas a 150Gy y posteriormente fueron almacenadas a -80°C hasta su uso como vacuna. El día de la vacunación, las células irradiadas y transfectadas fueron descongeladas y resuspendidas en DMEM sin suplementar.

Para la formación de los complejos utilizados como vacuna se transfectaron los fibroblastos y a las 2h de la transfección se formaron los complejos entre éstos y células B16 irradiadas. Se incuban 24h los complejos y se preparan para ser utilizados como vacuna.

En ambos casos, tras las 24h de incubación se recoge el medio de cultivo para mediante ELISA determinar la producción de GM-CSF.

Los animales utilizados fueron ratones C57BL/6. El diseño experimental de ésta vacunación fue el siguiente: el día 0 se inyecta subcutáneamente en la pata izquierda de los animales  $10^5$  células B16 salvajes, los días -21, -7 y 7 con respecto a la inyección del tumor se administran las dosis de vacuna y los días -15 y 15 se tomaron las muestras de sangre por punción de la vena safena. Las dosis de células utilizadas como vacuna fueron de  $2 \times 10^5$  células B16 o  $2 \times 10^5$  B16 +  $2 \times 10^5$  fibroblastos según fuese el modelo de células libres o complejos. Los grupos de animales que se incluyeron en este estudio fueron: a) B16 p2F, vacunados con células B16 transfectadas con p2F GM-CSF; b) B16 pMok, vacunados con células B16 transfectadas con pMok GM-CSF; c) Cplex25 p2F, vacunados con complejos celulares formados con PEI  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  y con fibroblastos transfectados con p2F GM-CSF y; d) Cplex50 p2F, vacunados con complejos celulares formados con PEI  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  y con fibroblastos transfectados con p2F GM-CSF ; e) Cplex25 pMok, vacunados con complejos celulares formados con PEI  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  y con fibroblastos transfectados con pMok GM-CSF; f) Cplex50 pMok, vacunados con complejos celulares formados con PEI  $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  y con fibroblastos transfectados con pMok GM-CSF y g) Control, al que se inyectaron sólo  $200 \mu\text{l}$  DMEM en cada dosis de vacunación. El esquema de esta vacunación es el siguiente:



En el esquema, V representa dosis de vacuna, T representa la implantación del tumor y el punto rojo representa toma de sangre. Cada una de las líneas verticales representa un día.

## 2.1- Crecimiento del tumor

Tras la implantación del tumor se monitorizó visualmente el desarrollo del tumor y una vez se hizo visible, se midieron el diámetro mayor y el menor de éste con un pie de rey para calcular el volumen tumoral con la fórmula  $V_t = (\text{diámetro menor}^2 \times \text{diámetro mayor}) / 2$ . En la figura 17 se muestran los resultados del volumen tumoral de cada uno de los grupos vacunados. Los tumores comenzaron a ser visibles en el grupo control el día 11 tras la implantación del tumor.

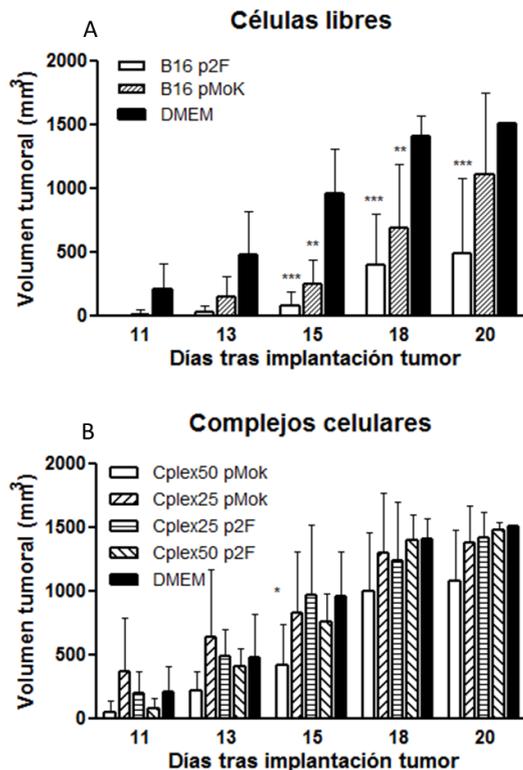


Figura 17. Volumen tumoral en ratones vacunados con células libres (A) y complejos celulares (B). El volumen tumoral fue calculado como se describe en la sección de material y métodos. Los grupos representados son: B16 p2F, vacunado con B16 transfectadas con p2F GM-CSF; B16 pMok, vacunado con células B16 transfectadas con pMok GM-CSF; Cplex25 p2F, vacunado con complejos celulares 25µg/mL PEI transfectados con p2F GM-CSF; Cplex50 p2F,

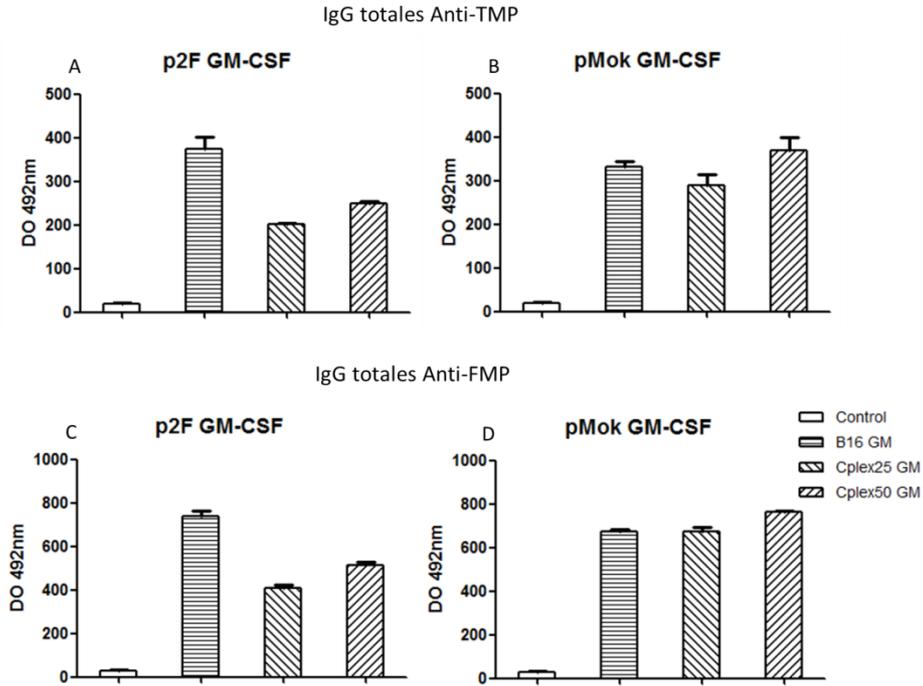
vacunado con complejos celulares 50µg/mL PEI transfectados con p2F GM-CSF; Cplex25 pMok, vacunado con complejos celulares 25µg/mL PEI transfectados con pMok GM-CSF; Cplex50 pMok, vacunado con complejos celulares 50µg/mL PEI transfectados con pMok GM-CSF; y DMEM, solo se le administró DMEM. Significación estadística con respecto al grupo control (DMEM): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (N=5).

En la gráfica 17A se representan los resultados de volumen tumoral en los grupos vacunados con células libres. En esta gráfica podemos ver como el grupo que mejor resultado obtuvo, consiguiendo un mayor retraso del crecimiento tumoral fue el vacunado con B16 transfectadas con el plásmido bajo expresador de GM-CSF (p2F GM-CSF), logrando una inhibición del crecimiento del 92% ( $p \leq 0.01$ ), 71% ( $p \leq 0.001$ ) y 67% ( $p \leq 0.01$ ) respecto al grupo control (DMEM) en los días 15, 18 y 20, respectivamente. El grupo vacunado con células B16 transfectadas con el plásmido alto expresador de GM-CSF (pMok GM-CSF) alcanzó el 70% y 51% de retraso de crecimiento tumoral respecto el grupo control el día 15 ( $p \leq 0,05$ ) y 18 ( $p \leq 0,05$ ) respectivamente. La figura 17B muestra los resultados de volumen tumoral en los grupos vacunados con complejos celulares Fib-B16/PEI. El grupo de animales vacunado con complejos celulares compuestos por B16 y fibroblastos transfectados con pMok GM-CSF y PEI 50µg/mL alcanzó una inhibición del crecimiento tumoral de 56% ( $p \leq 0,05$ ), 28% y 28% respecto el grupo control los días 15, 18 y 20, respectivamente. El resto de grupos vacunados con complejos celulares no lograron ningún retraso significativo del crecimiento tumoral.

## **2.2.- Respuesta inmune antitumoral: Producción de IgG específicas frente a TMP y FMP**

Se determinó mediante ELISA la producción de IgG totales y subtipos (IgG1 e IgG2a) específicas frente a proteínas de membrana tumoral (TMP) y específicas frente a proteínas de membrana de fibroblastos (FMP) en sangre de

los animales vacunados. La figura 18 muestra las gráficas de los resultados obtenidos de producción de IgG totales frente a TMP y FMP. La producción de IgG totales frente a TMP y FMP fue siempre mayor a los 15 días tras la implantación del tumor que en el día -15. Como era de esperar, la producción de IgG en todos los casos fue mayor en los grupos vacunados que en el grupo control (mezcla de la sangre de los diferentes grupos obtenida el día -15). Las gráficas de la izquierda de la figura muestran la producción de IgG totales en animales vacunados con células B16 o con complejos celulares Fib-B16/PEI transfectados con el plásmido bajo expresador de GM-CSF (p2F GM-CSF). En éstas figuras, la máxima producción de IgG anti-TMP y anti-FMP fue alcanzada por el grupo vacunado con células B16 libres. La producción de IgG anti-TMP y anti-FMP en los grupos vacunados con complejos celulares empleando 25 o 50µg/mL de PEI fue muy similar. Las gráficas de la derecha de la figura representan las IgG frente a TMP y FMP en animales vacunados con células B16 libres o complejos celulares con el plásmido alto expresador de GM-CSF (pMok GM-CSF). En este caso tanto los grupos vacunados con complejos celulares como con células B16 libres produjeron la misma cantidad de IgG totales anti-TMP y la misma cantidad de IgG totales anti-FMP.



*Figura 18. Producción de IgG totales específicas anti-TMP y anti-FMP.* Las figuras A y C muestran la producción de IgG totales específicas frente a proteínas de membrana tumoral de las células B16 (TMP) y frente a proteínas de membrana de fibroblastos (FMP), respectivamente, de los grupos tratados con células transfectadas con el plásmido p2F GM-CSF. Las figuras B y D, muestran los resultados análogos de los grupos tratados con células transfectadas con el plásmido pMok GM-CSF. Los ratones fueron vacunados los días -21, -7 y 7 con respecto a la implantación del tumor ( $10^5$  células B16), y se tomaron muestras de sangre los días -15 y 15, como se describe en la sección de material y métodos. Los grupos representados en la figura son los resultados de medidas de IgG totales en el día 15 de los ratones vacunados con: B16 GM, células B16 transfectadas con el gen GM-CSF; Cplex25 GM, complejos celulares 25 $\mu$ g/mL PEI transfectados con el gen GM-CSF; Cplex50 GM, complejos celulares 50 $\mu$ g/mL PEI transfectados con el gen GM-CSF; Control, mezcla de sangre de los diferentes grupos obtenida el día -15. Todos los grupos alcanzaron una diferencia estadística significativa de  $p < 0,001$  respecto al control.

La producción de IgG1 e IgG2a específicas frente a TMP y FMP se representa en las figuras 19 y 20 respectivamente. Los resultados que se muestran en

ambas figuras son muy similares, aunque la producción de IgG2a es mucho menor a la de IgG1 en valores netos de densidad óptica. Las diferencias observadas en la producción de IgG1 e IgG2a anti-TMP y anti-FMP entre todos los grupos de animales es muy similar a la observada con la producción de IgG totales. En todas las gráficas de las figuras 18, 19 y 20 todos los grupos vacunados alcanzaron diferencias significativas, respecto al control, en la producción de IgG.

La producción de IgG totales y subtipos anti-TMP y anti-FMP en ningún caso fue mayor en los grupos de animales vacunados con complejos celulares que en el grupo vacunado con células B16 libres. Las unidades de DO 492 son relativas y por esta razón los niveles de una gráfica no pueden ser comparados con las de otra gráfica.

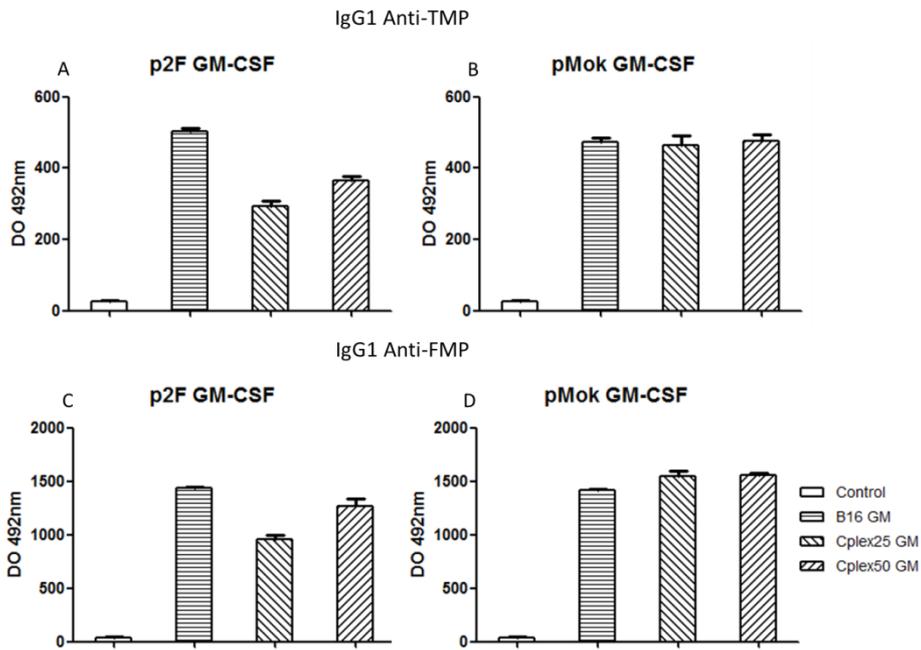
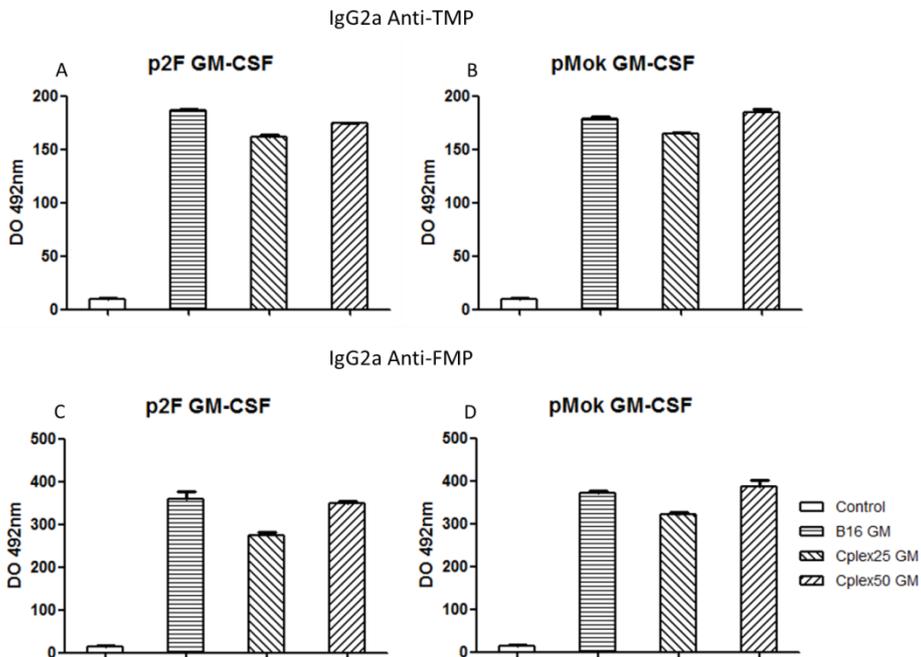


Figura 19. Producción de subtipos de IgG1 específicas anti-TMP y anti-FMP. Las figuras A y C muestran la producción de IgG1 específicas frente a proteínas de membrana tumoral de las células B16 (TMP) y frente a proteínas de membrana de fibroblastos (FMP), respectivamente, de los grupos tratados con células transfectadas con el plásmido p2F GM-CSF. Las figuras B y D, muestran los

resultados análogos de los grupos tratados con células transfectadas con el plásmido pMok. Los ratones fueron vacunados los días -21, -7 y 7 con respecto a la implantación del tumor ( $10^5$  células B16), y se tomaron muestras de sangre los días -15 y 15, como se describe en la sección de material y métodos. Los grupos representados en la figura se han descrito en la figura 18. Todos los grupos alcanzaron una diferencia estadística significativa de  $p < 0,001$  respecto al control.



*Figura 20. Producción de subtipos de IgG2a específicas anti-TMP y anti-FMP.* Las figuras A y C muestran la producción de IgG2a específicas frente a proteínas de membrana tumoral de las células B16 (TMP) y frente a proteínas de membrana de fibroblastos (FMP), respectivamente, de los grupos tratados con células transfectadas con el plásmido p2F GM-CSF. Las figuras B y D, muestran los resultados análogos de los grupos tratados con células transfectadas con el plásmido pMok. Los ratones fueron vacunados los días -21, -7 y 7 con respecto a la implantación del tumor ( $10^5$  células B16), y se tomaron muestras de sangre los días -15 y 15, como se describe en la sección de material y métodos. Los grupos representados en la figura se han descrito en la figura 18. Todos los

grupos alcanzaron una diferencia estadística significativa de  $p < 0,001$  respecto al control.

Para comprobar que las IgG anti-TMP y anti-FMP presentes en las muestras de sangre analizadas eran capaces de unirse a células tumorales o fibroblastos, diseñamos un experimento en el que se incubaron las células B16 o fibroblastos en presencia de suero sanguíneo del día 15 de cada uno de los grupos de ratones vacunados y un anticuerpo anti-IgG1 de ratón marcado con un fluorocromo (Alexa fluor 488). Posteriormente las células se pasaron por el citómetro de flujo para analizar el porcentaje a las que se les habían unido IgG anti-TMP o anti-FMP. Los resultados de esta prueba se muestran en la figura 21.

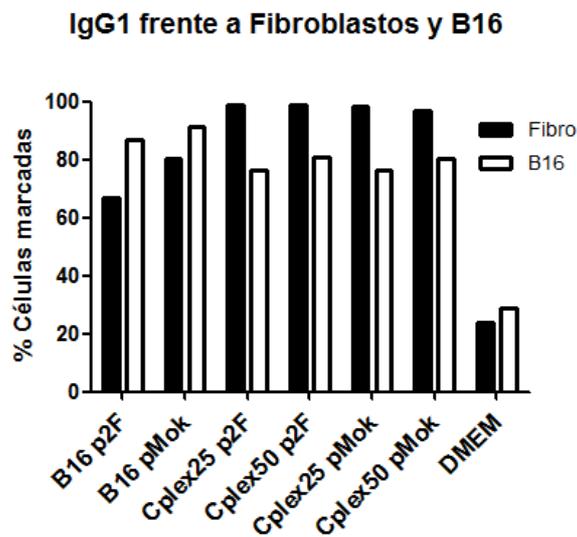


Figura 21. Presencia en plasma de IgG1 frente a fibroblastos o B16 en suero de ratones vacunados. La gráfica representa la cantidad de células B16 o fibroblastos marcadas tras incubación con suero sanguíneo procedente del día 15 de cada uno de los grupos vacunados y un anticuerpo anti-IgG1 de ratón. Los grupos representados han sido definidos en la figura 17.

Se observa cómo hay mayor porcentaje de B16 marcadas en las muestras que se incubaron con sueros de ratones vacunados con células B16 libres, mientras que por el contrario observamos mayor porcentaje de fibroblastos marcados en las muestras que se incubaron con sueros procedentes de ratones vacunados con complejos celulares. Como era de esperar el grupo que menos porcentaje de células B16 y fibroblastos marcados obtuvo fue el que se incubó con suero procedente de ratones a los que solo se les administró DMEM.

### **2.3.- Supervivencia de los animales vacunados**

Además de realizar el seguimiento del crecimiento del tumor, también se monitorizó la supervivencia de los animales vacunados y se realizaron curvas de supervivencia (figura 22). Los animales eran eutanizados cuando los tumores alcanzaban los 1500mm<sup>3</sup>.

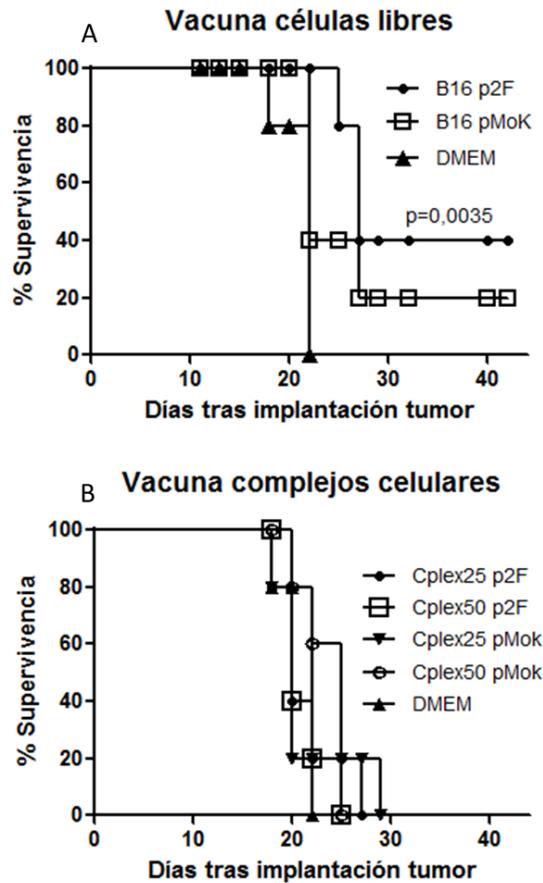


Figura 22. Supervivencia animales vacunados con células libres y complejos celulares. Las gráficas representan la supervivencia de los grupos de animales definidos en la figura 17. Se realizó el análisis estadístico mediante el test de Kaplan-Meier log-rank.

En la figura 22A se representan las curvas de supervivencia de los animales vacunados con células B16 libres. El grupo de ratones vacunado con células B16 transfectadas con el plásmido bajo expresador de GM-CSF alcanzó un 40% de supervivencia total ( $p < 0,005$ , respecto al grupo Control), mientras que el grupo vacunado con el plásmido alto expresador de GM-CSF alcanzó un 20% de supervivencia total. Los resultados de supervivencia de los animales fueron consistentes con los del crecimiento tumoral. La figura 22B representa la supervivencia de los grupos de animales vacunados con complejos celulares. Ninguno de los grupos de animales vacunados con complejos celulares

lograron sobrevivir pero todos los grupos vacunados consiguieron alargar la supervivencia con respecto al grupo control.

### **3.- SILENCIAMIENTO GÉNICO DE MOLÉCULAS INMUNOSUPRESORAS: ASO VS. PPRH**

El silenciamiento génico de las moléculas inmunosupresoras CTLA4 y Foxp3 es otro de los objetivos de esta tesis, ya que se espera que el silenciamiento de moléculas implicadas en la regulación negativa de la respuesta inmune antitumoral debe incrementar la eficacia de la vacuna terapéutica antitumoral. En vista del incremento de respuesta antitumoral descrito en la bibliografía utilizando anticuerpos para bloquear la molécula de superficie CD25 (receptor de IL2), nos propusimos evaluar también el silenciamiento génico de CD25 como alternativa al uso de anticuerpos. Para ello se evaluó y comparó la eficacia de silenciamiento génico de dos herramientas diferentes: los ASO modificados (2-OMe-fosforotioato) y los PPRH.

#### **3.1.- Evaluación de la entrada de ASO y PPRH a la célula**

Antes de testar la eficacia de silenciamiento *in vitro* de los ASO y PPRH que diseñamos para los genes CTLA4, Foxp3 y CD25 nos propusimos comprobar que estos oligonucleótidos, que utilizaríamos para el silenciamiento, eran realmente capaces de entrar en la célula sin ayuda de vectores y qué concentraciones eran necesarias para conseguir su entrada. Para ello diseñamos un ASO y PPRH modelos de tamaño promedio a los que posteriormente se utilizarían para el silenciamiento, marcados con el fluoróforo FAM. Para comprobar la entrada en la célula de estos ASO y PPRH modelos se incubaron linfocitos de ratón extraídos de sangre periférica o células EL4 de linfoma murino en presencia de diferentes concentraciones de dichos ASO y PPRH durante 24h. Tras la incubación, las células se llevaron al citómetro de flujo para analizar la población de células marcadas. Los resultados de este experimento se recogen en la figura 23. En esta gráfica podemos ver que las

células EL4 requieren aproximadamente hasta 100 veces menos concentración de ASO para alcanzar el mismo porcentaje de células marcadas que en los linfocitos. Observamos también que el porcentaje de células positivas para PPRH-FAM es de 2 a 3 veces mayor en las EL4 que en los linfocitos. También podemos observar que se necesita mucha más concentración de PPRH que de ASO para alcanzar un mismo porcentaje de células marcadas, unas 200 veces más en las células EL4 y unas 10 veces más en los linfocitos. El mayor porcentaje de células EL4 ASO-FAM positivas se observa a 500nM y el de EL4 PPRH-FAM positivas a 100 $\mu$ M. Por su parte, en los linfocitos se alcanza el 60% de ASO-FAM positivos a una concentración de ASO-FAM de 10 $\mu$ M y el 65% de PPRH-FAM positivos a una concentración de PPRH-FAM de 100 $\mu$ M.

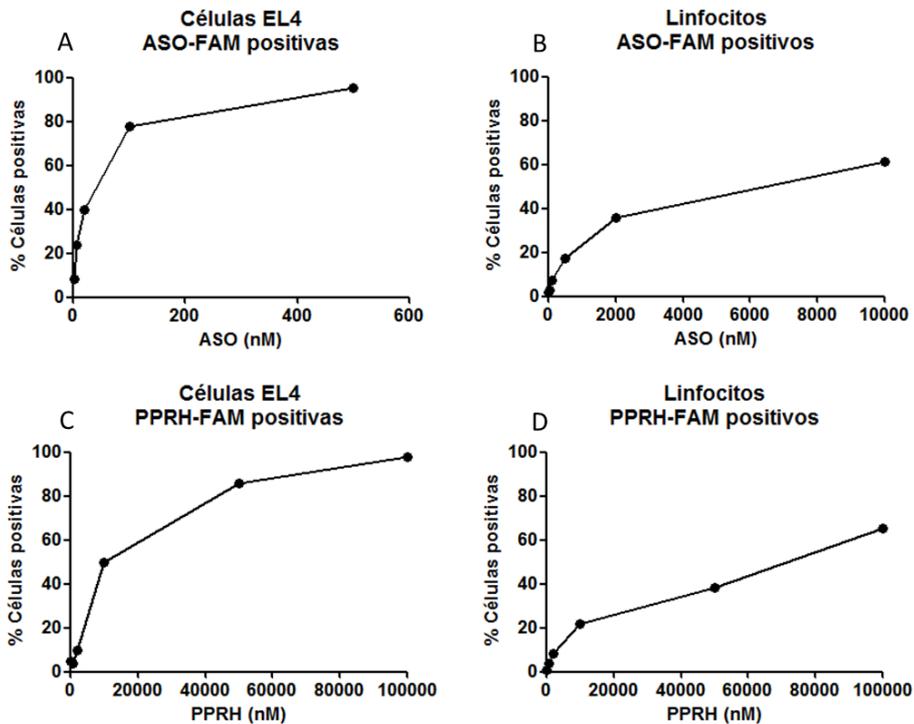


Figura 23. Identificación de células EL4 y linfocitos ASO-FAM y PPRH-FAM positivos. Células EL4 y linfocitos de ratón extraídos de sangre periférica se incubaron en presencia de diferentes concentraciones de ASO-FAM (A-B) y PPRH-FAM (C-D) durante 24h. Transcurrido el tiempo se analizaron mediante el

citómetro de flujo. En las gráficas se representa el porcentaje de células positivas para ASO-FAM y PPRH-FAM.

Para comprobar si las células ASO-FAM y PPRH-FAM contenían los ASO o PPRH en su interior se analizaron muestras con el citómetro de flujo AMNIS, el cual permite tomar imágenes de las diferentes poblaciones celulares de la muestra y además posee una herramienta que permite identificar si el marcaje se encuentra en el interior de la célula o adherido a la membrana. En la figura 24 se observa una imagen representativa de células EL4 marcadas con FAM.

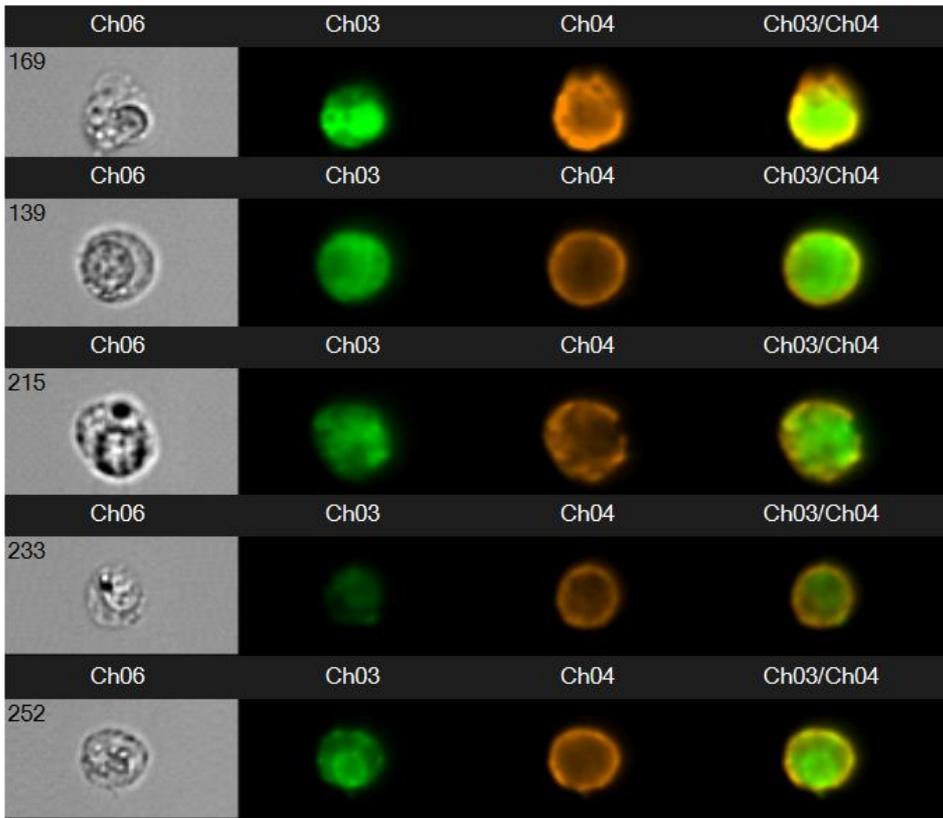


Figura 24. Presencia intracelular de ASO y PPRH en células EL4. Imagen tomada con el citómetro de flujo AMNIS en la que vemos como los ASO-FAM y PPRH-FAM (verdes) se encuentran dentro de la célula. Células EL4 fueron incubadas con ASO-FAM y PPRH-FAM (verde) y con anti-CD45 (naranja). El primer canal (Ch06) muestra la imagen en campo claro, el segundo canal (Ch03) fluorescencia verde, el tercer canal (Ch04) fluorescencia naranja y el último

canal (Ch03/Ch04) la superposición del canal verde y el naranja. Las tres primeras filas de imágenes corresponden a ASO-FAM y las dos últimas a PPRH-FAM.

En esta figura podemos ver como la fluorescencia verde (ASO-FAM o PPRH-FAM) se encuentra en el interior de la célula mientras que en naranja vemos la membrana celular (anti-CD45 Alexa fluor 677). Además el algoritmo para el cálculo de porcentaje de internalización de ASO-FAM y PPRH-FAM indica que la entrada es de un 95-99%. De este modo comprobamos que los ASO y los PPRH estaban entrando dentro de la célula. Quedaba ahora por determinar si los ASO y PPRH diseñados son capaces de, una vez allí, silenciar la expresión de los genes CTLA4, Foxp3 y CD25.

### **3.2.- Silenciamiento *in vitro* de los genes CTLA4, Foxp3 y CD25: ASO VS. PPRH**

Una vez comprobado que los ASO y los PPRH eran capaces de entrar en la célula sin ayuda de vectores, quisimos comparar la eficacia de silenciamiento de ASO y PPRH frente a los genes CTLA4, CD25 y Foxp3 de ratón. Para ello diseñamos 4 ASO y 4 PPRH que se unían a las mismas secuencias de ADN o ARN de los genes CTLA4, CD25 y Foxp3. Se diseñaron dos ASO y dos PPRH para regiones exónicas y otros dos ASO y dos PPRH para regiones intrónicas frente a los genes CTLA4, CD25 y Foxp3. La secuencia de cada uno de estos ASO y PPRH se detalla en el apartado de material y métodos. La eficacia de silenciamiento *in vitro* de estos ASO y PPRH se evaluó en la línea celular EL4. Las células se incubaron en presencia de ASO 100nM o 1µM y de PPRH 50µM durante 2h y posteriormente se añadía medio de cultivo y se dejaban incubar otras 24h o 48h para posteriormente extraer el ARN de las células y cuantificar el número de copias del ARNm de los genes CTLA4, Foxp3 y CD25. Como controles se utilizó el ARNm de células sin ningún ASO ni PPRH y el ARNm de células incubadas en presencia de un ASO o un PPRH modelo que no se unían a estos genes (resultados no mostrados).

Se calcularon los porcentajes de inhibición de la expresión de ARNm de cada uno de los ASO y PPRH considerando el ARNm de las células sin tratar como el valor de referencia. Los resultados de inhibición de expresión de estos genes se representan en la figura 25. En las gráficas de la izquierda (figura 25A, C y E) vemos representado el % de inhibición de ARNm cuando se utiliza ASO para el silenciamiento y en las gráficas de la derecha (figura 25B, D y F) el efecto del silenciamiento con PPRH. Podemos ver cómo cuando se utiliza ASO los mejores resultados se consiguen a la concentración de  $1\mu\text{M}$  y se extrae el ARNm a las 48h. En la gráfica 25A se recogen los datos de inhibición de expresión de ARNm de CTLA4 utilizando ASO. En este gráfico observamos cómo el ASO que mejor resultados de silenciamiento logra es el ASO 2, inhibiendo la expresión del ARNm de CTLA4 al 52%. El resto de ASOs alcanzan un porcentaje de inhibición de ARNm de CTLA4 de entre el 17 y el 33%. En la figura 25C vemos representado los resultados de silenciamiento obtenidos con ASO frente al gen Foxp3. En este caso podemos ver cómo el ASO 4 consigue los mejores resultados, obteniendo un 50% de inhibición de expresión de ARNm de Foxp3. El resto de ASOs tan solo consiguen inhibir la expresión de ARNm de Foxp3 entre un 16% y un 31%. La gráfica E de la figura 25 muestra los resultados de silenciamiento del gen CD25. En este caso ninguno de los ASO probados fue capaz de alcanzar una inhibición de expresión de ARNm al 50%. Cuando las células se incubaron 24h en presencia de ASO a  $100\text{nM}$  el mayor silenciamiento lo consiguió el ASO 5 con un 38% de inhibición de expresión de ARNm de CD25, mientras que cuando se incubaron 48h con  $1\mu\text{M}$  el mejor ASO resultó ser el ASO 8 con un 30% de inhibición. Las gráficas B, D y F de la figura 25 recogen los datos del silenciamiento con PPRH incubando las células con una concentración de PPRH de  $50\mu\text{M}$  y extrayendo el ARNm a las 48h. En la gráfica B se representa los resultados de silenciamiento para el gen CTLA4. En ella podemos ver cómo de los 4 PPRHs ensayados sólo el PPRH 2 consiguió una pequeña inhibición del porcentaje de expresión de ARNm, de un 4%. Los datos del silenciamiento de Foxp3 se representan en la gráfica D. En ella podemos ver cómo únicamente el PPRH 3 fue capaz de silenciar el gen Foxp3 consiguiendo un 13% de

inhibición. Para el silenciamiento de CD25 (figura 25F) dos PPRH consiguieron inhibiciones de la expresión de ARNm detectables, el PPRH 7 y el 12 con un porcentaje de inhibición de expresión del ARNm del 22 y el 3%, respectivamente.

### Eficacia del silenciamiento génico in vitro

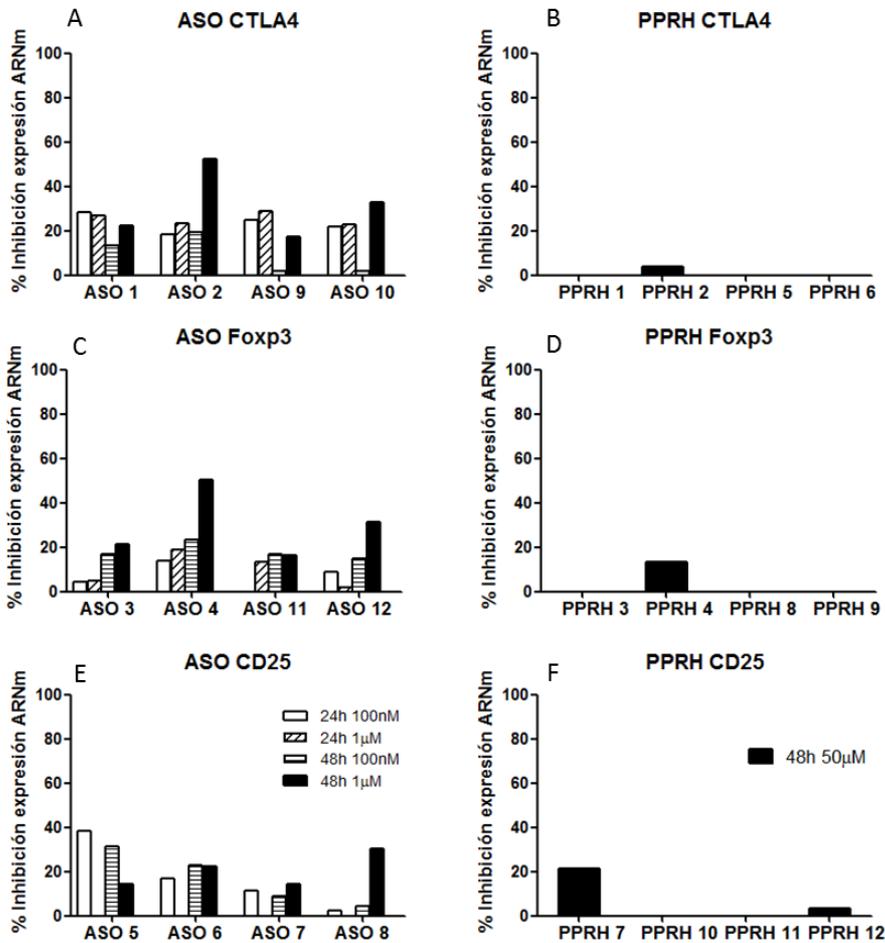


Figura 25. Silenciamiento in vitro de CTLA4, Foxp3 y CD25. Las células EL4 fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de ASO o PPRH frente a los genes CLA4, Foxp3 y CD25 durante 1h y la extracción del ARN se hizo a las 24h o 48h. Las gráficas muestran el porcentaje de inhibición de ARNm de cada gen con respecto al grupo control (sin ningún ASO ni PPRH). (N=2) Entre los dos experimentos no hubo dispersión apreciable en las figuras.

Los datos de estas figuras evidencian que concentraciones mucho mayores de PPRH que de ASO son necesarias para conseguir silenciar un gen y además la eficacia del silenciamiento de los ASO es mayor que la de los PPRH, al menos para los genes CTLA4, Foxp3 y CD25. Teniendo en cuenta los resultados del silenciamiento *in vitro* decidimos descartar los ASO y PPRH frente a CD25 en el experimento *in vivo* ya que no disponíamos de herramientas suficientemente potentes para su silenciamiento (<40% de inhibición de ARNm).

### **3.3- Toxicidad celular de los ASO y PPRH**

Paralelamente al estudio de eficacia de silenciamiento *in vitro* de ASO y PPRH quisimos evaluar la toxicidad celular provocada por éstos. Para ello se incubaron células EL4 en presencia de ASO o PPRH en las mismas condiciones que se utilizaron para el silenciamiento *in vitro*. Transcurridas 24h o 48h desde la incubación con ASO y PPRH se añadía calceína-AM y se determinaba la viabilidad celular mediante la prueba de metabolización de ésteres de calceína. En la figura 26 se recogen los resultados de este experimento.

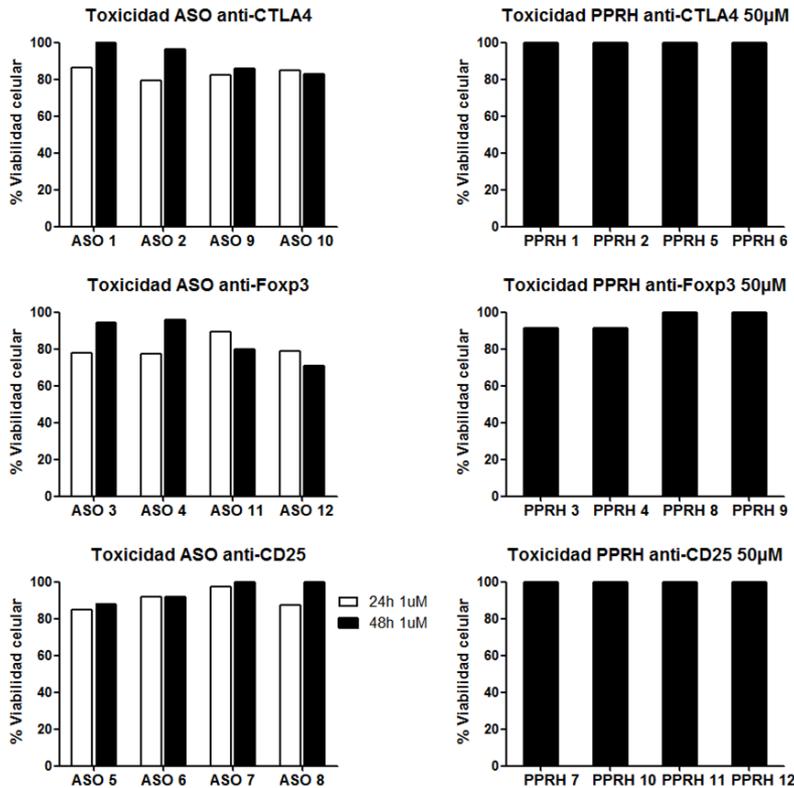


Figura 26. Citotoxicidad ASO y PPRH. Las células EL4 fueron incubadas durante 24 ó 48h en presencia de ASO anti-CTLA4, ASO anti-Foxp3 o ASO anti-CD25 (1µM) o durante 24h en presencia de PPRH (50µM). Transcurrido el tiempo de incubación se añadió calceína-AM y se midió la fluorescencia a los 40min. Las gráficas representan los porcentajes de viabilidad de las células incubadas con cada uno de los ASO y PPRH (n=2). Entre los dos experimentos no hubo dispersión apreciable en las figuras.

En la gráfica 26A se representa el porcentaje de viabilidad celular de cada grupo tratado con ASO y en la gráfica 26B de los tratados con PPRH. Podemos observar cómo la viabilidad celular en todos los casos fue bastante alta (70-100%), indicando que ni los ASO ni los PPRH presentan citotoxicidad relevante *in vitro*.

### 3.4.- Farmacocinética de los ASO y PPRH

Una vez comprobado que disponíamos de las herramientas necesarias para silenciar los genes de CTLA4 y Foxp3 realizamos un estudio farmacocinético de los ASO y PPRH. Para ello se inyectaron los ASO-FAM y PPRH-FAM modelos a ratones C57BL/6 por vía intravenosa e intraperitoneal (n=2). Tras la inyección de los ASO-FAM o PPRH-FAM se extrajeron muestras de sangre a diferentes tiempos: 5min, 15min, 30min, 1h, 2h, 4h y 8h. Los resultados de la farmacocinética para ASO y PPRH por cada una de estas vías se representan en la figura 27.

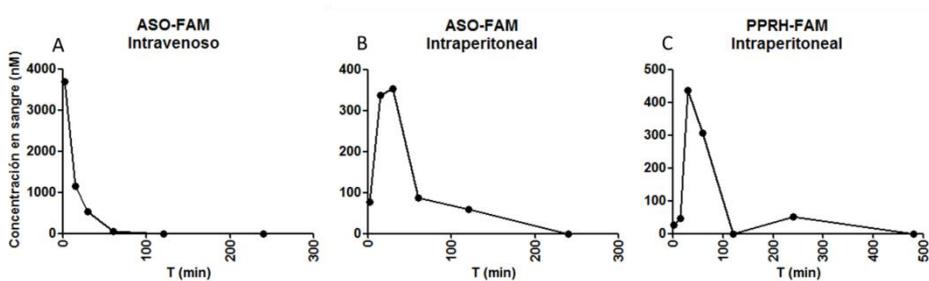


Figura 27. Farmacocinética de ASO y PPRH. Se administró por vía i.v o vía i.p ASO o PPRH modelos marcados con el fluorocromo FAM a ratones C57BL/6 y se tomaron muestras de sangre a diferentes tiempos: 5, 15, 30, 60, 120, 240 y 480 minutos. Se midió la fluorescencia de cada muestra de sangre y a partir de una curva patrón se determinó las concentraciones de ASO-FAM y PPRH-FAM. Las gráficas representan la cinética de ASO (A, B) y PPRH (C) tras su administración vía i.v o i.p. (n=2)

En la gráfica de la farmacocinética del ASO por vía intravenosa vemos cómo tras la inyección, la concentración de ASO en sangre cae bruscamente y a los 15 minutos ya ha bajado a más de la mitad de la concentración inicial y a la hora prácticamente es indetectable en sangre. En la gráfica de farmacocinética de ASO por vía intraperitoneal podemos ver que hay una primera etapa de absorción en la que se alcanza el máximo de concentración en sangre a los 30 minutos y a partir de este momento se observa una caída brusca de la concentración sanguínea (cinética de disposición rápida) seguida de otra caída más suave (cinética de disposición lenta), llegando a ser prácticamente nula a

las 4 horas de la inyección. En el caso de la cinética intraperitoneal del PPRH vemos que es similar al del ASO pero la caída de la concentración en la fase de disposición rápida es más acusada, alcanzándose antes las concentraciones bajas en sangre. Estos resultados nos indican que la vía de administración más adecuada para nuestro experimento *in vivo* es la intraperitoneal ya que podemos tener concentraciones altas de ASO durante más tiempo en sangre. Además a partir de la cantidad de ASO y PPRH inyectadas y las concentraciones de éstos determinadas en sangre calculamos la cantidad de ASO y PPRH que serían necesarias para alcanzar concentraciones en sangre potencialmente terapéuticas según los estudios de silenciamiento *in vitro*. Para el silenciamiento con ASO se necesitarían 500µg por ratón (25mg/kg), mientras que para el PPRH necesitaríamos unos 19,5mg por ratón (aproximadamente 975mg/kg). Esa cantidad de PPRH requerida para alcanzar las concentraciones que habían resultado eficaces para el silenciamiento *in vitro* hace inviable la utilización de PPRH sin vector para el silenciamiento de los genes CTLA4 y Foxp3 en nuestro experimento *in vivo*.

#### **4.- EXPRESIÓN DE CTLA4 y FOXP3 EN RATONES TRAS IMPLANTACIÓN DE TUMOR**

##### **4.1.- Expresión de CTLA4 y Foxp3 en ratones vacunados**

Una vez nos habíamos cerciorado de que éramos capaces de silenciar, aunque de manera parcial, los genes CTLA4 y Foxp3 y antes de iniciar el experimento de silenciamiento *in vivo*, hicimos un estudio de expresión de estos genes en ratones tras implantación del tumor B16, habiéndoles vacunado con células B16 modificadas genéticamente para producir GM-CSF en un modelo de vacunación terapéutica. Estos datos nos ayudarían a diseñar el experimento de vacunación terapéutica combinada con silenciamiento génico. Para este estudio se inyectaron  $2 \times 10^4$  células B16 (día 0) a ratones C57BL/6 (n=5) y  $2 \times 10^6$  B16 irradiadas y transfectadas con p2F GM-CSF en cada dosis de vacuna (días 3, 7 y 10). Se les extrajo sangre los días 0, 2, 4, 7, 11, 14 y 21. En cada toma de

sangre se extrajo 50µL para extraer el ARN y mediante RT-qPCR cuantificar el número de copias de ARNm de CTLA4 y Foxp3. De los 5 animales vacunados 4 desarrollaron el tumor (grupo de No respondedores) y uno no desarrolló el tumor (Respondedor). En la figura 28 podemos ver representados los resultados de expresión de ARNm de estos genes. La sangre extraída a cada uno de los ratones los días 0, 11, 14 y 21 se mezcló utilizando volúmenes iguales (50µL), por lo que la diferencia de expresión de los genes estudiados entre el Respondedor y el grupo de No respondedores sólo puede observarse los días 2, 4 y 7.

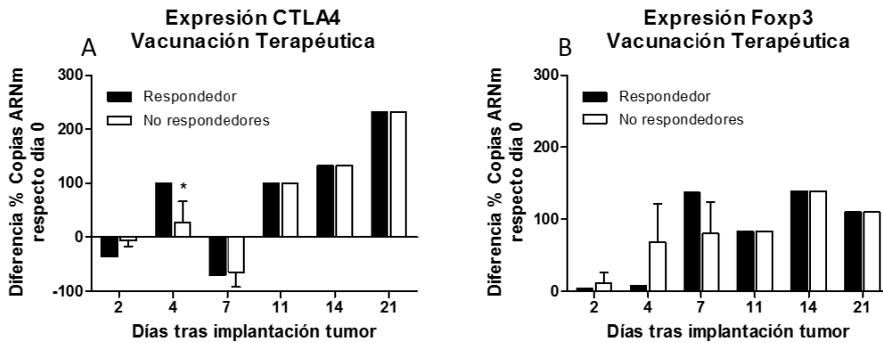


Figura 28. Expresión de ARNm CTLA4 y Foxp3 tras la implantación del tumor en animales con vacunación terapéutica. Se inyectaron  $2 \times 10^4$  células B16 (día 0) a ratones C57BL/6 y se les inyectó  $2 \times 10^5$  células B16 irradiadas y transfectadas con p2F GM-CSF los días 3, 10 y 17. Se les extrajo muestras de sangre los días 0, 2, 4, 7, 11, 14 y 21. Se aisló el ARN de la sangre y mediante RT y qPCR se cuantificó el número de copias de ARNm de CTLA4 y Foxp3. La gráficas representan la diferencia de porcentaje de número de copias de ARNm de CTLA4 (A) y Foxp3 (B) respecto al día 0 en los grupos de No respondedores (animales que desarrollaron el tumor, n=4) y de Respondedor (animales que no desarrollaron el tumor, n=1). A partir del día 11 las barras del grupo No respondedores y Respondedor corresponden en realidad a un único grupo ya que representan una mezcla de sangre de todos los ratones. Significación estadística respecto al Respondedor: \*p<0,05.

En la gráfica de la figura 28A se representa la diferencia de % de copias de ARNm de CTLA4 con respecto al día 0. En esta gráfica se observa que la expresión de CTLA4 del grupo de No respondedores (n=4) entre el día 0 y el 2 es prácticamente la misma, aumenta el día 4 y disminuye el día 7. En el caso del Respondedor (n=1) ocurre prácticamente lo mismo pero el día 2 la expresión en lugar de mantenerse, baja respecto al día 0. Al comparar la expresión de CTLA4 entre ambos grupos se observa que el Respondedor tiene menos de la mitad de diferencia de expresión con respecto al día 0 que el de No respondedores el día 2, más del doble el día 4 (con diferencia estadísticamente significativa entre ellos,  $p < 0,05$ ) y prácticamente idéntica el día 7. En la figura 28B podemos ver representada la diferencia de % de copias de ARNm de Foxp3. En el grupo de No respondedores se mantiene prácticamente al mismo nivel de expresión entre el día 0 y el 2, aumenta el día 4 y se mantiene el día 7. La expresión de Foxp3 en el Respondedor es muy similar pero en este caso entre el día 2 y el 4 en lugar de aumentar se mantiene. Si comparamos ambos grupos observamos que la diferencia de expresión de Foxp3 con respecto al día 0 en el grupo de Respondedores es unas tres veces menor que el de No respondedores el día 2, aproximadamente 10 veces inferior el día 4 y casi el doble el día 7.

Por último, hicimos también el estudio de expresión de estos genes en los ratones supervivientes de una vacunación preventiva (n=2) a los que se reimplantó el tumor ( $10^5$  células B16) 4 meses tras la primera inyección del tumor. Uno de los ratones desarrolló el tumor y acabó muriendo (No respondedor) y el otro permaneció libre de tumor y sobrevivió (Respondedor). Los resultados de expresión de los genes CTLA4 y Foxp3 en este experimento se muestran en la figura 29.

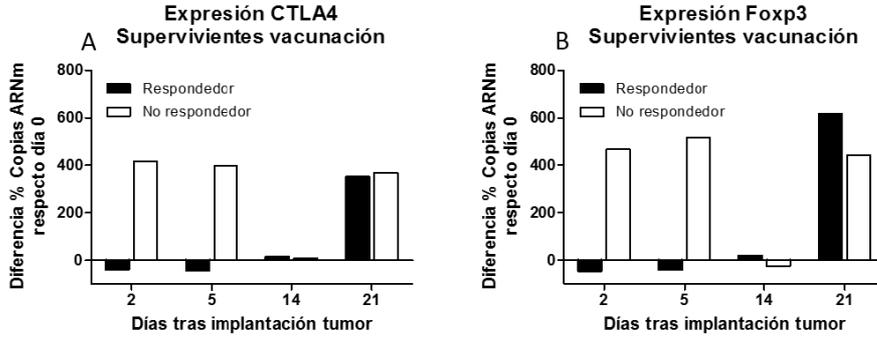


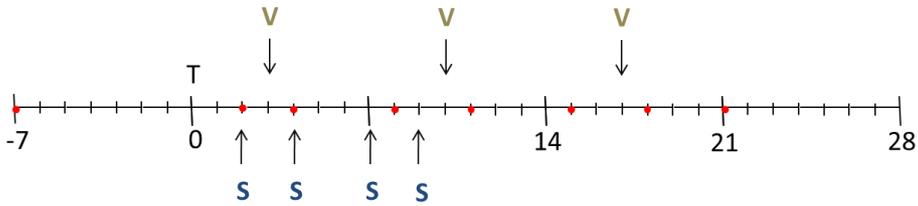
Figura 29. Expresión de ARNm de CTLA4 y Foxp3 en ratones supervivientes tras reimplantación de tumor. Se inyectaron  $10^5$  células B16 (día 0) a ratones C57BL/6 supervivientes de una vacunación preventiva 4 meses después de la primera exposición al tumor y se les extrajo muestras de sangre los días 0, 2, 5, 14 y 21. Se aisló el ARN de la sangre y mediante RT y qPCR se cuantificó el número de copias de ARNm de CTLA4 y Foxp3. La gráficas representan la diferencia de porcentaje de copias de ARNm de CTLA4 (A) y Foxp3 (B) respecto al día 0 en el No respondedor (animales que desarrollaron el tumor, n=1) y de Respondedor (animales que no desarrollaron el tumor, n=1).

En esta figura podemos ver cómo, en los dos genes estudiados, en el No respondedor hay un pico de expresión los días 2 y 5 de aproximadamente 4 veces el valor de expresión del día 0. Después la expresión vuelve a bajar el día 14 y sube de nuevo el día 21. Sin embargo en el Respondedor no aparecen los picos de expresión a los 2 y 5 días, únicamente se observa el pico de expresión a los 21 días tras la inyección de las células tumorales. El Respondedor tiene una expresión de los dos genes prácticamente igual que a la del No respondedor el día 0, menor los días 2 y 5 y muy similar los días 14 y 21.

En estos estudios de expresión génica observamos que tanto la expresión de ARNm de CTLA4 como de Foxp3 en los primeros días es menor en el grupo de Respondedor que en el grupo de No respondedores.

## 5.- VACUNACIÓN TERAPÉUTICA CON CÉLULAS MODIFICADAS CON EL GEN DE GM-CSF Y SILENCIAMIENTO GÉNICO DE MOLÉCULAS INMUNOSUPRESORAS

De acuerdo con todos los resultados que se han ido exponiendo desde el apartado 3 de esta sección logramos diseñar el experimento de vacunación terapéutica que se presenta en este apartado. Realizamos un experimento que combina la vacunación terapéutica con células tumorales modificadas con el gen de GM-CSF con el silenciamiento génico de las moléculas inmunosupresoras CTLA4 y/o Foxp3. Para este experimento se utilizaron células B16 irradiadas y transfectadas con el plásmido p2F GM-CSF, ya que éste fue el que mejores resultados consiguió en los experimentos previos de vacunación. Para el silenciamiento utilizamos ASO y no PPRH ya que *in vitro* se habían mostrado más eficaces y las altas cantidades de PPRH que harían falta para poder llevar a cabo un silenciamiento *in vivo*, sin el uso de vectores, los hacían inviables. Utilizamos los ASOs que mejores resultados de inhibición de expresión de ARNm alcanzaron *in vitro*. Éstos son el ASO 2 para el gen CTLA4 y el ASO 4 para el gen Foxp3. Los ratones que se utilizaron para la realización de este estudio también son C57BL/6. A continuación se detalla el diseño experimental de este estudio: el día 0 se inyectan subcutáneamente  $2 \times 10^4$  células B16 en la pata izquierda de los ratones; los días 3, 10 y 17 se inyectan subcutáneamente en el lomo de los animales las tres dosis de vacuna ( $2 \times 10^6$  células B16 productoras de GM-CSF y letalmente irradiadas); y los días 2, 4, 7 y 9 se inyectaron intraperitonealmente 500µg de ASO (en 100µL de PBS) por ratón. Los días de tomas de sangre son -7, 2, 4, 8, 11, 15, 18 y 21. Cada uno de estos días se extrajo 50µL de sangre a cada ratón con un capilar de vidrio tras punción de la vena safena. El esquema de este experimento es el siguiente:



En este esquema T representa la implantación del tumor, V representa dosis de vacuna, S representa dosis de ASO y el punto rojo representa toma de sangre. Cada una de las líneas verticales representa un día.

Los grupos de animales que se incluyeron en este experimento son los siguientes: a) Vac+ASOoct4, vacunados con células B16 productoras de GM-CSF y a los que se les administró ASO anti-CTLA4; b) Vac+ASOfoxp3, vacunados con células B16 productoras de GM-CSF y a los que se les administró ASO anti-Foxp3; y c) Vac+ASOoct4+foxp3, vacunados con células B16 productoras de GM-CSF y a los que se les administró ASO anti-CTLA4 y anti-Foxp3. Se incluyeron dos grupos de animales como controles: d) Vac+ASOcont, ratones vacunados con células B16 productoras de GM-CSF y a los que se les administró un ASO control; y e) Control no vacunado, sólo se les inyectó 200 $\mu$ L de DMEM. (N=5 por grupo).

### 5.1.- Crecimiento del tumor

Tras la implantación del tumor se monitorizó visualmente la aparición del mismo y una vez visible se midió con un pie de rey tal y como se indica en el apartado de material y métodos. Los resultados del volumen tumoral de este experimento se representan en la figura 30.

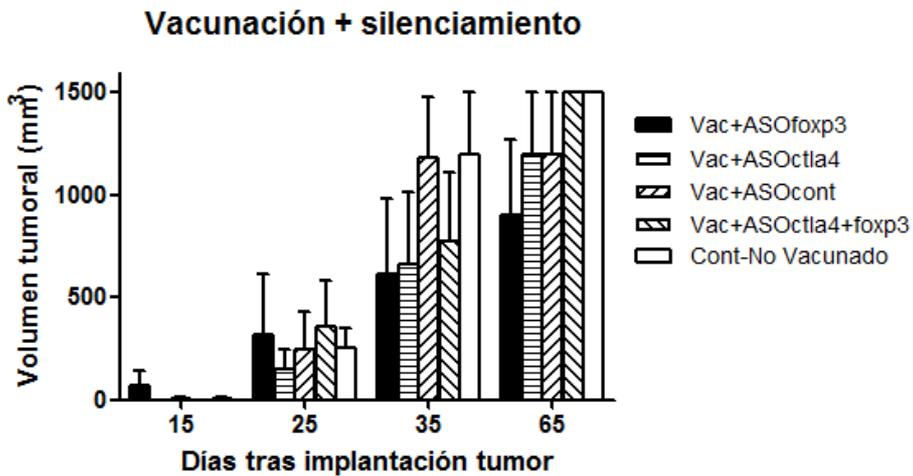


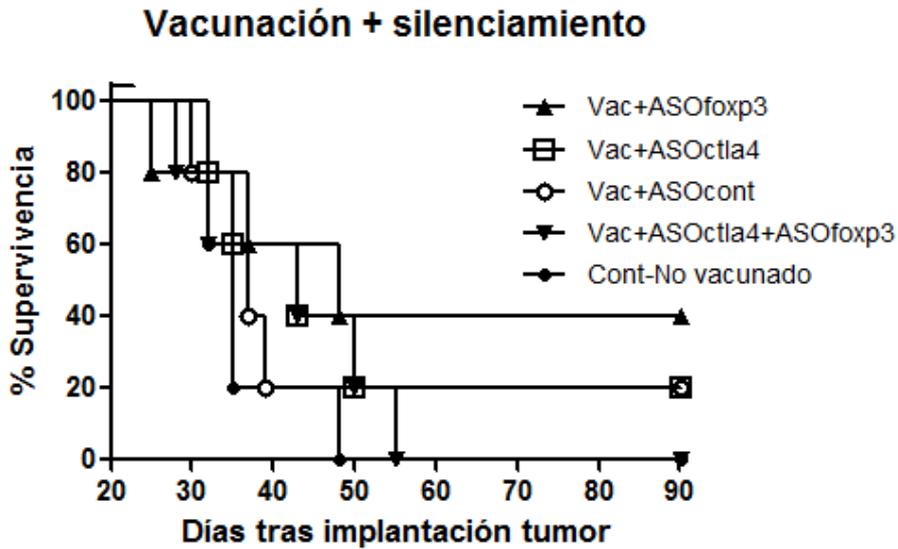
Figura 30. Volumen tumoral en ratones vacunados con células transfectadas + ASO. La gráfica representa el volumen tumoral de ratones a los que se vacunó con células tumorales transfectadas e irradiadas los días 3, 10 y 17 tras la implantación del tumor (día 0) y se les administró ASO los días 2, 4, 7 y 9. Los grupos de vacunación representados en la gráfica son: a) Vac+ASOctla4, vacunados con células B16 irradiadas productoras de GM-CSF y a los que se les administró ASO anti-CTLA4; b) Vac+ASOfxp3, vacunados con células B16 irradiadas productoras de GM-CSF y a los que se les administró ASO anti-Foxp3; y c) Vac+ASOctla4+foxp3, vacunados con células B16 irradiadas productoras de GM-CSF y a los que se les administró ASO anti-CTLA4 y anti-Foxp3. Se incluyeron dos grupos de animales como controles: d) Vac+ASOcont, ratones vacunados con células B16 irradiadas productoras de GM-CSF y a los que se les administró un ASO control; y Control-No Vacunado, sólo se les inyectó 100 $\mu$ L de DMEM. (N=5, en cada grupo). Se aplicó el test *two-way* ANOVA y no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos tratados y el grupo control.

En esta gráfica podemos observar que en todos los grupos vacunados se retrasó el crecimiento tumoral con respecto al control. Los tumores comenzaron a ser visibles a partir del día 15. El grupo que mejor funcionó fue el Vac+ASOfxp3 alcanzando un 49% y un 40% de inhibición de crecimiento tumoral respecto al control los días 35 y 65, respectivamente, seguido del grupo Vac+ASOctla4 que

alcanzó un 45% y 20% de inhibición de crecimiento tumoral los días 35 y 65 respectivamente. El grupo Vac+ASO $\text{ctla4}$ +ASO $\text{foxp3}$  alcanzó un 36% de inhibición del crecimiento tumoral el día 35. El grupo Vac+ASO $\text{cont}$  logró inhibir el crecimiento tumoral un 20% el día 65. Por razones éticas, los volúmenes tumorales nunca pasaron de  $1500\text{mm}^3$ , ya que una vez el tumor alcanzaba este tamaño los animales eran eutanizados para evitar su sufrimiento. Este hecho condiciona la significación estadística de esta medida ya que los grupos que peor funcionan tienen siempre una subestimación de su valor real porque una vez que los animales alcanzan los  $1500\text{mm}^3$  son eutanizados y por lo tanto el volumen del tumor se mantiene en  $1500\text{mm}^3$  y no sigue aumentando cómo sucedería en el caso de no ser eutanizados.

## 5.2.- Supervivencia de los animales

Se realizaron también curvas de supervivencia de los animales. En la figura 31 podemos ver una gráfica con las curvas de supervivencia de los diferentes grupos de animales. El grupo que mejor resultado logró fue el Vac+ASO $\text{foxp3}$  con un 40% de supervivencia de los animales. Los grupos Vac+ASO $\text{ctla4}$  y Vac+ASO $\text{cont}$  alcanzaron ambos un 20% de supervivencia. Sin embargo, paradójicamente el grupo Vac+ASO $\text{ctla4}$ + $\text{foxp3}$  resultó tener la misma supervivencia final que el grupo control (0% supervivencia), aunque alargó en 3 días la vida media de los animales con respecto a éste. De este resultado se deduce que no sólo no tuvo efecto sinérgico la combinación de ASO frente a CTLA4 y de ASO frente a Foxp3 sino que además resultó contraproducente para el éxito de la vacuna antitumoral. Los resultados de supervivencia fueron coherentes con los observados para el volumen tumoral. Tras aplicar el test de log-rank a los resultados de supervivencia no observamos diferencia significativa en los grupos vacunados con respecto al control. Posiblemente la ausencia de significación estadística esté condicionada por la eutización de los animales cuando los tumores alcanzaban  $1500\text{mm}^3$  tal y como se ha comentado anteriormente.



*Figura 31. Supervivencia en ratones vacunados con células transfectadas + ASO.*  
 La gráfica representa las curvas de supervivencia de los grupos de animales procedentes de la vacunación terapéutica + silenciamiento, descritos en la figura 30. Se realizó el test Kaplan-Meier log-rank y no se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control.

El día del sacrificio del animal se le extrajeron los pulmones y mediante una lupa se observaba la posible presencia de metástasis, sin embargo, en ningún caso se detectaron.

### **5.3.- Expresión de CTLA4 y Foxp3 en animales con vacunación terapéutica + silenciamiento génico**

Para el estudio de expresión de los genes CTLA4 y Foxp3 en los ratones que participaron en el experimento de vacunación celular terapéutica combinada con silenciamiento génico se extrajo el ARN de la sangre obtenida de los animales y mediante RT y PCR cuantitativa se determinó el número de copias de ARNm para cada gen. Para representar los datos de expresión de estos genes se dividió a los animales en dos grupos en función del éxito de la respuesta frente al tumor, independientemente del grupo de tratamiento al que

pertenecían: No Respondedores (desarrollaron el tumor, n=21) y Respondedores (no desarrollaron tumor, n=4). Se mezcló a partes iguales la sangre de cada uno de los ratones procedente de los días -7 (antes de ninguna manipulación de los animales) y 2 (después de la implantación del tumor pero antes de ningún tratamiento) por considerar que al tratarse de animales singénicos su sistema inmunitario se comportaría igual antes de recibir ningún tratamiento. En la figura 32 se representa el número de copias de ARNm de cada uno de estos genes en el grupo Control no vacunado (animales a los que tras la implantación del tumor sólo se les administró DMEM).

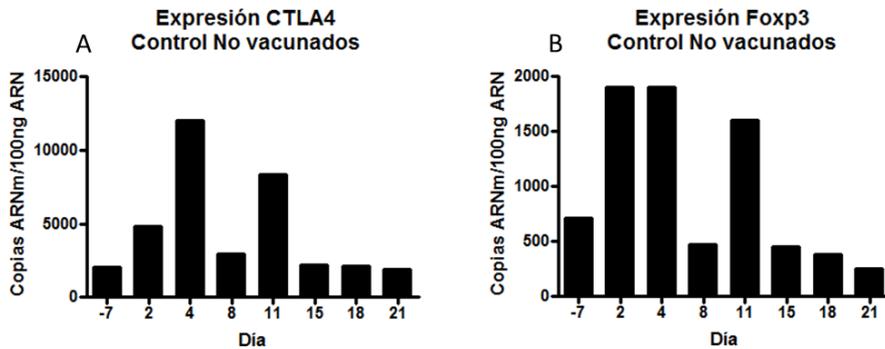
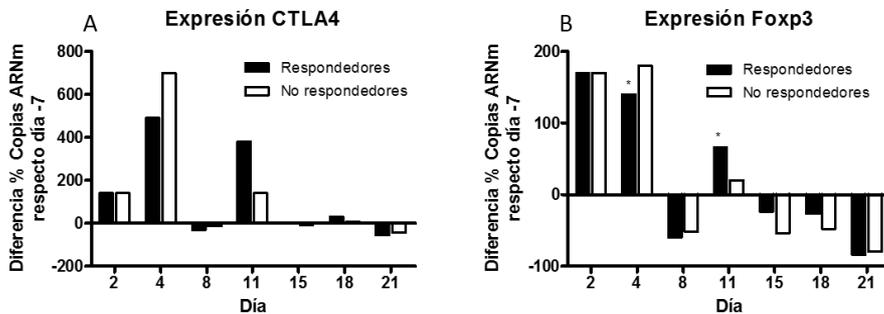


Figura 32. Expresión de CTLA4 y Foxp3 tras implantar el tumor en animales no vacunados. Las gráficas representan el número de copias de ARNm de CTLA4 (A) y Foxp3 (B)/ 100ng ARN total a diferentes días tras implantar el tumor (día 0) en el grupo Control no vacunado. A los animales de este grupo únicamente se le administró DMEM tras la implantación del tumor (n=5).

En la gráfica de la figura 32A se representa el número de copias de ARNm de CTLA4/100ng de ARN total. En esta gráfica se observa un pico de expresión de ARNm de CTLA4 el día 4 (12000 copias ARNm CTLA4/100ng ARN total) y otro algo menor el día 11. El resto de días la producción de ARNm de CTLA4 es más similar a la del día -7 (2000 copias ARNm CTLA4/100ng ARN total). En la gráfica de la figura 32B se representa el número de copias de ARNm de Foxp3/100ng de ARN total. En ella observamos cómo hay un pico de expresión de ARNm de Foxp3 los días 2 y 4 (19000 copias ARNm Foxp3/100ng ARN total) y otro algo menor el día 11 (15000 copias ARNm Foxp3/100ng ARN

total). El resto de días la expresión de ARNm de Foxp3 se mantiene más próxima a la del día -7 (700 copias ARNm Foxp3/100ng ARN total).

La figura 33 muestra los resultados de la diferencia del % de copias de ARNm de CTLA4 y Foxp3 con respecto al día -7 en el grupo de Respondedores versus al grupo de No respondedores.



*Figura 33. Expresión de ARNm de CTLA4 y Foxp3 en el grupo de Respondedores y en el grupo de No respondedores. La gráfica representa la diferencia de % de copias de ARNm de CTLA4 (A) y Foxp3 (B) respecto el día -7 en el grupo de Respondedores (n=4) y en el de No respondedores (n=21). La barras del día 2 de ambos grupos en realidad representan un mismo grupo ya que en éste día se mezcló la sangre de todos los ratones. Significación estadística con respecto al grupo No respondedores: \*  $p < 0,05$ .*

En la gráfica de la figura 33A podemos observar cómo los días 4 y 11 la expresión de ARNm de CTLA4 es mayor que la del día -7 en ambos grupos, mientras que es similar a la del día -7 los días 8, 15, 18 y 21. La expresión de ARNm de CTLA4 es menor en el grupo de Respondedores que en el de No respondedores el día 4 y 8 y mayor el día 11.

En la gráfica B de la figura 33 se observa que al igual que ocurre con el gen CTLA4, la expresión de ARNm de Foxp3 es mayor que la del día -7 en los días 4 y 11 tanto en el grupo de Respondedores como en el de No respondedores. La expresión de ARNm de Foxp3 en el grupo de Respondedores es menor que la del grupo de No respondedores en los días 4 y 8 y mayor en los días 11, 15 y 18.

#### **5.4.- Estudio de poblaciones linfocitarias Treg y CTLA4 mediante citometría de flujo**

Con el objetivo de dilucidar si existían diferencias en las poblaciones linfocitarias Treg (CD4CD25Foxp3+) y CTLA4 de sangre periférica entre los grupos que desarrollaron el tumor (No respondedores) y los que no lo desarrollaron (Respondedores) se realizaron citometrías de flujo con muestras de sangre procedentes de cada uno de los ratones del estudio. Las muestras de sangre procedentes de ratones No respondedores fueron tomadas el día de sacrificio del animal cuando el tumor alcanzaba los 1500mm<sup>3</sup> y a los 5 meses tras la implantación del tumor en el caso del grupo de Respondedores. Además se realizaron también citometrías con muestras de sangre de ratones control a los que no se les implantó el tumor (Control sin tumor, n=5). Tras la extracción de sangre se aislaron los linfocitos mediante centrifugación por gradiente con Ficoll y posteriormente se dividieron los linfocitos en dos partes para realizar el marcaje de Treg (CD4CD25Foxp3) y de linfocitos CD4CTLA4Foxp3. Los resultados procedentes de estas citometrías se representan en la figura 34.

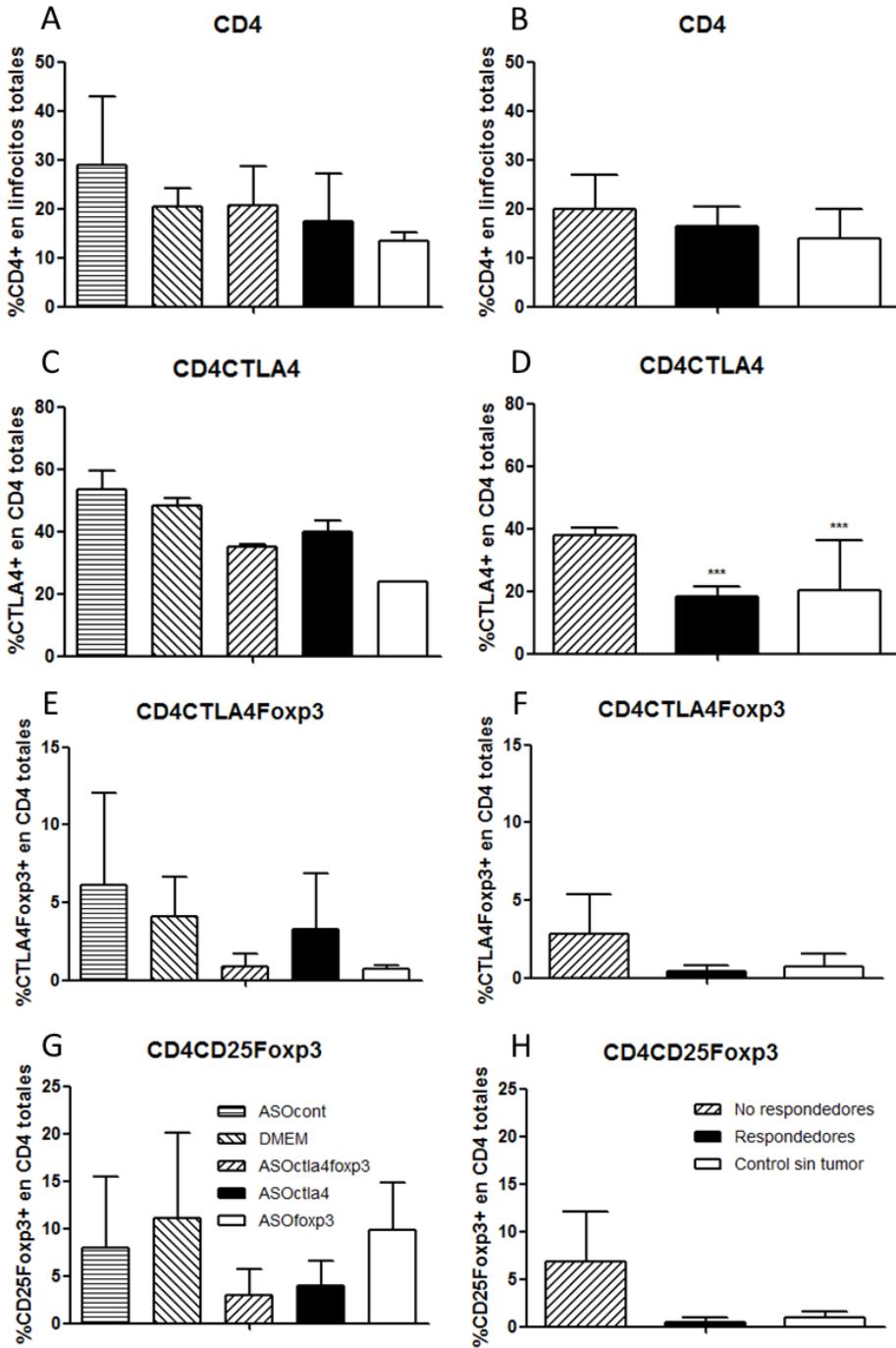


Figura 34. Comparación de las poblaciones linfocitarias CTLA4 y Foxp3 en los diferentes grupos de vacunación. Las gráficas A y B representan el porcentaje de linfocitos CD4+; las gráficas C y D representan el porcentaje de linfocitos CD4 que son CTLA4+; las gráficas E y F representan el porcentaje de linfocitos

CD4 que son CTLA4+Foxp3+; las gráficas G y H representan el porcentaje de linfocitos CD4 que son CD25+Foxp3+. Las gráficas de la izquierda representan el porcentaje de linfocitos positivos en los diferentes grupos No respondedores (vacunados con células B16 productoras de GM-CSF más los ASO indicados, y el grupo control tratado sólo con DMEM) y las gráficas de la derecha representan el porcentaje de linfocitos positivos en el grupo global de No respondedores (promedio), Respondedores (2 ratones de Vac+ASOfoxp3, 1 ratón Vac+ASOoct4 y 1 ratón Vac+ASOcont) y Control sin tumor. Significación estadística con respecto al grupo No respondedores: \*\*\*  $p < 0,001$ .

En las gráficas de la parte izquierda de la figura (34A, C, E y G) se representa el porcentaje de linfocitos en los ratones No respondedores de los distintos grupos de tratamiento y en las gráficas de la parte derecha (34B, D, F y H) el promedio de los grupos No respondedores de la izquierda ( $n=21$ ), los Respondedores ( $n=4$ ) y el Control sin tumor ( $n=5$ ). Las gráficas de la figura 34A y B representan el porcentaje de linfocitos CD4+. Aunque se aprecia un mayor porcentaje de CD4+ en el grupo de No Respondedores que en el de Respondedores y el Control sin tumor, no hay diferencias significativas. En las gráficas de las figuras 34C y 34D se representa el porcentaje de linfocitos CD4 que son CTLA4+. Podemos ver que el grupo de animales No respondedores, tiene un mayor porcentaje de linfocitos CD4CTLA4+ que el grupo de Respondedores y el control sin tumor con la máxima significación estadística. Las gráficas de las figuras 34E y 34F representan el % linfocitos CD4 que son CTLA4+Foxp3+ y en ellas no se observan diferencias significativas. Las gráficas de las figuras 34G y 34H representan el % linfocitos CD4 que son CD25+Foxp3+ y en ellas no se observan diferencias significativas entre el grupos de animales No respondedores y el grupo Respondedores o Control sin tumor.

# DISCUSIÓN

Este trabajo se centra en la búsqueda de nuevas estrategias que nos permitan optimizar y aumentar la eficacia de las vacunas antitumorales con células modificadas genéticamente. Los principales objetivos de esta tesis son el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación que permitan reducir el número de células tumorales del paciente necesarias gracias a la utilización de sus fibroblastos y la optimización de las vacunas terapéuticas mediante la combinación de diferentes estrategias inmunomoduladoras utilizando terapia génica.

En este sentido, nuestro grupo ha realizado importantes esfuerzos utilizando modelos murinos de melanoma y ha demostrado en estudios previos que la vacunación preventiva con células modificadas genéticamente consigue el 100% de supervivencia de los animales (17, 50, 51) y que la vacunación terapéutica consigue retrasar el crecimiento del tumor y alargar la supervivencia de los animales (50, 51).

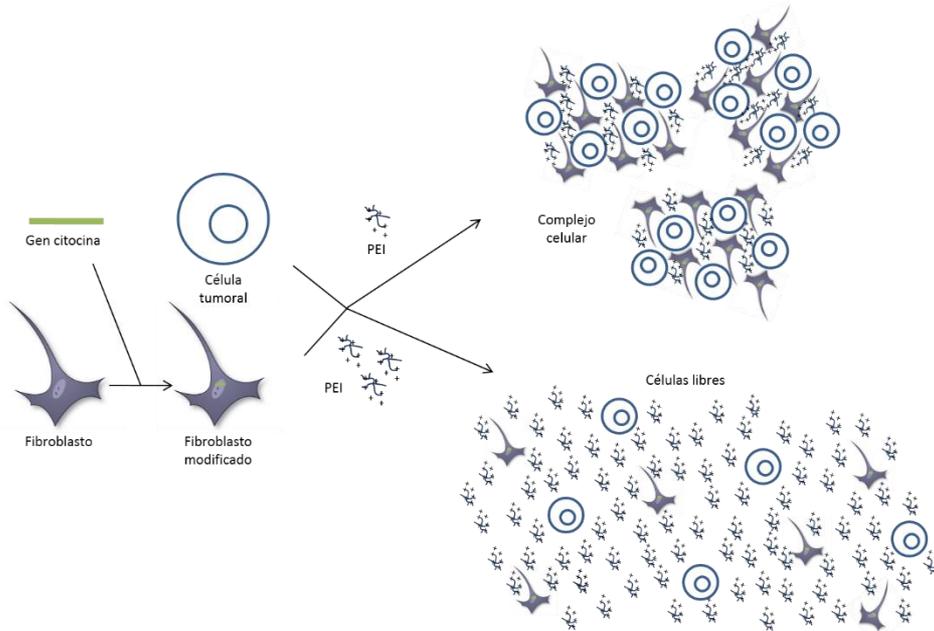
El uso de células tumorales autólogas modificadas genéticamente como vacuna parece en principio la mejor opción. Sin embargo, en la práctica clínica conseguir células tumorales en cantidad suficiente para cultivarlas, expandirlas, transfectarlas y devolverlas al mismo paciente con las garantías de seguridad y eficacia de producción del gen transfectado resulta en muchas ocasiones muy complicado. Además algunas células tumorales son refractarias a la transfección génica. Por ello pensamos que, la utilización como vacunas antitumorales, de complejos celulares constituidos por células tumorales y fibroblastos autólogos modificados genéticamente para producir citoquinas inmunoactivadoras se muestra como una alternativa atractiva al uso exclusivo de células tumorales modificadas genéticamente como vacuna. En este sentido, uno de los principales objetivos de esta tesis es el desarrollo de complejos celulares formados por fibroblastos modificados con genes inmunoactivadores y células tumorales que posteriormente utilizaremos como vacuna antitumoral. La utilización de estos complejos como vacuna nos permitiría reducir el número de células tumorales necesarias. La idea de utilizar dos tipos celulares distintos en una vacuna para aumentar la respuesta inmune antitumoral no es

nueva. Vacunas basadas en células tumorales fusionadas con células dendríticas han sido ya probadas con relativo éxito (106-112). Además, algunos modelos de vacunación en los que se administraba conjuntamente fibroblastos modificados genéticamente y células tumorales ya han sido probados también (113-116). Dentro de este marco, nosotros pensamos que la administración de ambos tipos de células formando complejos, en lugar de administradas de forma libre, puede tener una mayor eficacia de respuesta antitumoral porque las células con la función inmunopotenciadora (fibroblastos modificados) y la célula tumoral permanecen unidas facilitando así la migración de células del sistema inmune al lugar donde ambas se encuentren y el reconocimiento de los antígenos tumorales, coincidiendo en espacio y tiempo.

En nuestro grupo tenemos amplia experiencia en vacunas celulares antitumorales. Recientemente hemos desarrollado una vacuna celular antitumoral probada en modelos murinos de melanoma (21). Esta vacuna estaba basada en células tumorales B16 modificadas genéticamente para producir GM-CSF. La vacuna logró un 100% de respuesta antitumoral en vacunación preventiva (inhibiendo el desarrollo del tumor) y una respuesta antitumoral parcial (retrasando el crecimiento del tumor) en vacunación terapéutica. En este estudio, se puso de manifiesto que el orden de presentación de antígenos, citoquina inmunoactivadora (GM-CSF) e implantación del tumor es crucial para conseguir una buena respuesta antitumoral y los mejores resultados se consiguen cuando es la misma célula tumoral utilizada como vacuna la que produce GM-CSF.

En el presente trabajo, en primer lugar, nos propusimos formar complejos entre fibroblastos modificados genéticamente y células tumorales mediante el empleo del polímero catiónico PEI. Las cargas positivas del PEI interaccionan con las negativas de las membranas celulares permitiendo que se unan unas células con otras y formando así complejos celulares. La formación de los complejos con PEI es dosis dependiente hasta llegar a una concentración de PEI a la que se observa una máxima agregación y por encima de la cual los complejos dejan progresivamente de formarse hasta quedar libres las células. Esto es

consecuente con el mecanismo por el cual pensamos que se forman los complejos. La parte externa de las membranas plasmáticas de las células están cargadas negativamente, mientras que el PEI es un polímero catiónico. Al añadir pequeñas cantidades de PEI a las células, las cargas positivas de éste interaccionan con las negativas de la membrana plasmática y va recubriéndolas de modo que al aproximarse dos células quedan adheridas por interacciones electrostáticas entre las cargas negativas de sus membranas y las cargas positivas del PEI. Sin embargo, si se continúa añadiendo PEI podría llegar un momento en que éste se encuentre en exceso y haya tantas cargas positivas entre unas células y otras que se produzcan repulsiones electrostáticas entre ellas (ver figura 35).



*Figura 35. Mecanismo propuesto para la formación de complejos celulares mediante adición de PEI.*

Al observar al microscopio confocal los complejos celulares formados por fibroblastos transfectados con el gen de la proteína fluorescente verde (eGFP) y células B16, mediante la adición de PEI, vemos que a ciertas concentraciones de PEI (alrededor de 50µg/mL) la fluorescencia verde se distribuye de forma

homogénea por todo el complejo celular, por lo que sugerimos que a dichas concentraciones las células forman complejos fusionándose parcialmente o permitiendo el intercambio de material citoplasmático. A concentraciones superiores de PEI (100µg/mL) la citotoxicidad de éste se hace visible y se observa que el material citoplasmático difunde al exterior de la célula.

Comprobamos que los fibroblastos presentes en los complejos eran capaces de producir las citoquinas de los genes transfectados (GM-CSF e IL-12) a concentraciones con potencial efecto inmunomodulador. También comprobamos que la viabilidad de las células que formaban parte de los complejos era aceptable. En los complejos formados entre fibroblastos y células B16 mediante adición de PEI, al utilizar la concentración de PEI en la cual se observó una mayor proporción de complejos (50µg/mL), los fibroblastos transfectados produjeron una cantidad de GM-CSF suficiente para mediar una respuesta inmune antitumoral. En este sentido, según la bibliografía al respecto, una secreción local de GM-CSF  $>30\text{ng}/10^6\text{células}/24\text{h}$  se establece como la mínima necesaria para desencadenar una respuesta inmune antitumoral (13).

Tanto GM-CSF como IL-12 han demostrado en estudios preclínicos y clínicos tener un papel importante en la respuesta inmune antitumoral (10-24, 50-53). Los plásmidos que utilizamos para transfectar las células en el experimento de formación de complejos fueron el plásmido pMoK mGM-CSF y el p2F mGM-CSF. La construcción plasmídica pMok contiene el promotor del citomegalovirus que permite potentes expresiones del gen. Por su parte, el plásmido p2F es un plásmido bicistrónico que contiene dos promotores con elementos reguladores distintos que permiten la expresión simultánea de dos genes. Esto le confiere la ventaja de poder introducir en su secuencia los genes de dos citoquinas como IL-12 y GM-CSF cuya administración conjunta se ha visto que posee efecto sinérgico (22, 51, 117, 118). La producción de GM-CSF fue unas 10 veces mayor en las células transfectadas con el plásmido pMoK mGM-CSF que con p2F mGM-CSF, estos resultados concuerdan con otros previos obtenidos por nuestro grupo. Sin embargo, no debemos desechar esta

segunda construcción génica al utilizar estos complejos en un modelo de vacunación en ratones ya que en experimentos previos llevados a cabo por nuestro grupo se observó que a pesar de que *in vitro* el plásmido pMoK mGM-CSF consiguió una mayor producción de la citoquina que el p2F mGM-CSF, *in vivo* ocurrió lo contrario (119). Además se ha demostrado también por nuestro laboratorio y otros grupos que una dosis excesivamente alta de GM-CSF puede ser contraproducente para la respuesta antitumoral (17, 50, 120).

Una de las principales limitaciones de este trabajo se presenta en el estudio de caracterización de complejos ya que el recuento de células que forman parte de los complejos es muchas veces aproximado, sobre todo en el caso de complejos de gran tamaño. Esto es debido principalmente a que en estos complejos las células aparecen superpuestas, así que cuando hay más de 100 células en un complejo se contabilizan como 101. Por otra parte, las muestras se preparan poniendo una gota entre porta y cubre, de modo que al colocar el cubre los complejos de mayor tamaño tienden a quedar en el centro de la preparación mientras que las células libres se sitúan en los extremos. Para subsanar esto, siempre se toman fotografías de campos representativos de cada una de las zonas de la muestra. Por este motivo es posible que en algunas fotografías no se pueda ver reflejado el porcentaje calculado de células formando complejos.

Una vez desarrollado los complejos celulares y comprobado su viabilidad celular y su capacidad de producción de la citoquina codificada por el gen transfectado, utilizamos estos complejos en un modelo de vacunación preventiva frente a melanoma murino. Se comparó en una vacunación preventiva la respuesta antitumoral de células B16 libres frente a complejos celulares B16-Fib/PEI utilizando células transfectadas con el plásmido “alto expresador” de GM-CSF (pMok GM-CSF) y el “bajo expresador” (p2F GM-CSF).

Para evaluar la respuesta inmune humoral se determinó la producción de IgG específicas anti-TMP (proteínas de membrana tumoral) y anti-FMP (proteínas de membrana del fibroblasto) en muestras de sangre de los animales vacunados

de los días -15 y 15. La producción de IgG anti-TMP totales y subtipos 1 y 2a fue mayor en todos los grupos vacunados con complejos que en el grupo control. Esto demostró que los complejos son capaces de producir una respuesta humoral frente al tumor. Además, la producción de IgG anti-FMP fue muy similar en los grupos vacunados con células libres y en los grupos vacunados con complejos celulares. Esto es debido a que las células tumorales B16 comparten muchos epítomos con las células sanas de ratón. Por otra parte, cuando los animales se vacunaron con células B16 transfectadas con el plásmido bajo expresador de GM-CSF, la respuesta humoral frente al tumor generada fue mayor que la respuesta generada en los grupos vacunados con complejos celulares transfectados con el mismo plásmido. Pensamos que este resultado puede ser debido al descenso en la producción de GM-CSF causado por la presencia de PEI en los complejos, ya que previamente vimos que la presencia de PEI en los complejos reduce la producción de citoquinas, posiblemente debido a la toxicidad del PEI. Por el contrario, la producción de IgG fue muy similar en los grupos vacunados con células libres y complejos celulares transfectados con el plásmido alto expresador de GM-CSF. Probablemente esto sea debido a que la producción de GM-CSF en este caso es tan alta que a pesar de la reducción de producción de GM-CSF, debida al efecto tóxico del PEI, los niveles de esta citoquina siguen siendo suficientemente altos.

Cuando los animales se vacunaron con células B16 libres, los mejores resultados fueron obtenidos con el grupo vacunado con células transfectadas con el plásmido bajo expresador de GM-CSF, alcanzando un 92% de inhibición del crecimiento tumoral en el día 20. Estos resultados refuerzan la idea de que altas dosis de GM-CSF puede mediar efectos negativos.

En los grupos vacunados con complejos celulares los mejores resultados se consiguieron usando el plásmido alto expresador con un 56% de inhibición del crecimiento tumoral el día 15 en el grupo de complejos celulares con 50 $\mu$ g/mL de PEI.

Los resultados de supervivencia son coherentes con los del crecimiento tumoral. Sólo los grupos vacunados con células B16 transfectadas con el

plásmido bajo expresador y alto expresador lograron un 40% y un 20% de supervivencia, respectivamente. La menor respuesta antitumoral mediada por los complejos celulares podría ser debido a la baja expresión de GM-CSF y/o a la producción de factores inmunosupresores como PGE<sub>2</sub>, IDO o TGF- $\beta$  por parte de los fibroblastos (121, 122).

El uso de los complejos celulares como vacuna antitumoral es posible ya que hemos comprobado que los complejos celulares no incrementan la respuesta inmune humoral observada frente al fibroblasto que ya se produce con las células tumorales solas (respuesta cruzada), y sin embargo sí son capaces de provocar una respuesta inmune frente al tumor. A pesar de que nuestros resultados sugieren que los complejos celulares median una menor respuesta antitumoral que las células tumorales libres, nuevos estudios con diferentes dosis de células formando los complejos podrían ayudar a lograr la misma eficacia que la conseguida con células tumorales libres.

El otro objetivo principal de esta tesis era intentar mejorar la eficacia de las vacunas terapéuticas mediante la combinación de una vacunación terapéutica basada en células tumorales B16 modificadas con el gen de GM-CSF y el silenciamiento génico de las moléculas inmunosupresoras CTLA4 y/o Foxp3.

La activación de la respuesta antitumoral en las vacunas preventiva y terapéutica difiere principalmente en que el sistema inmune en el primer caso no ha tenido contacto previo con los antígenos tumorales y en estas circunstancias es extraordinariamente eficaz. Mientras que en los casos en que la vacunación se realiza en sujetos que han tenido contacto previo con los antígenos tumorales (vacunación terapéutica), domina la respuesta supresora de tolerancia al tumor. En esta respuesta inmunosupresora los principales protagonistas son los linfocitos Treg (CD4+CD25+Foxp3+), aunque existen otras células implicadas como las células mieloides supresoras (MDSC) o las células dendríticas tolerogénicas. Las principales moléculas implicadas en esta respuesta inmunosupresora son la molécula de superficie CTLA4 y el factor de transcripción nuclear Foxp3. Actualmente está bastante sustentado que la activación inicial mediante el reconocimiento del antígeno por las células T

genera señales de estimulación cuando la misma se realiza en presencia de moléculas coestimuladoras (interacción CD28/B7), de modo que la célula T con el ligando CD28 se une a la molécula B7 de la célula presentadora de antígeno, provocando una serie de señales intracelulares que conducen a la activación del linfocito y a la sobreexpresión en la superficie celular de receptores CTLA4, que al unirse a B7 desencadenan una respuesta inmunosupresora. El receptor CTLA4 se caracteriza por tener mayor afinidad que el ligando CD28, por las moléculas B7.1 y B7.2. De este modo, se sustituye de forma progresiva una respuesta de activación por otra de supresión, limitando la intensidad y el tiempo de la activación de la respuesta inmunitaria inducida por el antígeno y por tanto la eficacia de las vacunas terapéuticas antitumorales.

En la actualidad se conoce que una serie de anticuerpos monoclonales anti-CTLA4 pueden bloquear la interacción de B7 y CTLA4 y de este modo, facilitar y prolongar la eficacia de la fase de activación (71, 123, 124). Dos anticuerpos anti-CTLA-4 (ipilimumab y tremelimumab) han sido utilizados en humanos, en sendos ensayos clínicos (48, 125), para evaluar su seguridad y eficacia antitumoral, en combinación con quimioterapia o vacunas y en varios regímenes de dosis. El ipilimumab ha mostrado ser eficaz tanto en combinación con vacunas antitumorales (126) como en monoterapia (48). El ipilimumab ha demostrado en un ensayo clínico fase III en pacientes con melanoma metastásico avanzado ser capaz de alargar la vida de estos pacientes (48). Este estudio condujo a la aprobación del ipilimumab por la FDA y por la Agencia Europea del Medicamento en 2011 para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico avanzado. A pesar del gran avance que ha supuesto el ipilimumab para estos pacientes, su uso tiene una serie de limitaciones: a) sólo alrededor del 20% de los pacientes tratados con ipilimumab responden positivamente al tratamiento; b) los pacientes con melanoma con metástasis en tránsito no reúnen los requisitos para ser tratados con ipilimumab; c) el tratamiento con ipilimumab bloquea indistintamente la isoforma soluble de CTLA4 (CTLA4s) como la anclada a membrana (CTLA4m); d) produce

reacciones adversas relacionadas con autoinmunidad, principalmente exantema cutáneo, colitis, e hipofisitis que en ocasiones pueden ser graves; y e) elevado coste del tratamiento. Por estas razones pensamos que el silenciamiento génico de CTLA4 puede ser una alternativa atractiva al tratamiento con anticuerpos. Además mediante silenciamiento génico podemos inhibir también la expresión de Foxp3, que por tratarse de una proteína intracelular no puede ser diana de anticuerpos. Además nos propusimos también silenciar el gen CD25 que se encuentra altamente expresado en los linfocitos Treg y su bloqueo mediante anticuerpos ha mostrado deplecionar el número de Treg y promover la respuesta inmune antitumoral en estudios en ratones (77, 78).

En este trabajo antes de iniciar el experimento de vacunación terapéutica más silenciamiento génico se llevaron a cabo una serie de experimentos para elegir la herramienta de silenciamiento más adecuada, la concentración óptima de ésta para el experimento *in vivo* y la vía de administración.

Para el silenciamiento *in vitro* de los genes de CTLA4, Foxp3 y CD25 comparamos la eficacia de los ASO y PPRH. Ambas herramientas median el silenciamiento génico mediante su unión a moléculas de ARNm o ADN. Tanto los ASO como los PPRH se utilizaron en este estudio sin vector de transferencia génica. Los PPRH tienen la ventaja de no necesitar ningún tipo de modificación química para garantizar su estabilidad frente a la degradación por nucleasas, mientras que los ASO si la necesitan. Los ASO que utilizamos en este trabajo son 2-OMe-fosforotioatos. Los experimentos *in vitro* de entrada al interior celular de ASO-FAM y PPRH-FAM ponen de manifiesto que los PPRH tienen más dificultad que los ASO para entrar en la célula sin ayuda de vectores, ya que se necesitan concentraciones mucho más altas para conseguir una misma entrada. Esto puede ser debido a que los PPRH utilizados tienen el doble de tamaño que los ASO utilizados y a que las modificaciones 2-OMe-fosforotioato de los ASO facilitan la entrada de éstos en la célula.

En los silenciamientos *in vitro* se observa que tras comparar la eficacia de silenciamiento de 4 ASO y 4 PPRH para cada uno de los genes estudiados los mejores resultados con las concentraciones ensayadas se logran con los ASO,

alcanzando un 52% y un 50% de inhibición de expresión de ARNm de CTLA4 y Foxp3 respectivamente. Sin embargo con los PPRH el mejor resultado alcanzó tan solo un 22% de inhibición de ARNm de CD25.

Una vez comprobado *in vitro* que los ASO y PPRH eran capaces de entrar en la célula y silenciar los genes CTLA4, Foxp3 y CD25, hicimos un estudio farmacocinético utilizando un ASO y un PPRH de tamaño promedio a los que se utilizaron para el silenciamiento génico, marcados con un fluorocromo. Tras administrar el ASO modelo por vía intravenosa e intraperitoneal elegimos la vía de administración intraperitoneal como la más adecuada ya que con ella se lograba mantener concentraciones plasmáticas más elevadas durante más tiempo. También se administró el PPRH modelo por vía intraperitoneal y se observó que su cinética en sangre era muy similar a la del ASO. La vía intraperitoneal ha sido frecuentemente utilizada para administrar ASO en estudios con animales. En función de la cantidad de ASO y PPRH administrada, la volemia del ratón y la cinética en sangre tras inyección intraperitoneal se calculó la cantidad de ASO y PPRH que se necesitaría para alcanzar las concentraciones plasmáticas que *in vitro* eran capaces de silenciar los genes de interés. La cantidad necesaria de ASO y PPRH para el silenciamiento *in vivo* era de 500µg/ratón (25mg/Kg) y 19,5mg/ratón (1g/kg), respectivamente. La gran cantidad de PPRH necesaria para el silenciamiento *in vivo* sin el uso de vectores hizo inviable su utilización para el siguiente experimento. Sin embargo, la dosis de ASO necesaria para llevar a cabo el experimento *in vivo* se encontraba dentro del rango de dosis utilizadas en otros estudios (127-130).

Para poder decidir en qué días se administrarían las dosis de ASO en el experimento *in vivo* era necesario hacer un estudio de expresión del ARNm de los genes CTLA4 y Foxp3 tras implantar el tumor en ratones a los que se les administró una vacunación terapéutica con células B16 transfectadas con el plásmido bajo expresador de GM-CSF (p2F GM-CSF). De estos animales vacunados un 20% inhibió el crecimiento del tumor y sobrevivió (grupo Respondedor) y un 80% desarrolló el tumor y acabó muriendo (grupo No

respondedores). Tanto en la expresión de ARNm de CTLA4 como de Foxp3 vemos que a los pocos días de implantar el tumor se produce un pico de expresión. En los primeros días en que se aprecian diferencias en la expresión de éstos genes, la expresión en el grupo No respondedores es mayor que en el grupo Respondedor. Esto nos hace pensar que la mayor expresión de CTLA4 y Foxp3 en los primeros días puede estar relacionada con el desarrollo del tumor. Quisimos también estudiar la expresión de estos genes en ratones supervivientes de una vacunación preventiva a los que se les reimplantó el tumor 4 meses después de la primera exposición al tumor. Tras la reimplantación del tumor a los 4 meses el 50% de los animales inhibió el crecimiento del tumor y sobrevivió (Respondedor) y el otro 50% desarrolló el tumor y murió (No respondedor). Un experimento previo llevado a cabo por nuestro grupo estudió la memoria inmunológica de los animales supervivientes a una vacunación mediante la reimplantación del tumor un año después de la primera exposición pero en aquella ocasión se les administró una dosis de recuerdo de la vacuna una semana antes. En aquel experimento el 100% de los animales a los que se les reimplantó el tumor sobrevivió (50). Estos resultados indican que una dosis de recuerdo de la vacuna podría ser necesaria para generar respuestas inmunes antitumorales efectivas frente a futuras exposiciones al tumor. En cuanto a la expresión de los genes CTLA4 y Foxp3 tras la reimplantación del tumor a los 4 meses vemos cómo aparecen picos de expresión tanto de ARNm de CTLA4 como de Foxp3 en el grupo de No respondedores los días 2, 5 y 21, mientras que en el grupo de Respondedores sólo se observa el día 21. Estos resultados refuerzan la idea de que la mayor expresión de CTLA4 y Foxp3 en los primeros días tras la implantación del tumor (días 2 a 5) está relacionada con el desarrollo del tumor y el fracaso de la respuesta inmune antitumoral.

Con todos estos datos diseñamos el experimento *in vivo* de vacunación terapéutica con células B16 productoras de GM-CSF y silenciamiento de CTLA4 y/o Foxp3. Las dosis de vacuna se administraron los días 3, 10 y 17 y las dosis de ASO los días 2, 4, 7 y 9 respecto a la implantación del tumor (día 0). Con este calendario de administración de ASO pretendíamos silenciar a los

genes CTLA4 y Foxp3 desde la primera dosis de vacuna hasta la última, facilitando así que la respuesta inmune efectora generada por la vacuna no se viese limitada por la respuesta inmunosupresora generada tras la activación de la respuesta inmune celular efectora. En este experimento el grupo de animales que mejor resultado obtuvo fue al que se le administró la vacuna y ASO anti-Foxp3, logrando reducir el crecimiento del tumor hasta un 40% respecto al control, más de 2 meses después de la implantación del tumor. Además en este grupo de tratamiento un 40% de los animales permanecieron libres de enfermedad, sobreviviendo a la implantación del tumor. Este resultado es coherente con un estudio *in vitro* en el que tras silenciar Foxp3 con siRNA se consiguió disminuir la expresión de CTLA4 y aumentar la respuesta inmune antitumoral (131). El grupo de animales al que se le vacunó y administró ASO anti-CTLA4 alcanzó un 20% de inhibición del crecimiento tumoral dos meses después de la implantación del tumor. En este grupo un 20% de los animales logró sobrevivir. Sin embargo, el grupo vacunado al que se le administró ASO anti-CTLA4 + ASO anti-Foxp3 obtuvo peores resultados incluso que los del grupo vacunado al que se le administró un ASO control. Este inesperado resultado podría ser explicado desde un punto de vista farmacocinético. Es posible que la administración conjunta de ambos ASO disminuya la disponibilidad de éstos al formarse dímeros entre ellos. Tras comparar las secuencias de ambos ASO descartamos la posibilidad de formación de enlaces de Watson y Crick entre ambos ASO, sin embargo sí observamos que es posible que se formen hasta 8 enlaces tipo Reverse Hoogsteen permitiendo la formación de dímeros entre ambos ASO, dificultando así su entrada en la célula. A continuación se representan las secuencias de ambos ASO en las que podemos ver resaltado en negrita los nucleótidos que formarían enlaces de Reverse Hoogsteen.

ASO 2 (CTLA4): 5' **GAAGAGTGAGCAGGG** 3'

ASO 4 (Foxp3): 3' **GGGAAGGCACGAAGGGGG** 5'

Por otra parte, el 20% de supervivencia observado en el grupo de animales vacunados y tratados con ASO control podría ser debido a su potencial efecto adyuvante inmunogénico.

Tras analizar la expresión de ARNm de los genes CTLA4 y Foxp3 procedente de muestras de sangre periférica, observamos que entre los días 2 y 4 tras la implantación del tumor aparece un pico de expresión en ambos genes. Posteriormente la expresión cae y aparece otro pico el día 11. El aumento de expresión de ARNm del gen Foxp3 (día 2) tras la implantación del tumor parece ser más rápido que el de CTLA4 (día 4). Esto podría deberse a que al menos en parte la expresión del gen CTLA4 se encuentra regulada positivamente por el factor de transcripción Foxp3 (132-137), por lo que la menor expresión de Foxp3 el día 2 podría verse reflejada en la expresión de CTLA4 el día 4. Al comparar los datos de expresión de ARNm de estos genes en el grupo de animales que respondió positivamente al tratamiento, evitando el desarrollo del tumor, con el grupo de animales en los que se acabó desarrollando el tumor observamos que entre los días 4 y 8 la expresión de estos genes es mayor en el grupo de animales que no respondieron positivamente al tratamiento que en el grupo de animales que tras el tratamiento consiguió evitar el desarrollo del tumor. Estos datos están en consonancia con los de los estudios de expresión de los genes CTLA4 y Foxp3 tras implantar el tumor en ratones vacunados y tras reimplantar el tumor 4 meses después en ratones supervivientes de una vacunación. Una vez más se reafirma la idea de que la expresión temprana de los genes CTLA4 y Foxp3 está relacionada con el desarrollo del tumor.

En nuestro experimento el grupo de animales vacunado al que se le administró ASO anti-CTLA4 no obtuvo los éxitos mostrados en estudios previos en los que se combinó células B16 productoras de GM-CSF con anticuerpos anti-CTLA4 (100). Probablemente esto sea debido al diferente mecanismo de acción de estas dos estrategias de bloqueo. Recientemente un estudio llevado a cabo por Simpson (138) demostró que la depleción de Treg observada en el infiltrado tumoral tras la terapia con anti-CTLA4 es mediada principalmente

por citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). En este estudio se pone de manifiesto que la depleción de Treg en el infiltrado tumoral es debida fundamentalmente a la unión de la Fc del anticuerpo anti-CTLA4 a los FcR (especialmente al FcRIV en el ratón) y no al bloqueo de expresión en superficie de CTLA4. Los FcRIV son abundantes en los macrófagos que son las principales células responsables de la ADCC. En nuestro estudio en el grupo vacunado y tratado con ASO anti-CTLA4 se bloquea la expresión de CTLA4 pero no provoca la depleción de la célula Treg, de modo que ésta puede mediar inmunosupresión a través mecanismos alternativos a CTLA4 (139). Esto explicaría la menor respuesta antitumoral obtenida en este grupo en nuestro estudio en comparación a los resultados de otros grupos utilizando anticuerpos anti-CTLA4.

Los exitosos resultados obtenidos en el grupo de animales vacunados a los que se les administró ASO anti-Foxp3 confirman que el factor de transcripción Foxp3 es clave en la generación de la respuesta inmunosupresora mediada por las células Treg, ya que, cómo señalan otros autores, Foxp3 activa y estabiliza la expresión de los principales genes inmunosupresores cómo CTLA4, PD1 y TGF- $\beta$  (140). Además éstos resultados evidencian que el silenciamiento de Foxp3 es una prometedora estrategia para el tratamiento del cáncer. Así mismo, el bloqueo de la expresión de Foxp3 mediante ASO supone una nueva vía de tratamiento en la estrategia de bloqueo de moléculas inmunosupresoras que sería imposible de llevar a cabo mediante anticuerpos anti-Foxp3. En este sentido, existe un estudio previo que utiliza un vector lentiviral que codifica un Foxp3 shRNA que logró retrasar el crecimiento del tumor y alargar la supervivencia de los animales en un modelo de leucemia murina (141). No obstante, en nuestro estudio conseguimos mejorar esos resultados ya que logramos hasta un 40% de supervivencia de los animales con el grupo de animales vacunados a los que se les administró ASO anti-Foxp3.

Posiblemente una de las limitaciones de este estudio sea que los ASO empleados son capaces de inhibir sólo un 50% del ARNm de los genes CTLA4 y Foxp3.

En este estudio no se observaron los efectos adversos característicos del tratamiento con anticuerpos anti-CTLA4, como despigmentación, diarrea o pérdida de peso, descritos en otros estudios en los que se utilizan anticuerpos anti-CTLA4 (142, 143). En un reciente estudio que utiliza anticuerpos anti-CD25 deplecionantes de células Treg y anticuerpos anti-CTLA4 tampoco observaron estos efectos adversos (77). Probablemente esto sea debido a que únicamente se inhibe la expresión de nuevas moléculas CTLA4 pero no se bloquea las existentes con anterioridad al tratamiento, dejando intactas las Treg específicas frente a antígenos propios.

Tras estudiar las poblaciones de linfocitos Treg y CTLA4 en los animales que desarrollaron el tumor y en los que no desarrollaron el tumor observamos que hay un aumento significativo de linfocitos CD4CTLA4 en los animales que no desarrollaron el tumor con respecto a los que desarrollaron el tumor y respecto a ratones control a los que no se les implantó el tumor. Sin embargo aunque también se observa un ligero aumento en la población de linfocitos Treg (CD4CD25Foxp3) en el grupo de animales que desarrollaron el tumor, no se aprecian diferencias significativas. Posiblemente no observamos diferencias significativas en el caso de las células Treg porque en nuestro experimento las muestras de sangre procedentes de los animales no respondedores se recogían cuando la respuesta inmune supresora ya estaba totalmente instaurada (el sacrificio del animal se realiza cuando el tumor ya había alcanzado 1500mm<sup>3</sup>). Estos resultados apoyan la idea descrita por otros autores de que Foxp3 es importante sobre todo en etapas iniciales de la respuesta inmunosupresora (144).

Nuestros datos refuerzan la idea de que la falta de eficacia observada en las vacunaciones terapéuticas está relacionada principalmente con la expresión de ciertos genes inmunosupresores (73, 145) y confirma que el bloqueo de la expresión de moléculas implicadas en la respuesta inmunosupresora es una prometedora estrategia antitumoral. En este sentido, la depleción de células Treg parece ser una condición necesaria, aunque no suficiente, para el éxito de la respuesta antitumoral. Así mismo, mostramos la existencia de una relación

entre la expresión temprana de los genes CTLA4 y Foxp3 con el desarrollo del tumor y que la combinación del silenciamiento génico con la vacunación terapéutica media efectos sinérgicos antitumorales, sugiriendo que la modulación de la respuesta Treg mediante silenciamiento génico es una alternativa atractiva al uso de anticuerpos. Por último, aunque el silenciamiento de Foxp3 se presenta como un candidato de gran interés, nuevos estudios destinados a aumentar la eficacia del silenciamiento son necesarios para optimizar los resultados obtenidos en este trabajo.

## **CONCLUSIONES:**

Los resultados mostrados en este trabajo nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- Es posible desarrollar vacunas antitumorales basadas en complejos celulares de fibroblastos modificados con el gen de GM-CSF y células tumorales B16, con capacidad de producir una respuesta antitumoral en un modelo de melanoma murino, con producción de IgG específicas antitumorales.
- Para asegurar una respuesta antitumoral eficaz tras una reexposición al tumor en animales supervivientes a una vacunación es necesario administrar una dosis de vacuna de recuerdo.
- El silenciamiento génico *in vitro* con ASO 2-OMe-fosforotioatos es más eficaz que con PPRH en ausencia de vectores de transferencia génica.
- El desarrollo del tumor parece estar relacionado con el aumento de expresión del ARNm de los genes CTLA4 y Foxp3 entre los días 2 y 5 tras su implantación.
- En animales portadores de tumor, la administración de ASO frente a genes de moléculas inmunosupresoras (CTLA4 y Foxp3) aumenta la eficacia de la respuesta antitumoral de la vacunación celular terapéutica frente a melanoma murino. Sin embargo, ASO anti-Foxp3 consigue un porcentaje de supervivencia mayor.
- El silenciamiento génico es una estrategia que permite bloquear una molécula intracelular (Foxp3) que resulta imposible de bloquear mediante el empleo de anticuerpos. Y además, el éxito del tratamiento con ASO no se asocia a efectos adversos relevantes en contraposición a los observados con la utilización de anticuerpos (anti-CTLA4).

**BIBLIOGRAFIA**

- 1- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, *et al.* Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 2000 88:669-72.
- 2- Li Z, Düllmann J, Schiedlmeier B, *et al.* Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*, 2002 296:497.
- 3- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, *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.
- 4- Kustikova OS, Geiger H, Li Z, Brugman MH, *et al.* Retroviral vectors insertion sites associated with dominant hematopoietic clones mark “stemness” pathways. *Blood*, 2007 Mar 1;109(5):1897-907.
- 5- Baum C. Insertional mutagenesis in gene therapy and stem cell biology. *Curr. Opin.Hematol*, 2007 Jul;14(4):337-42.
- 6- Strauss BE, Costanzi-Strauss E. Combating oncogene activation associated with retrovirus-mediated gene therapy of X- linked severe combined immunodeficiency. *Braz J Med Biol Res.* 2007 May;40(5):601-13.
- 7- Markusic DM, Herzog RW. Liver-Directed Adeno-Associated Viral Gene Therapy for Hemophilia. *J Genet Syndr GeneTher.* 2012 Jan 18;1:1-9.
- 8- Di Matteo M, Samara-Kuko E, Ward NJ, Waddington SN, McVey JH, Chuah MK, Vanden Driessche T. Hyperactive PiggyBac Transposons for Sustained and Robust Liver-targeted Gene Therapy. *Mol Ther.* 2014 Sep;22(9):1614-24.
- 9- High KH, Nathwani A, Spencer T, Lillicrap D. Current status of haemophilia gene therapy. *Haemophilia*, 2014 May;20 Suppl 4:43-9.
- 10- Dunussi-Joannopoulos K, Dranoff G, Weinstein HJ, Ferrara JL, 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; 91:222–30.

- 11- Wang Z, Qiu SJ, Ye SL, Tang ZY, Xiao X. Combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther* 2001; 8(10):751-8.
- 12- Kang WK, Park C, Yoon HL, *et al.* Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2001; 12(6):671-84.
- 13- Borrello I, Pardoll D. GM-CSF-based cellular vaccines: a review of the clinical experience. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2002; 13:185–93.
- 14- Parney IF, Farr-Jones MA, Kane K, Chang LJ, Petruk KC. Human autologous in vitro models of glioma immune gene therapy using B7-2, GM-CSF and IL-12. *Can J Neurol Sci* 2002; 29(3):267–75.
- 15- Qiu S, Ye S, Wang Z, Tang Z, Lu L, Xiao X. Study on the effects of combined IL-12 and GM-CSF gene therapy for murine liver cancer. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2002; 10 (6):413-6.
- 16- Salgia R, Lynch T, Skarin A, *et al.* Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2003; 21(4):624-630.
- 17- 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; 10:887–97.
- 18- Soiffer R, Hodi FS, Haluska F, *et al.* Vaccination with irradiated, autologous melanoma cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by adenoviral-mediated gene transfer augments antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2003; 21(17):3343-3350.
- 19- Heinzerling L, Burg G, Dummer R, *et al.* Intratumoral injection of DNA encoding human interleukin-12 into patients with metastatic melanoma: clinical efficacy. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 35–48.
- 20- Triozzi PI, Strong TV, Bucy RP, *et al.* Intratumoral administration of a recombinant Canarypox virus expressing interleukin 12 in patients with metastatic melanoma. *Hum Gene Ther* 2005; 16(1): 91–100.

- 21- Herrero MJ, Botella R, Dasí F, Agás R, Sánchez M, Aliño SF. Antigens and cytokine genes in antitumor vaccines: the importance of the temporal delivery sequence in antitumor signals. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1091:412–24.
- 22- Chang CJ, Chen YH, Huang KW, *et al.* Combined GM-CSF and IL-12 gene therapy synergistically suppresses the growth of orthotopic liver tumors. *Hepatology* 2007; 45(3):746-54.
- 23- Daud AI, DeConti RC, Andrews S, *et al.* Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5896–903.
- 24- Choi KJ, Zhang SN, Choi IK, Kim JS, Yun CO. Strengthening of antitumor immune memory and prevention of thymic atrophy mediated by adenovirus expressing IL-12 and GM-CSF. *Gene Ther* 2012; 19(7):711-23.
- 25- Määttä AM, Samaranayake H, Pikkarainen J, Wirth T, Ylä-Herttua S. Adenovirus mediated herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir gene therapy for resectable malignant glioma. *Curr Gene Ther.* 2009 Oct;9(5):356-67.
- 26- Higashi K, Hazama S, Araki A, Yoshimura K, Iizuka N, Yoshino S, Noma T, Oka M. A novel cancer vaccine strategy with combined IL-18 and HSV-TK gene therapy driven by the hTERT promoter in a murine colorectal cancer model. *Int J Oncol.* 2014 Oct;45(4):1412-20.
- 27- Xiao X, Jin R, Li J, Bei Y, Wei T. The Antitumor Effect of Suicide Gene Therapy Using Bifidobacterium infantis-mediated Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase/Ganciclovir in a Nude Mice Model of Renal Cell Carcinoma. *Urology.* 2014 Oct;84(4):982.e15-20.
- 28- Zakaria MK, Khan I, Mani P, Chattopadhyay P, Sarkar DP, Sinha S. Combination of hepatocyte specific delivery and transformation dependent expression of shRNA inducing transcriptional gene silencing of c-Myc promoter in hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer.* 2014 Aug 10;14(1):582.

- 29- Yan R, Hallam A, Stockley PG, Boyes J. Oncogene dependency and the potential of targeted RNAi-based anti-cancer therapy. *Biochem J.* 2014 Jul 1;461(1):1-13.
- 30- Metz R, DiCola M, Kurihara T, Bailey A, Frank B, Roecklein B, Blaese M. Mode of action of RNA/DNA oligonucleotides: progress in the development of gene repair as a therapy for alpha (1)-antitrypsin deficiency. *Chest.* 2002 Mar;121(3 Suppl):91S-97S.
- 31- Yusa K, Rashid ST, Strick-Marchand H, *et al.* Targeted gene correction of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011 Oct 12;478(7369):391-4.
- 32- Yusa K. Seamless genome editing in human pluripotent stem cells using custom endonuclease-based gene targeting and the piggyBac transposon. *Nat Protoc.* 2013 Oct;8(10):2061-78.
- 33- Nakase M, Inui M, Okumura K, Kamei T, Nakamura S, Tagawa T. p53 gene therapy of human osteosarcoma using a transferrin-modified cationic liposome. *Mol Cancer Ther.* 2005 Apr;4(4):625-31.
- 34- Kim SS, Rait A, Kim E, Pirolo KF, Nishida M, Farkas N, Dagata JA, Chang EH. A nanoparticle carrying the p53 gene targets tumors including cancer stem cells, sensitizes glioblastoma to chemotherapy and improves survival. *ACS Nano.* 2014 Jun 24;8(6):5494-514.
- 35- Rejeeth C, Kannan S. p53 gene therapy of human breast carcinoma: using a transferrin-modified silica nanoparticles. *Breast Cancer.* 2014 May 4.
- 36- Woller N, Gürlevik E, Ureche CI, Schumacher A, Kühnel F. Oncolytic viruses as anticancer vaccines. *Front Oncol.* 2014 Jul 21;4:188.
- 37- Chiocca EA, Rabkin SD. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res.* 2014 Apr;2(4):295-300.
- 38- Ramírez M, García-Castro J, Alemany R. Oncolytic virotherapy for neuroblastoma. *Discov Med.* 2010 Nov;10(54):387-93.
- 39- Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366:2443-54.
- 40- Sznol M, Kluger H, Hodi F, *et al.* Survival and long-term follow up of safety and response in patients (pts) with advanced melanoma (MEL) in a

- phase I trial of nivolumab (anti-Pd-1; BMS-936558; ONO-4538). *J Clin Oncol*. 2013;31 (Suppl 15):Abstr 9006.
- 41- Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, *et al*. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2013;369:122-33.
- 42- Ribas A, Robert C, Daud A, *et al*. Clinical efficacy and safety of lambrolizumab (MK-3475, Anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(Suppl 15): Abstr 9010.
- 43- Mamalis A, Garcha M, Jagdeo J. Targeting the PD-1 pathway: a promising future for the treatment of melanoma. *Arch Dermatol Res*. 2014 Aug;306(6):511-9.
- 44- Gunturi A, McDermott DF. Potential of new therapies like anti-PD1 in kidney cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2014 Mar;15(1):137-46.
- 45- Tykodi SS. PD-1 as an emerging therapeutic target in renal cell carcinoma: current evidence. *Onco Targets Ther*. 2014 Jul 25;7:1349-59.
- 46- Bachy E, Coiffier B. Anti-PD1 antibody: a new approach to treatment of lymphomas. *Lancet Oncol*. 2014 Jan;15(1):7-8.
- 47- Robert C, Ribas A, Wolchok JD, *et al*. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*. 2014 Sep 20;384(9948):1109-17.
- 48- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, *et al*. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine* vol. 363, no. 8, pp. 711 -723, 2010.
- 49- C. Robert, L. Thomas, I. Bondarenko *et al*. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2517-26.
- 50- Miguel A, Herrero MJ, Sendra L, Botella R, Algás R, Sánchez M, Aliño SF. Comparative antitumor effect of preventive versus therapeutic vaccines employing B16 melanoma cells genetically modified to express GM-CSF and B7.2 in a murine model. *Toxins* 2012, 4,1058–1081.
- 51- Miguel, A.; Herrero, M.J.; Sendra, L.; Botella, R.; Algás, R.; Sánchez, M.; Aliño, S.F. Comparative antitumor effect among GM-CSF, IL-12 and GM-

CSF+IL-12 genetically modified tumor cell vaccines. *Cancer Gene Ther.* 2013, 20, 576–581.

52- Nagai H, Oniki S, Fujiwara S, Yoshimoto T, Nishigori C. Antimelanoma immunotherapy: clinical and preclinical applications of IL-12 family members. *Immunotherapy* 2010; 2: 697–709.

53- Sangro B, Melero I, Qian C, Prieto J. Gene therapy of cancer based on interleukin12. *Curr Gene Ther.* 2005; 5: 573–581.

54- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, *et al*; IMPACT Study Investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010 Jul 29;363(5):411-22.

55- Novaković S1, Stegel V, Kopitar A, Ihan A, Novaković BJ. Preventive and therapeutic antitumor effect of tumor vaccine composed of CpG ODN class C and irradiated tumor cells is triggered through the APCs and activation of CTLs. *Vaccine.* 2007 Nov 28;25(49):8241-56.

56- Tong X, Wang L, Liu Y, Qi Y, Qin Y, Xu Y, Tong T. The complete preventive effect of homologous tumor vaccines-based on a 5-year experimental study in mice. *Biomed Pharmacother.* 2010 Nov;64(9):605-8.

57- Guo C, Manjili MH, Subjeck JR, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res.* 2013;119:421-75.

58- Reilly RT, Emens LA, Jaffee EM. Humoral and cellular immune responses: independent forces or collaborators in the fight against cancer? *Curr Opin Investig Drugs.* 2001 Jan;2(1):133-5.

59- Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:305-34.

60- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 2000 Jul 17;192(2):303-10.

61- Nakaseko C, Miyatake S, Iida T, Hara S, Abe R, Ohno H, Saito Y, Saito T. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) engagement delivers an inhibitory signal through the membrane-proximal region in the absence of the tyrosine motif in the cytoplasmic tail. *J. Exp. Med.* 1999 Sep 20;190(6):765-74.

- 62- Ise W, Kohyama M, Nutsch KM, Lee HM, Suri A, Unanue ER, Murphy TL, Murphy KM. CTLA-4 suppresses the pathogenicity of self antigen-specific T cells by cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Nat. Immunol.* 2010 Feb;11(2):129-35.
- 63- Carreno BM1, Bennett F, Chau TA, Ling V, Luxenberg D, Jussif J, Baroja ML, Madrenas J. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J. Immunol.* 2000 Aug 1;165(3):1352-6.
- 64- Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, *et al.* Transendocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science.* 2011 Apr 29;332(6029):600-3.
- 65- Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 2011; 331: 1565-1570.
- 66- Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 2005 Apr;5(4):263-74.
- 67- Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30:531–564.
- 68- Moret-Tatay I, Sanmartin I, Marco FM, Díaz J, Aliño SF. Non viral therapeutic cell vaccine mediates potent antitumor effects. *Vaccine.* 2006 May 1;24(18):3937-45.
- 69- Wolchok JD, Saenger Y. The mechanism of anti-CTLA-4 activity and the negative regulation of T-cell activation. *Oncologist.* 2008;13 Suppl 4:2–9.
- 70- Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, Damle NK. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med.* 1992 Dec 1;176(6):1595-604.
- 71- O'Day SJ, Hamid O, Urba WJ. Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA4) a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies. *Cancer.* 2007; 110: 2614 -2627.
- 72- Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB, Bluestone JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994 Aug;1(5):405-13.

- 73- Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252-64.
- 74- Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr. Opin.Immunol*. 2006 Apr;18(2):206-13.
- 75- Wang XY, Zuo D, Sarkar D, Fisher PB. Blockade of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 as a new therapeutic approach for advanced melanoma. *Expert Opin Pharmacother*. 2011 Dec;12(17):2695-706.
- 76- Juang CM, Hung CF, Yeh JY, *et al*. Regulatory T cells: potential target in anticancer immunotherapy. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007 Sep;46(3):215-21.
- 77- Klyushnenkova EN, Riabov VB, Kouivaskaia DV, Wietsma A, Zhan M, Alexander RB. Breaking immune tolerance by targeting CD25+ regulatory T cells is essential for the anti-tumor effect of the CTLA-4 blockade in an HLA-DR transgenic mouse model of prostate cancer. *Prostate*. 2014 Oct;74(14):1423-32.
- 78- Saha A, Chatterjee SK. Combination of CTL-associated antigen-4 blockade and depletion of CD25 regulatory T cells enhance tumour immunity of dendritic cell-based vaccine in a mouse model of colon cancer. *Scand J Immunol*. 2010 Feb;71(2):70-82.
- 79- Iversen PL, Arora V, Acker AJ, Mason DH, Devi GR. Efficacy of antisense morpholino oligomer targeted to c-myc in prostate cancer xenograft murine model and a phase I safety study in humans. *Clin. Cancer Res*. 2003; 9: 2510–19.
- 80- Lee Y, Vassilakos A, Feng N *et al*. GTI-2040, an antisense agent targeting the small subunit component (R2) of human ribonucleotide reductase, shows potent antitumor activity against a variety of tumors. *Cancer Res*. 2003; 63: 2802–11.
- 81- Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modification. *Eur J Biochem*. 2003; 270: 1628–44.
- 82- O'Brien SM, Cunningham CC, Golenkov AK, Turkina AG, Novick SC, Rai KR. Phase I to II multicenter study of oblimersen sodium, a bcl-2 antisense

- oligonucleotide, in patients with advanced chronic lymphocyte leukemia. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 7697–702.
- 83- Desai AA, Schilsky RL, Young A, *et al.* A phase I study of antisense oligonucleotide GTI-2040 given by continuous intravenous infusion in patients with advanced solid tumors. *J Oncol.* 2005; 16: 958–65.
- 84- Chi KN, Eisenhauer E, Fazli L, *et al.* A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of OGX-011, a 2 $\phi$ -methoxyethyl antisense oligonucleotide to clusterin, in patients with localized prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97:1287–96.
- 85- Schlingensiepen KH, Schlingensiepen R, Steinbrecher A, *et al.* Targeted tumor therapy with the TGF-b2 antisense compound AP 12009. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006; 17: 129–39.
- 86- Bogdahn U, Hau P, Stockhammer G, *et al.* Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF-beta2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro Oncol.* 2011 Jan;13(1):132-42.
- 87- Erba HP, Sayar H, Juckett M, *et al.* Safety and pharmacokinetics of the antisense oligonucleotide (ASO) LY2181308 as a single-agent or in combination with idarubicin and cytarabine in patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia (AML). *Invest New Drugs.* 2013 Aug;31(4):1023-34.
- 88- Tanioka M, Nokihara H, Yamamoto N, *et al.* Phase I study of LY2181308, an antisense oligonucleotide against survivin, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Aug;68(2):505-11.
- 89- The Vitravene Study Group. A randomized controlled clinical trial of intravitreal fomivirsen for treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *Am J Ophthalmol.* 2002; 133: 467–74.
- 90- Hovingh K, Besseling J, Kastelein J. Efficacy and safety of mipomersen sodium (Kynamro). *Expert Opin Drug Saf.* 2013 Jul;12(4):569-79.
- 91- de Almagro MC, Coma S, Noé V, Ciudad CJ. Polypurine Hairpins Directed against the Template Strand of DNA Knock Down the Expression of Mammalian Genes. *J Biol Chem.* 2009 Apr 24;284(17):11579-89.

- 92- de Almagro MC, Mencia N, Noé V, Ciudad CJ. Coding polypurine hairpins cause target-induced cell death in breast cancer cells. *Hum Gene Ther.* 2011 Apr;22(4):451-63.
- 93- Rodríguez L, Villalobos X, Dakhel S, Padilla L, Hervas R, Hernández JL, Ciudad CJ, Noé V. Polypurine reverse Hoogsteen hairpins as a gene therapy tool against survivin in human prostate cancer PC3 cells in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol.* 2013 Dec 1;86(11):1541-54.
- 94- Villalobos X, Rodríguez L, Prévot J, Oleaga C, Ciudad CJ, Noé V. Stability and immunogenicity properties of the gene-silencing polypurine reverse Hoogsteen hairpins. *Mol Pharm.* 2014 Jan 6;11(1):254-64.
- 95- Mitsuyasu RT, Merigan TC, Carr A, *et al.* Phase 2 gene therapy trial of an anti-HIV ribozyme in autologous CD34+ cells. *Nat Med.* 2009 Mar;15(3):285-92.
- 96- Cho EA, Moloney FJ, Cai H, *et al.* Safety and tolerability of an intratumorally injected DNAzyme, Dz13, in patients with nodular basal-cell carcinoma: a phase 1 first-in-human trial (DISCOVER). *Lancet.* 2013 May 25;381(9880):1835-43.
- 97- Coelho T, Adams D, Silva A, *et al.* Safety and efficacy of RNAi therapy for transthyretin amyloidosis. *N Engl J Med.* 2013 Aug 29;369(9):819-29.
- 98- Moreno-Montañés J, Sádaba B, Ruz V, Gómez-Guiu A, Zarranz J, González MV, Pañeda C, Jimenez AI. Phase I clinical trial of SYL040012, a small interfering RNA targeting  $\beta$ -adrenergic receptor 2, for lowering intraocular pressure. *Mol Ther.* 2014 Jan;22(1):226-32.
- 99- Fitzgerald K, Frank-Kamenetsky M, Shulga-Morskaya S, *et al.* Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet.* 2014 Jan 4;383(9911):60-8.
- 100- van Elsas A, Hurwitz AA, Allison JP. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors

- accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med.* 1999 Aug 2;190(3):355-66.
- 101- Bramhall RJ, Mahady K, Peach AH. Spontaneous regression of metastatic melanoma-clinical evidence of the abscopal effect. *Eur J SurgOncol.* 2014 Jan;40(1):34-41.
- 102- Emanuel PO, Mannion M, Phelps RG. Complete regression of primary malignant melanoma. *Am J Dermatopathol.* 2008 Apr;30(2):178-81.
- 103- Maio M. Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Ann Oncol.* 2012 Sep;23Suppl 8:viii10-4.
- 104- Botella-Estrada R, Malet G, Revert F, Dasí F, Crespo A, Sanmartín O, Guillén C, Aliño SF. Antitumor effect of B16 melanoma cells genetically modified with the angiogenesis inhibitor RNasin. *Cancer Gene Ther.* 2001 Apr;8(4):278-84.
- 105- Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem.* 1981, 25, 1604-1607.
- 106- Avigan DE, Vasir B, George DJ, *et al.* Phase I/II study of vaccination with electrofused allogeneic dendritic cells/autologous tumor-derived cells in patients with stage IV renal cell carcinoma. *J Immunother.* 2007 Oct;30(7):749-61.
- 107- Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, Milling A, Thiemann M, Sherev T, Sparbier K, Sterry W, Walden P. Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor-specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients. *Int J Cancer* 2004 Jul 10;110(5):730-40.
- 108- Zhou J, Weng D, Zhou F, *et al.* Patient-derived renal cell carcinoma cells fused with allogeneic dendritic cells elicit anti-tumor activity: in vitro results and clinical responses. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 Oct;58(10):1587-97.
- 109- Wei YC, Sticca RP, Li J, *et al.* Combined treatment of dendritoma vaccine and low-dose interleukin-2 in stage IV renal cell carcinoma patients induced clinical response: A pilot study. *Oncol Rep* 2007. Sep;18(3):665-71.

- 110- Avigan D, Vasir B, Gong J, *et al.* Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. *Clin Cancer Res.* 2004 Jul 15;10(14):4699-708.
- 111- Phan V, Errington F, Cheong SC, *et al.* A new genetic method to generate and isolate small, short-lived but highly potent dendritic cell-tumor cell hybrid vaccines. *Nat Med.* 2003 Sep;9(9):1215-9.
- 112- Linardakis E, Bateman A, Phan V, *et al.* Enhancing the efficacy of a weak allogeneic melanoma vaccine by viral fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumor cell-tumor cell fusion. *Cancer Res.* 2002 Oct 1;62(19):5495-504.
- 113- Veelken H, Mackensen A, Lahn M, *et al.* A phase-I clinical study of autologous tumor cells plus interleukin-2-gene-transfected allogeneic fibroblasts as a vaccine in patients with cancer. *Int J Cancer.* Jan 27;70(3):269-77.
- 114- Okada H, Lieberman FS, Walter KA, *et al.* Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas. *J Transl Med.* 2007 Dec 19;5:67.
- 115- Okada H, Lieberman FS, Edington HD, Witham TF, Wargo MJ, Cai Q, Elder EH, Whiteside TL, Schold SC Jr, Pollack IF. Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of recurrent glioblastoma: preliminary observations in a patient with a favorable response to therapy. *J Neurooncol.* 2003 Aug-Sep;64(1-2):13-20.
- 116- Sobol RE, Shawler DL, Carson C, *et al.* Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a Phase I study. *Clin Cancer Res.* 1999 Sep;5(9):2359-65.
- 117- Hansson L, Abdalla AO, Moshfegh A, Choudhury A, Rabbani H, Nilsson B, Osterborg A, Mellstedt H. Long-term idiotype vaccination combined with interleukin-12 (IL-12), or IL-12 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor, in early-stage multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res.* 2007 Mar 1;13(5):1503-10.

- 118- Aruga A, Tanigawa K, Aruga E, Yu H, Chang AE. Enhanced adjuvant effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-12 compared with either alone in vaccine-induced tumor immunity. *Cancer Gene Ther.* 1999 Jan-Feb;6(1):89-95.
- 119- Herrero MJ. Terapia génica antitumoral mediante vacunas con células modificadas genéticamente. Tesis doctoral 2008.
- 120- 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 Res.* 2004, 64, 6337–6343.
- 121- Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, *et al.* Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 8;106(49):20847-52.
- 122- Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jul;1832(7):1070-8.
- 123- Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, *et al.* Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 95-106.
- 124- Cranmer LD, Hersh E. The role of the CTLA4 blockade in the treatment of malignant melanoma. *Cancer Invest.* 2007; 25: 613-631.
- 125- Ribas A, Hanson DC, Noe DA, *et al.* Tremelimumab (CP-675,206), a cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 blocking monoclonal antibody in clinical development for patients with cancer. *Oncologist.* 2007;12: 873 -883.
- 126- Santegoets SJ, Stam AG, Loughheed SM, *et al.* T cell profiling reveals high CD4+CTLA-4 + T cell frequency as dominant predictor for survival after prostate GVAX/ipilimumab treatment. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 Feb;62(2):245-56.
- 127- Ward AJ, Norrbom M, Chun S, Bennett CF, Rigo F. Nonsense-mediated decay as a terminating mechanism for antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(9):5871-9.
- 128- Burdick AD, Sciabola S, Mantena SR, *et al.* Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid--modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2014 Apr;42(8):4882-91.

129- Yang B, Yu RL, Tuo S, Tuo CW, Liu QZ, Zhang N, Lu XC, Chi XH, Lv SB, Cai LL. Antisense oligonucleotide against hTERT (Cantide) inhibits tumor growth in an orthotopic primary hepatic lymphoma mouse model. *PLoS One*. 2012;7(7):e41467.

130- Heemskerk H, de Winter C, van Kuik P, *et al*. Preclinical PK and PD studies on 2'-O-methyl-phosphorothioate RNA antisense oligonucleotides in the mdx mouse model. *Mol Ther*. 2010 Jun;18(6):1210-7.

131- Zhang HH, Fei R, Xie XW, Wang L, Luo H, Wang XY, Wei L, Chen HS. Specific suppression in regulatory T cells by Foxp3 siRNA contributes to enhance the in vitro anti-tumor immune response in hepatocellular carcinoma patients. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2009 Jun 18;41(3):313-8.

132- Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 2007 Feb 15;445(7129):771-5.

133- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

134- Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):931-5.

135- Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):936-40.

136- Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, Miyachi Y, Tsukada T, Sakaguchi S. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*. 2007 Apr 5;446(7136):685-9.

137- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3 regulatory T cell function. *Science*. 2008 Oct 10;322(5899):271-5.

138- Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, *et al*. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med*. 2013;210: 1695–1710.

- 139- 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. *JExp Med.* 2001;194:823–832.
- 140- Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, *et al.* FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell.* 2006; 126:375–387.
- 141- Tsai BY, Suen JL, Chiang BL. Lentiviral-mediated Foxp3 RNAi suppresses tumor growth of regulatory T cell-like leukemia in a murine tumor model. *Gene Ther.* 2010 Aug;17(8):972-9.
- 142- Gregor PD, Wolchok JD, Ferrone CR, *et al.* CTLA-4 blockade in combination with xenogeneic DNA vaccines enhances T-cell responses, tumor immunity and autoimmunity to self antigens in animal and cellular model systems. *Vaccine.* 2004;22:1700–1708.
- 143- Phan GQ, Yang JC, Sherry RM, *et al.* Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8372–8377.
- 144- Zheng Y, Manzotti CN, Burke F, Dussably L, Qureshi O, Walker LS, Sansom DM. Acquisition of suppressive function by activated human CD4 CD25–T cells is associated with the expression of CTLA-4 not FoxP3. *J. Immunol.* 2008 Aug 1;181(3):1683-91.
- 145- Mocellin S, Nitti D. Therapeutics targeting tumor immune escape: towards the development of new generation anticancer vaccines. *Med Res Rev.* 2008 May;28(3):413-44.