

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 088**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05760126 .2**
96 Fecha de presentación: **07.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1788078**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.05.2007**

54 Título: **Fármaco de células dendríticas que contienen células dendríticas, procedimiento terapéutico usando la célula dendrítica y procedimiento de cultivar células T gamma delta**

30 Prioridad:
08.07.2004 JP 2004229991

45 Fecha de publicación de la mención BOP:
20.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.04.2012

73 Titular/es:
MEDINET., CO. LTD.
USUI BLDG. 9F, 2-5-14 SHINYOKOHAMA
KOUHOKU-KU
YOKOHAMA-SHI, KANAGAWA 222-0033, JP

72 Inventor/es:
NIEDA, Mie;
ISOGAI, Manami y
KAKIMI, Kazuhiro

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

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).

ES 2 379 088 T3

DESCRIPCIÓN

Fármaco de células dendríticas que contienen células dendríticas, procedimiento terapéutico usando la célula dendrítica y procedimiento de cultivar células T gamma delta

Antecedentes de la invención**Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a células dendríticas pulsadas con fármacos de mejora del metabolismo óseo basados en bisfosfonatos (en lo sucesivo denominados bisfosfonatos). La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas células dendríticas, usos en procedimientos terapéuticos y procedimientos de cultivo de células T $\gamma\delta$ que usan dichas células dendríticas.

Antecedentes técnicos

Las células dendríticas funcionan como células presentadoras de antígeno para presentar antígenos, mediante fagocitosis y fragmentación, como epítopos antigénicos sobre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en su superficie celular. Cuando las células dendríticas entran en contacto con los linfocitos T en un ganglio linfático, las células T reconocen estos epítopos antigénicos.

En las células T, hay células T $\alpha\beta$ que expresan receptores de las células T $\alpha\beta$ y células T $\gamma\delta$ que expresan receptores de células T $\gamma\delta$. Las células T $\alpha\beta$ asumen principalmente la responsabilidad de la inmunidad adquirida, mientras que las células $\gamma\delta$ funcionan como células efectoras para las respuestas inmunitarias a infecciones bacterianas concretas, tales como tuberculosis, así como tumores, y asumen principalmente la responsabilidad de la inmunidad natural.

Recientemente se ha descubierto que las células T $\gamma\delta$ también tienen actividad citotóxica contra las células cancerosas, lo que atrae la atención sobre el desarrollo de inmunoterapia usando la potente actividad antitumoral poseída por las células T $\gamma\delta$. No obstante, la gran mayoría de las células T que generalmente están presentes en la sangre son células T $\alpha\beta$; las células T $\gamma\delta$ representan un simple 1-5 %. De acuerdo con esto, como procedimiento para proliferar las células T $\gamma\delta$, las células T $\gamma\delta$ que se separan usando imanes y similares se cultivan in Vitro y devuelven al cuerpo.

Se sabe que las células T $\gamma\delta$ también son activadas y/o proliferadas por antígenos no peptídicos; se sabe que son activadas y/o proliferadas por alcaloides, tales como alquilaminas, así como monoésteres de pirofosfato y bisfosfonatos.

Por encima de todo, en varios estudios se han considerado los procedimientos para cultivar células T $\gamma\delta$ in Vitro usando bisfosfonatos, pero no han podido producir un número suficiente de células T $\gamma\delta$. Un intento para obtener un número suficiente de células T $\gamma\delta$ adecuadas para un tratamiento implicó un incremento de la cantidad de sangre obtenida de un paciente, que también aumentó la carga impuesta sobre el paciente. De acuerdo con esto, existe la necesidad de establecer una técnica para obtener fácilmente un número suficiente de células T $\gamma\delta$ no solo in vitro sino también in vivo.

Sumario de la invención

La presente invención se creó a la luz de las circunstancias mencionadas anteriormente para proporcionar células dendríticas capaces de activar y/o proliferar con eficacia las células T $\gamma\delta$ in vivo y/o in vitro, composiciones farmacéuticas que comprenden dichas células dendríticas, el uso de las composiciones farmacéuticas en procedimientos terapéuticos y procedimientos de cultivo de células T $\gamma\delta$ usando dichas células dendríticas.

Como resultado de la investigación en la resolución de los problemas mencionados anteriormente, los inventores han encontrado que las células T $\gamma\delta$ pueden ser activadas y/o proliferadas usando células dendríticas, que normalmente se usan para la inducción de CTL, pulsadas con bisfosfonatos, en lugar de estimular directamente las células T $\gamma\delta$ con bisfosfonatos. Además, los inventores descubrieron que, al contrario que el caso de inducir células T $\alpha\beta$ específicas de antígeno usando un péptido antigénico de la enfermedad, las células T

La presente invención permite la proliferación fácil de células T $\gamma\delta$ sin imponer una carga sobre un paciente, lo que conduce a aplicaciones prácticas de terapias celulares inmunitarias que usan células T $\gamma\delta$.

La presente invención se describe a continuación.

(1) Las células dendríticas que se han pulsado con un bisfosfonato;

(2) Las células dendríticas de dicho (1), en las que las células dendríticas son células dendríticas inmaduras.

(3) Las células dendríticas de dicho (1) o (2), en las que dicho bisfosfonato es uno cualquiera de ácido pamidrónico, ácido alendróico, ácido zoledrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, ácido etidrónico, sus sales y/o sus hidratos.

5 (4) Una composición farmacéutica que comprende las células dendríticas pulsadas con un bisfosfonato;

(5) La composición farmacéutica de dicho (4), en la que dichas células dendríticas son células dendríticas inmaduras;

10 (6) La composición farmacéutica de dicho (4) o (5), en la que dicho bisfosfonato es uno cualquiera de ácido pamidrónico, ácido alendróico, ácido zoledrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, ácido etidrónico, sus sales y/o sus hidratos.

15 (7) Las células dendríticas pulsadas con un bisfosfonato; para uso en un procedimiento terapéutico;

(8) Las células dendríticas de dicho (7), en las que las células dendríticas son células dendríticas inmaduras.

20 (9) Las células dendríticas de dicho (7) o (8), en las que dicho bisfosfonato es uno cualquiera de ácido pamidrónico, ácido alendróico, ácido zoledrónico, ácido risedrónico, ácido inabdrónico, ácido incadrónico, ácido etidrónico, sus sales y/o sus hidratos.

(10) Las células dendríticas de cualquiera de dichos (7)- (9), en las que el procedimiento terapéutico para tratar cánceres y/o enfermedades infecciosas;

25 (11) Las células dendríticas de cualquiera de dichos (7) – (10), en la que dichas células dendríticas son autólogas;

(12) Un procedimiento de cultivo de células $\gamma\delta$, en el que se añaden las células dendríticas pulsadas con un bisfosfonato.

30 (13) El procedimiento de cultivo de células T de dicho (12), en el que dichas células dendríticas son células dendríticas inmaduras;

y

35 (14) El procedimiento de cultivo de las células T $\gamma\delta$ (i2) o (13), en el que dicho bisfosfonato es uno cualquiera de ácido pamidrónico, ácido alendróico, ácido zoledrónico, ácido risedrónico, ácido inabdrónico, ácido incadrónico, ácido etidrónico, sus sales y/o sus hidratos.

40 Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra los resultados del ejemplo 3. Los controles (células dendríticas no pulsadas con un bisfosfonato), células dendríticas pulsadas Aredia, Onclast y Zometa, se cocultivaron respectivamente con las células reaccionadas. Se muestra el número de células medido siete días después usando un hemocitómetro, la proporción de las células T $\gamma\delta$ medida usando un citómetro de flujo y el número de células T $\gamma\delta$ calculado a partir de las dos cifras.

45

La FIG. 2 muestra los resultados del Ejemplo 5. La ordenada indica el número de puntos y la abscisa indica la intensidad de los puntos. Como controles negativos se muestran el IFN- γ producido por las células T $\gamma\delta$ solas; las células T $\gamma\delta$ y Aredia y las células dendríticas solas.

50

Mejor modo de la invención

(1) Primera realización: Preparación de las células dendríticas de la invención

55 Las células dendríticas de la invención se explicarán con detalle primero.

Las células dendríticas de la presente invención se refieren a células dendríticas que se han pulsado con un bisfosfonato.

60 Como las células dendríticas de la invención, se pueden usar las células dendríticas inmaduras, las células dendríticas maduras o la mezcla de ambas. No obstante, es preferible usar células dendríticas inmaduras, ya que son capaces de activar y/o proliferar más adecuadamente células T $\gamma\delta$.

65 Además, se puede usar cualquier bisfosfonato siempre que funcione como inhibidor de la resorción ósea y, en general, se usa como fármaco para tratar la osteoporosis. Ejemplos incluyen ácido pamidrónico, una sal del mismo

- y/o sus hidratos (por ejemplo, pamidronato disódico pentahidrato (Aredia de Novartis Pharma), ácido alendróico, una sal del mismo y/o sus hidratos (p. ej., alendronato sódico trihidrato (Onclast de Banyu Pharmaceutical)), ácido zoledróico, una sal del mismo y/o sus hidratos (p. ej., zoledronato sódico hidrato (Zometa de Novartis Pharma)), ácido risedróico, una sal del mismo y/o sus hidratos (p. ej., risedronato sódico hidrato), ácido ibandróico, una sal del mismo y/o sus hidratos (p. ej., ibandronato sódico), ácido incadrónico, una sal del mismo y/o sus hidratos (p. ej., incadronato disódico), ácido etidróico, una sal del mismo y/o sus hidratos (p. ej., etodronato sódico). Por encima de todo, son particularmente preferibles el ácido pamidróico, ácido alendróico, ácido zoledróico, sus sales y/o sus hidratos.
- 10 A continuación se explicará con detalle el procedimiento de preparación de las células dendríticas de la presente invención.
- Primero se obtiene una muestra con el fin de obtener precursores de células dendríticas. Como muestra se puede usar sangre periférica, médula ósea, sangre de cordón umbilical o similares. Considerando la facilidad de la recolección y la mínima carga impuesta sobre el paciente, es preferible el uso de sangre periférica.
- 15 Es preferible recoger una cantidad de sangre que no cargue al donante. Como procedimiento de recolección, se puede recoger sangre entera usando un tubo para sangre de vacío o similar. Se puede añadir heparina o ácido cítrico de modo que la sangre recogida no se coagule. En el caso en el que se requiera un gran número de células, se pueden obtener directamente monocitos de sangre periférica mediante un procedimiento para obtener el componente mononuclear usando un sistema de recolección de componentes.
- 20 Las células mononucleares, o los precursores de células dendríticas, se separan después de la sangre obtenida. Se puede usar cualquier procedimiento para separar células nucleadas de los glóbulos rojos. Por ejemplo, normalmente se usa el procedimiento de separación con Ficoll, es decir un gradiente de densidades Ficoll-Paque, o elución.
- 25 Con el fin de eliminar las plaquetas y similares, es preferible limpiar las células recogidas varias veces usando un medio de cultivo, solución fisiológica salina, solución salina tamponada con fosfato (en lo sucesivo denominada PBS) o similar.
- 30 A continuación se separan los precursores de las células dendríticas de las células mononucleares obtenidas.
- Dado que el CD14 es un marcador conocido expresado en los precursores de las células dendríticas, se prefiere un procedimiento para aislar y recoger monocitos (células positivas para CD14) usando la Clasificación Celular Magnética (Miltenyi Biotec; denominado en lo sucesivo MACS), ya que es simple y proporciona un elevado índice de recolección de células.
- 35 También se puede usar otro procedimiento en el que las células mononucleares recogidas se cultivan durante al menos una hora en un matraz de cultivo en las condiciones de 34-38 °C, más preferentemente 37 °C, y de 2-10 % de CO₂, más preferentemente 5 % de CO₂ y las células depositadas se usan como precursores de células dendríticas.
- 40 A esto le siguió la diferenciación de las precursoras de células dendríticas en células dendríticas inmaduras o maduras. Como medio de cultivo se usa el medio AIM-V (Invitrogen).
- 45 Además del medio AIM-V, se puede añadir, según sea necesario, cualquier medio disponible comercialmente usado en cultivo celular, tal como RPMI-
- 50 1640 (Invitrogen), medio Eagle modificado de Dulbeccop (Invitrogen; en lo sucesivo denominado DMEM), TIL (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.), medio de queratinocitos epidérmicos (Kojin Bio, Ltd.; en lo sucesivo denominado KBM), y medio de Iscove (Invitrogen; en lo sucesivo denominado IMEM). Además, se puede añadir según sea necesario 5-20 % de suero bovino, suero bovino fetal (lo sucesivo denominado FBS), plasma humano o similares.
- 55 En el caso de las células dendríticas inmaduras, se obtienen añadiendo un factor inductor de la diferenciación al medio de cultivo y cultivando las precursoras de las células dendríticas.
- 60 Cualquier citosina se puede usar como factor inductor de la diferenciación; por ejemplo, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (en lo sucesivo denominado GM-CSF), interleucina-4 (en lo sucesivo denominado IL-4), factor de células madre (en lo sucesivo denominado SCF), IL-13, factor α de necrosis tumoral (en lo sucesivo denominado TNF- α) y similares pueden inducir la diferenciación de células dendríticas inmaduras. También es preferible añadir IL-1, IL-2, IL-3 y similares, según sea necesario. Más preferentemente, el uso de una combinación de GM-CSF e IL-4 permite una inducción eficiente.
- 65 El cultivo se lleva a cabo en las condiciones de 34-38 °C, más preferentemente a 37 °C, y 2-10 % de CO₂, más preferentemente 5% de CO₂, la duración del cultivo es preferentemente 5-7 días.

En el caso de obtener células dendríticas maduras, al 5°-7° día se añade un factor inductor de la diferenciación adicional después de comenzar el cultivo para cultivo adicional.

5 Como factor inductor de la diferenciación se puede usar cualquier citosina; es preferible usar, por ejemplo, GM-CSF, IL-4, SCF, IL-1 β M, IL-6, IL-13, IFN- α , prostaglandina E₂ (en lo sucesivo denominada PGE₂) y similares para inducir eficientemente la diferenciación de las células dendríticas maduras. También es preferible añadir IL-1, IL-2, IL-3 y similares, según sea necesario. Más preferentemente, el uso de una combinación de GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-1 β , PGE₂ y TNF- α permite una inducción eficiente.

10 El cultivo se lleva a cabo en las condiciones de 34-38 °C, más preferentemente a 37 °C, y 2-10 % de CO₂, más preferentemente 5% de CO₂, la duración es, preferentemente, de 24-48 horas.

15 Además, también se puede usar un procedimiento para obtener células dendríticas inmaduras o maduras recogiendo células madre hematopoyéticas (células positivas para CD34) como precursores de células dendríticas y añadiendo GM-CSF y TNF- α , así como ligando flt-3 (FL), ligando c-kit (SCF) o trombopoyetina (TPO) por separado o en combinación, o un procedimiento de recolección directa de las fracciones de las células dendríticas de la sangre o monocitos de sangre periférica separados usando un medio de gradiente de densidad, tal como Percoll.

20 A las células dendríticas inmaduras o maduras obtenidas se añade un bisfosfonato y se cultiva para preparar células estimuladoras (células dendríticas pulsadas con un bisfosfonato). La concentración del bisfosfonato añadida es, preferentemente, 0,1-30 μ M, más preferentemente 1-10 μ M.

25 La duración del pulsado de las células con el bisfosfonato es, preferentemente, de 1-36 horas, más preferentemente 12 horas.

30 Dado que las células dendríticas obtenidas de este modo tienen la capacidad de activar y/o proliferar las células T $\gamma\delta$, se puede usar como composición farmacéutica capaz de activar y/o proliferar las células T $\gamma\delta$ in vitro o in vivo. Cuando se usan in Vitro, se pueden usar como composición capaz de activar y/o proliferar las células T $\gamma\delta$. Cuando se usan in vivo, se pueden usar como vacuna de células dendríticas capaz de activar y/o proliferar las células T $\gamma\delta$ después de lavar y eliminar el bisfosfonato libre. En cualquier caso, se pueden añadir, según sea necesario, in Vitro o in vivo, una citosina (p. ej., IL-2), una proteína (p. ej., albúmina) o similares.

35 (2) Segunda realización: Composición farmacéutica que comprende células dendríticas de la invención

A continuación se explicará el procedimiento terapéutico usando las células dendríticas de la invención.

Las células dendríticas obtenidas en la primera realización se recogen mediante centrifugación o similares.

40 Las células recogidas se lavan. Se puede usar cualquier solución de lavado siempre que sea isosmótica y adecuada para usar como composición farmacéutica. Considerando la posterior administración a un paciente, es preferible el uso de solución fisiológica salina, PBS o similar.

45 Cuando se suspende en solución fisiológica salina, las células dendríticas recogidas pasan a ser utilizables como una preparación farmacéutica para administración. Además, se puede añadir una citocina, según sea necesario.

El número de células administradas se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con la afección del paciente; no obstante, normalmente, el número de células es, preferentemente, 10⁶-10¹²/persona, más preferentemente al menos 10⁷/persona.

50 La preparación se puede administrar mediante inyección intravenosa, intradérmica o hipodérmica, inyectada en un ganglio linfático afiliado, inyectada directamente en una lesión o introducida por goteo para administración general. También es posible inyectar la preparación en una arteria en las proximidades de una lesión.

55 Administrando las células dendríticas de la presente invención de este modo, se pueden activar las células T $\gamma\delta$ en el cuerpo del paciente. Dado que las células T $\gamma\delta$ tienen una actividad citotóxica inespecífica, se pueden usar en varios tratamientos, por ejemplo, para tratar cánceres y enfermedades infecciosas. Un beneficio del uso de células dendríticas en forma de una vacuna es el sorteo del problema causado administrando directamente un bisfosfonato. Una reacción de bisfosfonato frente a las células T $\gamma\delta$ en el cuerpo se debilita y disipa a medida que el número de administraciones aumenta, haciendo que el bisfosfonato sea incapaz de proliferar repetidamente las células T $\gamma\delta$. Pulsando las células dendríticas con un bisfosfonato para usar como vacuna evita que esto ocurra.

(3) Tercera realización: Procedimiento de cultivo de células T $\gamma\delta$ usando las células dendríticas de la invención.

A continuación se explicará con detalle el procedimiento de cultivo de **células T γδ** de la invención.

Las células dendríticas obtenidas en la primera realización y las células respondedoras se diseminan en un envase para cultivo.

En el presente documento, las células respondedoras hacen referencia a una subpoblación celular que contiene células T γδ; se prefieren las células mononucleares derivadas de sangre periférica y similares.

No hay una limitación concreta para el contenedor usado; se puede usar una placa, una placa de laboratorio, matraz, bolsa o similar de uso habitual en el cultivo de la técnica. La concentración de las subpoblaciones celulares individuales diseminadas se pueden fijar con libertad de acuerdo con la situación.

Se usa medio AIM-V para cultivar las células dendríticas y las células respondedoras. Además del medio AIM-V, se puede usar, según sea necesario, cualquier medio de cultivo disponible comercialmente usado en cultivo celular, tal como RPMI-1640, TIL, KBM e IMEM. Además, se puede añadir según sea necesario, 5-20 % de suero bovino, FBS, plasma humano, citocinas o similares.

El cultivo se lleva a cabo en las condiciones de 34-38 °C, más preferentemente a 37 °C, y 2-10 % de CO₂, más preferentemente 5% de CO₂, la duración del cultivo es preferentemente 5-87 días, más preferentemente de 7 días.

El número de células dendríticas y respondedoras diseminadas se puede fijar en función del contenedor usado y el fin de la aplicación. Las proporciones de mezcla de las células dendríticas y respondedoras se puede fijar adecuadamente de acuerdo con la situación, considerando la finalidad, que es incrementar la proporción de células T γδ en las células reaccionadas, se fija un número de células dendríticas, preferentemente, menor que las células respondedoras.

La presente invención permite la recolección de una población celular que contiene células T γδ activadas de pureza elevada, en cantidad de masa y de un modo sencillo, sin tener que seguir los complicados procedimientos de selección y purificación requeridos por las técnicas anteriores para obtener células T γδ. Además, la población celular obtenida de este modo se puede usar como tal en las terapias con células inmunitarias. Cuando se usan las células T γδ activadas en dichas terapias con células inmunitarias cabe esperar niveles elevados de efecto terapéutico contra tumores y enfermedades infecciosas.

Un beneficio de la activación y/o proliferación de las células T γδ in Vitro es que se salva el problema asociado con la administración directa de un bisfosfonato, cuya reacción frente a las células T γδ en el cuerpo se debilita y disipa cuando el número de administraciones aumenta, de modo que no puede proliferar repetidamente las células T γδ. La activación y/o proliferación las células T γδ in vitro para administración puede evitar que esto ocurra.

(4) Cuarta realización: Composición farmacéutica que comprende células T γδ obtenidas mediante la invención

A continuación se explicará el procedimiento de administración de las células T γδ obtenidas de un paciente.

Las células T γδ obtenidas mediante el procedimiento descrito en la tercera realización se recogen mediante centrifugación y similares.

Las células recogidas se lavan. Se puede usar cualquier solución de lavado siempre que sea isosmótica y adecuada para uso como preparación farmacéutica; considerando la posterior administración a un paciente, es preferible el uso de solución salina fisiológica, PBS o similar.

Cuando se suspenden en solución fisiológica salina, las células T γδ recogidas pasan a ser utilizables como una preparación para administración. Además, se puede añadir una citocina, según sea necesario.

El número de células administradas se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con la afección del paciente; no obstante, normalmente, el número de células es, preferentemente, 10⁸-10¹²/persona, más preferentemente al menos 10⁹/persona.

Se puede administrar mediante inyección intravenosa, intradérmica o hipodérmica, inyectada en un ganglio linfático afiliado, inyectada directamente en una lesión o introducida por goteo para administración general. También se puede inyectar la preparación en una arteria en las proximidades de una lesión.

Ejemplos

La presente invención se explicará con detalle con referencia a los ejemplos; no obstante, es obvio que la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Recolección y preparación de células dendríticas

- 5 A partir de los 30 ml de sangre periférica obtenida de un donante sano, se obtuvieron células mononucleares usando un medio con gradiente de densidad para separar las células sanguíneas. Las células obtenidas se lavaron varias veces para eliminar las plaquetas y similares, y las células positivas a CD-14 se aislaron usando MACS.

- 10 Los precursores de células dendríticas obtenidos se diferenciaron en células dendríticas. Como medio de cultivo se usó medio AIM-V con 10 % de FBS. Al medio se añadieron 500 U/ml de GM-CSF (IMMUNEX) y 500 ml de IL-4 (Osteogenetics GmbH). Las células dendríticas inmaduras se obtuvieron 5-7 días después de iniciar el cultivo. Además, al 5°-7° día desde el inicio del cultivo se añadieron 100 U/ml de IL-6 (R& D Systems), 10 ng/ml de IL-1 β (CHEMICON), 10 ng/ml de TNF- α (PHARMINGEN) y 1 μ g/ml de PGE₂ (SIGMA) para el cultivo posterior. Las células dendríticas maduras se recogieron 24-48 horas más tarde.

15 Ejemplo 2

Confirmación de la afección de las células dendríticas

- 20 Los antígenos sobre la superficie de las células dendríticas preparadas se detectaron usando un citómetro de flujo (Epics XL-MCL, Beckman Coulter). A las células que se van a medir, suspendidas en PBS, se añadieron anticuerpos diana y se tiñeron durante 15 minutos a 4 °C en condiciones de sombra. Los anticuerpos usados son anticuerpos anti-CD14, anti-CD83 y anti-HLA-DR marcados con PE (Beckman Coulter). Como controles negativos se usaron los isotipos de los respectivos anticuerpos. Las células teñidas se lavaron con PBS y se midieron usando Epics XL-MCL.

- 25 Los resultados mostraron que las células cultivadas con GM-CSF e IL-4 eran negativas para CD14 y CD83, positivas para HLA-DR y se confirmó que era una población de células dendríticas inmaduras. Las células cultivadas con GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-1 β , TNF α y PGE₂ fueron positivas a excepción de para CD14 y se confirmó que era una población de células dendríticas maduras.

Ejemplo 3

Proliferación de células T $\gamma\delta$ con células dendríticas

- 35 A las suspensiones que contienen las células dendríticas inmaduras o maduras derivadas de sangre periférica preparadas en el Ejemplo 1, se añadieron bisfosfonatos, Aredia, Onclast y Zometa, para alcanzar las concentraciones de 10 μ M, 10 μ M y 1 μ M, respectivamente, y se cultivaron durante aproximadamente 12 horas para preparar células estimulantes (células dendríticas pulsadas con bisfosfonatos). Como control negativo se usaron células dendríticas cultivadas sin añadir un bisfosfonato.

- 40 Estas células estimulantes, 5 x 10⁵ cada una, se cultivaron respectivamente en cultivos mixtos de 2 a 10⁶ células reaccionadas usando una placa de 24 pocillos (SUMILON) hasta un volumen total de 1 ml (la proporción entre las células reaccionadas y las células estimulantes fue de 4 a 1). Las células restantes tras el aislamiento de las células CD14 positivas del Ejemplo 1 (población de células negativas para CD14, principalmente población de células T), que se habían suspendido en medio AIM-V que contiene 10 % de FBS y 10 % de sulfoxido de dimetilo (DMSO), congeladas y almacenadas, se usaron como células reaccionadas tras descongelar y lavar. El cultivo se llevó a cabo en condiciones de aproximadamente 37 °C y 5 % de CO₂ durante 7 días.

- 50 En esta solución de cultivo mixto se observó una proliferación celular todavía mejor cuando se añadieron 50 U/ml de IL-2. Cuando la tasa de proliferación celular fue alta, al 4°-6° día se añadieron 100 U/ml de IL-2 y 1 ml de medio AIM-V que contiene 10 % de FBS.

- 55 Siete días después se midió el número de células usando un hemocitómetro y la proporción de células T $\gamma\delta$ usando un citómetro de flujo. Para los anticuerpos se usaron anticuerpos anti-CD3 marcados con PC5 y anticuerpos anti-pan $\gamma\delta$ marcados con FITC (Beckman Coulter). Estos Anticuerpos se añadieron a las células que se habían cultivado y se lavaron con PBS para pigmentar a 4 °C durante 15 minutos en condiciones sin luz.

- 60 El isotipo del anticuerpo anti-pan $\gamma\delta$ se usó como control negativo.

- Como se muestra en la FIG. 1, se encontró que, en comparación con los controles (las células dendríticas no pulsadas con bisfosfonato), todas las células dendríticas maduras y las células dendríticas inmaduras pulsadas con Aredia, Onclast y Zometa incrementaron la proporción de células T $\gamma\delta$ en las subpoblaciones de células cocultivadas.

65

Además, se descubrió que las células inmaduras pulsadas con bisfosfonatos aumentaban la proporción de células T $\gamma\delta$ más que las células dendríticas maduras pulsadas con bisfosfonatos.

Ejemplo 4

5

Recolección y preparación de células T $\gamma\delta$

A partir de los 30 ml de sangre periférica obtenida de un donante sano, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica usando un medio con gradiente de densidad para separar las células sanguíneas. Las células

10

obtenidas se lavaron varias veces para eliminar las plaquetas y similares.

Los monocitos de sangre periférica obtenidos se suspendieron en medio AIM-V (10 % de FCS) y se añadió Aredia para que la concentración en la suspensión de monocitos de sangre periférica fuera 10 μ M.

15

Esto se cultivó durante 14 días. Durante este periodo se añadieron medio AIM-V (10 % de FCS) e IL-2 a una concentración final de 1.000 U/ml de acuerdo con la proliferación celular.

Usando un citómetro de flujo se confirmó que el fenotipo de las células cultivadas era una subpoblación celular que contiene al menos un 95 % de células T $\gamma\delta$.

20

Ejemplo 5

Confirmación de la activación de las células T $\gamma\delta$

25

En cada pocillo de una placa MultiScreen (Millipore) se añadió 70 % de etanol y se eliminó en dos minutos.

Cada pocillo de la placa se lavó con 200 μ l de PBS cinco veces.

30

UN ANTICUERPO anti-interferón(IFN)- γ para recubrir (clon: 1-DK1, kit MABTECH ELiSpot para Interferón γ humano) y se añadieron 100 μ l/pocillo.

La placa se dejó en reposo durante la noche a 4 °C.

35

La placa se lavó con 200 μ l/pocillo de PBS cuatro veces.

Se añadió medio AIM-V con 10 5 de FBS a 200 μ l/pocillo y se realizó el bloqueo a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.

40

El medio de bloqueo se eliminó y la placa se lavó con 200 μ l/pocillo de PBS cuatro veces.

Las células T $\gamma\delta$ obtenidas en el Ejemplo 4 se recogieron mediante centrifugación y se lavaron dos veces con AIM-V.

45

A las 30.000 células T $\gamma\delta$ recogidas y 15.000 de las células dendríticas inmaduras o maduras obtenidas en el Ejemplo 1 se añadió Aredia, preparada para tener una concentración final de 10 μ M, y se precultivó en un tubo de 15 ml (Falcon) en las condiciones de 37 °C y 5% de CO₂ durante dos horas. Al mismo tiempo, también se realizó el precultivo de las células T $\gamma\delta$ solas, el precultivo de las células T $\gamma\delta$ solo con Aredia añadida y el precultivo de las respectivas células dendríticas solas. Cada volumen de cultivo se ajustó a 300 μ l.

50

La placa se lavó con PBS después de bloquear y cada grupo de células que completó el precultivo en las respectivas condiciones se diseminó en tres pocillos, 100 μ l/pocillo.

Se cultivaron durante la noche en condiciones de 37 °C y 5% de CO₂.

55

La solución de cultivo que contiene las células se eliminó y la placa se lavó cinco veces con 200 μ l/pocillo de PBS.

El anticuerpo anti-interferón(IFN)- γ marcado con biotina para detección (clon: 7-B6-1, kit MABTECH ELiSpot para Interferón γ humano) se diluyó hasta 1 μ g/ml con PBS que contiene 0,5% de FBS y se añadieron 100 μ l/pocillo.

60

La placa se dejó en reposo durante dos horas a temperatura ambiente.

El PBS que contiene anticuerpo anti-IFN- γ marcado con biotina se eliminó y la placa se lavó cinco veces con 200 μ l/pocillo de PBS.

65

Estreptoabizina unida a fosfatasa alcalina (kit MABTECH ELiSpot para Interferón γ humano) se diluyó con PBS que contiene 0,5 % de FBS a 1:1000 y se añadieron 100 μ l/pocillo.

La placa se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora.

La placa se lavó con cinco veces con 200 µl/pocillo de PBS.

- 5 Se añadieron 100 µl/pocillo de la solución madre sustrato BCIP/NBTplus (Wako); la placa se dejó en reposo en oscuridad hasta que las manchas fueron reconocibles.

Cuando las manchas se reconocieron visualmente, la placa se lavó exhaustivamente con agua destilada.

- 10 Después de confirmar que la membrana sobre la placa estaba seca, el número de manchas se midió usando un lector ELiSpot (AID Autoimmune Diagnostika GmbH) y los datos se analizaron usando el software AID versión 3.1 (AID).

- 15 Los resultados mostraron que el número de manchas y la intensidad de la mancha aumentaron solo cuando las células dendríticas y Aredia se añadieron simultáneamente a las células T γδ. Los resultados también mostraron que las células dendríticas inmaduras pulsadas con el bisfosfonato estimulaban la generación de IFN-γ más que las células dendríticas maduras.

Potencial para aplicación industrial

- 20 Como se ha descrito anteriormente, las células dendríticas pulsadas con bisfosfonatos en la presente invención son capaces de activar selectivamente y/o proliferar las células T γδ contenidas en sangre periférica. De acuerdo con esto, se pueden usar como composición capaz de activar y/o proliferar las células T γδ in vitro. Además, administrándolas a un paciente como composición administrable, las células T γδ se pueden activar in vivo, a partir
- 25 de lo cual se puede esperar un tratamiento eficaz de cánceres e infecciones víricas.

REIVINDICACIONES

1. Células dendríticas que se han pulsado con un fármaco de mejora del metabolismo óseo basado en bisfosfonato.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende células dendríticas pulsadas con un fármaco de mejora del metabolismo óseo basado en bisfosfonato.
3. Las células dendríticas pulsadas con un fármaco que mejora el metabolismo óseo basado en bisfosfonato para uso en un procedimiento terapéutico;
- 10 4. Las células dendríticas de cualquiera de dichos (3)- (9), en las que el procedimiento terapéutico para tratar cánceres y/o enfermedades infecciosas;
- 15 5. Uso de las células dendríticas de la reivindicación 1 en la fabricación de un medicamento para tratar cánceres y/o enfermedades infecciosas.
6. Las células dendríticas de la reivindicación 3 o 4 o el uso de la reivindicación 5 en el que dichas células dendríticas son autólogas.
- 20 7. Un procedimiento de cultivo de células T γδ que comprende añadir células dendríticas pulsadas con un fármaco de mejora del metabolismo óseo basado en bisfosfonato.
- 25 8. Las células dendríticas de las reivindicaciones 1, 3, 4 o 6; la composición farmacéutica de la reivindicación 2; el uso de las reivindicaciones 5 o 6 o el procedimiento de cultivo de las células T γδ de la reivindicación 7, en el que dichas células dendríticas son células dendríticas inmaduras.
- 30 9. Las células dendríticas de las reivindicaciones 1, 3, 4, 6 u 8; la composición farmacéutica de la reivindicación 2; el uso de las reivindicaciones 5, 6 u 8 o el procedimiento de cultivo de las células T γδ de la reivindicación 7 u 8, en el que dicho fármaco de mejora del metabolismo óseo basado en bisfosfonato es uno cualquiera de ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido zoledrónico, ácido risedrónico, ácido inabdrónico, ácido incadrónico, ácido etiderónico, sus sales y/o sus hidratos.

FIG. 1

Células dendríticas	Bisfosfonato	Concentración final (μ M)	Proporción de células T $\gamma \delta$ (%)	Número total de células ($\times 10^6$)	Número de células T $\gamma \delta$ ($\times 10^6$)
Células dendríticas inmaduras	Control	0	4,2	5,5	0,23
	Aredia	10	69,7	11	7,67
	Oncclast	10	79,8	8,2	6,54
	Zometa	1	75,9	11,6	8,80
Células dendríticas maduras	Control	0	10,4	9,6	1,00
	Aredia	10	38,8	11,1	4,31
	Oncclast	10	34,3	10,4	3,57
	Zometa	1	63,6	10,3	6,55

