

VACUNAS INDIVIDUALIZADAS PARA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE CÁNCER

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 **[001]** Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de Estados Unidos núm. de serie 62/955,684, presentada el 31 de diciembre de 2019, el contenido completo de la cual se incorpora en la presente por referencia.

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

10 **[002]** La presente invención se refiere en general al campo de inmunización de cuerpo apoptótico tumoral (TABI) y más particularmente, a composiciones y métodos para desarrollar y usar vacunas individualizadas para prevención y tratamiento de cáncer.

DECLARACIÓN DE INVESTIGACIÓN FINANCIADA FEDERALMENTE

[003] No se usaron fondos federales/gubernamentales para desarrollar esta invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 **[004]** Sin limitar el alcance de la invención, sus antecedentes se describen en relación con la elaboración y uso de cuerpos apoptóticos tumorales.

20 **[005]** Un ejemplo se enseña en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2018/0125956, presentada por Fucikova, et al., titulada "Cryopreservation Of Apoptotic Cancer Cells For Use In Immunotherapy Against Cancer". Se dice que estos solicitantes enseñan un método para preparar una vacuna potente útil para inmunoterapia al criopreservar una población de células que se someten a muerte celular inmunogénica y al usar estas células para activar células dendríticas para uso en inmunoterapia. En un ejemplo, el método usa células cancerosas de criopreservación que se someten a muerte celular, que se usan para preparar una composición farmacéutica para inmunoterapia contra cáncer.

25 **[006]** Otro ejemplo se enseña en la publicación de patente internacional W099/58645, presentada por Gregoire y Bartholeyns, titulada "New apoptotic bodies, monocyte derived cells containing the same, a process for their preparation and their uses as vaccines". Se dice que estos solicitantes enseñan cuerpos apoptóticos derivados de células tumorales humanas o líneas de células recuperadas de biopsia tumoral de un paciente e inducidas a apoptosis, en las cuales los cuerpos apoptóticos tienen las siguientes características: mantienen la integridad de membrana plasmática; son vesículas por arriba de aproximadamente 0.1 μm ; tienen mitocondrias intactas y ADN nuclear escindido que se origina en las células tumorales; presentan antígenos tumorales no enmascarados en sus membranas; y presentan antígenos de MHC y tumorales específicos del paciente.

30 **[007]** Sin embargo, otros expertos han encontrado que los cuerpos apoptóticos tumorales inhiben respuestas inmunitarias. Xie, et al., en un artículo titulado, "Tumor Apoptotic Bodies Inhibit CTL

Responses and Antitumor Immunity via Membrane-Bound Transforming Growth Factor-B1 Inducing CD8⁺ T-Cell Anergy and CD4⁺ Tr1 Cell Responses”, Cancer Res 2009; 69: (19). 1 de octubre de 2009, descubrió que los cuerpos apoptóticos tumorales fueron tolerogénicos y capaces de suprimir respuestas CTL CD8⁺ estimuladas por antígeno e inmunidad antitumoral mediante su inducción de anergia de células T CD8⁺ y respuestas de células T 1 CD4⁺ reguladoras tipo.

[008] Por lo tanto, no está claro a partir de la técnica cómo elaborar cuerpos apoptóticos tumorales que se pueden usar para estimular la respuesta inmunitaria. Lo que se necesita son nuevos métodos y composiciones que superen los problemas conocidos con la técnica anterior.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[009] En una modalidad, la presente invención incluye un método para preparar cuerpos apoptóticos a partir de un espécimen o biopsia tumoral, que comprende: obtener células tumorales humanas de un sujeto; inducir la apoptosis de las células tumorales humanas con un fármaco o un tratamiento físico; y recolectar cuerpos apoptóticos de las células tumorales humanas apoptóticas al: centrifugar a una baja velocidad para formar un sedimento y un sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; recolectar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; y centrifugar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad a una alta velocidad para formar un sedimento de centrifugación a alta velocidad y un sobrenadante de centrifugación a alta velocidad; y aislar el sedimento de centrifugación a alta velocidad, en donde una composición inmunogénica comprende cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi) tratados con fármacos que tienen una pureza de al menos 82 a 100 por ciento, y en donde los TABi se obtienen en menos de 2 horas. En un aspecto, el paso de centrifugación a baja velocidad se repite antes del paso de centrifugación a alta velocidad. En otro aspecto, el paso de inducción de apoptosis es con más de un fármaco dirigido a ese tipo de célula tumoral humana. En otro aspecto, el método comprende además el paso de obtener las células tumorales humanas que seleccionan el o los tratamientos físicos o fármaco para elaborar TABi específicos de sujeto, medir la proliferación de cTL *in vitro* a los TABi específicos de sujeto y entonces proporcionar los TABi específicos de sujeto al sujeto dependiendo de la proliferación de cTL medida. En otro aspecto, el paso de centrifugación a baja velocidad es menor de 100 g, o entre 25 y 75 g. En otro aspecto, el paso de centrifugación a alta velocidad es mayor de 1,500 g, o entre 1,750 y 10,000 g. En otro aspecto, el método no incluye un paso de centrifugación a velocidad media, en donde la centrifugación a velocidad media es entre 100 y 1,500 g. En otro aspecto, las células tumorales humanas son de un tumor líquido o sólido. En otro aspecto, las células tumorales humanas se obtienen de pulmón, mama, cuello uterino, ovario, esófago, colon, recto, neural, glioma, próstata, vejiga, hueso, páncreas, hígado, ovario, testículo, útero, placenta, cerebro, cartílago, músculo liso, músculo estriado, tejido fibroso, vaso sanguíneo, vaso linfático, ganglio linfático, tejido adiposo, riñón, glándula pituitaria, paratiroides, tiroides, bronquial, suprarrenal, estómago, intestino

grueso, intestino delgado, piel, adenomas, sarcomas, carcinomas, leucemias, linfomas, mieloma múltiple o blastomas, o una combinación de cualquiera de lo mismo. En otro aspecto, los TABI son ToPro-3 y anexina-V positivos, y después del paso de aislamiento comprenden más de 82% de las células totales. En otro aspecto, los TABI son autólogos, alogénicos o xenogénicos. En otro aspecto, el fármaco usado para tratar las células tumorales se selecciona de un agente antimetabolito, agente alquilante o tipo alquilante, agente de intercalación, inhibidor de topoisomerasa I o II, agente antimitótico, inhibidor de cinasa, inhibidor de proteasoma, inhibidores de Bcl-2, agentes de quimioterapia, anticuerpos monoclonales, productos biológicos, productos terapéuticos dirigidos. Algunos ejemplos específicos de agentes incluyen derivados de butirato, estaurosporina, derivados de sulindaco, citocinas inflamatorias, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, pemetrexed, metotrexato, edatrexato, hidroxiaurea, fludarabina, mercaptopurina, mostazas de nitrógeno (mecloreteamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y clorambucilo), aziridinas (tiotepa), nitrosoureas (carmustina, lomustina, semustina), triazenos (dacarbazina y temozolomida) y derivados de platino (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino y satraplatino), doxorubicina, epirubicina, idarubicina, nemorubicina, mitoxantrona, etopósido, tenipósido, paclitaxel, docetaxel, ixabepilona, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, sorafenib, dasatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib, imatinib, nilotinib, lapatinib, ibrutinib, acalabrutinib, bevacizumab (anticuerpo contra factor de crecimiento endotelial vascular), cetuximab, panitumumab, matuzumab, nimotuzumab (anticuerpos contra receptor de factor de crecimiento epidérmico), trastuzumab, pertuzumab (anticuerpos contra ErbB2), daratumumab (anticuerpo contra CD38), inhibidores anti-CD20 (rituximab, obinutuzumab, ofatumumab), topotecán, SN-38, CPT11, 9-nitrocamptotecina o análogos de nucleósidos antineoplásicos. En otro aspecto, el tratamiento físico para inducir la apoptosis es por un método físico seleccionado de: ionización, irradiación γ , irradiación UV, choque térmico, estrés, privación de suero o una combinación de los mismos. En otro aspecto, los TABI se liofilizan. En otro aspecto, los TABI se almacenan criogénicamente en una solución acuosa que comprende HEPES, NaCl, KCl, MgCl, suero autólogo libre de vesícula y trehalosa, ajustado a pH 7.4.

[0010] En una modalidad, la presente invención incluye una composición de inmunización de cuerpo apoptótico tumoral (TABI) inmunogénico elaborada por un método que comprende: obtener células tumorales humanas de un sujeto; inducir la apoptosis de las células tumorales humanas con un fármaco o un tratamiento físico; y recolectar cuerpos apoptóticos de las células tumorales humanas apoptóticas al: centrifugar a baja velocidad para formar un sedimento y un sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; recolectar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; y centrifugar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad a una alta velocidad para formar un sedimento de centrifugación a alta velocidad y un sobrenadante de centrifugación a alta velocidad; y aislar un sedimento después de la centrifugación a alta velocidad, en donde el sedimento comprende cuerpos apoptóticos tumorales

inmunogénicos (TABi) que tienen una pureza de al menos 82 por ciento, y en donde los TABi se obtienen en menos de 2 horas. En un aspecto, el paso de centrifugación a baja velocidad se repite antes del paso de centrifugación a alta velocidad. En otro aspecto, el paso de inducción de apoptosis es con más de un fármaco dirigido a ese tipo de célula tumoral humana. En otro aspecto, el paso de centrifugación a baja

5 velocidad es menor de 100 g, o entre 25 y 75 g. En otro aspecto, el paso de centrifugación a alta velocidad es mayor de 1,500 g, o entre 1,750 y 10,000 g. En otro aspecto, el método no incluye un paso de centrifugación a velocidad media, en donde la centrifugación a velocidad media es entre 100 y 1,500 g. En otro aspecto, las células tumorales humanas son de un tumor líquido o sólido. En otro aspecto, las células tumorales humanas se obtienen de pulmón, mama, cuello uterino, ovario, esófago, colon, recto,

10 neural, glioma, próstata, vejiga, hueso, páncreas, hígado, ovario, testículo, útero, placenta, cerebro, cartílago, músculo liso, músculo estriado, tejido fibroso, vaso sanguíneo, vaso linfático, ganglio linfático, tejido adiposo, riñón, glándula pituitaria, paratiroides, tiroides, bronquial, suprarrenal, estómago, intestino grueso, intestino delgado, piel, adenomas, sarcomas, carcinomas, leucemias, linfomas, mieloma múltiple o blastomas, o una combinación de cualquiera de lo mismo. En otro aspecto, los TABi son

15 ToPro-3 y anexina-V positivos, y después del paso de aislamiento comprenden más de 82% de las células totales. En otro aspecto, los TABi o los TABI son autólogos, alogénicos o xenogénicos. En otro aspecto, los agentes usados para tratar las células tumorales se seleccionan de un agente antimetabolito, agente alquilante o tipo alquilante, agente de intercalación, inhibidor de topoisomerasa I o II, agente antimitótico, inhibidor de cinasa, inhibidor de proteasoma, inhibidores de Bcl-2, agentes de

20 quimioterapia, anticuerpos monoclonales, productos biológicos, terapias dirigidas, por ejemplo, derivados de butirato, estaurosporina, derivados de sulindaco, citocinas inflamatorias, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, pemetrexed, metotrexato, pemetrexed, metotrexato, edatrexato, hidroxiurea, fludarabina, mercaptopurina, mostazas de nitrógeno (mecloretoxina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y clorambucilo), aziridinas (tiotepa), nitrosoureas (carmustina, lomustina, semustina), triazenos

25 (dacarbazina y temozolomida) y derivados de platino (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino y satraplatino), doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, nemorubicina, mitoxantrona, etopósido, tenipósido, paclitaxel, docetaxel, ixabepilona, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, sorafenib, dasatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib, imatinib, nilotinib lapatinib, ibrutinib, acalabrutinib, bevacizumab (anticuerpo contra factor de crecimiento endotelial vascular) , cetuximab, panitumumab, matuzumab,

30 nimotuzumab (anticuerpos contra receptor de factor de crecimiento epidérmico), trastuzumab, pertuzumab (anticuerpos contra ErbB2), daratumumab (anticuerpo contra CD38), inhibidores anti-CD20 (rituximab, obinutuzumab, ofatumumab), toptotecán, SN-38, CPT11, 9-nitrocamptotecina o análogos de nucleósidos antineoplásicos. En otro aspecto, el tratamiento físico para inducir la apoptosis es por un método físico seleccionado de: ionización, irradiación y, irradiación UV, choque térmico, estrés, privación

de suero o una combinación de los mismos. En otro aspecto, los TABi o los TABI se liofilizan. En otro aspecto, los TABi se almacenan criogénicamente en una solución acuosa que comprende HEPES, NaCl, KCl, MgCl, suero autólogo libre de vesícula y trehalosa, ajustado a pH 7.4. En otro aspecto, el método comprende además el paso de obtener las células tumorales humanas que seleccionan el o los tratamientos físicos o fármaco para elaborar TABi específicos de sujeto, medir la proliferación de cTL *in vitro* a los TABi específicos de sujeto y entonces proporcionar los TABi específicos de sujeto al sujeto dependiendo de la proliferación de cTL medida.

[0011] Un método para preparar cuerpos apoptóticos a partir de una biopsia tumoral, que comprende: obtener células tumorales humanas de un sujeto; inducir la apoptosis de las células tumorales humanas con un fármaco o un tratamiento físico; y recolectar cuerpos apoptóticos de las células tumorales humanas apoptóticas al: centrifugar a una baja velocidad de menos de o igual a 100 g para formar un sedimento y un sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; recolectar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; y centrifugar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad a una alta velocidad de más de 1,500 g para formar un sedimento de centrifugación a alta velocidad y un sobrenadante de centrifugación a alta velocidad; y aislar el sedimento de centrifugación a alta velocidad, en donde una composición inmunogénica comprende cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi) tratados con fármacos que tienen una pureza de al menos 82 a 100 por ciento, y en donde los TABi se obtienen en menos de 2 horas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0012] Para un entendimiento más completo de las características y ventajas de la presente invención, ahora se hace referencia a la descripción detallada de la invención junto con las figuras anexas y en las cuales:

[0013] La figura 1 muestra los pasos básicos para preparar los cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi) de la presente invención.

[0014] La figura 2 muestra tres diagramas de flujo que comparan la presente invención (diagrama de flujo medio) de métodos de la técnica anterior (diagramas de flujo izquierdo y derecho).

[0015] La figura 3 muestra resultados de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que comparan los resultados usando los métodos de la técnica anterior (izquierda y derecha), con la presente invención en el medio.

[0016] La figura 4 muestra los resultados de FACS del uso del método de la presente invención para seleccionar TABi inmunogénicos, después de la verificación de pureza de clasificación usando un citómetro de flujo.

[0017] Las figuras 5A a 5C muestran resultados de FACS de los TABi derivados bajo diferentes condiciones de tratamiento.

[0018] Las figuras 6A a 6C muestran la generación y propiedades inmunogénicas de los cuerpos apoptóticos tumorales (TABi) de la presente invención.

[0019] La figura 7 muestra la cuantificación de la proliferación de CTL después de pulsación con los TABi de autólogos de paciente de la presente invención.

5 **[0020]** La figura 8 muestra que las células T CD8+ cebadas con TABi de pacientes con CLL inducen la lisis específica robusta de células tumorales de CLL autólogas.

[0021] La figura 9 muestra las estrategias de sincronización para caracterización del contenido de ADN de los TABi de la presente invención.

10 **[0022]** La figura 10 muestra las estrategias de sincronización para la caracterización del contenido mitocondrial de los TABi de la presente invención.

[0023] Las figuras 11A a 11E muestran el contenido de los TABi: Los contenidos intracelulares de los TABi se formaron en imágenes usando microscopía confocal y se cuantificaron usando citometría de flujo.

15 **[0024]** La figura 12 muestra el co-cultivo de las PBMC de pacientes con CLL con TABi autólogos generados con diferentes agentes terapéuticos seguido por la medición de la proliferación de cTL autóloga de paciente.

[0025] La figura 13 muestra la cuantificación de la proliferación de cTL después de pulsación con los TABi autólogos de paciente.

20 **[0026]** La figura 14 muestra las células T CD8+ cebadas con TABi de pacientes con CLL inducen la lisis específica robusta de células tumorales de CLL autólogas.

[0027] Las figuras 15A y 15B muestran que los TABi estimulan la actividad de células T citolíticas específicas de tumor de paciente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 **[0028]** En tanto que la elaboración y uso de diferentes modalidades de la presente invención se analizan en detalle más adelante, se debe apreciar que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que se pueden incorporar en una amplia variedad de contextos específicos. Las modalidades específicas analizadas en la presente son solamente ilustrativas de formas específicas para realizar y usar la invención y no delimitan el alcance de la invención.

30 **[0029]** Para facilitar la comprensión de esta invención, varios términos se definen más adelante. Los términos definidos en la presente tienen significados como se entienden comúnmente por una persona experta en las áreas relevantes para la presente invención. No se propone que los términos tal como “un”, “una”, “el” y “la” se refieran solo a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la cual se puede usar un ejemplo específico para ilustración. La terminología en la presente se usa para

describir modalidades específicas de la invención, pero su uso no limita la invención, excepto como se describe en las reivindicaciones.

[0030] Como se usa en la presente, el término “cuerpos apoptóticos” se refiere a cuerpos de fragmentación celular que incluyen una membrana intacta, mitocondrias y ADN nuclear fragmentado de células tumorales inducidas a apoptosis por ya sea un tratamiento químico/fármaco y/o un insulto físico o tratamiento (por ejemplo, exposición a luz UV o rayos X). Las células apoptóticas se pueden distinguir de las células necróticas de acuerdo con rasgos bioquímicos y morfológicos característicos conocidos en la técnica. La muerte celular programada o “apoptosis” se caracteriza por uno o más de lo siguiente: agregación de cromatina seguida de fragmentación de ADN (un marcador de un proceso apoptótico) después de la activación de endonucleasas que dan por resultado fragmentos de ADN de, habitualmente, 180 pares de bases, encogimiento celular, reorganización del núcleo celular, membrana celular y metabolismo celular, sangrado de membrana activa y fragmentación final de la célula en vesículas encerradas en membrana, conocidas como cuerpos apoptóticos. Los eventos nucleares que conducen a apoptosis comienzan con el colapso de la cromatina contra la periferia nuclear y en uno o unos pocos grupos grandes dentro del núcleo. Los eventos celulares incluyen condensación citoplasmática y partición del citoplasma y núcleo en válvulas unidas a membrana (cuerpos apoptóticos), que contienen ribosomas, mitocondrias intactas y material nuclear que se rodean por una membrana celular intacta (un marcador específico del proceso apoptótico en comparación con necrosis, el otro proceso de muerte celular no fisiológica).

[0031] Como se usa en la presente, el término “cáncer” se refiere a un cáncer metastásico y/o no metastásico, e incluye cánceres primarios y secundarios.

[0032] Como se usa en la presente, los términos “muestra biológica” o “muestra” se refieren a materiales obtenidos de, o derivados de, un sujeto o paciente y pueden incluir secciones de tejidos tal como sangre, una biopsia, un tumor sólido, un tumor líquido, un tumor o incluso células cancerosas. Las muestras biológicas pueden incluir fluidos corporales tal como sangre y productos o fracciones de sangre (por ejemplo, suero, plasma, plaquetas, células sanguíneas rojas y similares), esputo, tejido, células cultivadas (por ejemplo, cultivos primarios, explantes y células transformadas) heces, orina, fluido sinovial, tejido articular, tejido sinovial, sinoviocitos, sinoviocitos tipo fibroblastos, sinoviocitos tipo macrófagos, células inmunitarias, células hematopoyéticas, fibroblastos, macrófagos, células T, etc.

[0033] Una “biopsia” se refiere al proceso de remover de una muestra de tejido para el crecimiento de células, evaluación diagnóstica o pronóstica, y al propio espécimen de tejido. Cualquier técnica de biopsia conocida en la técnica se puede aplicar a los métodos de diagnóstico y pronóstico divulgados en la presente. La técnica de biopsia aplicada dependerá del tipo de tejido que se va a evaluar (es decir, próstata, ganglio linfático, hígado, médula ósea, célula sanguínea, tejido articular, tejido sinovial,

sinoviocitos, sinoviocitos tipo fibroblastos, sinoviocitos tipo macrófagos, células inmunitarias, células hematopoyéticas, fibroblastos, macrófagos, células T, etc.), el tamaño y tipo de un tumor (es decir, sólido o suspendido (es decir, sangre o ascitis)), entre otros factores. Las técnicas de biopsia representativas incluyen biopsia por escisión, biopsia por incisión, biopsia por aguja, biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Las técnicas de biopsia se discuten, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, et al., eds., 16th ed., 2005, capítulo 70 y en todo momento de la parte V.

[0034] Como se usa en la presente, el término “biopsia líquida” se refiere a una muestra biológica obtenida de un fluido corporal tal como sangre, orina, fluido cefalorraquídeo (CFS), fluido de cavidad abdominal o vítreo o acuoso, fluido de ganglio linfático, fluido de vejiga, fluido de conducto lácteo, esputo, fluido gástrico, fluido de conducto biliar, fluido de seno y combinaciones de los mismos.

[0035] Como se usa en la presente, los términos “que trata” o “tratamiento”, como se entiende en la técnica, se refieren a obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos, cuando se trata un sujeto con cáncer u otra enfermedad. Usando la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, por ejemplo, mejora o alivio de uno o más síntomas o condiciones, disminución de grado de enfermedad de cáncer, estado de enfermedad estabilizado (es decir, no empeoramiento), prevención de propagación de enfermedad, retraso o desaceleración de progresión de enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad, disminución de reaparición de enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. Por lo tanto, “que trata” y “tratamiento” también pueden incluir prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada cuando no recibe tratamiento. Como se usa en la presente, “que trata” y “tratamiento” usando los TABi inmunogénicos de la presente invención también incluyen un tratamiento profiláctico. Por ejemplo, un sujeto con cáncer de etapa temprana se puede tratar para prevenir la progresión o metástasis, o de manera alternativa un sujeto en remisión se puede tratar con un compuesto o composición descrita en la presente para prevenir la reaparición. Habitualmente, los métodos de tratamiento incluyen administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de los TABi de la presente invención, ya sea como una administración individual, o más comúnmente, como una serie de inmunizaciones. Por ejemplo, se puede administrar una inmunización de cuerpo apoptótico tumoral (TABi) de la presente invención al menos una vez a la semana. De manera alternativa, los TABi de la presente invención se pueden administrar al sujeto de aproximadamente una vez cada dos a tres semanas, o aproximadamente una vez por semana durante un régimen de tratamiento dado. El curso o duración del tratamiento depende de una variedad de factores, tal como la severidad de la enfermedad, la edad del paciente, la concentración, la actividad de los TABi de la presente invención y/o combinaciones de los mismos. También se apreciará que la dosis efectiva de los TABi de la presente invención usada para el tratamiento o profilaxis puede incrementar o disminuir durante el transcurso de

un régimen de tratamiento o profilaxis particular. Los cambios en la dosis de los TABI de la presente invención pueden dar por resultado y llegar a ser evidentes por ensayos de diagnóstico estándar o imagenología conocida en la técnica. En algunos casos, se puede requerir la administración crónica. Por ejemplo, los TABI de la presente invención se administran al sujeto en una cantidad y duración

5

[0036] Como se usa en la presente, se usan las siguientes abreviaturas, un TABI es una Inmunización de **Cuerpo Apoptótico Tumoral**, que es el proceso de inmunización. Por el contrario, un TABi es los **Cuerpos Apoptóticos Tumoraes** es que se usan en la inmunización, y los TABi se refieren a la entidad física, es decir, un cuerpo apoptótico aislado de la célula.

10

[0037] Los presentes inventores han descubierto que los cuerpos apoptóticos de células cancerosas pueden inducir una respuesta antitumoral mediada por sistema inmunitario. Esta observación se usó para desarrollar vacunas personalizadas para pacientes con cánceres. Usando una estrategia única para la generación de estos cuerpos apoptóticos, los presentes inventores generaron un espectro de cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi) a partir del mismo tipo de tumor, en el cual cada uno de estos TABi tiene un efecto único y diferencial en la respuesta inmunitaria antitumoral. Los TABi se pueden usar en una inmunización de cuerpo apoptótico tumoral (TABI). Solos o conjuntamente, los métodos y composición enseñados en la presente permitieron generar un TABI con suficientes TABi para preparar inmunizaciones o vacunas, con un alto efecto terapéutico, que cuando se almacenan a largo plazo tuvieron una efectividad equivalente o solo ligeramente reducida en comparación con la

15

[0038] Generación de cuerpos apoptóticos. El aspecto único de la generación de los TABi de activación inmunitaria abarca su utilización en la terapia anticancerígena. Las células tumorales primarias de los pacientes se removieron y se sometieron a citólisis *ex vivo*, usando diferentes agentes terapéuticos de estándar de atención. Se encontró que cada agente terapéutico dio por resultado la generación de los TABi que son subjetivamente/físicamente diferentes; traducándose en un potencial inmunológico variable de cada tipo de TABi y para la combinación de los TABi en cada vacuna. Este planteamiento de vacuna se puede usar con un panel de agentes terapéuticos anticancerígenos. El o los productos terapéuticos anticancerígenos específicos variarán y serán dependientes del tipo de tumor, como lo sabrá el experto en la técnica con base en el estándar de atención, entonces vigente,

20

25

30

[0039] Selección de productos terapéuticos anticancerígenos para generación de TABi. Los TABi se generan por un panel único de fármacos anticancerígenos que serán específicos para un paciente, así como específicos para el tipo de cáncer. Esta estrategia única genera vacunas para los TABi que se

basa en los agentes terapéuticos usados, que se determinarán a través del siguiente proceso: (a) fármacos anticancerígenos específicos de enfermedad: para cada tipo de tumor se usa habitualmente un panel de hasta 5 productos terapéuticos (o tratamientos físicos) en la clínica para tratar ese tipo de cáncer (es posible usar más de 5, pero en general se usarán comúnmente hasta 5, que pueden incluir combinaciones de fármacos y tratamientos físicos tal como UV, rayos X, choque térmico, etc., como se describirá en la presente). La selección de estos 1-5 productos terapéuticos/tratamientos se determina con base en los TABi generados con la mayor capacidad de respuesta inmunogénica. Las células tumorales primarias del paciente se expondrán a concentraciones IC^{50-70} de cada uno de estos agentes (ex vivo) independientemente, que daría por resultado los TABi de generación, que se almacenarían.

(b) Potencial inmunológico de los TABi específicos, en el cual cada uno de los TABi individuales generados (solos o en combinación) se usa para estimular las células T (ex vivo) para valoración de su potencial inmunoestimulador. Los TABi con la inmunogenicidad más alta (como se determina por el ensayo de proliferación de células T) se mezclan conjuntamente para ese paciente específico y se usan como un TABi. c) La inmunización del paciente usando una dosis individual, pero más comúnmente, un plan de inmunización en el cual se aplican múltiples inmunizaciones durante el curso del tiempo.

[0040] Almacenamiento de TABi. Los presentes inventores han encontrado que los TABi se deben almacenar de una manera específica para mantener su potencial inmunogénico. Además, la relación de cada TABi generado dentro de la vacuna de TABi es única y se diseña específicamente para cada tipo de tumor y para cada paciente individual, que hace que cada vacuna de TABi sea altamente individualizada.

[0041] Proceso de generación de vacuna/inmunización TABi: La inmunización TABi se generará para cada paciente específico después de la remoción del tejido canceroso del individuo. Cada vacuna de TABi se desarrollará como sigue: (1) Las células tumorales se aíslan del sujeto y se tratan con el panel de hasta 5 tratamientos físicos o terapéuticos, que conduce a la apoptosis y formación de TABi. En tanto que no se prefiere, también es posible usar citometría de flujo (o metodología equivalente) para elaborar preparaciones de células tumorales individuales. Estas células tumorales individuales se cultivan *in vitro* y se tratan para generar los TABi con el panel de hasta 5 tratamientos físicos o terapéuticos. (2) Los TABi se aíslan usando el método de centrifugación a baja velocidad/alta velocidad de la presente invención, para proporcionar una cantidad significativa de TABi aislados, dentro de 2 horas. (3) Al mismo tiempo, la expansión de células ex vivo mediante un modelo de xenoinjerto tumoral derivado de paciente (PDx) para expandir el volumen de tejido tumoral para el material adecuado para generar la vacuna de TABi. (4) Los TABi se almacenan con la composición novedosa de la presente invención, proporcionando almacenamiento a largo plazo de una inmunización TABi efectiva. El TABi se puede

formular en la TABI usando composiciones y métodos conocidos por el experto al preparar inmunizaciones.

[0042] Utilización clínica de TABI. Habitualmente, la presente invención se usará con o después de un tratamiento de cáncer, sin embargo, también es posible usar los TABI como un agente terapéutico individual o de primera línea. La inmunización TABI se puede usar como adyuvante para el tratamiento de inducción sistémica en un esfuerzo por (1) retrasar la recaída, (2) erradicar la enfermedad residual mínima (MRD), (3) usar como una inmunoterapia para volver a inducir la remisión en pacientes con recaída y/o (4) cebado y expansión *ex vivo* de células T dirigidas a tumor u otras células inmunitarias.

[0043] La figura 1 muestra los pasos básicos para preparar los cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi) de la presente invención, usando leucemia como un ejemplo. El experto en la técnica reconocerá que las biopsias de tumores sólidos se pueden sustituir por la leucemia. En el paso 1, se recolecta una muestra biológica, tal como sangre, biopsia líquida, ganglio linfático, etc., de un paciente con un cáncer, por ejemplo, una leucemia linfocítica crónica (CLL). El experto en la técnica reconocerá que se pueden usar muchas fuentes diferentes de células cancerosas con la presente invención. En el paso 2, se aíslan las células tumorales. Por ejemplo, las células CLL CD19+CD5+ se pueden aislar de la muestra de sangre y, en particular, las células CLL CD19+CD5+ se separan de las células sanguíneas rojas y de otras células, por ejemplo, células sanguíneas blancas, al someter a lisis las células no CLL CD19 +CD5+ y sanguíneas rojas, al hacer paneo o adherirse a las células CLL CD19+CD5+ u otro método de aislamiento. En el paso 3, las células tumorales se tratan *ex vivo* con un fármaco u otro tratamiento. Por ejemplo, las células CLL CD19+CD5+ se tratan *ex vivo* con un fármaco o método físico que activa la formación de ampollas de membrana, que conduce a la formación de cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi). En el paso 4, los TABi se aíslan usando el nuevo método de centrifugación a baja velocidad de la presente invención. En el paso 5, se confirma la pureza de los TABi, y en el paso 6, los TABi se preparan en la inmunización TABI usada para tratar, en cuyo ejemplo, el mismo paciente.

[0044] La figura 2 muestra tres diagramas de flujo que comparan la presente invención (diagrama de flujo medio) de métodos de la técnica anterior (diagramas de flujo izquierdo y derecho). Los métodos tradicionales para aislar cuerpos apoptóticos tumorales se muestran a la izquierda y derecha. En el planteamiento de centrifugación estándar, los cuerpos apoptóticos se forman y se someten a una centrifugación a velocidad media, habitualmente a 300xg durante 10 minutos para sedimentar las células más grandes. El sobrenadante de centrifugación de velocidad media se recolecta y se somete a una centrifugación de alta velocidad, habitualmente a 3,000xg durante 20 minutos, con la pureza verificada por microscopía/citometría de flujo. En el método de clasificación de fluorescencia de la técnica anterior, los cuerpos apoptóticos se recolectan y centrifugan a una velocidad alta de 1,000xg durante 6 minutos

para sedimentar células grandes y cuerpos apoptóticos, que entonces se tiñen. Las células teñidas y los cuerpos apoptóticos entonces se centrifugan a una velocidad mayor de 3,000xg para eliminar las células, y el sobrenadante se somete a clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) durante aproximadamente 4 - 6 horas para obtener suficientes cuerpos apoptóticos para la prueba, y los cuerpos apoptóticos resultantes se verifican por FACS. Por el contrario, la presente invención obtiene los cuerpos apoptóticos y primero los somete a al menos un paso de centrifugación a baja velocidad de aproximadamente 50xg durante aproximadamente 5 minutos. Este sobrenadante de baja velocidad se recolecta y entonces se somete a un paso de centrifugación a alta velocidad de aproximadamente 3,000xg durante 8 minutos, que conduce a un rendimiento significativamente mayor. Para probar la pureza y porcentaje de los cuerpos apoptóticos (versus cuerpos no apoptóticos), una pequeña muestra de los cuerpos apoptóticos se etiqueta con marcadores, tal como anexina-V y ToPro3, para validar la pureza por citometría de flujo.

[0045] La figura 3 muestra resultados de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que comparan los resultados usando los métodos de la técnica anterior (izquierda y derecha), con la presente invención en el medio. Método para seleccionar el planteamiento de centrifugación a baja velocidad. Se consideró la cantidad, pureza, tiempo y eficiencia de costo de los TABi en la selección del planteamiento de centrifugación a baja velocidad. Usando este método, la pureza (~82%) y cantidad de células apoptóticas (anexina-V+ / ToPro-3+) fue óptima y se logró dentro de 1.5 horas. Por el contrario, la centrifugación tradicional produjo menor pureza (~43%). En tanto que el planteamiento basado en FACS produjo mayor pureza (94%), este método tomó ~ 12 – 14 horas. Todos los datos se analizaron usando FCS Express 6 (software DeNovo).

[0046] La figura 4 muestra los resultados de FACS del uso del método de la presente invención para seleccionar TABi inmunogénicos, después de la verificación de pureza de clasificación usando un citómetro de flujo. Método para seleccionar verificación de pureza de posterior a clasificación inmunogénica de TABi usando citómetro de flujo. Después del tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-CD38 (Daratumumab) (30 µg/ml, 18 h), 4-(4-([2-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-1-ciclohexen-1-il]metil)-1-piperazinil)-N-({3-nitro-4-[(tetrahidro-2H -piran-4-ilmetil)amino]fenil}sulfonil)-2-(1H-pirrol[2,3-b]piridin-5-iloxi)benzamida (Venetoclax) (30 µM, 18 h) y luz ultravioleta (254 nm, 17 min, seguido por incubación durante 18 h), se tiñeron células CLL clasificadas CD19+ con anexina V y/o TO-PRO-3 en amortiguador de unión a anexina V (1X) durante 10 min a temperatura ambiente y se colocaron inmediatamente en hielo antes del análisis en un citómetro de flujo Attune NxT (invitrogen). La pureza posterior a clasificación de los TABi se determinó usando las siguientes estrategias de sincronización (anexina V positiva con dispersión hacia adelante baja (FSC) confirmada con anexina V+/TO-PRO-3+). Las

muestras sin teñir se usaron como un control. Todos los datos se analizaron usando FCS Express 6 (software DeNovo).

[0047] Las figuras 5A a 5C muestran resultados de FACS de los TABi derivados bajo diferentes condiciones de tratamiento. Los TABi se derivan bajo diferentes condiciones de tratamiento. Las células CLL CD19+/CD5+ (n=3 pacientes) se trataron con: Figura 5A concentraciones supratrapéuticas del anticuerpo monoclonal terapéutico anti-CD38 daratumumab (Dara), figura 5B inhibidor de Bcl-2 venetoclax (ven), o figura 5C luz UV de onda corta durante 24 horas. Las células se sometieron a citometría de flujo y se activaron con base en el tamaño (FSC) y el marcador apoptótico (anexina V) como se muestra en compuerta R3. Estas células activadas entonces se examinaron adicionalmente para la pureza de TABi como se muestra en compuerta R4.

[0048] Las figuras 6A a 6C muestran la generación y propiedades inmunogénicas de los cuerpos apoptóticos tumorales (TABi). Figura 6A. Los TABi se cosecharon de células CLL CD19+/CD5+ (n=3 pacientes) que se trataron con concentraciones supratrapéuticas del anticuerpo monoclonal terapéutico anti-CD38 daratumumab (Dara), inhibidor de Bcl-2 venetoclax (Ven) o luz UV de onda corta durante 18 h. Los TABi se tiñeron con DAPI (azul) y anexina V (verde, marcador de apoptosis) y se formaron en imágenes por microscopía confocal. Figura 6B. Por separado, los TABi se tiñeron con anexina V y yoduro de propidio y se sometieron a citometría de flujo para delinear qué etapas de apoptosis estuvieron experimentando los TABi durante un período de 24 horas. Figura 6C. El tamaño de TABi se determinó por espectrofotometría, que mostró que los tamaños variaron de 3.6 μ m - 8.7 μ m y fueron hasta cierto punto dependientes del fármaco usado para generar los TABi.

[0049] Tabla 1. Datos cuantificados de la figura 6B y 6C

Distribución de tamaño (d. μ M)	DARA	VEN	UV
3.6	4.00 $\pm$ 0.4	1.47 $\pm$ 0.75	4.07 $\pm$ 1.53
4.18	13.96 $\pm$ 3.74	12.9 $\pm$ 2.3	6.5 $\pm$ 0.3
4.8	33.95 $\pm$ 4.55	42.50 $\pm$ 1.6	23.75 $\pm$ 1.2
5.6	27.85 $\pm$ 1.35	24.35 $\pm$ 1.85	32.05 $\pm$ 2.6
6.5	13.00 $\pm$ 1.6	6.05 $\pm$ 0.45	15.20 $\pm$ 1.0
7.5	2.50 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 0.80	10.80 $\pm$ 0.2
8.7	1.25 $\pm$ 0.14	4.15 $\pm$ 2.05	7.30 $\pm$ 4.2

[0050] Tabla 2.

Etapas de apoptosis	DARA	VEN	UV
---------------------	------	-----	----

Sin apoptosis	22.33±3.95	1.25±0.61	19.79±18.59
Temprana	3.8±1.42	2.6±0.68	4.3±2.31
Tardía	51.73±5.73	92.47±2.60	68.31±21.05
Necrosis	22.16±5.31	3.66±2.48	3.07±1.47

[0051] La figura 7 muestra otro método de la presente invención, en el cual la cuantificación de la proliferación de CTL después de pulsación con los TABi autólogos de paciente (células T derivadas de pacientes con CLL, impulsadas con TABi autólogo de las figuras 6A-6C) de la presente invención. Cuantificación de la proliferación de CTL después de pulsación con los TABi autólogos de paciente (de las tablas 1 y 2). Las células T citotóxicas CD8⁺ (cTL) se aislaron de pacientes con CLL (n=3) y se etiquetaron con CFSE, seguido de cocultivo con los TABi generados a partir de las células CLL autólogas (generadas bajo condiciones similares como en el panel A). La incubación de las cTL con TABi vivos usando Dara versus Ven versus UV indujo una proliferación robusta de cTL en el orden de 48.9%, 60.12% y 38.04%, respectivamente, en comparación con control (CFSE+ cTL incubadas con células de CLL tratadas con DMSO autólogas de paciente). Los TABi se almacenaron bajo diferentes condiciones (mostradas en la tabla) y medios de congelación en -80 F y se descongelaron 1 semana después para probar su capacidad para inducir una respuesta inmunogénica de cTL. Se encontró que en comparación con los medios comerciales (datos en archivo), los TABi se almacenaron en un TAB-stor (ver tabla 4), que cuando se descongelan e incuban con CFSE + cTL autólogas de paciente, dieron por resultado un nivel similar de proliferación de cTL en comparación con cuando se usaron los TABi frescos en tiempo real. La tabla 3 incluye los datos de proliferación.

[0052] Tabla 3. % de datos de proliferación de células T CD8⁺ para figura 7

	TABi frescos	TABstor TABi	Medios solamente
Dara-TABi	45.60±2.80	28.01±0.19	2.68±0.18
Ven-TABi	59.61±4.83	45.35±4.25	2.00±0.18
UV-TABi	39.13±1.18	29.54±0.01	1.88±0.34

[0053] La figura 8 muestra otro método de la presente invención, en el cual las células T CD8⁺ cebadas con TABi de pacientes con CLL inducen la lisis específica robusta de células tumorales CLL autólogas. Las células T CD8⁺ cebadas con TABi de pacientes con CLL inducen la lisis específica robusta de células tumorales de CLL autólogas. Las células B CD19⁺ etiquetadas con calceína AM de los pacientes se aislaron por separación de MAC. De manera similar, las células T CD8⁺ de los mismos

pacientes se aislaron y se expusieron a los TABi autólogos de paciente generados usando diferentes fármacos (Daratumumab, D; venetoclax, V o luz UV) durante 72 horas. A continuación, las células T CD8+ cebadas con TABi se cocultivaron con células CLL autólogas etiquetadas con calceína AM durante 6 horas y se calculó la lisis específica. Los medios no de TABi o que contienen fármacos se usaron como un control. La relación de efector (célula T) a diana (célula CLL) fue 1:1. La lisis específica se calculó usando la fórmula:

$$\text{Lisis específica} = 100 \times \frac{\text{Liberación experimental (RFU)} - \text{Liberación espontánea (RFU)}}{\text{Liberación máxima (RFU)} - \text{Liberación espontánea (RFU)}}$$

[0054] La figura 9 muestra otro método de la presente invención, en el cual las estrategias de sincronización para la caracterización del contenido de ADN de los TABi de la presente invención. La figura 10 muestra otro método de la presente invención, en el cual las estrategias de sincronización para la caracterización del contenido mitocondrial de los TABi de la presente invención.

[0055] Las figuras 11A a 11E muestran el contenido de los TABi de la presente invención: Los contenidos intracelulares de los TABi se formaron en imágenes usando microscopía confocal y se cuantificaron usando citometría de flujo. Para la imagenología confocal, las células clasificadas CD19+ de pacientes con CLL se pre-tiñeron con (figura 11A) Hoechst 33342 (para contenido de ADN); (figura 11B) Hoechst 33342 y SytoRNA Select (para contenido de ADN y ARN) y (figura 11C) MitoTracker Green (para contenido mitocondrial); seguido de tratamiento con Daratumumab (D-TABi, 30 µg/ml, 18h), Venetoclax (V-TABi, 30 µM, 18 h) o haz ultravioleta (UV-TABi, 254 nm, 17 min, seguido de incubación durante 18 h) para promover el desmontaje de células apoptóticas. Entonces, las células se tiñeron con (figura 11A) anexina V-FITC y (figuras 11B y C) anexina V-APC, respectivamente. Los TABi se formaron en imágenes usando un aumento de 63x y los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

[0056] Para el análisis citométrico de flujo, se tiñeron células CLL clasificadas CD19+ con una combinación de Hoechst 33342/anexina V-FITC/TO-PRO-3 (contenido de ADN) MitoTracker Green/anexina V-V450/TO-PRO-3 (contenido mitocondrial), Hoechst 33342/MitoTracker Green/anexina V-APC (contenido de ADN y mitocondrial) o Hoechst 33342/SYTO RNaselect green/anexina V-APC (contenido de ADN y ARN). Las células se tiñeron con Hoechst 33342 (5 µg/ml), MitoTracker Green (100 nM) y/o SYTO RNaselect Green (500 nM) antes de la inducción de apoptosis. Las células se tiñeron con anexina V y/o TO-PRO-3 en amortiguador de unión a anexina V (1X) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se colocaron inmediatamente en hielo antes del análisis en un citómetro de flujo Attune NxT (invitrogen). Las muestras sin teñir se usaron como un control. Todos los datos se analizaron

usando FCS Express 6 (software DeNovo). La distribución del contenido intracelular de los TABi varía con el mecanismo de desmontaje de células apoptóticas usando los diferentes fármacos. La distribución de ADN y mitocondrias en los TABi se cuantificó con base en (figuras 11D y 11E) el índice de distribución de ADN de TABi (figura 11D) y el índice de distribución de mitocondrias de TABi (figura 11E), respectivamente (n = 3). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. Índice de distribución de ADN = $\text{ADN}^+ \text{ TABi} / \text{ADN}^- \text{ TABi}$; Índice de distribución de mitocondrias = $\text{mitocondrias}^+ \text{ TABi} / \text{mitocondrias}^- \text{ TABi}$.

[0057] La figura 12 muestra que los cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi) generados con diferentes agentes anticancerosos inducen la proliferación de células T CD8+ citotóxicas robustas.

Los TABi se generaron al exponer células clasificadas CD19+ de pacientes con CLL (n=3) con daratumumab (30 µg/ml), rituximab (30 µg/ml), acalabrutinib (30 µM) o venetoclax (30 µM, 18 h); y posteriormente se aislaron usando centrifugación a baja velocidad. En paralelo, las células T CD8+ (cTL) se aislaron y tiñeron con CellTrace^{MR} CFSE (5 µM, 20 min) y se reintrodujeron nuevamente en su mezcla de PBMC autólogas de paciente, seguido de co-cultivo con los TABi durante 72 h a 37°C y CO₂ al 5%. Se lavaron las células con amortiguador de unión a anticuerpo y se tiñeron con CD4 y CD8. La proliferación de células activadas CD8 se determinó usando citómetro de flujo Attune NxT (Invitrogen). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. **, p<0.001. Todos los fármacos se obtuvieron de fuentes comerciales o clínicas.

[0058] La figura 13 muestra la cuantificación de la proliferación de cTL después de pulsación con los TABi autólogos de paciente (de la diapositiva 6D, E). Las células T citotóxicas CD8+ (cTL) se aislaron de pacientes con CLL (n=3) y se etiquetaron con CFSE, seguido de cocultivo con los TABi generados a partir de las células CLL autólogas (generadas bajo condiciones similares como en el panel A). La incubación de las cTL con TABi vivos usando Dara versus Ven versus UV indujo una proliferación robusta de cTL en el orden de 48.9%, 60.12% y 38.04%, respectivamente, en comparación con control (CFSE+ cTL incubadas con células de CLL tratadas con DMSO autólogas de paciente). Los TABi se almacena bajo diferentes condiciones (mostradas en la tabla 6) y medios de congelación en -80°F y se descongelaron 1 semana después para probar su capacidad para inducir una respuesta inmunogénica de cTL. Se encontró que en comparación con los medios comerciales (datos en archivo), los TABi se almacenaron en TAB-stor, que cuando se descongelan e incuban con CFSE + cTL autólogas de paciente, dieron por resultado un nivel similar de proliferación de cTL en comparación con cuando se usaron los TABi frescos en tiempo real.

[0059] Tabla 5. % de proliferación de células T CD8+ en figura 13

	TABi frescos	TABstor TABi	Medios solamente

Dara-TABi	45.60±2.80	28.01±0.19	2.68±0.18
Ven-TABi	59.61±4.83	45.35±4.25	2.00±0.18
UV-TABi	39.13±1.18	29.54±0.01	1.88±0.34

5 **[0060]** La figura 14 muestra las células T CD8+ cebadas con TABi de pacientes con CLL inducen la lisis específica robusta de células tumorales de CLL autólogas. Las células B CD19+ etiquetadas con calceína AM de los pacientes se aislaron por separación de MAC. De manera similar, las células T CD8+ de los mismos pacientes se aislaron y se expusieron a los TABi autólogos de paciente generados usando diferentes fármacos (Daratumumab, D; venetoclax, V o luz UV) durante 72 horas. A continuación, las
10 células T CD8+ cebadas con TABi se cocultivaron con células CLL autólogas etiquetadas con calceína AM durante 6 horas y se calculó la lisis específica. Los medios no de TABi o que contienen fármacos se usaron como un control. La relación de efector (célula T) a diana (célula CLL) fue 1:1. La lisis específica se calculó usando la fórmula:

$$15 \quad \text{Lisis específica} = 100 \times \frac{\text{Liberación experimental (RFU)} - \text{Liberación espontánea (RFU)}}{\text{Liberación máxima (RFU)} - \text{Liberación espontánea (RFU)}}$$

[0061] Las figuras 15A y 15B muestran que las inmunizaciones de cuerpo apoptótico tumoral (TABi) estimulan la actividad de células T citolíticas específicas de tumor de paciente: Las células CLL CD19+ se aislaron de las PBMC del paciente 1 con CLL (P1) y del paciente 2 con CLL (P2) y entonces se dividieron en 2 alícuotas/muestra de paciente: La alícuota 1 se usó para generar los TABi al exponer células CD19+ de cada paciente a daratumumab (30 µM, 18 h); seguido de aislamiento de los TABi usando centrifugación a baja velocidad. De la alícuota 2: Las células CLL CD19+ se etiquetaron con calceína AM (5 uM/30 min en la oscuridad a 37°C) y se muestran como CD19 P1 o P2. Por separado,
25 de cada PBMC de pacientes, las células T CD8+ (Tc) se aislaron y se incubaron con los TABi autólogos de paciente (+ TABi Tc P1 o P2) o PBS durante 72 horas. Figura 15A. Después de lavar el exceso de calceína AM, las células CD19+ de P1 o P2 se co-cultivaron con correspondientes cTL autólogas que se pre-expusieron al TABi autólogo de paciente (es decir, CD19 P1 con Tc P1). Figura 15B. En paralelo, se realizó un experimento heterólogo de paciente donde las células P1 CD19 etiquetadas con calceína
30 AM se cocultivaron con cTL expuestas a TABi de P2 (Tc P2) y las células P2 CD19 se cocultivaron con cTL expuestas a TABi de P2 (Tc P1). La fluorescencia de calceína se midió como en el panel A. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. * p<0.05

[0062] Para el análisis citométrico de flujo, se tiñeron células CLL clasificadas CD19+ con una combinación de Hoechst 33342/anexina V-FITC/TO-PRO-3 (contenido de ADN) MitoTracker

Green/anexina V-V450/TO-PRO-3 (contenido mitocondrial), Hoechst 33342/MitoTracker Green/anexina V-APC (contenido de ADN y mitocondrial) o Hoechst 33342/SYTO RNaselect green/anexina V-APC (contenido de ADN y ARN). Las células se tiñeron con Hoechst 33342 (5 µg/ml), MitoTracker Green (100 nM) y/o SYTO RNaselect Green (500 nM) antes de la inducción de apoptosis. Las células se tiñeron con anexina V y/o TO-PRO-3 en amortiguador de unión a anexina V (1X) durante 10 min a temperatura ambiente y se colocaron inmediatamente en hielo antes del análisis en un citómetro de flujo Attune NxT (invitrogen). Las muestras sin teñir se usaron como un control. Todos los datos se analizaron usando FCS Express 6 (software DeNovo). La distribución del contenido intracelular de los TABi varía con el mecanismo de desmontaje de células apoptóticas usando los diferentes fármacos. La distribución de ADN y mitocondrias en los TABi se cuantificó con base en (figura 13) el índice de distribución de ADN de TABi y el índice de distribución de mitocondrias de TABi (figura 13) (n = 3). Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. Índice de distribución de ADN = $\frac{\text{ADN} + \text{TABi}}{\text{ADN} - \text{TABi}}$; Índice de distribución de mitocondrias = $\frac{\text{mitocondrias} + \text{TABi}}{\text{mitocondrias} - \text{TABi}}$.

[0063] Tabla 6. Comparación TAB-Stor.

	Planteamiento: 1	Planteamiento: 2	Planteamiento: 3
	TABi10 (90% FBS libre de EV+DMSO)	TABi7.5 (92.5% FBS libre de EV+DMSO)	TABStor HEPES (12 mM), NaCl (130 mM), KCl (2.mM), MgCl (0.35 mM) pH 7.4 Suero autólogo libre de vesícula adicionado + trehalosa (1:1)
4 grados	-	-	-
-80 grados	-	-	*+ USED
Congelación instantánea	-	-	*+ USED

[0064] Por lo tanto, se encontró que el aislamiento de los TABi a través de una centrifugación a baja velocidad produjo TABi inmunogénicos de alta calidad que se optimizaron para uso en el mismo paciente, y en cantidades suficientes para proporcionar múltiples inmunizaciones. Además, se desarrolló un medio de almacenamiento novedoso que produce una inmunización de alto rendimiento que perdió poco, si es que perdió, de su potencia en comparación con los TABi recién aislados. Finalmente, los TABi elaborados, aislados y/o almacenados usando la presente invención mejoraron la lisis de células tumorales específicas de paciente mediante células T CD8⁺, en comparación con células T CD8⁺ no expuestas.

[0065] En una modalidad, la presente invención incluye un método para preparar cuerpos apoptóticos a partir de una biopsia tumoral, que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de: obtener células tumorales humanas de un sujeto; inducir la apoptosis de las células tumorales humanas con un fármaco o un tratamiento físico; y recolectar cuerpos apoptóticos de las células tumorales humanas apoptóticas al: centrifugar a una baja velocidad para formar un sedimento y un sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; recolectar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; y centrifugar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad a una alta velocidad para formar un sedimento de centrifugación a alta velocidad y un sobrenadante de centrifugación a alta velocidad; y aislar el sedimento de centrifugación a alta velocidad, en donde la composición inmunogénica comprende cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi) tratados con fármacos que tienen una pureza de al menos 82 a 100 por ciento, y en donde los TABi se obtienen en menos de 2 horas. En un aspecto, el paso de centrifugación a baja velocidad se repite antes del paso de centrifugación a alta velocidad. En otro aspecto, el paso de inducción de apoptosis es con más de un fármaco dirigido a ese tipo de célula tumoral humana. En otro aspecto, el método comprende además el paso de obtener las células tumorales humanas que seleccionan el o los tratamientos físicos o fármaco para elaborar los TABi específicos de sujeto, medir los TABi específicos de sujeto para la proliferación de cTL *in vitro* y entonces proporcionar los TABi específicos de sujeto dependiendo de la proliferación de cTL medida. En otro aspecto, el paso de centrifugación a baja velocidad es menor de 100 g, o entre 25 y 75 g. En otro aspecto, el paso de centrifugación a alta velocidad es mayor de 1,500 g, o entre 1,750 y 10,000 g. En otro aspecto, el método no incluye un paso de centrifugación a velocidad media, en donde la centrifugación a velocidad media es entre 100 y 1,500 g. En otro aspecto, las células tumorales humanas son de un tumor líquido o sólido. En otro aspecto, las células tumorales humanas se obtienen de pulmón, mama, cuello uterino, ovario, esófago, colon, recto, neural, glioma, próstata, vejiga, hueso, páncreas, hígado, ovario, testículo, útero, placenta, cerebro, cartílago, músculo liso, músculo estriado, tejido fibroso, vaso sanguíneo, vaso linfático, ganglio linfático, tejido adiposo, cerebro, riñón, glándula pituitaria, paratiroides, tiroides, bronquial, suprarrenal, estómago, intestino grueso, intestino delgado, piel, adenomas, sarcomas, carcinomas, leucemias, linfomas, mieloma múltiple o blastomas, o una combinación de cualquiera de lo mismo. En otro aspecto, los TABi son ToPro-3 y anexina-V positivos, y después del paso de aislamiento comprenden más de 82% de las células totales. En otro aspecto, los TABi son autólogos, alogénicos o xenogénicos. En otro aspecto, el fármaco usado para tratar las células tumorales se selecciona de un agente antimetabolito, agente alquilante o tipo alquilante, agente de intercalación, inhibidor de topoisomerasa I o II, agente antimitótico, inhibidor de cinasa, inhibidor de proteasoma, inhibidores de Bcl-2, agentes de quimioterapia, anticuerpos monoclonales, productos biológicos, terapias dirigidas, tal como, derivados de butirato, estaurosporina, derivados de sulindaco,

citocinas inflamatorias, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, pemetrexed, metotrexato, pemetrexed, metotrexato, edatrexato, hidroxiurea, fludarabina, mercaptopurina, mostazas de nitrógeno (mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y clorambucilo), aziridinas (tiotepa), nitrosoureas (carmustina, lomustina, semustina), triazenos (dacarbazina y temozolomida) y derivados de platino (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino y satraplatino), doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, nemorubicina, mitoxantrona, etopósido, tenipósido, paclitaxel, docetaxel, ixabepilona, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, sorafenib, dasatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib, imatinib, nilotinib lapatinib, ibrutinib, acalabrutinib, bevacizumab (anticuerpo contra factor de crecimiento endotelial vascular), cetuximab, panitumumab, matuzumab, nimotuzumab (anticuerpos contra receptor de factor de crecimiento epidérmico), trastuzumab, pertuzumab (anticuerpos contra ErbB2), daratumumab (anticuerpo contra CD38), inhibidores anti-CD20 (rituximab, obinutuzumab, ofatumumab), topotecán, SN-38, CPT11, 9-nitrocarnitotecina o análogos de nucleósidos antineoplásicos. En otro aspecto, el tratamiento físico para inducir la apoptosis es por un método físico seleccionado de: ionización, irradiación γ , irradiación UV, choque térmico, estrés, privación de suero o una combinación de los mismos. En otro aspecto, los TABi o los TABi se liofilizan. En otro aspecto, los TABi o TABi se almacenan criogénicamente en una composición que comprende HEPES, NaCl, KCl, MgCl, suero autólogo libre de vesícula y trehalosa, ajustado a pH 7.4.

[0066] En una modalidad, la presente invención incluye una inmunogénica composición elaborada por un método que comprende, que consiste esencialmente de, o que consiste de: obtener células tumorales humanas de un sujeto; inducir la apoptosis de las células tumorales humanas con un fármaco o un tratamiento físico; y recolectar cuerpos apoptóticos de las células tumorales humanas apoptóticas al: centrifugar a baja velocidad para formar un sedimento y un sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; recolectar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; y centrifugar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad a una alta velocidad para formar un sedimento de centrifugación a alta velocidad y un sobrenadante de centrifugación a alta velocidad; y aislar un sedimento después de la centrifugación a alta velocidad, en donde el sedimento comprende cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi) que tienen una pureza de al menos 82 por ciento, y en donde los TABi se obtienen en menos de 2 horas. En un aspecto, el paso de centrifugación a baja velocidad se repite antes del paso de centrifugación a alta velocidad. En otro aspecto, el paso de inducción de apoptosis es con más de un fármaco dirigido a ese tipo de célula tumoral humana. En otro aspecto, el paso de centrifugación a baja velocidad es menor de 100 g, o entre 25 y 75 g. En otro aspecto, el paso de centrifugación a alta velocidad es mayor de 1,500 g, o entre 1,750 y 10,000 g. En otro aspecto, el método no incluye un paso de centrifugación a velocidad media, en donde la centrifugación a velocidad media es entre 100 y 1,500 g. En otro aspecto, las células tumorales humanas son de un tumor líquido o sólido. En otro aspecto, las

células tumorales humanas se obtienen de pulmón, mama, cuello uterino, ovario, esófago, colon, recto, neural, glioma, próstata, vejiga, hueso, páncreas, hígado, ovario, testículo, útero, placenta, cerebro, cartílago, músculo liso, músculo estriado, tejido fibroso, vaso sanguíneo, vaso linfático, ganglio linfático, tejido adiposo, cerebro, riñón, glándula pituitaria, paratiroides, tiroides, bronquial, suprarrenal, estómago, intestino grueso, intestino delgado, piel, adenomas, sarcomas, carcinomas, leucemias, linfomas, mieloma múltiple o blastomas, o una combinación de cualquiera de lo mismo. En otro aspecto, los TABi o TABI son ToPro-3 y anexina-V positivos, y después del paso de aislamiento comprenden más de 82% de las células totales. En otro aspecto, los TABi o TABI son autólogos, alogénicos o xenogénicos. En otro aspecto, los agentes usados para tratar las células tumorales se seleccionan de un agente antimetabolito, agente alquilante o tipo alquilante, agente de intercalación, inhibidor de topoisomerasa I o II, agente antimitótico, inhibidor de cinasa, inhibidor de proteasoma, inhibidores de Bcl-2, agentes de quimioterapia, anticuerpos monoclonales, productos biológicos, terapias dirigidas, tal como, derivados de butirato, estaurosporina, derivados de sulindaco, citocinas inflamatorias, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, pemetrexed, metotrexato, edatrexato, hidroxiurea, fludarabina, mercaptopurina, mostazas de nitrógeno (mecloreteamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán y clorambucilo), aziridinas (tiotepa), nitrosoureas (carmustina, lomustina, semustina), triazenos (dacarbazina y temozolomida) y derivados de platino (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino y satraplatino), doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, nemorubicina, mitoxantrona, etopósido, tenipósido, paclitaxel, docetaxel, ixabepilona, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, sorafenib, dasatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib, imatinib, nilotinib lapatinib, ibrutinib, acalabrutinib, bevacizumab (anticuerpo contra factor de crecimiento endotelial vascular) , cetuximab, panitumumab, matuzumab, nimotuzumab (anticuerpos contra receptor de factor de crecimiento epidérmico), trastuzumab, pertuzumab (anticuerpos contra ErbB2), daratumumab (anticuerpo contra CD38), inhibidores anti-CD20 (rituximab, obinutuzumab, ofatumumab), topotecán, SN-38, CPT11, 9-nitrocamptotecina o análogos de nucleósidos antineoplásicos. En otro aspecto, el tratamiento físico para inducir la apoptosis es por un método físico seleccionado de: ionización, irradiación y, irradiación UV, choque térmico, estrés, privación de suero o una combinación de los mismos. En otro aspecto, los TABi o TABI se liofilizan. En otro aspecto, los TABi se almacenan criogénicamente en una composición que comprende HEPES, NaCl, KCl, MgCl, suero autólogo libre de vesícula y trehalosa, ajustado a pH 7.4. En otro aspecto, el método comprende además el paso de obtener las células tumorales humanas que seleccionan el o los tratamientos físicos o fármaco para elaborar los TABi específicos de sujeto, medir los TABi específicos de sujeto para la proliferación de cTL *in vitro* y entonces proporcionar los TABI específicos de sujeto dependiendo de la proliferación de cTL medida.

[0067] Un método para preparar cuerpos apoptóticos a partir de una biopsia tumoral, que comprende, que consiste esencialmente de o que consiste de: obtener células tumorales humanas de un sujeto; inducir la apoptosis de las células tumorales humanas con un fármaco o un tratamiento físico; y recolectar cuerpos apoptóticos de las células tumorales humanas apoptóticas al: centrifugar a una baja
5 velocidad de menos de o igual a 100 g para formar un sedimento y un sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; recolectar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad; y centrifugar el sobrenadante de centrifugación a baja velocidad a una alta velocidad de más de 1,500 g para formar un sedimento de centrifugación a alta velocidad y un sobrenadante de centrifugación a alta velocidad; y aislar el sedimento de centrifugación a alta velocidad, en donde la composición inmunogénica
10 comprende cuerpos apoptóticos tumorales inmunogénicos (TABi) tratados con fármacos que tienen una pureza de al menos 82 a 100 por ciento, y en donde los TABi se obtienen en menos de 2 horas.

[0068] Se contempla que cualquier modalidad analizada en esta especificación se puede implementar con respecto a cualquier método, kit, reactivo o composición de la invención y viceversa. Además, se pueden usar composiciones de la invención para lograr métodos de la invención.

[0069] Se entenderá que las modalidades particulares descritas en la presente se muestran a manera de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de la presente invención se pueden emplear en diferentes modalidades sin apartarse del alcance de la invención. Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que la experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos descritos en la
15 presente. Se considera que estos equivalentes están dentro del alcance de esta invención y se cubren por las reivindicaciones.

[0070] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la especificación son indicativas del nivel de habilidad de aquellos expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patentes se incorporan en la presente por referencia en la
25 misma medida como si cada publicación individual o solicitud de patente se indicara específica e individualmente que se incorpora por referencia.

[0071] El uso de la palabra “un” o “una” cuando se usa en conjunto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. El uso del término “o” en las
30 reivindicaciones se usa para significar “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o las alternativas son mutuamente exclusivas, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere solo a alternativas e “y/o”. En todo momento de esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el

dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

[0072] Como se usa en esta especificación y la o las reivindicaciones, las palabras “que comprende” (y cualquier forma de comprender, tal como “comprenden” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de tener, tal como “tienen” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de incluir, tal como “incluye” e “incluyen”) o “que contiene” (y cualquier forma de contener, tal como “contiene” y “contienen”) son inclusivas o abiertas y no excluyen características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o pasos adicionales no mencionados, pero no excluyen la presencia de otras características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o pasos no señalados. En modalidades de cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en la presente, “que comprende” se puede reemplazar con “que consiste esencialmente de” o “que consiste de”. Como se usa en la presente, el término “que consiste” se usa para indicar la presencia del número entero citado (por ejemplo, un rasgo, un elemento, una característica, una propiedad, un paso de método/proceso o una limitación) o grupo de números enteros (por ejemplo, rasgos, elementos, características, propiedades, pasos de método/proceso o limitaciones) solamente. Como se usa en la presente, la frase “que consiste esencialmente de” requiere las características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o pasos especificados, pero no excluye la presencia de otras características, elementos, componentes, grupos, números enteros y/o pasos no señalados, así como aquellos que no afectan materialmente la función y/o características básicas y novedosas de la invención reivindicada.

[0073] El término “o combinaciones de lo mismo”, como se usa en la presente, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos listados que preceden al término. Por ejemplo, se propone que “A, B, C o combinaciones de los mismos” incluya al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más artículos o términos, tal como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la técnica entenderá que habitualmente no hay límite en el número de artículos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente a partir del contexto.

[0074] Como se usa en la presente, las palabras de aproximación tal como, sin limitación, “aproximadamente”, “sustancial” o “sustancialmente” se refieren a una condición que cuando se modifica de esta manera se entiende que no necesariamente es absoluta o perfecta, pero se consideraría suficientemente cercana a aquellos expertos en la técnica para justificar la designación de la condición como que está presente. El grado al cual la descripción puede variar dependerá de qué tan grande se puede instituir un cambio y todavía tener un experto en la técnica que reconoce que el rasgo modificado

todavía tiene las capacidades y características requeridas del rasgo no modificado. En general, pero sujeto al análisis anterior, un valor numérico en la presente que se modifica por una palabra de aproximación tal como “aproximadamente” puede variar del valor señalado por al menos ± 1 , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12 o 15%.

5 **[0075]** Todas las composiciones y/o métodos divulgados y reivindicados en la presente se pueden realizar y ejecutar sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. En tanto que las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de modalidades preferidas, será evidente para aquellos expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o métodos y en los pasos o en la secuencia de pasos del método descrito en la
10 presente sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para aquellos expertos en la técnica se consideran que están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define por las reivindicaciones anexas.

[0076] Para ayudar a la oficina de patentes, y a cualquier lector de cualquier patente emitida en esta solicitud al interpretar las reivindicaciones anexas a la presente, los solicitantes desean señalar que no
15 tienen la intención de que ninguna de las reivindicaciones anexas invoque el párrafo 6 de 35 USC § 112, USC § 112 párrafo (f), o equivalente, como existe en la fecha de presentación de lo mismo a menos que las palabras “medio para” o “paso para” se usen explícitamente en la reivindicación particular.

[0077] Para cada una de las reivindicaciones, cada reivindicación dependiente puede depender tanto de la reivindicación independiente como de cada una de las reivindicaciones dependientes anteriores
20 para todas y cada una de las reivindicaciones siempre y cuando la reivindicación anterior proporcione una base de antecedentes adecuada para un elemento o término de reivindicación.

REFERENCIAS

[0078] Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer 14, 135–146
25 (2014).

[0079] Bachireddy, P., Burkhardt, U. E., Rajasagi, M. & Wu, C. J. Haematological malignancies: at the forefront of immunotherapeutic innovation. Nat. Rev. Cancer 15, 201–215 (2015).

[0080] Restifo, N. P., Dudley, M. E. & Rosenberg, S. A. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. Nat. Rev. Immunol. 12, 269–281 (2012).

30 **[0081]** Burkhardt, U. E. et al. Autologous CLL cell vaccination early after transplant induces leukemia-specific T cells. J. Clin. Invest. 123, 3756–3765 (2013).

[0082] Kokhaei P1, Choudhury A, Mahdian R, Lundin J, Moshfegh A, Osterborg A, Mellstedt H. Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate, and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. Leukemia. 2004 Nov;18(11):1810-5.

[0083] Keenan BP, Jaffee EM. Whole cell vaccines--past progress and future strategies. *Semin Oncol.* 2012 Jun;39(3):276-86.

[0084] Thomas A, Santarsiero L, Lutz E, Armstrong T, Chen Y, Huang L, et al. Mesothelin-specific CD8(+) T cell responses provide evidence of in vivo cross-priming by antigen-presenting cells in vaccinated pancreatic cancer patients. *J Exp Med.* 2004;200:297–306.

[0085] Shirota H, Klinman DM. CpG-conjugated apoptotic tumor cells elicit potent tumor-specific immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:659-69.

10

15

20

25

30