(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 774 707**

(51) Int. CI.:

C12N 15/00	(2006.01)	***A61K 39/00***	(2006.01)
A61K 35/12	(2015.01)	***A61K 39/02***	(2006.01)
A61K 35/14	(2015.01)	***A61K 39/12***	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)		
A61P 31/12	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 37/04	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		
C12Q 1/02	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2007 PCT/JP2007/053209**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2007 WO07097370**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2007 E 07714709 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 1990410**

(54) Título: **Inmunoterapia mediante la utilización de células capaces de co-expresar un antígeno diana y CD1d y pulsadas con un ligando de CD1d**

(30) Prioridad:

22.02.2006 JP 2006045193

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.07.2020

(73) Titular/es:

RIKEN (100.0%)
2-1 HIROSAWA
WAKOU-SHI, SAITAMA 351-0198, JP

(72) Inventor/es:

FUJII, SHIN-ICHIRO y
SHIMIZU, KANAKO

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inmunoterapia mediante la utilización de células capaces de co-expresar un antígeno diana y CD1d y pulsadas con un ligando de CD1d

Campo técnico

La presente invención se refiere a una célula que co-expresa un antígeno diana y CD1d y que tiene la capacidad de inmunoactivar el antígeno diana, un inmunoinductor para un antígeno diana, y similares.

Técnica antecedente

Una célula NKT es una célula que constituye un linaje de linfocitos que tiene simultáneamente las características de una célula T y de una célula NK, que se activa por un antígeno presente en la molécula CD1d similar al MHC de clase I, y muestra acciones tales como una acción antitumoral y similares. Los ejemplos del antígeno (ligando de CD1d) presente en CD1d, que activa fuertemente las células NKT, incluyen el glucolípido α-galactosilceramida (α-GalCer). Una célula presentadora de antígeno (CPA) cargada con un antígeno tal como α-GalCer y similares estimula a una célula NKT primaria, y puede diferenciarse • proliferar. Entre los ejemplos de dicha CPA se encuentran los macrófagos, células dendríticas inmaduras o maduras (CD) y similares. De estos, los presentes inventores notificaron previamente que una CD madura pulsada con α-GalCer activa fuertemente a las células NKT.

Hasta ahora, se ha probado clínicamente la administración de células NKT activadas por células dendríticas que presentan el ligando de CD1d como una inmunoterapia mediante células NKT. Además, los presentes inventores notificaron que la inducción de inmunidad de células T específicas de antígeno se produce como efecto adyuvante de un ligando de CD1d mediante la administración del ligando de CD1d a un modelo de ratón.

Las publicaciones conocidas en el campo de la invención por los presentes inventores incluyen las siguientes.

La referencia de no patente 1 describe que, en un modelo de ratón, una CD madura pulsada con α-GalCer puede activar fuertemente a las células NKT productoras de IFN-γ, y que una célula NKT inducida de esta manera muestra un efecto antitumoral.

La referencia de no patente 2 describe que, en un experimento utilizando una muestra humana, una CD madura pulsada con α-GalCer puede activar fuertemente a células NKT que producen IFN-γ, y ese macrófago y célula dendrítica inmadura también puede activar células NKT.

La referencia de no patente 3 describe que cuando una célula dendrítica captura un antígeno durante la activación de las células NKT, la célula dendrítica se vuelve madura, y puede inducir a una célula T específica de antígeno.

La referencia de no patente 4 describe que, en la maduración de las células dendríticas mediante las células NKT, son importantes el IFN-γ y el TNF-α, así como la señal CD40.

La referencia de no patente 5 describe que las células NKT humanas activadas *in vitro* pueden eliminar la diana de expresión de CD1d que presenta α-GalCer.

La referencia de no patente 6 describe que CD1d se expresa en la línea celular de leucemia de células B, y puede mediar la presentación de α-GalCer a las células NKT.

La referencia de no patente 7 describe que, en la activación de las células NKT, las células T específicas de antígeno no pueden inducirse sin la maduración de las células dendríticas y la captación del antígeno por las células.

La referencia de no patente 8 describe que la administración de antígenos durante la activación de las células NKT mediante la administración de α-GalCer induce una respuesta inmunológica específica de antígeno.

La referencia de no patente 9 se refiere al uso de células tumorales irradiadas para inmunoterapia.

Sin embargo, todavía no se ha desarrollado un método que permita la inducción simultánea de la activación de las células NKT y la respuesta inmunológica de las células T frente a tumores, el cual se desea fervientemente para el establecimiento de una inmunoterapia tumoral.

referencia de no patente 1: Fujii et al., Nature Immunology 3: 867-874 (2002)
referencia de no patente 2: Fujii et al., Journal of Immunological Methods 272: 147-159 (2003)
referencia de no patente 3: Fujii et al., The Journal of Experimental Medicine 198: 267-279 (2003)
referencia de no patente 4: Fujii et al., The Journal of Experimental Medicine 199: 1607-18 (2004)
referencia de no patente 5: Metelitsa et al., The Journal of Immunology 167: 3114-3122 (2001)
referencia de no patente 6: Fais et al., International Journal of Cancer 109: 402-11 (2004)

referencia de no patente 7: Hermans et al., The Journal of Immunology 171: 5140-5147 (2003)
referencia de no patente 8: Silk et al., The Journal of Clinical Investigation 114, 1800-11 (2004)
referencia de no patente 9: Liu et al., Journal of Experimental Medicine, 202: 1507-1516 (2005)

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar un inmunoinductor que induzca simultáneamente la activación de células NKT y la respuesta inmunológica de células T a los tumores.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores descubrieron inesperada y sorprendentemente que una célula tumoral pulsada con un ligando de CD1d induce una respuesta inmunológica muy intensa específica de la célula tumoral, en particular la activación simultánea de las células NK/NKT y la respuesta inmunológica de las células T. Los presentes inventores han realizado además estudios intensivos y han descubierto que la respuesta inmunológica antitumoral mencionada anteriormente depende del CD1d expresado en una célula tumoral, y similares. Basándose en los hallazgos anteriores, los presentes inventores han concluido que un antígeno tumoral y la célula que co-expresa CD1d, que se pulsa con un ligando de CD1d, puede inducir una respuesta inmunológica muy fuerte específica para la célula tumoral, en particular, la activación simultánea de las células NK/NKT y la respuesta inmunológica de las células T. Dicha metodología se considera ampliamente aplicable no sólo a la inmunoterapia tumoral, sino también a la inmunoterapia de las células y organismos que expresen un antígeno diana específico, por ejemplo, células infectadas por virus y patógenos (por ejemplo, virus). La idea de utilizar una célula que co-expresa antígeno diana y CD1d, que se pulsa con un ligando de CD1d, para la inducción de la inmunidad al antígeno diana (que incluye el producto que contiene el antígeno diana) no se describe ni se sugiere en las referencias de la técnica anterior mencionadas anteriormente.

Los presentes inventores han completado la presente invención basándose en lo anterior.

Es decir, la presente invención proporciona la siguiente invención.

[1] Un inmunoinductor para un antígeno diana, que comprende una célula que co-expresa antígeno diana y CD1d, en donde el antígeno diana y la célula que co-expresa CD1d ha sido pulsada con un ligando de CD1d y el ligando de Cd1d se presenta por lo tanto en la superficie de la célula a través de CD1d, para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de una enfermedad neoplásica o infección, siempre que la célula no sea una célula dendrítica.
[2] Una composición que comprende el inmunoinductor de [1] y un adyuvante, para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de una enfermedad neoplásica o infección.
[3] Uso de una célula que co-expresa antígeno diana y CD1d capaz de activar la inmunidad al antígeno diana, en donde el antígeno diana y la célula que co-expresa CD1d se ha pulsado con un ligando de CD1d y el ligando de CD1d se presenta por lo tanto en la superficie de la célula a través de CD1d, en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de una enfermedad neoplásica o una infección, siempre que la célula no sea una célula dendrítica.
[4] El uso de [3], en donde el medicamento comprende un adyuvante.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la cantidad de producción de IFN-γ de una célula mononuclear obtenida del hígado de un ratón co-cultivada con una célula tumoral pulsada con α-GalCer. CD1dB16: B16 con expresión mejorada de CD1d CD1dEL4: EL4 con expresión mejorada de Cd1d CD: célula dendrítica WT:tipo salvaje JαKO: ratón deficiente en el gen Ja281 (ratón deficiente en células NKT Va14+) -: no pulsada con α-GalCer +: pulsada con α-GalCer
La figura 2 muestra la cantidad de producción de IFN-γ en un ratón inmunizado con una célula tumoral pulsada con varias concentraciones de α-GalCer. Gal: α-GalCer CD/G: célula dendrítica pulsada con α-GalCer B16/G: célula B16 pulsada con α-GalCer CD1dB16/G: B16 con expresión mejorada de CD1d pulsada con α-GalCer
La figura 3 muestra la diferencia en inmunidad antitumoral en modelos de metástasis pulmonares.
La figura 4 muestra la respuesta inmunológica antitumoral en un ratón inmunizado con una célula tumoral pulsada con α-GalCer.
La figura 5 muestra los niveles relativos de expresión del ARNm de CD1d entre las líneas de células tumorales, medidos mediante un método de RT-PCR en tiempo real.
La figura 6 muestra los niveles relativos de expresión de la proteína CD1d entre las líneas de células tumorales, medidos mediante citometría de flujo. CD: célula dendrítica CD1dB16: B16 con expresión mejorada de CD1d CD1dEL4: EL4 con expresión mejorada de CD1d isotipo: ratIgG2b
La figura 7 muestra un efecto letal proporcionado por una célula mononuclear obtenida del hígado en células tumorales pulsadas o no pulsadas con el ligando de CD1d. Relación E/T: relación efector (E)/diana (T), donde la

célula mononuclear obtenida del hígado que contiene la célula NKT y la célula NK corresponde a E, y la célula tumoral corresponde a T.
La figura 8 muestra los resultados de la medición de la captación de CFSE por la célula dendrítica utilizando un citómetro de flujo.

Mejor modo de realizar la invención

(1. Células)

La presente invención proporciona un inmunoinductor para un antígeno diana, para su uso en la profilaxis o en el tratamiento de una enfermedad o infección neoplásica, que comprende una célula que co-expresa antígeno diana y CD1d, en donde la célula que co-expresa antígeno diana y CD1d se ha pulsado con un ligando de CD1d y, por lo tanto, el ligando de CD1d se presenta en la superficie de la célula a través de CD1d, siempre que la célula no sea una célula dendrítica. Dicha célula de coexpresión pulsada con un ligando de CD1d tiene la capacidad de activar la inmunidad frente al antígeno diana.

El ligando de CD1d se refiere a una sustancia presentada en una célula presentadora de antígeno (CPA) que expresa CD1d, que puede activar a las células NKT. Los ejemplos de "ligando de CD1d" incluyen α-GalCer (α-galactosilceramida), α-C-GalCer (α-C-galactosilceramida), iGB3 (isoglobotrihexosilceramida), GD3 (gangliósido 3), GSL-1 (ácido glucurónico con enlace alfa), GSL-1'SA (ácido galacturónico), con preferencia por α-GalCer y α-C-GalCer. La célula de la presente invención presenta el ligando de CD1d en la superficie celular a través de CD1d, y puede activar a las células NKT.

Los presentes inventores descubrieron primero que una célula predeterminada (por ejemplo, una célula que expresa antígeno diana y CD1d) pulsada con un ligando de CD1d es muy útil para inmunoterapia. Por ejemplo, a modo de antígeno diana y de célula que co-expresa CD1d, están presentes células que incluyen la linea celular B16 de melanoma obtenida de ratón y la linea celular EL4 de linfoma de células T obtenida de ratón. Sin embargo, sin dicho hallazgo por parte de los presentes inventores, no hay motivación para producir de manera intencionada una célula que co-exprese antígeno diana y CD1d que pueda utilizarse para el método desarrollado por los presentes inventores.

En la presente memoria descriptiva, cuando se desea hacer referencia, en particular, a una célula que co-expresa antígeno diana y CD1d pulsada con un ligando de CD1d, puede abreviarse como, cuando sea necesario, "célula pulsada de la presente invención" (que significa una célula que puede tener la capacidad de activar la inmunidad al antígeno diana). "Célula no pulsada" significa una célula que puede adquirir la capacidad de activar la inmunidad al antígeno diana después de pulsarse con un ligando de CD1d, pero no puede tener la capacidad de activar la inmunidad al antígeno diana ya que no está pulsada con el ligando de CD1d.

La célula de la presente invención puede aislarse y/o purificarse. El aislamiento y la purificación pueden realizarse mediante un método conocido propiamente dicho.

La célula de la presente invención también puede obtenerse de cualquier especie animal. Entre los ejemplos de tales especies animales se incluyen mamíferos tales como el ser humano, mono, chimpancé, perro, gato, caballo, bovino, cerdo, oveja, cabra, ratón, rata, cobaya, hámster, conejo y similares, dándose preferencia a una célula obtenida de un humano desde el punto de vista de la aplicación clínica.

La célula de la presente invención puede ser un tipo celular obtenido de cualquier tejido. Los ejemplos de tales tejidos incluyen estómago, intestino delgado (por ejemplo, duodeno, yeyuno, íleon, colon), intestino grueso, rectal, pulmón, páncreas, riñón, hígado, timo, bazo, glándula tiroidea, glándula suprarrenal, próstata, ovario, útero, médula ósea, piel y sangre periférica. La célula de la presente invención también puede ser un tipo celular concreto en los tejidos mencionados anteriormente o un tipo celular en un tejido distinto de los tejidos mencionados anteriormente. Los ejemplos de dicho tipo celular incluyen células epiteliales, células endoteliales, células epidérmicas, células intersticiales, fibroblastos, adipocitos, células mamarias, células mesangiales, células β del páncreas, células nerviosas, células gliales, células inmunitarias (por ejemplo, células T, células B, células NK, células NKT, macrófagos, mastocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos) y células precursoras y células madre de estas células.

Asimismo, la célula de la presente invención puede ser una célula obtenida de un animal (por ejemplo, una célula de cultivo primario) o una línea celular. La línea celular puede ser una línea celular existente o una línea celular recién preparada. La línea celular puede producirse mediante un método conocido per se.

Más importante aún, la célula de la presente invención es una célula que expresa tanto un antígeno diana como CD1d.

Un antígeno diana es un antígeno que se expresa en una célula anormal o patógeno, y no está particularmente limitado mientras se produzca la desaparición intracorpórea de la célula anormal o patógeno, o se espere una

disminución de la cantidad de la célula anormal o del patógeno debido a una acción inmunológica dirigida al antígeno. Entre los ejemplos del antígeno diana se incluyen el antígeno tumoral y el antígeno patogénico. La célula de la presente invención puede expresar uno o más antígenos diana para la misma diana.

El antígeno tumoral puede ser un antígeno de un tumor sólido que incluya tumores epiteliales y no epiteliales, o un tumor en un tejido hematopoyético. Si bien el antígeno del tumor sólido no está particularmente limitado, por ejemplo, pueden mencionarse MART-1/Melan-A, Mage-1, Mage-3, gp100, tirosinasa, CEA, PSA, CA-125, erb-2, Muc-1, Muc-2, TAG-72, AES, FBP, lectina-C, NY-ESO-1, galectina-4/(NY-CO-27, Pec60, HER-2/erbB-2/neu, telomerasa, G250, Hsp105, una mutación puntual en el oncogén ras, una mutación puntual en el oncogén p53 y el antígeno carcinoembrionario (por ejemplo, documentos JP-A-2005-139118, JP-A-2004-147649, JP-A-2002-112780, JP-A-2004-222726). Si bien el antígeno tumoral (por ejemplo, leucemia) en un tejido hematopoyético no está particularmente limitado, pueden mencionarse, por ejemplo, proteinasa 3, WT-1, hTERT, PRAME, PML/RAR-a, DEK/CAN, ciclofilina B, TEL-MAL1, BCR-ABL, OFA-iLRP, Survivina, idiotipo, proteína de esperma 17, SPAN-Xb, CT-27 y MUC1.

El antígeno patogénico puede ser un antígeno patogénico de un virus, un antígeno patogénico de microorganismos o un antígeno patogénico protozoario. Si bien el antígeno de un virus patógeno no está particularmente limitado, pueden mencionarse, por ejemplo, GP-120, p17, GP-160 (que son del HIV), NP, HA (que son del virus influenza), antígenos de HB, proteína de la envuelta del VHB, proteína nuclear, proteína polimerasa, NS3, NS5 (que son de virus de la hepatitis), HSVdD (virus del herpes simple), EBNA1, 2, 3A, 3B y 3C, LMP1 y 2, BZLF1, BMLF1, BMRF1, BHRF1 (que son virus EB), Tax (HTLV-I), proteína de la espícula del SARS-CoV (virus del SARS), CMV pp5, IE-1 (que son de CMV), proteínas E6, E7 (que son de VPH) (por ejemplo, documento JP-A-2004-222726). Los ejemplos de antígenos patogénicos de microorganismos incluyen los antígenos expresados en bacterias patógenas (por ejemplo, clamidias, micobacterias, Legionella) o levaduras patógenas (por ejemplo, aspergillus, Candida). Los ejemplos de antígenos patogénicos protozoarios incluyen antígenos expresados en la malaria o en la coinfección esquistosomiasis-malaria.

Se sabe que CD1d es una molécula similar a un antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que presenta glucolípidos en lugar de péptidos. CD1d se expresa en la célula presentadora del antígeno (por ejemplo, una célula dendrítica), células epiteliales en los tejidos del intestino, hígado y similares, algunas células tumorales (por ejemplo, células de tumores sólidos, células de leucemia) y células infectadas por virus.

La célula de la presente invención también puede ser una célula normal o anormal. La célula normal se refiere a una célula que no está en estado patogénico. Por otro lado, la célula anormal se refiere a una célula en estado patogénico. Los ejemplos de la célula anormal incluyen una célula tumoral y una célula infectada por virus. La célula tumoral puede ser una correspondiente al tipo celular mencionado anteriormente. Los ejemplos de células infectadas por virus incluyen los tipos celulares infectados con un virus patogénico mencionados anteriormente. Si bien el virus patógeno no está particularmente limitado, pueden mencionarse, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis (por ejemplo, de tipo A, tipo B, tipo C, tipo D y el virus de la hepatitis tipo E), virus de la gripe, virus del herpes simple, virus del Nilo Occidental, virus del papiloma humano, virus de la encefalitis equina y virus de la leucemia de células T humano (por ejemplo, HTLV-I).

La célula de la presente invención también puede ser no transformante o transformante. Cuando se utiliza en la presente memoria descriptiva, la transformación se refiere a una manipulación transgénica artificial y el transformante significa una célula producida por dicha manipulación artificial. Por tanto, una célula producida por una manipulación no artificial se trata como una que no se clasifica como transformante en la presente memoria descriptiva. Para ser más precisos, cuando la célula de la presente invención es transformante, la célula de la presente invención puede producirse mediante transformación, como una célula hospedadora, una célula que no expresa ni el antígeno diana ni el CD1d, o una célula que expresa de manera natural tanto el antígeno diana como CD1d o uno de ellos, con un vector que exprese al menos un antígeno diana, o un vector que exprese al menos CD1d o 1 o 2 vectores que expresen al menos un antígeno diana y CD1d (el detalle del vector de expresión se describe más adelante). En la transformación, la célula hospedadora puede ser cualquier célula, y puede ser, por ejemplo, una célula normal o una célula anormal (por ejemplo, una célula tumoral tal como una célula de leucemia y similares, una célula infectada por un virus) o una célula que no expresa de manera natural un antígeno diana y CD1d, una célula que expresa de manera natural un antígeno diana, una célula que expresa de manera natural CD1d, o una célula que expresa de manera natural un antígeno diana y CD1d.

La célula de la presente invención también puede ser una célula en la que se han introducido antígenos diana o una célula en la que no se han introducido antígenos diana. Cuando se utiliza en la presente memoria descriptiva, la introducción de un antígeno diana significa una acción artificial de transferencia de antígenos diana, y una célula con un antígeno diana introducido significa una célula producida por dicha acción artificial. Por tanto, en la presente memoria descriptiva una célula producida por una acción no artificial se trata como una que no se clasifica como una célula con un antígeno diana introducido. Para ser más precisos, cuando la célula de la presente invención es una célula con un antígeno diana introducido, la célula de la presente invención puede producirse por la incorporación de un antígeno diana, como una célula hospedadora, en una célula que no expresa ni el antígeno diana ni el CD1d, o en una célula que expresa de manera natural tanto el antígeno diana como CD1d o uno de ellos.

La célula de la presente invención también puede ser una célula derivada de una célula presentadora de antígeno (CPA) o no CPA, siendo cada una de origen natural. Los ejemplos de CPA de origen natural incluyen los macrófagos, células B, células de Langerhans y células T activadas. Por tanto, la célula de la presente invención puede ser una CPA de origen natural o una no CPA que alberga un antígeno diana incorporado o transformado con un vector que expresa al menos un antígeno diana, un vector que expresa al menos CD1d, o 1 o 2 vectores que expresan al menos un antígeno diana y CD1d.

La célula de la presente invención también puede ser una célula derivada de una célula presentadora de antígeno que expresa CD1d (CPA que expresa CD1d) o una CPA que no expresa CD1d, siendo cada una de origen natural. La CPA que expresa CD1d se refiere a una célula capaz de activar a las células NKT, que tiene CD1d en su superficie. Los ejemplos de CPA que expresan CD1d incluyen macrófagos y células B. Por tanto, la célula de la presente invención puede ser una CPA de origen natural que expresa CD1d o una CPA que no expresa CD1d que alberga un antígeno diana incorporado o transformado con un vector que expresa al menos un antígeno diana, un vector que expresa al menos CD1d, o 1 o 2 vectores que expresan al menos un antígeno diana y CD1d.

Por otra parte, como la célula de la presente invención, se puede utilizar, además, una célula derivada de un individuo a inmunizar con una célula (singénica con respecto al sujeto de la administración), una célula obtenida de otro individuo alogénica para un individuo a inmunizar con una célula (célula alogénica con respecto al sujeto de la administración), o una célula obtenida de un individuo heterogénea para un individuo a inmunizar con una célula (heterogénea con respecto al sujeto de la administración). Dado que el objetivo es la inducción de una respuesta inmunológica de células T frente a un antígeno tumoral de uno mismo, es preferente una célula singénica.

La célula pulsada de la presente invención es, como se menciona a continuación, útil como agente farmacéutico, activador de inmunidad y similares. La célula no pulsada de la presente divulgación es útil, por ejemplo, para la producción de la célula pulsada de la presente invención.

(2. Preparación y métodos de identificación)

Ahora se describe un método para preparar la célula de la presente invención.

El método de preparación de la célula no pulsada de la presente divulgación puede incluir tratar una célula de manera que el antígeno diana y la CD1d se co-expresen en la célula objeto, o que la expresión del antígeno diana y/o CD1d se potencie en el antígeno diana y en la célula que co-expresa CD1d.

Por ejemplo, cuando el método de preparación de la presente divulgación incluye el tratamiento de una célula de tal manera que el antígeno diana y la CD1d se co-expresen en la célula objeto, la célula objeto puede ser una célula que no exprese ni el antígeno diana ni CD1d, o una célula que exprese solo uno del antígeno diana y CD1d.

Además, cuando el método de preparación de la presente divulgación incluye el tratamiento de una célula de manera que la expresión del antígeno diana y/o CD1d se potencie en la célula que co-expresa el antígeno diana y CD1d, la expresión del antígeno diana y/o CD1d puede potenciarse hasta el punto en el que el efecto del tratamiento de la inmunoterapia que utiliza la célula de la presente invención esté lo suficientemente aumentado.

El tratamiento en el método de preparación de la presente divulgación puede ser una transformación o una actividad para introducir un antígeno diana. Para ser más precisos, el método de preparación de la presente divulgación puede incluir (a) transformar una célula que exprese CD1d con un vector que exprese al menos un antígeno diana, (b) transformar una célula que exprese un antígeno diana con un vector que exprese al menos CD1d, (c) transformar una célula con 1 o 2 vectores que expresen al menos un antígeno diana y CD1d, (d) incorporar un antígeno diana propiamente dicho en una célula que exprese CD1d, o e) transformar una célula con un vector que exprese al menos CD1d e incorporar el antígeno diana propiamente dicho en la célula, o f) incorporar un antígeno diana propiamente dicho en una célula y transformar la célula con un vector que exprese al menos CD1d. La transformación de la célula puede realizarse mediante un método conocido per se, tal como un método de lipofección, un método de precipitación con fosfato de calcio, un método de electroporación y similares. La introducción del antígeno diana en la célula puede realizarse, por ejemplo, utilizando un choque hiperosmótico, electroporación, un liposoma o una proteína de fusión de un péptido señal, que permita la captación intracelular, y un antígeno diana.

En el método de preparación mencionado anteriormente, las células que expresan CD1d en (a) y (d) pueden ser una célula que exprese CD1d y no exprese un antígeno diana, o una célula que exprese tanto un antígeno diana como CD1d. La célula que expresa el antígeno diana en (b) puede ser una célula que exprese un antígeno diana y no exprese CD1d, o una célula que exprese tanto un antígeno diana como CD1d. Las células en (c), (e) y (f) pueden ser una célula que no exprese ni un antígeno diana ni CD1d, una célula que exprese un antígeno diana y no exprese CD1d, una célula que exprese CD1d y no exprese un antígeno diana, o una célula que exprese tanto un antígeno diana como CD1d.

En otro aspecto, el método de preparación de la presente divulgación puede ser un método de preparación de la

célula pulsada de la presente invención. El método de preparación de la célula pulsada de la presente invención puede incluir tratar un antígeno diana y una célula que co-expresa CD1d con un ligando de CD1d en un medio de cultivo. Mediante dicho tratamiento, el ligando de CD1d se presenta en el antígeno diana y la célula que co-expresa CD1d, y la célula que co-expresa puede adquirir la capacidad de activar la inmunidad al antígeno diana.

El medio de cultivo puede prepararse utilizando, como medio basal, un medio utilizado para cultivar células animales. Los ejemplos del medio basal incluyen al medio MEM, medio DMEM, medio αMEM, medio de Ham, medio RPMI1640, medio de Fisher, y un medio mixto de los mismos. El medio de cultivo puede contener, por ejemplo, suero (por ejemplo, FCS), sustituto de suero (por ejemplo, sustituto de suero knockout (KSR)), ácido graso o lípido, aminoácido, vitamina, factor de crecimiento, citocina, antioxidante, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, agente tamponador, sales inorgánicas y similares. Según convenga, pueden establecerse otras condiciones de cultivo tales como la temperatura de cultivo, la concentración de CO_2 y similares. Si bien la temperatura del cultivo no está particularmente limitada, por ejemplo, es de aproximadamente 30 - 40 °C, preferentemente de aproximadamente 37 °C. La concentración de CO_2 es, por ejemplo, aproximadamente del 1 - 10 %, preferentemente aproximadamente del 5%. Pueden establecerse adecuadamente otras condiciones tales como el número de células a cultivar, las concentraciones de diversos factores y similares mediante métodos conocidos per se.

La célula que se utilizará para la preparación de la célula pulsada de la presente invención no está particularmente limitada mientras sea una célula que co-expresa un antígeno diana y CD1d y no sea una célula dendrítica. A modo de célula que co-expresa un antígeno diana y CD1d, por ejemplo, puede usarse una célula tratada o una célula no tratada.

Cuando una célula tratada (por ejemplo, una transformante) se utiliza como célula que co-expresa antígeno diana y CD1d, el método de preparación de la presente divulgación puede incluir el tratamiento de una célula de manera que el antígeno diana y CD1d se co-expresen en la célula objeto o que la expresión del antígeno diana y/o CD1d se potencie en la célula que co-expresa el antígeno diana y CD1d, y la obtención del antígeno diana y la célula que co-expresa CD1d. La metodología es la misma que la del método de preparación de la presente divulgación mencionado anteriormente. La célula objeto puede ser una célula obtenida de un individuo para administrarse con la célula de la presente invención (célula singénica), una célula obtenida de un individuo alogénica para el individuo al que se administrará la célula de la presente invención (célula alogénica), o una célula obtenida de un individuo heterogénea para el individuo al que se administrará la célula de la presente invención (célula heterogénea).

Por otro lado, cuando se utiliza una célula no tratada (por ejemplo, no transformante) como célula que co-expresa el antígeno diana y CD1d, el método de preparación de la presente divulgación puede incluir además la recuperación de la célula que co-expresa el antígeno diana y/o CD1d a partir de una muestra biológica obtenida de un individuo para proporcionar la célula que co-expresa el antígeno diana y CD1d. Los ejemplos de la muestra biológica obtenida de un individuo incluyen muestras biológicas tales como una masa tumoral, sangre periférica, hígado, ganglio linfático, bazo y similares. Los ejemplos de la célula obtenida de un individuo incluyen células anormales tales como células tumorales (por ejemplo, una célula de leucemia), una célula infectada por virus y similares (la célula anormal puede ser del mismo tipo que la célula de la presente invención). El individuo puede ser del mismo tipo que la especie animal mencionada anteriormente. El individuo también puede ser igual o diferente del individuo al que se le administra la célula de la presente invención.

Cuando una célula no tratada (la propia célula obtenida de un individuo) se utiliza como una célula que coexpresa un antígeno diana y CD1d, cuando sea necesario, es posible identificar utilizando una parte de la muestra biológica que contiene la célula no transformante, si la célula contenida en la muestra expresa o no tanto el antígeno diana como CD1d. La presente divulgación también proporciona dicho método de identificación. Los presentes inventores descubrieron por primera vez que una célula que co-expresa antígeno diana y CD1d pulsada con un ligando de CD1d es muy útil para una inmunoterapia. Sin dicho hallazgo por parte de los presentes inventores, no hay motivación para identificar intencionadamente una célula que co-exprese un antígeno diana y CD1d (en particular, una célula de co-expresión obtenida de un individuo) que pueda utilizarse para el método desarrollado por los presentes inventores. Cuando se obtiene un tumor como muestra biológica, se considera que el antígeno tumoral se expresa de manera natural en una célula contenida en la muestra. En tal caso, por tanto, no siempre es necesario confirmar la expresión del antígeno tumoral en el método de identificación de la presente divulgación y solo basta con la confirmación de la expresión de CD1d. Lo mismo se aplica a otros antígenos diana.

Por tanto, el método de identificación de la presente divulgación puede incluir la medición de la expresión de CD1d o las expresiones del antígeno diana y CD1d en la célula objeto. Entre los ejemplos de la célula objeto se incluyen una célula tratada y una no tratada, y la célula ya existente y la célula nueva. Los ejemplos de la célula objeto y/o de una célula obtenida de un individuo incluyen células anormales tales como una célula tumoral, una célula infectada por virus y similares (la célula anormal puede ser del mismo tipo que la célula de la presente invención).

La expresión del antígeno diana y de CD1d puede medirse mediante un método conocido per se y utilizando, por ejemplo, cebadores plurales (por ejemplo, pares de cebadores) que puedan amplificar el antígeno diana y/o CD1d, una sonda de ácido nucleico que pueda detectar al antígeno diana y/o a CD1d, o un anticuerpo para el antígeno diana y/o para CD1d.

El método de preparación de la presente divulgación es útil, por ejemplo, para la preparación de la célula de la presente invención que tiene las ventajas mencionadas anteriormente. El método de identificación de la presente divulgación es útil, por ejemplo, para la detección de una célula necesaria para la preparación de la célula pulsada de la presente invención.

(3. Vector de expresión)

Cuando se utiliza en la presente memoria descriptiva, un vector que expresa al menos un antígeno diana significa un vector que expresa un antígeno diana solo, o un vector que expresa un antígeno diana y otros factores útiles. Los ejemplos de vectores que expresan al menos un antígeno diana incluyen un vector de expresión de antígeno diana y un vector de co-expresión de antígeno diana y CD1d.

El vector que expresa al menos CD1d es un vector que expresa un vector que expresa CD1d solo, y un vector que expresa CD1d y otros factores útiles. Entre los ejemplos de vectores que expresan al menos CD1d figuran un vector de expresión de CD1d y un vector de co-expresión de un antígeno diana y CD1d.

Los 1 o 2 vectores que expresan al menos un antígeno diana y CD1d son un único vector que expresa tanto un antígeno diana como CD1d, o una combinación de un vector que expresa al menos un antígeno diana y un vector que expresa al menos CD1d. Los ejemplos de los 1 o 2 vectores que expresan al menos un antígeno diana y CD1d incluyen un vector de co-expresión de CD1d y un antígeno diana y una combinación de un vector de expresión de un antígeno diana y un vector de expresión de CD1d.

La presente divulgación también proporciona dicho vector de co-expresión.

El vector de co-expresión de la presente divulgación puede contener un primer polinucleótido que codifique un antígeno diana y un segundo polinucleótido que codifique CD1d. El vector de co-expresión de la presente divulgación puede contener también un promotor vinculado funcionalmente al primer y al segundo polinucleótidos mencionados anteriormente. La vinculación funcional del promotor significa que el promotor está unido al polinucleótido de tal manera que permite la expresión de un factor codificado por el polinucleótido bajo regulación.

Para ser más precisos, el vector de co-expresión de la presente divulgación puede ser un vector de expresión de ARNm policistrónico. El vector de expresión de ARNm policistrónico puede contener un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido conjugado, que permite la expresión de un antígeno diana y de un ARNm policistrónico de CD1d, y de un promotor vinculado funcionalmente al conjugado.

El vector de co-expresión de la presente divulgación puede ser también un vector de expresión de ARNm no policistrónico. El vector de expresión de ARNm no policistrónico puede contener un primer polinucleótido y un primer promotor vinculado funcionalmente al polinucleótido, así como un segundo polinucleótido y un segundo promotor vinculado funcionalmente al polinucleótido.

El promotor que se utilizará para un vector de co-expresión no está particularmente limitado, siempre que pueda funcionar en una célula en la que se vaya a introducir. Pueden mencionarse ejemplos del mismo que incluyen promotores virales tales como el promotor temprano derivado del SV40, LTR del citomegalovirus, LTR del virus del sarcoma de Rous, LTR derivado del MoM-uLV, un promotor temprano derivado de adenovirus y similares, promotores del gen de una proteína constitutiva de los mamíferos tal como el promotor del gen de la β-actina, promotor del gen PGK, promotor del gen de la transferrina y similares. Además, también se puede utilizar un promotor específico de una célula para introducirse en dicha célula. Los ejemplos de dicho promotor incluyen promotores específicos de células anormales, tales como el promotor específico de células tumorales, el promotor específico de una célula infectada por el virus (por ejemplo, un promotor tardío de virus) y similares. No solo el vector de co-expresión de la presente divulgación puede tener dicho promotor sino también el vector de expresión que se utilizará en la presente invención.

El vector de co-expresión contiene preferentemente una señal de terminación de la transcripción, es decir, una región terminadora, aguas abajo del oligo(poli)nucleótido que codifica una molécula de ácido nucleico. Puede contener además un gen marcador de selección (gen que proporciona resistencia a agentes farmacéuticos (por ejemplo, tetraciclina, ampicilina, kanamicina, higromicina, fosfinotricina), un gen que complemente una mutación auxótrofa, etc.) para seleccionar una célula transformada.

Un vector que sea la estructura básica de un vector de co-expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido o un vector viral (por ejemplo, un vector derivado de un virus tal como el adenovirus, retrovirus, virus adenoasociado, herpesvirus, virus vaccinia, poxvirus, virus de la polio, virus Sindbis, virus hemaglutinante de Japón, lentivirus y similares).

El vector de co-expresión de la presente divulgación es, como el agente de la presente invención mencionado anteriormente, útil, por ejemplo, como agente farmacéutico, y para la activación de células inmunitarias y para la

preparación de la célula de la presente invención.

(4. Agente y composición)

La presente invención proporciona un agente (o composición) que contiene la célula de la presente invención, para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de una enfermedad neoplásica o infección.

La especie animal a la que se administra el agente de la presente invención puede ser la misma que la especie animal de la que deriva el antígeno diana y la célula que co-expresa CD1d. Por tanto, el agente de la presente invención puede lograr la inmunización con una célula singénica, alogénica o heterogénea en la inmunización con la célula de la presente invención.

El agente de la presente invención puede contener, además de la célula de la presente invención pulsada con un ligando Cd1d, cualquier vehículo, por ejemplo, vehículos y/o adyuvantes aceptables farmacéuticamente. Los ejemplos de vehículos aceptables farmacéuticamente incluyen, pero no se limitan a, diluyentes tales como agua, suero y similares. Si bien el adyuvante no está particularmente limitado mientras pueda mejorar la antigenicidad del antígeno diana, pueden mencionarse, por ejemplo, BCG, dimicolato de trehalosa (TDM), Merck65, AS-2, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, dextrano y el ligando TLR (por ejemplo, lipopolisacárido (LPS), CpG).

El agente de la presente invención es útil, por ejemplo, como un agente o reactivo farmacéutico. Para ser más precisos, el agente de la presente invención es útil para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades neoplásicas o infecciones, o para la inmunoterapia (por ejemplo, la activación de inmunocitos tales como las células NK/NKT, células T y similares). Los ejemplos de enfermedades neoplásicas posiblemente prevenidas o tratadas por el agente de la presente invención incluyen tumores en los tejidos y en los tipos celulares mencionados anteriormente, tales como un tumor sólido (por ejemplo, tumor epitelial, tumor no epitelial) y tumores en los tejidos hematopoyéticos. Para ser más precisos, entre los ejemplos del tumor sólido prevenido o tratado posiblemente por el agente de la presente invención se encuentran el cáncer digestivo (por ejemplo, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer rectal), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de células pequeñas, cáncer de células no pequeñas), cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de timo, cáncer de bazo, cáncer de tiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de ovario, cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma de endometrio, cáncer de cuello de útero), cáncer de huesos, cáncer de piel, sarcoma (por ejemplo, el sarcoma de Kaposi), melanoma, blastoma (por ejemplo, neuroblastoma), adenocarcinoma, carcinoma planocelular, carcinoma no planocelular, tumor cerebral, así como la recidiva y metástasis de estos tumores sólidos. Los ejemplos del tumor en el tejido hematopoyético prevenido o tratado posiblemente por el agente de la presente invención incluyen la leucemia (por ejemplo, la leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células T del adulto (ATL), síndrome mielodisplásico (SMD)), linfoma (por ejemplo, linfoma de células T, linfoma de células B, linfoma de Hodgkin, mieloma (mieloma múltiple), así como la recidiva de estos tumores. Los ejemplos de las infecciones tratadas posiblemente por el agente de la presente invención incluyen infecciones causadas por los patógenos mencionados anteriormente.

Los presentes inventores también han descubierto en la actualidad que un antígeno diana y una célula que co-expresa CD1d pulsada con un ligando de CD1d pueden tener la capacidad de inducir simultáneamente la activación de las células NK/NKT y la respuesta inmunológica de las células T. Se sabe que las células NK/NKT tienen como objetivo adecuado a las células que no expresan el MHC de clase I, y las células T tienen como objetivo adecuado las células que expresan el MHC de clase I. Por consiguiente, el agente de la presente invención es ventajoso en el sentido de que se puede esperar un efecto en varias células que expresan antígenos diana.

Aunque la dosis del agente de la presente invención varía dependiendo del tipo de célula pulsada de la presente invención (pulsada con un ligando de CD1d), de los niveles de expresión del antígeno diana y CD1d en la célula pulsada de la presente invención, del modo de administración, de la gravedad de la enfermedad, de la especie animal del sujeto de administración y de la aceptabilidad, peso corporal, edad del sujeto de administración y similares y no puede generalizarse, se pueden administrar células de manera apropiada en un número que permita una inmunoactividad deseada.

La presente invención se explica con más detalle a continuación, refiriéndose a los ejemplos, que son meras ejemplificaciones y no limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplos

(Materiales y métodos)

(Preparación de la célula tumoral pulsada con α-GalCer)

Como línea de células tumorales pulsada con α-GalCer, se utilizó la línea celular de melanoma obtenido de ratón

B16 y la línea celular de linfoma T obtenido de ratón EL4. Se añadió α-GalCer a B16 ($2x10^4$ células/ml) o a EL4 ($1x10^5$ células/ml) a una concentración de 500 ng/ml, y las células se cultivaron al 5% de CO_2, a 37 °C. Como medio de cultivo, se utilizó un 10 % de FCS que contenía RPMI (10 ml). Después de un cultivo durante 2 días, las líneas celulares B16 o a EL4 pulsadas con α-GalCer se lavaron 4 veces con PBS y luego se recolectaron.

(Preparación de la célula dendrítica pulsada con α-GalCer)

Se recolectaron células de la médula ósea del fémur y de la tibia de ratones de tipo salvaje (C57BL/6, hembras, de 6 a 8 semanas de edad), y se eliminaron las células positivas para CD4, CD8, B220 o I-Ab utilizando anticuerpos y complementos. Las células obtenidas se ajustaron a $1x10^6$ células/ml con GM-CSF (10 ng/ml) y RPMI que contenía 5 % de FCS y se cultivaron en una placa de 24 pocillos. El medio se cambió cada dos días y se añadió α-GalCer a 100 ng/ml el día 6. El día 7, se añadió LPS (100 ng/ml) y se maduraron las células dendríticas. Las células se recolectaron el día 8 y se lavaron con PBS.

(Preparación de la célula mononuclear)

Las células mononucleares se prepararon a partir del bazo y el hígado. El bazo se extrajo de ratones de tipo salvaje (C57BL/6, hembras, de 6 a 8 semanas de edad), se filtró con un colador de células, los glóbulos rojos se hemolizaron con un tampón de lisis ACK, y las células mononucleares se lavaron para obtener células mononucleares obtenidas del bazo. Además, se extrajo el hígado de ratones de tipo salvaje o de ratones con deficiencia del gen Jα281(ratón con deficiencia de células NKT Vα14+: por ejemplo, véase Fujii et al., The Journal of Experimental Medicine 198: 267-279 (2003), y Fujii et al., The Journal of Experimental Medicine 199: 1607-18 (2004)), se filtraron con una malla de acero inoxidable y se separó una capa de células mononucleares usando un Percoll mediante el método de centrifugación de gradiente de densidad para obtener células mononucleares obtenidas del hígado.

(Producción de un modelo animal de metástasis pulmonar y la evaluación del mismo)

Las células de melanoma B16 se ajustaron a $5x10^5$/200 µl con PBS y se administraron por vía intravenosa a ratones (C57BL/6, hembras, de 6 a 8 semanas de edad) por la vena de la cola. Después de 2 semanas, se extrajo el pulmón de los ratones y se midió el número de células B16 metastásicas en el pulmón.

Ejemplo 1: Activación *in vitro* de la célula NKT/NK por la célula tumoral pulsada con el ligando de CD1d

La célula B16 o EL4 pulsada con α-GalCer, o la célula dendrítica (control) pulsada con α-GalCer se co-cultivó con una célula mononuclear (fracción que contiene la célula NKT/NK) obtenida del hígado de un ratón de tipo salvaje o de un ratón con deficiencia del gen Ja281 (ratón con deficiencia de célula NKT Va14+), y se midió el nivel de IFN-γ en el sobrenadante del cultivo mediante ELISA y utilizando un anticuerpo anti-IFN-γ. Dado que el IFN-γ es una sustancia producida específicamente por células NKT/NK activadas, el nivel de IFN-γ en el sobrenadante del cultivo puede ser un indicio de células NKT/NK activadas. Además, se realizó un experimento similar al anterior utilizando B16 y EL4 en las que se había introducido un vector de expresión de CD1d de retrovirus (producido mediante el uso del gen CD1d de ratón (N.º de referencia de GenBank: NM-007639)).

Como resultado, tanto las células B16 como las EL4 pulsadas con α-GalCer activaron las células NKT/NK (Fig. 1). Además, Las células B16 y EL4 pulsadas con α-GalCer y que contenían un vector de expresión de CD1d de retrovirus activaban las células NKT/NK más que las células B16 y EL4 pulsadas con α-GalCer y sin el vector (Fig. 1).

Por lo anterior, ha quedado claro que las células tumorales pulsadas con un ligando de CD1d activan a las células NKT/NK *in vitro* de manera dependiente del nivel de expresión de CD1d.

Ejemplo 2: Activación *in vivo* de células NKT por células tumorales pulsadas con el ligando de CD1d

Se administraron células B16 ($5x10^5$ células) o células dendríticas (control, $1x10^6$ células) pulsadas con α-GalCer por vía intravenosa a ratones (C57BL/6, hembras, de 6 a 8 semanas de edad) por la vena de la cola. Dos días después de la administración, se aisló el bazo de los ratones, se filtró con un colador de células, los glóbulos rojos se hemolizaron con tampón de lisis ACK, y los esplenocitos se ajustaron con RPMI que contenía un 5% de FCS. ($3x10^5$células/pocillo) se cultivaron durante 16 h en presencia de α-GalCer de la misma manera que en el ejemplo 1 y se midió el nivel de IFN-γ en el sobrenadante del cultivo mediante ELISPOT y utilizando un anticuerpo anti-IFN-γ. Además, se realizó un experimento similar al anterior utilizando células B16 en las que se había introducido un vector de expresión de CD1d de retrovirus.

Como resultado, las células dendríticas pulsadas con α-GalCer indujeron a las células NKT productoras de IFN-γ reactivas con α-GalCer(figura 1). Cuando se utilizaron células B16, la eficiencia disminuyó pero las células NKT productoras de IFN-γ reactivas con α-GalCer pudieron inducirse de la misma manera, donde la capacidad de inducción dependía de la concentración de α-GalCer utilizada para pulsar y la capacidad de inducción era más

eficiente en B16 que expresa fuertemente CD1d (figura 2).

Por lo anterior, ha quedado claro que las células tumorales pulsadas con un ligando de CD1d activan a las células NKT *in vivo* de manera dependiente de la concentración de α-GalCer.

Ejemplo 3: Efecto antitumoral en un modelo animal de pulmón metastásico

Se examinó el efecto antitumoral de la producción de IFN-γ por células tumorales pulsadas con un ligando de CD1d. Se administró B16, o B16 con expresión de CD1d mejorada, o B16 pulsada con α-GalCer o B16 con expresión mejorada de CD1d pulsada con α-GalCer (ambas a $5x10^5$ células) por vía intravenosa a ratones. Después, tras 14 días desde la administración, se extrajo el pulmón de los ratones y se evaluó el efecto antitumoral.

Como resultado, los ratones del modelo metastásico a los que se había administrado B16 o B16 con expresión mejorada de Cd1d mostraron un aumento del tumor, pero el tumor aparentemente desapareció en los ratones del modelo a los que se les había administrado B16 pulsada con α-GalCer o B16 con expresión mejorada de CD1d pulsada con α-GalCer (figura 3).

Por lo anterior, ha quedado claro que las células tumorales pulsadas con un ligando de CD1d muestran un efecto antitumoral mediante una respuesta inmunológica espontánea incrementada.

Ejemplo 4: Inducción de linfocito T citotóxico contra antígeno tumoral

Se administró B16 (5×10^5 células) por vía subcutánea al ratón (ratón de tipo salvaje) al que se le había administrado B16 con expresión mejorada de CD1d pulsada con α-GalCer, cuyo tumor se confirmó que había desaparecido en el ejemplo 3. Además, se administró B16 (1×10^5 células) por vía subcutánea a un ratón con deficiencia de CD8 (comprado en Jackson Laboratory) al que se le había administrado B16 con expresión mejorada de CD1d pulsada con α-GalCer, y se comparó la resistencia al tumor de estos ratones.

Como resultado, el ratón de tipo salvaje expuesto a B16 mostró resistencia al tumor administrado por vía subcutánea. Sin embargo, el tumor no pudo eliminarse en el ratón deficiente en CD8 (figura 4). Esto muestra que la administración de una célula tumoral pulsada con un ligando de CD1d tal como α-GalCer lleva a la función de los linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) como una célula efectora, a través de la cual se proporciona un efecto antitumoral.

Por lo anterior, ha quedado claro que el método desarrollado por los presentes inventores puede derivar una CTL a un antígeno tumoral expresado en el tumor.

Ejemplo 5: Medición del nivel de expresión de CD1d en una línea celular tumoral

Para comparar los niveles de expresión de CD1d en varias líneas de células tumorales, se midieron mediante RT-PCR en tiempo real y citometría de flujo, los niveles de expresión de CD1d en la línea celular B16 de melanoma obtenido de ratón, en la línea celular de linfoma de células T obtenida de ratón EL4, en células plasmáticas obtenidas de ratón (célula B) línea J558, en la línea celular de leucemia monocítica obtenida de ratón WEHI-3B, y en las líneas celulares que albergan un gen CD1d introducido por un retrovirus.

Como resultado, se confirmó la expresión del ARNm de CD1d en todas las líneas de células tumorales, y la expresión del ARNm de CD1d en las líneas de células tumorales, en las que se había introducido el gen CD1d, mostró un notable incremento (figura 5). Asimismo, se examinó la expresión de la proteína CD1d en B16 y EL4 que mostraron un nivel relativamente más bajo de expresión del ARNm de CD1d para detectar la expresión de la proteína CD1d en estas líneas celulares y niveles de expresión notablemente incrementados debido al transgén de CD1d (figura 6).

Por lo anterior, ha quedado claro que estas células tumorales expresan la proteína CD1d y que la expresión de la proteína CD1d está notablemente potenciada en una célula que tiene un gen CD1d introducido.

Ejemplo 6: Célula tumoral que expresa CD1d como diana de las células NKT activadas

Después, se consideró si las células tumorales que expresan CD1d pueden o no ser una diana de las células NKT activadas. Para ser específicos, una célula tumoral se pulsó con α-Gal-Cer durante 48 horas y se marcó con ^{51}Cr. Después del lavado, la célula tumoral obtenida se co-cultivó con células mononucleares obtenidas del hígado, y se midió la cantidad de ^{51}Cr liberada, en base a la cual se midió la actividad citotóxica.

Como resultado, la célula tumoral que expresa necesariamente CD1d pulsada con α-GalCer liberó una cantidad mayor de ^{51}Cr que una célula tumoral no pulsada con α-GalCer. Esto muestra que una célula tumoral pulsada con un ligando de CD1d activa a las células NKT, y luego se elimina como diana de las células NKT.

Por lo anterior, ha quedado claro que una célula pulsada con un ligando de CD1d puede ser una diana de las células NKT.

Ejemplo 7: Célula tumoral que expresa CD1d como diana de las células NKT activadas

Después, se consideró si las células tumorales que expresan CD1d pueden o no ser una diana de las células NKT activadas. Para ser específicos, se marcaron células EL4 que expresan necesariamente CD1d pulsadas con α-GalCer con CFSE (éster de succinimidil-carboxifluoresceína) y se administró a un ratón. Después de 10 horas, se recolectaron los esplenocitos del ratón, y se midió la captación de CFSE por la célula dendrítica con un citómetro de flujo.

Como resultado, se ha confirmado la captación de CFSE por parte de la célula dendrítica CD11c+ (en particular, CD11c+CD8a+) (figura 8).

Por lo anterior, se ha sugerido que la célula tumoral administrada se elimina por la activación de las células NK/NKT, y el antígeno se captura y se presenta por la célula dendrítica adyacente, con lo que se puede lograr la inmunidad antitumoral.

(Conclusión)

Las células NKT son un grupo de células que conectan la inmunidad natural y la inmunidad adquirida a través de la maduración de las células dendríticas. En este estudio, se ha demostrado que cuando un ligando de CD1d se presenta por un tumor que expresa CD1d, puede mantenerse una clara activación *in vivo* de las células NKT que producen IFN-γ y las células NK, que la activación de las células NK/NKT elimina a la célula tumoral, y el antígeno se incorpora y se presenta por la célula dendrítica adyacente, y que la inmunidad adquirida al antígeno puede inducirse posteriormente. Una vez que se induce la inmunidad adquirida, la inmunidad tumoral se introduce en la memoria. De esta forma, una célula tumoral que expresa CD1d pulsada con un ligando puede inducir inmunidad natural a corto plazo e inmunidad adquirida a largo plazo, lo que se considera un método muy eficaz para la inmunoterapia tumoral en el futuro.

Por tanto, los logros de los estudios de los presentes inventores y los elementos derivados de los logros son los siguientes.

1) Los presentes inventores activaron con éxito a las células NK/NKT *in vivo* utilizando una célula tumoral pulsada con un ligando de CD1d *in vitro*. La administración única de un ligando de CD1d empleado convencionalmente activa las células NK/NKT solo temporalmente. Sin embargo, el presente método activa estas células de manera sostenida, lo que a su vez permite la producción de IFN-γ a largo plazo.
2) El presente método puede inducir células T citotóxicas contra el antígeno tumoral expresado en el tumor. Por tanto, el método puede establecer inmunidad adquirida y memoria inmunológica al tumor.
3) Las células NK/NKT y las células T se activaron con éxito por la fuerte expresión de una molécula CD1d en una célula tumoral mediante un transgén, y pulsando con un ligando de CD1d.
4) El presente método es muy conveniente ya que puede realizarse fácilmente una vez que se ha recolectado una célula tumoral.
5) De acuerdo con el método desarrollado por los presentes inventores, no solo es posible una inmunoterapia utilizando células tumorales de leucemia y similares, sino que también es posible una inmunoterapia utilizando células infectadas por virus que expresen antígenos específicos como células tumorales y similares.

Aplicabilidad industrial

En la presente invención, una célula que co-expresa un antígeno diana y CD1d adquiere, después de que se pulse con un ligando de CD1d, una capacidad de activación de la inmunidad para un antígeno diana. La célula obtenida de esta manera es útil para la profilaxis o el tratamiento o la inmunoterapia de enfermedades neoplásicas (por ejemplo, un tumor sólido que contenga un tumor epitelial o un tumor no epitelial, leucemia, linfoma, mieloma) o infecciones (por ejemplo, infecciones virales).

Esta solicitud se basa en la solicitud de patente N.º 2006-045193 presentada el 22 de febrero de 2006 en Japón.

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoinductor para un antígeno diana, que comprende una célula que co-expresa antígeno diana y CD1d, en donde el antígeno diana y la célula que co-expresa CD1d ha sido pulsada con un ligando de CD1d y el ligando de Cd1d se presenta por lo tanto en la superficie de la célula a través de CD1d, para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de una enfermedad neoplásica o infección, siempre que la célula no sea una célula dendrítica.

2. Una composición que comprende el inmunoinductor de la reivindicación 1 y un adyuvante, para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de una enfermedad neoplásica o infección.

3. Uso de una célula que co-expresa antígeno diana y CD1d capaz de activar la inmunidad al antígeno diana, en donde el antígeno diana y la célula que co-expresa CD1d se ha pulsado con un ligando de CD1d y el ligando de CD1d se presenta por lo tanto en la superficie de la célula a través de CD1d, en la fabricación de un medicamento para su uso en un método de profilaxis o tratamiento de una enfermedad neoplásica o una infección, siempre que la célula no sea una célula dendrítica.

4. El uso de la reivindicación 3, en donde el medicamento comprende un adyuvante.

FIG. 1

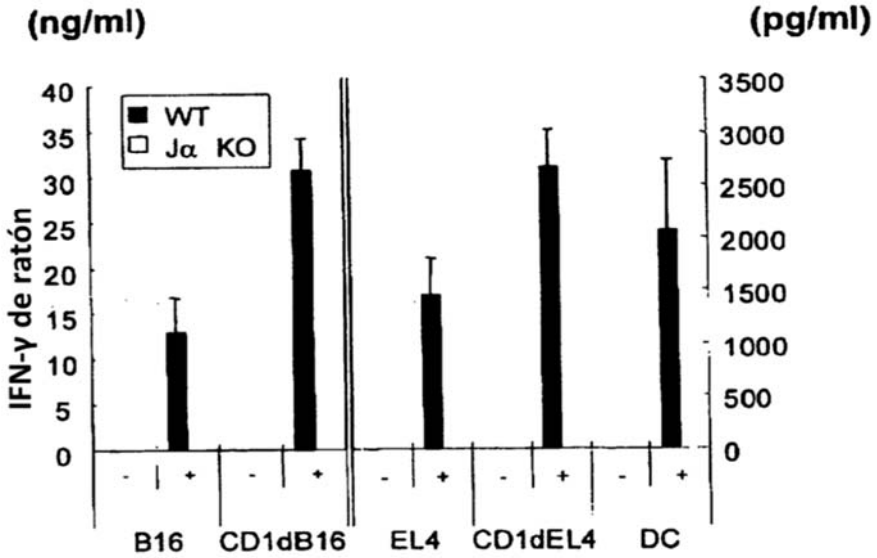

(ng/ml)
(pg/ml)
IFN-γ de ratón
WT
Jα KO
40
35
30
25
20
15
10
5
0
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
- + - + - + - + - +
B16
CD1dB16
EL4
CD1dEL4
DC

FIG. 2

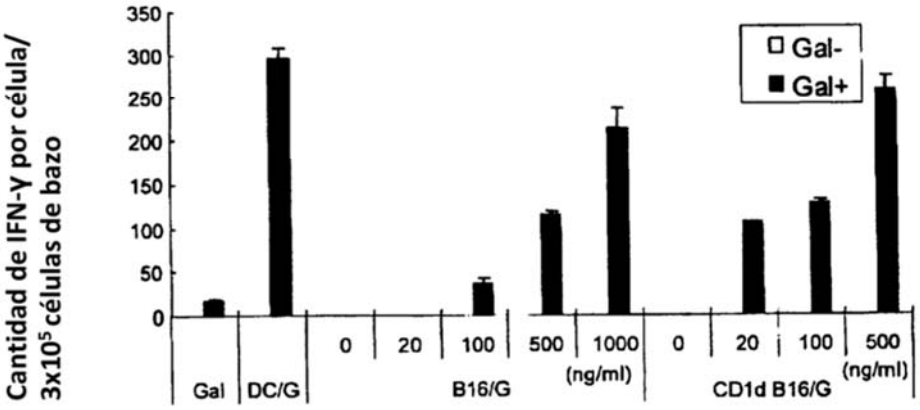

Cantidad de IFN-γ por célula/ 3x10⁵ células de bazo
Gal-
Gal+
350
300
250
200
150
100
50
0
Gal
DC/G
0
20
100
B16/G
500
1000
(ng/ml)
0
20
100
500
(ng/ml)
CD1d B16/G

FIG. 3

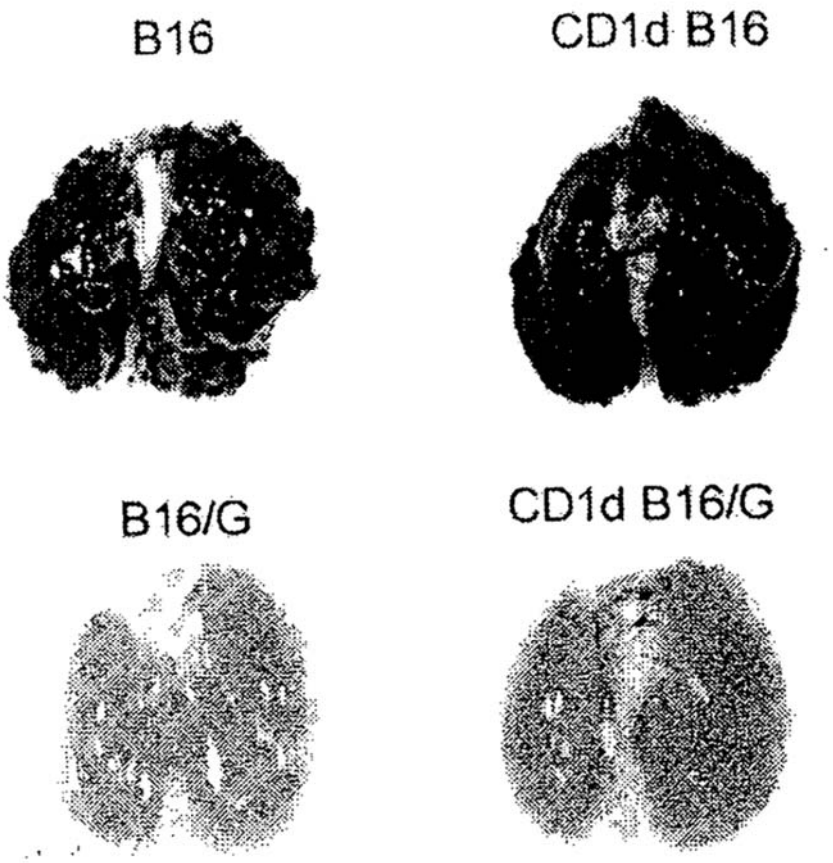


FIG. 4

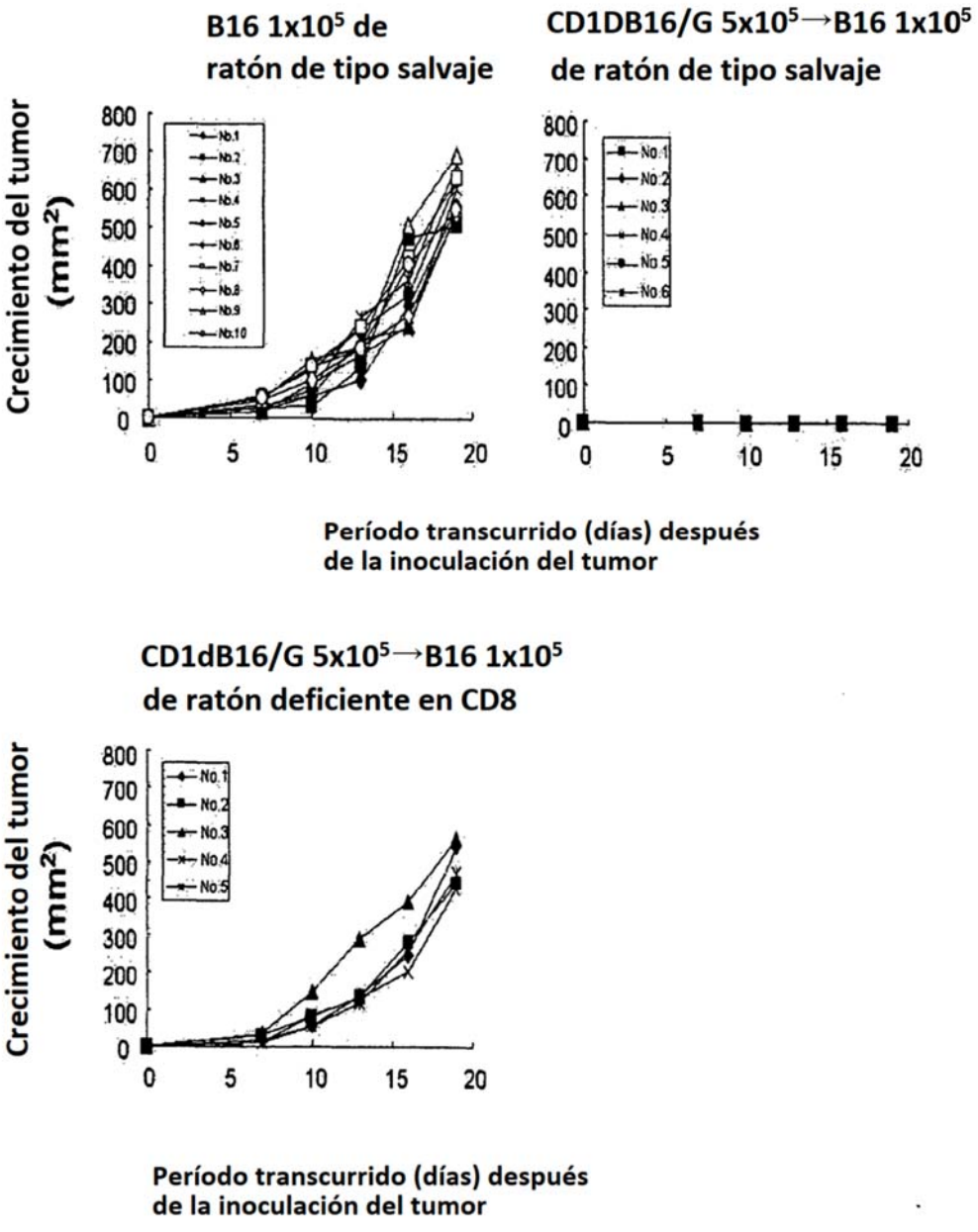

B16 1x10⁵ de ratón de tipo salvaje
CD1DB16/G 5x10⁵→B16 1x10⁵ de ratón de tipo salvaje
Crecimiento del tumor (mm²)
Período transcurrido (días) después de la inoculación del tumor
CD1dB16/G 5x10⁵→B16 1x10⁵ de ratón deficiente en CD8
Crecimiento del tumor (mm²)
Período transcurrido (días) después de la inoculación del tumor

FIG. 5

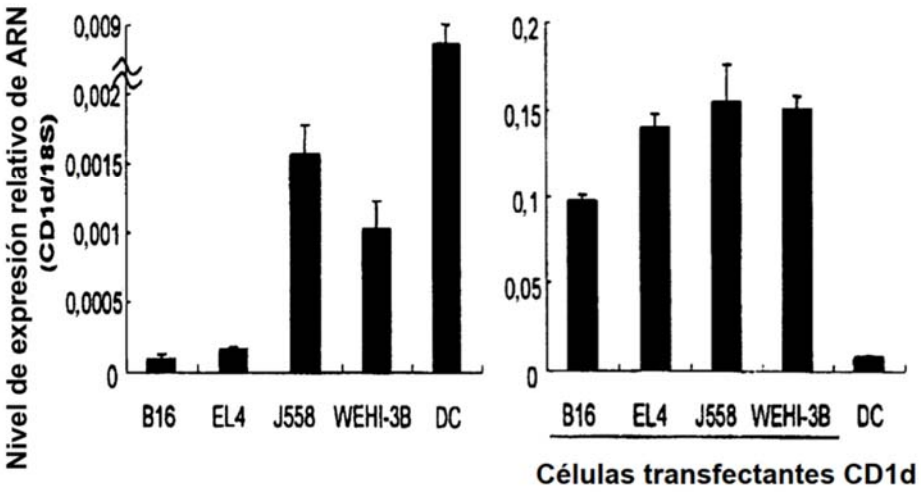

Nivel de expresión relativo de ARN (CD1d/18S)
0,009
0,002
0,0015
0,001
0,0005
0
B16
EL4
J558
WEHI-3B
DC
0,2
0,15
0,1
0,05
0
B16
EL4
J558
WEHI-3B
DC
Células transfectantes CD1d

FIG. 6

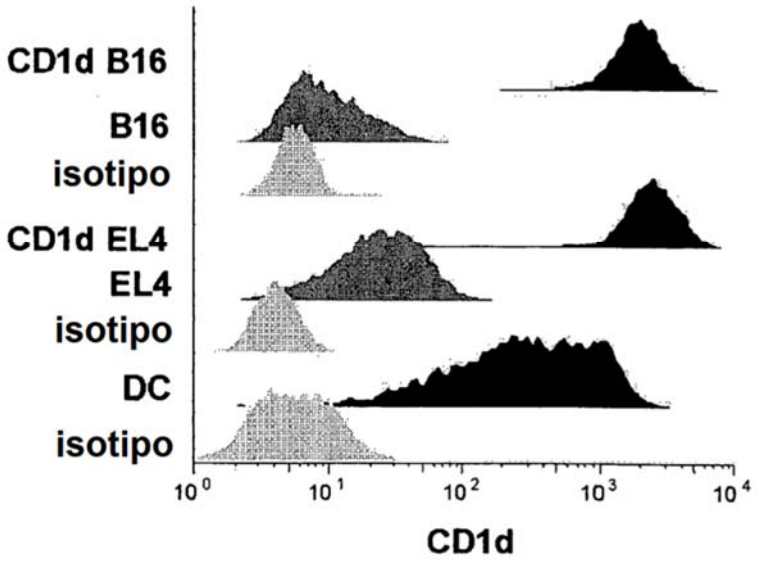

CD1d B16
B16
isotipo
CD1d EL4
EL4
isotipo
DC
isotipo
10 0
10 1
10 2
10 3
10 4
CD1d

FIG. 7

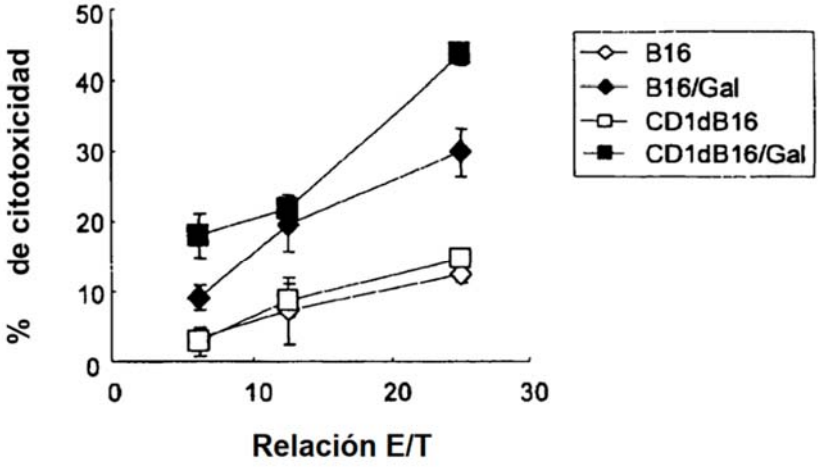
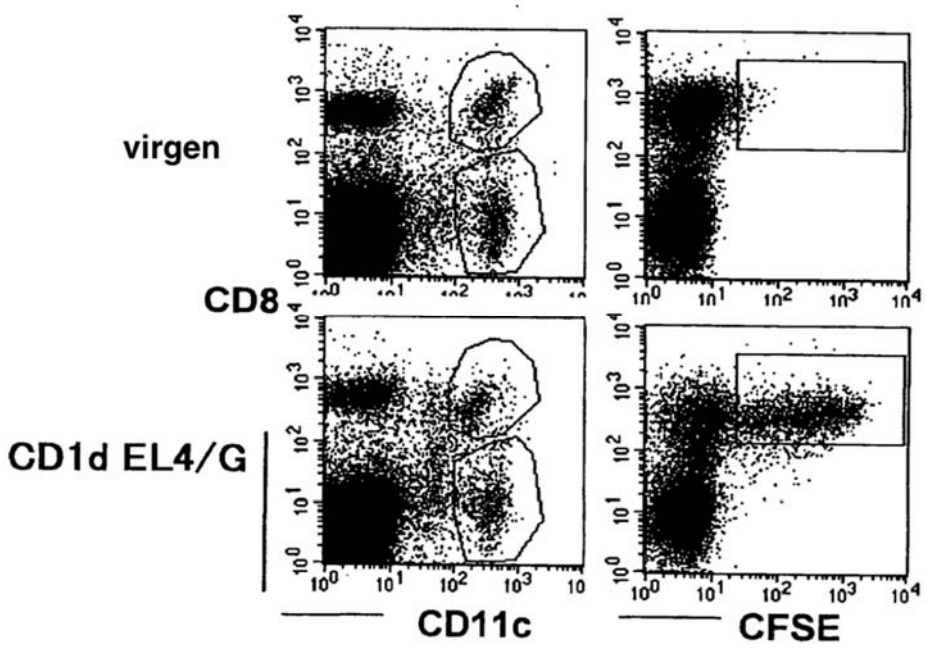

% de citotoxicidad
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
Relación E/T
B16
B16/Gal
CD1dB16
CD1dB16/Gal

FIG. 8


virgen
CD8
CD1d EL4/G
CD11c
CFSE