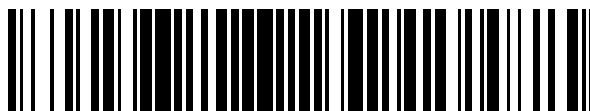


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 573**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06797441 .0**
96 Fecha de presentación: **05.09.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1930414**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

54 Título: **Método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno**

30 Prioridad:
08.09.2005 JP 2005295598
14.04.2006 JP 2006112571

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2012

73 Titular/es:
MEDINET CO., LTD. (100.0%)
2-3-12, ShinyokohamaKohoku-ku
Yokohama-shi, Kanagawa 222-0033 , JP

72 Inventor/es:
NIEDA, MIE;
ISOGAI, MANAMI;
TAKAHARA, MASASHI y
NICOL, ANDREW

74 Agente/Representante:
PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 391 573 T3

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

Método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una célula presentadora de antígeno que se somete a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y un antígeno de enfermedad. También la presente invención se refiere a una composición médica que comprende la célula presentadora de antígeno, un método de tratamiento y prevención que usa células dendríticas y un método de inducción de un inmunocito que usa la célula presentadora de antígeno. Adicionalmente, la presente invención se refiere a un inmunocito que se induce mediante el método de inducción, a una composición médica que comprende el inmunocito y a un método de tratamiento y prevención que usa el inmunocito.

15 **Antecedentes de la técnica**

Como métodos para tratar el cáncer, existían la resección quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia usando un agente antitumoral. En los últimos años, se han estudiado y puesto en práctica otros diversos métodos terapéuticos distintos de estos. Uno de ellos es una terapia con inmunocélulas que utiliza inmunocitos. Por ejemplo, se describe la activación de linfocitos T $\gamma\delta$ por un aminobisfosfonato mediante una célula presentadora de antígeno por Miyagawa *et al.* en The Journal of Immunology 2001, 166, 5508 y Kunzmann *et al.* en Blood, 2003, 102(11), 39b. Se describe también la activación directa de linfocitos T $\gamma\delta$ y su uso potencial en el tratamiento del cáncer por Kato *et al.* en The Journal of Immunology, 2001, 167, 5092, Wilhelm *et al.* en Blood, 2003, 102(1), 200, Kunzmann *et al.* en Blood, 2000, 96, 384 y Tanaka *et al.* en Bio Clinica, 2004, 19(5), 439.

25 La terapia inmunocelular incluye una terapia con LAK (linfocitos citolíticos activados por linfocinas) en que los linfocitos se activan *in vitro* por linfocinas y se transfieren entonces al cuerpo, una terapia con CTL (linfocitos T citotóxicos, de aquí en adelante designados como CTL) que usa CTL que reconocen y atacan específicamente una lesión, una terapia con células dendríticas y similares.

30 En la terapia con células dendríticas, que usa células dendríticas obtenidas permitiendo que esté presente un antígeno de enfermedad en el MHC (complejo antigénico principal de histocompatibilidad) directamente o después del procesamiento intracelular, se inducen *in vivo* para tratamiento CTL específicos de antígeno de enfermedad que atacan selectivamente un patógeno. El antígeno de enfermedad a presentar puede ser, por ejemplo, una proteína o péptido antigénico de cáncer, una proteína o péptido antigénico de enfermedad infecciosa o una parte de los mismos (véanse los documentos no de patente 1 y 2, por ejemplo).

35 Con el cultivo conjunto de las células dendríticas sometidas a pulsos con el antígeno de enfermedad y los linfocitos para estimular los linfocitos con las células dendríticas, es posible inducir CTL específicos de antígeno de enfermedad *in vitro*. Por ejemplo, en el caso de uso de células dendríticas sometidas a pulsos con la proteína o péptido antigénico de cáncer o la proteína o péptido antigénico de enfermedad infecciosa, hay un aumento de los CTL específicos de antígeno de enfermedad inducidos en el cultivo conjunto de 5 a 20 veces del caso en que no se usen las células dendríticas anteriormente observadas.

45 En la terapia de células dendríticas que usa células dendríticas sometidas a pulsos con la proteína o péptido antigénico de cáncer o la proteína o péptido antigénico de enfermedad infecciosa, la eficacia de la inducción de los CTL específicos de antígeno de enfermedad *in vivo*, a saber, la relación de CTL a todos los linfocitos, es conocida por aumentar por un factor de 2 a 14. La terapia con células dendríticas se da también a conocer en los documentos US 6.821.778, WO 2006/06638 y por Conti *et al.* en The Journal of Immunology, 2005, 174, 252-260.

50 Para potenciar la eficacia de la terapia de células dendríticas elevando la eficacia de la inducción de los CTL específicos de antígeno de enfermedad por células dendríticas, se realizan principalmente dos métodos actualmente.

55 En un método, además de someter a pulsos las células dendríticas con el antígeno de enfermedad, permitiendo a un fármaco o similar que reaccione con un reactor de tipo Toll (de aquí en adelante designado como TLR) en las células dendríticas para que reaccione con las células dendríticas de modo que se potencie la capacidad presentadora de antígeno de las células dendríticas, aumenta directamente la eficacia de inducción de los CTL específicos de antígeno de enfermedad (un efecto coadyuvante por el TLR; véanse los documentos no de patente 3 y 4, por ejemplo). En el otro método, además de someter a pulsos las células dendríticas con el antígeno de enfermedad, permitiendo al glucolípidos o similar estar presente en moléculas presentadoras de antígeno distintas de moléculas de MHC, por ejemplo, moléculas CD1d (diferenciación de agrupamiento 1d) en las células dendríticas de modo que activen los inmunocitos, incluyendo iNKT (linfocitos T citolíticos naturales invariantes), etc., distintos de los CTL específicos de antígeno de enfermedad, aumenta indirectamente la eficacia de inducción de los CTL específicos de antígeno de enfermedad por estos inmunocitos activados (un efecto coadyuvante mediante inmunocitos distintos de los CTL específicos de antígeno de enfermedad, véanse los documentos no de patente 5 y 6, por ejemplo).

Sin embargo, el aumento en la inducción de CTL específicos de antígeno de enfermedad mediante el efecto coadyuvante directo por TLR o el efecto coadyuvante indirecto por inmunocitos distintos de los CTL específicos de antígeno de enfermedad es de aproximadamente 4 a 6 veces que en el caso en que estos coadyuvantes no se usen (*in vitro*). Por consiguiente, se deseaba desarrollar una tecnología capaz de inducir CTL específicos de antígeno de enfermedad más eficazmente.

Documento no de patente 1: Blood 2004, 103, 383-389

Documento no de patente 2: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001, 98, 8809-8814

Documento no de patente 3: Nat. Rev. Immunol. 2004, 4, 449-511

Documento no de patente 4: Cancer Res. 2004, 64, 5461- 5470

Documento no de patente 5: J. Clin. Invest. 2004, 114, 1800-1811

Documento no de patente 6: J. Exp. Med. 2002, 195, 617-624

Divulgación de la invención

Problema a resolver por la invención

La presente invención se realizó considerando lo anterior y proporciona un método para un tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno (por ejemplo, una célula dendrítica o similar) para inducir eficazmente un inmunocito que incluye de forma dominante un CTL CD8+ específico de antígeno de enfermedad y/o un linfocito T $\gamma\delta$ *in vivo* y/o *in vitro*, una composición médica que comprende la célula presentadora de antígeno activada, un método de tratamiento y prevención que usa la célula presentadora de antígeno, un método de inducción de un inmunocito que incluye un CTL CD8+ específico de antígeno de enfermedad y/o un linfocito T $\gamma\delta$ que usa la célula presentadora de antígeno activada, un inmunocito que es inducido por el método, una composición médica que comprende el inmunocito y un método de tratamiento y prevención que usa el inmunocito.

Medios para resolver el problema

Para resolver el problema descrito anteriormente, los inventores de la presente invención realizaron estudios. Los inventores encontraron entonces que, al someter células dendríticas a pulsos conjuntamente con bisfosfonato además del pulso con un antígeno de enfermedad, las relaciones de CTL específicos de antígeno de enfermedad y linfocitos T $\gamma\delta$ a todos los linfocitos y los números de CTL específicos de antígeno de enfermedad y linfocitos T $\gamma\delta$ aumentaban considerablemente en comparación con el caso de no añadir bisfosfonato, y completaron la presente invención. Por ejemplo, al añadir bisfosfonato, la relación de CTL específicos de antígeno de enfermedad a todos los linfocitos puede aumentar por un factor de aproximadamente 100 y la relación de linfocitos T $\gamma\delta$ a todos los linfocitos puede aumentar por un factor de aproximadamente 3 en comparación con aquellas en el caso de no añadir bisfosfonato, y el número de CTL específicos de antígeno de enfermedad puede aumentar por un factor de aproximadamente 90 y el número de linfocitos T $\gamma\delta$ puede aumentar por un factor de aproximadamente 6 en comparación con aquellos en el caso de no añadir bisfosfonato. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos valores numéricos. La presente invención promueve adicionalmente el desarrollo de una terapia inmunocelular que trata y previene cáncer y/o enfermedades infecciosas induciendo CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$.

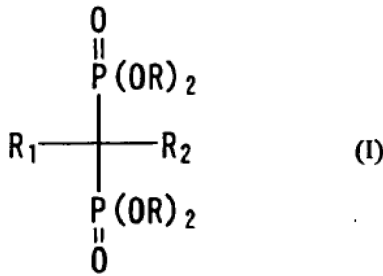
Un objeto de la invención es:

(1) Un método para un tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno, incluyendo el método someter la célula presentadora de antígeno a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y un antígeno de enfermedad;

(2) el método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según (1), en el que la célula presentadora de antígeno es al menos una seleccionada del grupo consistente en una célula dendrítica, una célula dendrítica inmadura y una célula presentadora de antígeno artificial;

(3) el método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según (1) o (2), en el que el bisfosfonato es un compuesto químico representado por la fórmula (I), una sal del mismo o su hidrato:

Fórmula 1



- 5 en la que R es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo arilo o un grupo arilo sustituido, un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido, un grupo alquilamino inferior, un grupo aralquilo, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico, o R₁ y R₂ forman parte de la misma estructura cíclica, y
- 10 un sustituyente en R₁ y R₂ se selecciona del grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo alcoxilo, un grupo arilo, un grupo ariltio, un grupo ariloxilo, un grupo alquiltio, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico;
- 15 (4) el método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según cualquiera de (1) a (3), en el que el bisfosfonato es al menos uno seleccionado del grupo consistente en ácido zoledrónico, ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, ácido etidrónico, una sal de los mismos o su hidrato;
- 20 (5) el método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según cualquiera de (1) a (4), en el que la concentración de bisfosfonato en el pulso conjunto es de 0,001 a 20 µM;
- (6) el método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según (5), en el que la concentración de bisfosfonato en el pulso conjunto es de 0,001 a 5 µM;
- 25 (7) el método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según cualquiera de (1) a (6), en el que el antígeno de enfermedad es al menos uno seleccionado del grupo consistente en una proteína antigénica de cáncer, un péptido antigénico de cáncer, una proteína antigénica de enfermedad infecciosa o un péptido antigénico de enfermedad infecciosa, una célula de cáncer lisada o una célula de enfermedad infecciosa lisada y una célula apoptótica y una célula necrótica de una célula de cáncer o una célula de enfermedad infecciosa, y un producto termotratado de los mismos;
- 30 (8) el método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según cualquiera de (1) a (7), en el que la concentración de antígeno de enfermedad en el pulso conjunto es de 0,01 a 20 µg/ml;
- 35 (9) el método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según (8), en el que la concentración de antígeno de enfermedad en el pulso conjunto es de 0,1 a 2 µg/ml;
- (10) un método de producción de una célula presentadora de antígeno, incluyendo el método tratar la célula presentadora de antígeno con el método para tratamiento de activación según cualquiera de (1) a (9);
- 40 (11) una célula presentadora de antígeno activada producida mediante el método de producción según (10);
- (12) una composición médica para un cáncer y/o una enfermedad infecciosa, comprendiendo la composición médica la célula presentadora de antígeno activada según (11);
- 45 (13) la composición médica según (12), en la que la célula presentadora de antígeno es una célula presentadora de antígeno autóloga o una célula presentadora de antígeno alogénica que comparte el mismo HLA;
- (14) un método de prevención y tratamiento de un cáncer y/o una enfermedad infecciosa, incluyendo el método administrar la célula presentadora de antígeno activada según (11); y
- 50 (15) el método de prevención y tratamiento según (14), en el que la célula presentadora de antígeno es una célula presentadora de antígeno autóloga o una célula presentadora de antígeno alogénica que comparte el mismo HLA.
- 55 (16) Un método para inducir un inmunocito, incluyendo el método
- (i) someter una célula presentadora de antígeno a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y un antígeno de

enfermedad, y

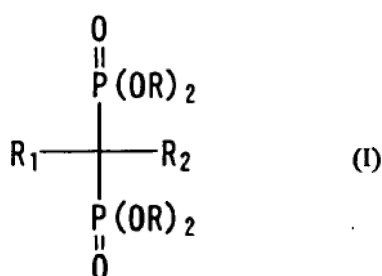
(ii) cultivar conjuntamente la célula presentadora de antígeno y un linfocito simultáneamente a o después del pulso conjunto;

5 (17) el método para inducir un inmunocito según (16), en el que el inmunocito a inducir incluye al menos uno de un CTL CD8+ específico de antígeno de enfermedad y un linfocito T $\gamma\delta$;

10 (18) el método para inducir un inmunocito según (16) o (17), en el que la célula presentadora de antígeno es al menos una seleccionada del grupo consistente en una célula dendrítica, una célula dendrítica inmadura y una célula presentadora de antígeno artificial;

15 (19) el método para inducir un inmunocito según cualquiera de (16) a (18), en el que el bisfosfonato es un compuesto químico representado por la fórmula (I), una sal del mismo o su hidrato:

Fórmula 1



20 en la que R es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo arilo o un grupo arilo sustituido, un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido, un grupo alquilamino inferior, un grupo aralquilo, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico, o R_1 y R_2 forman parte de la misma estructura cíclica, y

25 un sustituyente en R_1 y R_2 se selecciona del grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo alcoxilo, un grupo arilo, un grupo ariltio, un grupo ariloxilo, un grupo alquiltio, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico;

30 (20) el método para inducir un inmunocito según cualquiera de (16) a (19), en el que el bisfosfonato es al menos uno seleccionado del grupo consistente en ácido zoledrónico, ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, ácido etidrónico, una sal de los mismos y su hidrato;

35 (21) el método para inducir un inmunocito según cualquiera de (16) a (20), en el que la concentración de bisfosfonato en el pulso conjunto es de 0,001 a 20 μM ;

(22) el método para inducir un inmunocito según (21), en el que la concentración de bisfosfonato en el pulso conjunto es de 0,001 a 5 μM ;

40 (23) el método para inducir un inmunocito según cualquiera de (16) a (22), en el que el antígeno de enfermedad es al menos uno seleccionado del grupo consistente en una proteína antigénica de cáncer, un péptido antigénico de cáncer, una proteína antigénica de enfermedad infecciosa o un péptido antigénico de enfermedad infecciosa, una célula de cáncer lisada o una célula de enfermedad infecciosa lisada y una célula apoptótica y una célula necrótica de una célula de cáncer o una célula de enfermedad infecciosa, y un producto termotratado de los mismos;

45 (24) el método para inducir un inmunocito según cualquiera de (16) a (23), en el que la concentración de antígeno de enfermedad en el pulso conjunto es de 0,01 a 20 $\mu\text{g/ml}$; y

(25) el método para inducir un inmunocito según (24), en el que la concentración del antígeno de enfermedad en el pulso conjunto es de 0,1 a 2 $\mu\text{g/ml}$.

50 (26) Un método de producción de un inmunocito, incluyendo el método inducir el inmunocito mediante el método de inducción según cualquiera de (16) a (25);

(27) un inmunocito producido mediante el método de producción según (26);

55 (28) una composición médica para un cáncer y/o una enfermedad infecciosa, comprendiendo la composición médica

el inmunocito según (27);

5 (29) la composición médica para un cáncer y/o una enfermedad infecciosa según (28); en la que la célula presentadora de antígeno es una célula presentadora de antígeno autóloga o una célula presentadora de antígeno alogénica que comparte el mismo HLA;

(30) un método de prevención y tratamiento de un cáncer y/o una enfermedad infecciosa, incluyendo el método administrar el inmunocito según (27); y

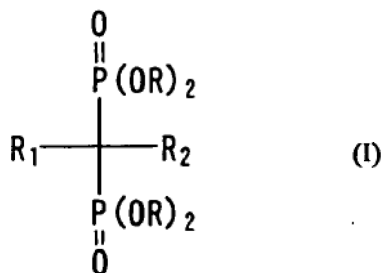
10 (31) el método de prevención y tratamiento de un cáncer y/o una enfermedad infecciosa según (30), en el que la célula presentadora de antígeno es una célula presentadora de antígeno autóloga o una célula presentadora de antígeno alogénica que comparte el mismo HLA.

15 (32) Un acelerador de la activación de una célula presentadora de antígeno en el momento del pulso con un antígeno de enfermedad, comprendiendo el acelerador de la activación bisfosfonato como componente eficaz;

20 (33) el acelerador de la activación de una célula presentadora de antígeno en el momento del pulso con un antígeno de enfermedad según (32), en el que la célula presentadora de antígeno es al menos una seleccionada del grupo consistente en una célula dendrítica, una célula dendrítica inmadura y una célula presentadora de antígeno artificial;

(34) el acelerador de la activación de una célula presentadora de antígeno en el momento del pulso con un antígeno de enfermedad según (32) o (33), en el que el bisfosfonato es un compuesto químico representado por la fórmula (I), una sal del mismo o su hidrato:

25 Fórmula 1



30 en la que R es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo arilo o un grupo arilo sustituido, un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido, un grupo alquilamino inferior, un grupo aralquilo, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico, o R₁ y R₂ forman parte de la misma estructura cíclica, y

35 un sustituyente en R₁ y R₂ se selecciona del grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo alcoxilo, un grupo arilo, un grupo ariltio, un grupo ariloxilo, un grupo alquiltio, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico; y

40 (35) el acelerador de la activación de una célula presentadora de antígeno en el momento del pulso con un antígeno de enfermedad según cualquiera de (32) a (34), en el que el bisfosfonato es al menos uno seleccionado del grupo consistente en ácido zoledrónico, ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, ácido etidrónico, una sal de los mismos y su hidrato.

Breve descripción de los dibujos

45 [FIG. 1] La figura 1 es un gráfico que muestra un ejemplo del resultado de medir la relación de CTL CD8+ específicos de A27L.

Descripción de la invención

50 Realización 1: Producción de células presentadoras de antígeno activadas

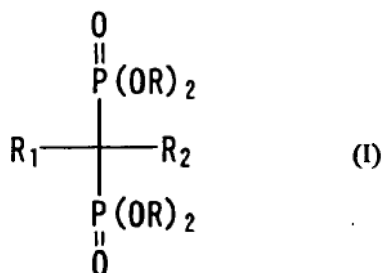
En primer lugar, se detallarán las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención.

55 Las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención son células presentadoras de antígeno que se someten a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y un antígeno de enfermedad.

Las células presentadoras de antígeno anteriormente mencionadas usadas en la presente invención no están particularmente limitadas, sino que pueden ser cualquiera de células dendríticas inmaduras, células dendríticas maduras, otras células presentadoras de antígeno, células presentadoras de antígeno artificiales y una mezcla de las mismas, por ejemplo. Entre ellas, son preferibles las células dendríticas inmaduras y las células dendríticas maduras, y son más preferibles las células dendríticas inmaduras. Esto es debido a que, cuando se someten a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y un antígeno de enfermedad, las células dendríticas inmaduras pueden inducir más preferiblemente CTL específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$. También las células presentadoras de antígeno artificiales anteriormente observadas son células presentadoras de antígeno que se producen artificialmente y pueden ser, por ejemplo, células que se genomanipulan para expresar al menos moléculas del antígeno de histocompatibilidad principal (MHC) de clase I y moléculas coestimulantes (por ejemplo, CD80, CD86). Adicionalmente, las células presentadoras de antígeno artificiales anteriormente observadas pueden obtenerse modificando una línea celular derivada de tumor de modo que las moléculas de MHC de clase I y moléculas coestimulantes se expresen como se describe anteriormente. Los ejemplos de línea celular anteriormente observada incluyen MDA-MB-231 derivada de cáncer de mama (antígeno HLA-A*0201 de clase I), TUHR10TKB derivada de cáncer renal (antígeno HLA-A*0201/A*2402 de clase I), una línea JR-st derivada de cáncer de estómago (antígeno HLA-A*2402 de clase I) y similares. Estas líneas celulares están disponibles en ATCC, RIKEN BioResource Center, etc., por ejemplo. La producción de las células presentadoras de antígeno artificiales mencionadas anteriormente se da a conocer en la publicación de EE.UU. US-2005-004864-A1, y los contenidos completos de la misma se incorporan a la presente memoria como referencia.

En la presente invención, el bisfosfonato no está particularmente limitado, sino que designa un compuesto químico que es un análogo de ácido pirofosfórico y se obtiene sustituyendo C (un átomo de carbono) por O (un átomo de oxígeno) en el P-O-P de un esqueleto de ácido pirofosfórico. Los ejemplos de bisfosfonato usado en la presente invención pueden incluir un compuesto químico representado por la fórmula (I) siguiente, una sal del mismo y su hidrato.

Fórmula 1



En la fórmula (I) anterior, R es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R_1 y R_2 se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo arilo que puede estar sustituido, un grupo alquilo que puede estar sustituido, un grupo alquilamino inferior, un grupo aralquilo, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico, y R_1 y R_2 pueden formar parte de la misma estructura cíclica.

Los sustituyentes en R_1 y R_2 descritos anteriormente se seleccionan del grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo alcoxilo, un grupo arilo, un grupo ariltio, un grupo ariloxilo, un grupo alquiltio, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico, por ejemplo.

En la presente invención, el átomo de halógeno es, por ejemplo, un átomo de flúor, un átomo de cloro o un átomo de bromo; el grupo alquilo es, por ejemplo, un grupo alquilo C_1 - C_{30} de cadena lineal o cadena ramificada tal como un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo pentilo, un grupo heptilo, un grupo octilo o un grupo pentadecanilo; el grupo alquilo inferior es, por ejemplo, un grupo alquilo C_1 - C_{10} de cadena lineal o cadena ramificada; el grupo arilo es, por ejemplo, un grupo fenilo o un grupo naftilo; el grupo aralquilo es, por ejemplo, un grupo arilalquilo inferior; el grupo cicloalquilo es, por ejemplo, un grupo cicloalquilo C_1 - C_{10} tal como un grupo ciclooctilo o un grupo adamantilo y el grupo heterocíclico es, por ejemplo, un grupo piridilo, un grupo furilo, un grupo pirrolidinilo, un grupo imidazolilo, un grupo quinolilo o un grupo isoquinolilo.

También en la presente invención el bisfosfonato es preferiblemente uno farmacéuticamente aceptado y, por ejemplo, puede ser un bisfosfonato que tiene efecto inhibidor de la resorción ósea y que se usa generalmente como agente terapéutico para la osteoporosis. Los ejemplos del mismo incluyen un ácido zoledrónico, una sal del mismo y/o su hidrato (por ejemplo, zoledronato de sodio hidratado (ZOMETA™, Novartis Pharma AG)), un ácido pamidrónico, una sal del mismo y/o su hidrato (por ejemplo, pamidronato de disodio pentahidratado (AREDIA™, Novartis Pharma AG)), un ácido alendronico, una sal del mismo y/o su hidrato (por ejemplo, alendronato de sodio trihidratado (ONCLAST™, Banyu Pharmaceutical Co., Ltd)), un ácido risedrónico, una sal del mismo y/o su hidrato (por ejemplo, risedronato de sodio hidratado), un ácido ibandrónico, una sal del mismo y/o su hidrato (por ejemplo,

ibandronato de sodio), un ácido incadrónico, una sal del mismo y/o su hidrato (por ejemplo, incadronato de disodio) y un ácido etidróico, una sal del mismo y/o su hidrato (por ejemplo, etidronato de disodio). Entre ellos, se prefieren el ácido zoledrónico, ácido pamidrónico, ácido alendrónico y sus sales y/o sus hidratos.

5 Con respecto al antígeno de enfermedad usado en la presente invención, la “enfermedad” mencionada anteriormente no está particularmente limitada, sino que es un cáncer o una enfermedad infecciosa, por ejemplo. El cáncer no está particularmente limitado, sino que puede ser cualquier cáncer, por ejemplo, un cáncer (incluyendo un precáncer) que sea difícil de tratar. La enfermedad infecciosa no está particularmente limitada sino que puede ser, por ejemplo, infecciones víricas tales como SIDA, hepatitis B y C, infecciones celulares, infecciones bacterianas, micosis o protozoosis. No hay una limitación particular sobre la forma del antígeno de enfermedad usado en la presente invención que puede ser, por ejemplo, una proteína antigénica de cáncer, un péptido antigénico de cáncer, una proteína antigénica de enfermedad infecciosa o un péptido antigénico de enfermedad infecciosa. Adicionalmente, los ejemplos de antígeno de enfermedad observado anteriormente incluyen una célula de cáncer lisada o una célula de enfermedad infecciosa lisada, y una célula apoptótica y una célula necrótica de una célula de 15 cáncer o una célula de enfermedad infecciosa, y un producto termotratado de los mismos.

En el caso en que el antígeno de enfermedad anteriormente observado sea un antígeno de cáncer, puede usarse cualquier antígeno de cáncer. Por ejemplo, es posible usar un antígeno de cáncer de cualquiera de cáncer de próstata, hepatoma y cáncer pancreático. El antígeno de cáncer anteriormente observado puede ser, por ejemplo, aquellos codificados por la familia de genes MAGE tales como MAGE1, MAGE3, GAGE, BAGE y RAGE. Los ejemplos de otros antígenos de cáncer incluyen un antígeno de cáncer que surge por mutaciones tales como p53, K-ras, CDK4 y el producto del gen bcl-c-abl, un antígeno de cáncer que se sobreexpresa en células de cáncer tales como la proteína c-erb2 (neu) y un antígeno vírico oncogénico tal como la proteína E7 de HPV-16. Adicionalmente, es también posible usar un antígeno oncofetal tal como antígeno embrionario de carcinoma (CEA) o α -fetoproteína (AFP), o un antígeno de diferenciación tal como un antígeno específico de próstata y CD-10 (antígeno CALLA), que se expresa en leucemias y linfomas de linfocitos B. 20 25

Las clases de enfermedades infecciosas para el antígeno de enfermedad infecciosa no están particularmente limitadas tampoco. Por ejemplo, la enfermedad infecciosa puede ser una enfermedad intratable entre las infecciones víricas tales como SIDA, hepatitis B y C, infección por virus de Epstein-Barr (EBV) o infección por HPV. También puede emplearse un antígeno de parásitos tal como proteínas de circumsporozoito de *Plasmodium*. 30

Adicionalmente, en la presente invención, puede usarse un péptido sintético como el péptido antigénico de enfermedad descrito anteriormente. Esto reduce la carga sobre el paciente en comparación con el caso de usar un antígeno de cáncer recogido a partir de los propios tejidos de cáncer del paciente. La proteína o péptido antigénico de cáncer anteriormente observado puede ser, por ejemplo, aquellos enumerados en las tablas 1 a 3 siguientes, que pueden procurarse o sintetizarse fácilmente por un especialista en la materia. 35

Tabla 1

Nombre de antígeno	Clase de cáncer	Nombre de antígeno	Clase de cáncer	Nombre de antígeno	Clase de cáncer
AARS	Placentoma	BMS1L	Mieloma	DUSP12	Placentoma
ABL1	Fibroblastoma	BMX	Cáncer de próstata, etc.	DYH1B	Hepatoma
ACADVL	Placentoma	BRD2	Linfoma T	EBP	Hepatoma
ACLT7B	Tumor cerebral	BTG3	Cáncer de útero	EBV-BMLF1	Linfoma B, etc.
ACP2	Linfoma	C21ORF2	Cáncer de pulmón, etc.	EBV-EBNA-2,3,4,6	Linfoma B, etc.
ACVR2B	Tumor cerebral	CALU	Queratinocitoma	EDF-1	Cáncer pancreático
ADPRT	Fibroblastoma	CARHSP1	Placentoma	EEF1G	Hepatoma, etc.
ADSL	Tumor cerebral	CASP-8	Carcinoma espinocelular	EEF2	Cáncer de ovario
AF6	Mieloma	CCN1	Tumor cerebral	EF1D	Cáncer de piel, etc.
AFP	Cáncer de pulmón	CCT8	Mieloma	EGLN1	Cáncer tonsilar

AGPAT2	Cáncer renal	CD43	Cáncer renal	EIF3S6IP	Tumor cerebral, cáncer cervicouterino, etc.
AIBP	Cáncer renal	CDC27	Melanoma	EIF4EBP3	Linfoma
AIM1	Hepatoma	CDC2L5	Glioblastoma	EIF4G2	Placentoma, etc.
AKAP9	Tumor cerebral	CDIPT	Carcinoma escirro	ela2	Leucemia linfoblástica aguda
ALDA	Fibroblastoma	CDK4	Melanoma	EMS1	Cáncer de mama
ALDOA	Fibroblastoma	CEA	Cáncer de colon, etc.	EPHB2	Cáncer de estómago, etc.
ALOX12B	Tumor cerebral, etc.	CENF	Cáncer de mama	ETV6-AML1	Leucemia monocítica aguda
ALPHA NAC	Tumor cerebral	CENPB	Cáncer de útero	FBLN1	Tumor cerebral
AMHR2	Carcinoma escirro	CHD3	Timoma	FBXO7	Cáncer pancreático
ANT3	Tumor cerebral, cáncer de pulmón, etc.	CKAP1	Mieloma	FDFT1	Hepatoma
ANXA11	Teratocarcinoma	CLIC6	Cáncer digestivo	FH	Tumor cerebral
ANXA2	Diversos cánceres	CLK3	Cáncer cervicouterino	FKSG11	Cáncer de mama
APIG2	Hepatoma	CLN6	Cáncer de pulmón	FNBP3	Cáncer de piel
AP1M1	Hepatoma	CNTF	Cáncer de pulmón, etc.	FXYD5	Mieloma
AP2M1	Mieloma	COG8	Cáncer de útero	GAGE3,4,5,6,7B	Melanoma, diversos cánceres
AP3D1	Sarcoma, etc.	COPB2	Cáncer de pulmón	GCC2	Linfoma
APC	Cáncer de colon, etc.	CORO1A	Tumor cerebral, etc.	GDF11	Tumor cerebral
APEXL2	Cáncer de pulmón, etc.	COTL1	Placentoma, etc.	GLIPR1	Glioma
ARL1	Cáncer de vejiga urinaria	CSDA	Placentoma	GNB3	Tumor cerebral
ARL6IP	Mieloma	CTAG1	Melanoma	GNG4	Tumor cerebral
ARNTL1	Tumor cerebral	CTAG2	Melanoma	GOA4	Cáncer de estómago
ASNA1	Cáncer de útero	CTAGE-1	Carcinoma escirro	GOLGA1	Cáncer cervicouterino, carcinoma escirro
ATF3	Sarcoma	CTNNA1	Cáncer de colon, etc.	GOT1	Hepatoma
ATIC	Hepatoma	CUL5	Carcinoma escirro	gp100	Melanoma
ATP5B	Placentoma	DAD1	Tumor cerebral	GRB7	Cáncer de pulmón, etc.
ATRX	Diversos cánceres	DCTN1	Tumor cerebral	GTF2H2	Cáncer de piel, etc.

BAG5	Tumor cerebral	DDX5	Sarcoma	GTF2I	Cáncer cervicouterino
BAGE	Melanoma, diversos cánceres	DKFZP434N0735	Tumor cerebral	GUCY2D	Tumor de retina
BASP1	Tumor cerebral	DKFZP434P112	Carcinoma escirro	H2AFY	Cáncer de pulmón, etc.
BAZ1A	Cáncer cervicouterino	DKFZP564C236	Tumor cerebral	HC58	Hepatoma
BAZ2A	Carcinoma escirro	DLG5	Tumor cerebral	HDAC5	Cánceres de colon, recto, etc.
bcr-abl	Leucemia mieloide crónica	DNAJA1	Placentoma	HER2/neu	Cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago
BIRC2	Hepatoma	DNAJA2	Cáncer de piel	HKF1	Tumor cerebral
BIRC3	Hepatoma	DNAJB1	Placentoma	HMGA2	Hepatoma
BMAL2	Tumor cerebral	DSP	Cáncer de piel	HMG1	Mieloma

Tabla 2

Nombre de antígeno	Clase de cáncer	Nombre de antígeno	Clase de cáncer	Nombre de antígeno	Clase de cáncer
HMMR	Cáncer de mama	LDHB	Cáncer de vejiga urinaria, sarcoma, etc.	NME1	Cáncer de pulmón, etc.
HNRPAB	Placentoma, etc.	LGALS1	Cáncer de pulmón	NME2	Tumor de retina
HPV16-E6	Cáncer cervicouterino, etc.	LGALS4	Cáncer de estómago	NOTCH2	Cáncer de mama, etc.
HPV16-E7	Cáncer cervicouterino, etc.	LIMS1	Mieloma	NRIP1	Cáncer de mama
HPV18-E6	Cáncer cervicouterino, etc.	LMNA	Cáncer de pulmón, cáncer renal	NUDT4	Placentoma
HPV18-E7	Cáncer cervicouterino, etc.	LRP130	Hepatoma	NUPL1	Tumor cerebral, placentoma
HRASLS3	Hepatoma, etc.	LYST	Cáncer de pulmón, etc.	NY-CO-10	Cánceres de colon y recto
HSP60	Hepatoma, cáncer de útero	MAGE-1	Melanoma, diversos cánceres	NY-CO-33	Cáncer de colon
HSP90A	Diversas clases	MAGE-2	Melanoma, diversos cánceres	NY-CO-7	Cánceres de colon y recto
HSPA4	Linfoma	MAGE-3	Melanoma, diversos cánceres	NY-CO-8	Cánceres de colon y recto
HSPCA	Placentoma	MAGE-4	Melanoma, diversos cánceres	NY-ESO-1	Carcinoma escirro
HSPE1	Cáncer de útero	MAGE-6	Melanoma, diversos cánceres	OCLN	Cáncer de colon
HSPH1	Leucemia mieloide	MAGED2	Cáncer de mama, diversos cánceres	OGFR	Cáncer de piel, etc.

HTLV-1 tax	Leucemia de linfocitos T en adultos	MAN2C1	Carcinoma escirro, etc.	p53	Carcinoma espinocelular, etc.
ID4	Cáncer de útero	MAP1B	Tumor cerebral	PAD3	Cáncer renal
IDH2	Cáncer de corazón y colon	MAPK1	Cáncer de pulmón, etc.	PAF1	Hepatoma
IFI16	Leucemia de linfocitos T	MARK4	Tumor cerebral	PAP	Cáncer de próstata
IGBP1	Linfoma B, etc.	MART-1	Melanoma	PDAP1	Diversos cánceres
IKBKAP	Cáncer cervicouterino	MAZ	Cáncer pancreático, etc.	PDI	Cáncer de colon, cáncer de pulmón, etc.
ILF3	Linfocitoma T, cáncer cervicouterino	MBD2	Linfoma	PDXK	Cáncer de ovario
INPP1	Cáncer de colon	MCM3	Cáncer cervicouterino, cáncer pancreático, etc.	PECI	Hepatoma
JPHL1	Mieloma	MED6	Cáncer de pulmón, etc.	PFAS	Tumor cerebral
JUN	Diversos cánceres	MESDC2	Mieloma	PFKFB3	Tumor cerebral, etc.
KCNAB3	Tumor cerebral	MIF	Tumor cerebral, etc.	PFN1	Cánceres de colon, pulmón y pancreático
KIAA0117	Mieloma, cáncer de pulmón	MJD1	Tumor cerebral	PFN2	Tumor cerebral
KIAA0175	Leucemia mieloide	MK167	Diversos cánceres	PHF11	Eritoblastoma
KIAA0291	Tumor cerebral, etc.	MLF1	Cáncer de vejiga urinaria, etc.	PHF3	Glioma, etc.
KIAA0570	Tumor cerebral	MLH1	Cáncer pancreático, cáncer de vejiga urinaria	PHKG2	Hepatoma, etc.
KIAA0619	Tumor cerebral	MRPS26	Cáncer de piel	PI3	Cáncer de piel
KIAA0801	Tumor cerebral	MSLN	Cáncer de útero, cáncer de mama y ovario	PIAS1	Leucemia de linfocitos B
KIAA0909	Tumor cerebral	MUC-1	Cáncer de mucina, cáncer pancreático, etc.	PICALM	Mieloma
KIAA0975	Tumor cerebral	MUM-1	Melanoma	PKCB1	Tumor de linfocitos B
KIAA0989	Tumor cerebral	MVP	Tumor de retina	PKD1	Cáncer renal
KIF22	Linfoblastoma	MYH10	Sarcoma	PMSCL1	Linfoblastoma
KIF9	Carcinoma escirro, etc.	MYH9	Mieloma	POLR2E	Cáncer de pulmón
KLHL2	Tumor cerebral	MYO9B	Hepatoma	PPM1B	Hepatoma

KNS2	Tumor cerebral, etc.	NAF1	Linfoma	PPP2R5C	Mieloma, etc.
KRT13	Cáncer pancreático	NAP	Carcinoma escirro	PPP4C	Placentoma, mieloma
KRT14	Cáncer pancreático	NAP1L1	Melanoma	PRC1	Cáncer renal
KRT18	Cáncer cervicouterino	NASP	Carcinoma escirro	PRDM5	Diversos cánceres
KRT7	Placentoma	NBC4	Carcinoma escirro	PRDX1	Cáncer de vejiga urinaria
KRT8	Cáncer de colon, etc.	NCOR2	Tumor cerebral	PRKWINK2	Cáncer de colon
KTN1	Linfoma	NDUFV3	Tumor cerebral	proteínasa 3	Leucemia mieloide aguda
LB1	Linfoma B, etc.	NEDD9	Linfoma	PSA	Cáncer de próstata
LDHA	Sarcoma	NFE2L2	Melanoma	PSMD4	Tumor cerebral

Tabla 3

Nombre de antígeno	Clase de cáncer	Nombre de antígeno	Clase de cáncer	Nombre de antígeno	Clase de cáncer
PSMD9	Sarcoma	SLC25A2	Carcinoma escirro	TMF1	Cáncer cervicouterino, cáncer pancreático
PSME3	Cáncer de pulmón, etc.	SLC25A27	Tumor cerebral	TNKS2	Cáncer de mama
PTMS	Cáncer renal	SLX13	Tumor cerebral	TNNT1	Sarcoma
PTTG	Tumor cerebral	SMTN	Cáncer de colon	TOP2B	Diversos cánceres
QPRT	Tumor cerebral, sarcomas cerebral y renal, etc.	SNN	Tumor cerebral	TP53BP2	Diversos cánceres
RAB5C	Cáncer de pulmón, etc.	SNT-1	Cáncer de útero	TPD52	Cáncer de mama
RAGE	Cáncer renal	SNX6	Diversos cánceres	TPI1	Hepatoma
RAN	Tumor cerebral	SOX1	Tumor cerebral	TPM1	Hepatoma
ras	Cáncer pancreático, cáncer de colon, hepatoma, etc.	SOX2	Tumor cerebral	TRAPPC1	Cáncer de útero
RASSF1	Cáncer pancreático	SPN	Cáncer renal, etc.	TRP1,2	Melanoma
RBM10	Cáncer de pulmón, mieloma	SR+89	Cáncer de pulmón	TSTA3	Cáncer de pulmón
RBM6	Cáncer de pulmón	SRP19	Hepatoma, etc.	TTC12	Linfoma
RGS19IP1	Cáncer de pulmón, etc.	SSA1	Timoma, etc.	TXNRD1	Cáncer pancreático, etc.
RNF12	Cáncer renal	SSA2	Cáncer de piel	tirosinasa	Melanoma

ES 2 391 573 T3

RNPC2	Hepatoma	SSNA1	Carcinoma escirro	U2AF1L1	Tumor cerebral
RPA2	Cáncer renal, etc.	SSP1	Hepatoma, etc.	U2AF1L2	Tumor cerebral
RPL10	Cáncer de mama	SSSCA1	Cáncer de útero	UBE1	Placentoma
RPL10A	Cáncer de piel	SSX1	Fibroblastoma	UBE2D2	Carcinoma escirro
RPL21	Cáncer de colon	SSX4	Cáncer de vejiga urinaria, etc.	UBQLN2	Cáncer de pulmón
RPL27A	Cáncer de colon	ST13	Cáncer de colon	UE3A	Queratinocitoma
RPL3	Cáncer de colon	STARD10	Cáncer de colon	UN1	Cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, etc.
RPL30	Cáncer de mama	STARD7	Cáncer de útero, etc.	USH1C	Cáncer de colon
RPL32	Cáncer renal	STIP1	Cáncer de pulmón	USP1	Carcinoma escirro
RPL34	Cáncer de útero	STK11	Hepatoma, etc.	USP10	Mieloma
RPL37A	Tumor cerebral	STM	Tumor cerebral	USP16	Carcinoma escirro
RPS15A	Cáncer de colon	STX4A	Diversos cánceres	USP19	Tumor cerebral
RPS18	Placentoma	SUCLA2	Hepatoma, etc.	USP32	Tumor cerebral
RSN	Leucemia monocítica	SULT1A3	Tumor cerebral, etc.	USP4	Tumor cerebral
RUVBL1	Cánceres de colon y recto	SURF5	Cáncer de pulmón, cáncer de piel, etc.	VCL	Cáncer de útero
SART-1	Diversos cánceres	SYCP1	Carcinoma escirro	VEGFB	Fibroblastoma
SATB1	Cáncer de pulmón	TADA3L	Diversos cánceres	VESPR	Cáncer de piel
SBDS	Cáncer de útero	TAF10	Hepatoma, etc.	VPS45A	Tumor cerebral
SCNN1A	Cáncer renal, etc.	TAF7	Cáncer de piel	WT1	Diversas leucemias, diversos cánceres
SCP1	Carcinoma escirro	TBC1D1	Tumor cerebral, etc.	YARS	Cáncer de pulmón, etc.
SCP2	Hepatoma	TBC1D4	Tumor cerebral	YWHAE	Hepatoma, etc.
SCR3	Cáncer de pulmón	TBC1D5	Mieloma	ZFP36L2	Leucemia de linfocitos T
SDBCAG84	Cáncer de pulmón	TCE1	Cáncer renal	ZIC2	Tumor cerebral
SEC14L1	Cáncer de pulmón, etc.	TCEB3	Cáncer de pulmón	ZNF202	Carcinoma escirro
1-Sep	Cáncer de mama	TCF4	Timoma	ZNF232	Eritoblastoma
SFRS5	Cáncer de colon	TDRD3	Placentoma	ZNF282	Leucemia de linfocitos T
SGPL1	Tumor cerebral	TEL-AML1	Leucemia monocítica aguda	ZNF292	Placentoma
SIN3A	Tumor cerebral	TGFB1	Cáncer renal	β -catenina	Melanoma
SK-Br-3	Cáncer de mama	TIAF1	Cáncer de mama	Idiotipo de anticuerpo	Linfoma B

SLC22A17	Tumor cerebral	TIMP3	Cáncer renal
SLC25A11	Tumor cerebral	TKT	Hepatoma

En la presente invención, someter a pulsos una célula presentadora de antígeno con cierta sustancia significa causar que la célula presentadora de antígeno reaccione con esa sustancia, y preferiblemente significa presentar directa o indirectamente la sustancia anteriormente observada sobre la superficie de una célula presentadora de antígeno. También someter a pulsos conjuntamente una célula presentadora de antígeno significa someter a pulsos la célula presentadora de antígeno con al menos dos sustancias simultánea, sucesiva o intermitentemente. La sustancia anteriormente mencionada es preferiblemente bisfosfonato y/o un antígeno de enfermedad.

Ahora, se detallarán el método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según la presente invención y el método para producir una célula presentadora de antígeno activada según la presente invención con referencia al siguiente ejemplo, que usa una célula dendrítica como célula presentadora de antígeno. En la presente invención, el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno designa un proceso que incluye someter a una célula presentadora de antígeno a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y un antígeno de enfermedad, como se describe anteriormente.

En primer lugar, se explicará la preparación de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas en este ejemplo). La preparación de las células dendríticas empieza al adquirir una muestra para obtener precursores de células dendríticas. La muestra anteriormente observada puede ser sangre periférica, médula ósea, sangre de cordón umbilical o similar. Se usa preferiblemente sangre periférica en vista del hecho de que es fácilmente disponible y no supone una gran carga para el paciente. Es preferible que la cantidad de sangre a recoger se determine de modo que no suponga una carga para el donante. El método de recogida de la sangre puede ser recogida de sangre completa usando un tubo de recogida de sangre a vacío, una bolsa de recogida de sangre o similar. También, cuando se necesita una gran cantidad de células, es posible obtener células mononucleares de sangre periférica directamente empleando un método de recogida de la fracción de células mononucleares usando un instrumento de aféresis. Para evitar la coagulación, pueden añadirse heparina o ácido cítrico a la sangre recogida.

A continuación, se separan las células mononucleares que contienen los precursores de células dendríticas de la sangre recogida. La separación puede llevarse a cabo mediante cualquier método de separación de células nucleadas de eritrocitos. Por ejemplo, se emplea generalmente un método que utiliza el fraccionamiento de Ficoll, concretamente, el gradiente de densidad o elución de Ficoll-Paque. Es preferible lavar las células recogidas varias veces usando un medio de cultivo, una solución salina fisiológica o una solución salina tamponada con fosfato (de aquí en adelante designada como PBS) con el fin de eliminar los trombocitos.

Posteriormente, se separan los monocitos (células positivas de CD14), que son los precursores de las células dendríticas, de las células mononucleares recogidas. CD14 es conocido como un marcador que se expresa en monocitos, que son los precursores de las células dendríticas. Por tanto, los monocitos pueden aislarse y recogerse mediante clasificación celular magnética (Miltenyi Biotec; de aquí en adelante designada como MACS) usando perlas magnéticas con anticuerpos anti-CD14. Este método es preferible debido a su simplicidad y mayor recuperación de monocito. Como alternativa, puede ser posible también emplear un método que incluya transferir las células mononucleares recogidas a un matraz de cultivo, cultivarlas a 34 a 38°C, más preferiblemente a 37°C, en condiciones de 2% a 10% de CO₂, más preferiblemente 5% de CO₂, durante al menos una hora, y usando células adherentes como precursores de las células dendríticas.

Después de ello, se lleva a cabo la inducción de la diferenciación de células dendríticas inmaduras o células dendríticas maduras a partir de los precursores obtenidos de las células dendríticas. Como medio de cultivo, se usa un medio AIM-V (Invitrogen Corporation). Además del medio AIM-V, es posible usar un medio comercialmente disponible que se use para cultivo celular, tal como un medio RPMI-1640 (Invitrogen Corporation), medio de Eagle modificado por Dulbecco (Invitrogen Corporation; de aquí en adelante designado como DMEM), TIL (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.), un medio de queratinocitos epidérmicos (Kohjin Bio. Co., Ltd.: de aquí en adelante designado como KBM) o medio de Iscove (Invitrogen Corporation; de aquí en adelante designado como IMEM). Adicionalmente, es posible añadir de 0,5 a 20% de suero bovino, suero fetal bovino (de aquí en adelante designado como FBS), suero humano, plasma humano o similar, según sea necesario.

En caso de obtención de células dendríticas inmaduras, se añade un inductor de la diferenciación al medio de cultivo para cultivar los precursores de las células dendríticas. El inductor de la diferenciación puede ser cualquier citocina. Por ejemplo, un factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (de aquí en adelante designado como GM-CSF), interleucina 4 (de aquí en adelante designada como IL-4; otras interleucinas se designan también de manera similar); un factor citoblástico (de aquí en adelante designado como SCF), IL-13 o un factor de necrosis tumoral α (de aquí en adelante designado como TNF- α) puede inducir eficazmente las células dendríticas inmaduras. Adicionalmente, es preferible añadir IL-1, IL-2 o IL-3 según sea necesario. Más preferiblemente, el uso de GM-CSF e IL-4 en combinación permite una inducción eficaz. El cultivo se realiza a 34 a 38°C, preferiblemente a 36°C en condiciones de 2 a 10% de CO₂, preferiblemente 5% de CO₂, y el periodo de cultivo es preferiblemente de 5

a 7 días.

En caso de obtener las células dendríticas maduras, se añade un inductor de la diferenciación adicional del día 5 a al 7 después de iniciar el cultivo, seguido de cultivo adicional. El inductor de la diferenciación puede ser cualquier citocina. Por ejemplo, es preferible inducir eficazmente las células dendríticas maduras usando GM-CSF, IL-4, SCF, IL-1 β , IL-6, IL-13, TNF- α o prostaglandina E2 (de aquí en adelante designada como PGE2). Adicionalmente, es preferible añadir IL-1, IL-2, o IL-3, según sea necesario. Más preferiblemente, el uso de GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-1 β , PGE2 y TNF- α en combinación permite una inducción eficaz. El cultivo se realiza a 34 a 38°C, preferiblemente a 37°C, en condiciones de 2 a 10% de CO₂, preferiblemente 5% de CO₂, y el tiempo de cultivo es preferiblemente de 24 a 48 horas.

Además, también es posible usar un método que incluya recoger citoblastos hematopoyéticos (células positivas de CD34) como precursores de las células dendríticas y añadir a los mismos GM-CSF, TNF- α y ligando flt-3 (FL), ligando c-kit (SCF) o trombopoyetina (TPO) únicamente o en combinación, obteniendo por tanto las células dendríticas inmaduras o las células dendríticas maduras, o un método que incluya recoger la fracción de células dendríticas directamente de la sangre o de células mononucleares de sangre periférica separadas usando una solución de gradiente de densidad tal como Percoll.

A continuación, se someten las células presentadoras de antígeno resultantes (en este ejemplo, las células dendríticas inmaduras o las células dendríticas maduras) a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y un antígeno de enfermedad.

La concentración de bisfosfonato no está particularmente limitada, a condición de que sea la concentración a que las células se someten habitualmente a pulsos con bisfosfonato. Por ejemplo, se prefieren de 0,001 a 20 μ M y se prefieren adicionalmente de 0,001 a 5 μ M, como se describe en el documento [The Journal of Immunology, 2001, vol. 166, 5508-5514 o en Blood, 2001, vol. 98, nº 5, 1616-1618]

La concentración del antígeno de enfermedad no está particularmente limitada, a condición de que sea la concentración a que las células dendríticas se someten habitualmente a pulsos con un antígeno de enfermedad. Por ejemplo, en el caso de la proteína o péptido antigénico de enfermedad descrito anteriormente, se prefiere de 0,01 a 20 μ g/ml, y se prefieren adicionalmente de 0,1 a 2 μ g/ml, como se describe en los documentos [Cancer Research, 1999, vol. 59, 2167-2173, The Journal of Immunology, 1995, vol. 154, 2257-2265 o The Journal of Immunology, 1994, 153, 996-1003].

Adicionalmente, en el caso de someter células dendríticas a pulsos con una población celular que incluye células apoptóticas y/o células necróticas como antígeno de enfermedad, los ejemplos de método para preparar la población celular anteriormente observada pueden incluir 1) un método de cultivo de una célula de cáncer o una línea celular de cáncer de modo que se permita la formación espontánea de una población celular, 2) un método para someter una célula de cáncer o una línea celular de cáncer a irradiación UV (1 J/cm²-s durante 2 minutos) para causar la formación de la población celular y 3) un método de tratamiento térmico de una célula de cáncer o línea celular de cáncer a 85°C durante 10 minutos para causar la formación de la población celular.

Las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención (en este ejemplo, las células dendríticas activadas) preparadas (producidas) mediante el método anteriormente descrito para tratamiento de activación según la presente invención pueden inducir eficazmente inmunocitos que incluyen predominantemente CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$. Por ejemplo, en el caso *in vitro* o *in vivo*, las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención pueden usarse como composición médica capaz de inducir inmunocitos que incluyen predominantemente CTL específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$. En particular, dicha composición médica se usa preferiblemente como agente de tratamiento y prevención de cáncer y/o enfermedades infecciosas. En la presente invención, los inmunocitos designan células capaces de reconocer la especificidad de un antígeno y/o de estar implicadas en una reacción inmunitaria específica que incluye linfocitos T, linfocitos iNKT, linfocitos NK (linfocitos citolíticos naturales), linfocitos B, monocitos, células dendríticas y macrófagos, o una población celular que incluye una clase o dos o más clases de estas células. También, en la presente invención, incluir predominantemente CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$ significa que la relación y/o el número de CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$ aumenta en comparación con antes de la estimulación. En el caso en que las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención se usen *in vitro*, pueden usarse como composición capaz de inducir inmunocitos que incluyen predominantemente CTL CD8+ específicos de antígeno y/o linfocitos T $\gamma\delta$. En el caso en que las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención se usen *in vivo*, pueden usarse como vacuna tal como una vacuna de células dendríticas capaz de inducir inmunocitos que incluyen predominantemente CTL CD8+ específicos de antígeno y/o linfocitos T $\gamma\delta$ después de eliminar bisfosfonato y antígeno de enfermedad libres por lavado. Adicionalmente, en ambos casos de uso de las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención *in vitro* e *in vivo*, pueden usarse también citocinas (por ejemplo IL-2) y otras proteínas (por ejemplo, albúmina), etc., por ejemplo, según sea necesario.

Realización 2: Composición médica que comprende células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención

5 Se describirá ahora una composición médica que usa células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención a modo de ejemplo usando células dendríticas como células presentadoras de antígeno de forma similar a anteriormente.

10 En primer lugar, se recogen mediante centrifugación las células presentadoras de antígeno activadas (las células dendríticas activadas) obtenidas en la realización 1 descrita anteriormente. A continuación, se lavan las células recogidas. El líquido usado para el lavado puede ser cualquier líquido, a condición de que sea isotónico y pueda usarse para preparaciones farmacéuticas. Considerando la administración posterior a un paciente, es preferible usar una solución salina fisiológica, PBS o similar. Se suspenden entonces en una solución salina fisiológica las células dendríticas recogidas y se vuelven aplicables como composición médica. También es posible añadir un componente sérico tal como albúmina y citocinas, según sea necesario. En particular, dicha composición médica se usa preferiblemente como agente de tratamiento y prevención para cáncer y/o enfermedades infecciosas. Por consiguiente, como realización relacionada, la presente invención incluye el uso de la célula presentadora de antígeno activada de la presente invención para producir una composición médica para un cáncer y/o una enfermedad infecciosa.

20 Realización 3: Método de tratamiento y prevención que usa células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención

25 Se describirá ahora un método de tratamiento y prevención que usa células dendríticas de la presente invención a modo de ejemplo, que usa células dendríticas como células presentadoras de antígeno de forma similar a anteriormente.

30 Al administrar las células presentadoras de antígeno activadas (las células dendríticas activadas) de la presente invención, obtenidas en la realización 1, o la composición médica de la presente invención, obtenida en la realización 2 descrita anteriormente, es posible tratar y prevenir un cáncer y/o una enfermedad infecciosa.

35 El número de células a administrar puede seleccionarse adecuadamente según un método de administración y unas condiciones del paciente sin ninguna limitación particular. Por ejemplo, se administran preferiblemente de una vez de 10^6 a 10^8 células por persona, y al menos 10^7 células por persona más preferiblemente. El número de administraciones varía según el estado del paciente y puede ser de 4 a 6 veces en una tanda. El intervalo de administraciones depende del número de células dendríticas a administrar y no está particularmente limitado. Se prefiere administrar las células dendríticas una vez por semana a una vez al mes. Adicionalmente, se prefiere administrar las células dendríticas cada dos semanas si el número de células es de 5×10^6 , y se prefiere administrarlas una vez al mes si el número es de 2×10^7 o mayor. El método de administración no está particularmente limitado, sino que puede ser inyección intravenosa, inyección hipodérmica, inyección intracutánea, inyección directa en un nódulo linfático regional, inyección directa en el sitio dañado o administración sistémica por goteo. Como alternativa, también es posible inyectar las células dendríticas en una arteria cercana al sitio dañado.

45 Al administrar las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención de esta manera, es posible activar y hacer proliferar no solo los CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad, sino también los linfocitos T $\gamma\delta$, en el cuerpo del paciente.

50 Estos CTL específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$ no solo pueden destruir una célula de cáncer y una célula infectada directamente, sino que también dañan estas células indirectamente mediante citocinas tales como interferón γ (de aquí en adelante designado como IFN γ). Por lo tanto, pueden usarse eficazmente para diversos tratamientos y prevenciones de cánceres y enfermedades infecciosas, por ejemplo. Sigue la ventaja de usar las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención como vacuna. Una vacuna convencional de células dendríticas sometidas a pulsos con un antígeno de enfermedad solo activa solo CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad. En contraposición, la vacuna de las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención puede activar linfocitos T $\gamma\delta$ además de CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad. Además, las citocinas que se inducen a partir de estos CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$ son capaces de activar un linfocito T auxiliar, un linfocito NK, un linfocito iNKT (linfocito T citolítico natural) y un linfocito B. Esto activa la inmunidad humoral y celular en el organismo entero, de modo que mejora el efecto del tratamiento y la prevención. También, las células presentadoras de antígeno usadas para el tratamiento de activación son preferiblemente células presentadoras de antígeno autólogas del paciente o células presentadoras de antígeno alogénicas que comparten el mismo HLA. Esto es debido a que, cuando se administran al paciente, pueden exhibir su función sin eliminarse por la inmunidad del paciente.

65 Realización 4: Método para inducir inmunocitos que incluyen predominantemente CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$

Se describirá ahora un método para inducir inmunocitos según la presente invención. El método para inducir inmunocitos según la presente invención es un método para inducir inmunocitos que incluyen predominantemente CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$, y más específicamente, un método de inducción que incluye un proceso de (i) someter una célula presentadora de antígeno a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y antígeno de enfermedad, y un proceso de (ii) cultivar conjuntamente la célula presentadora de antígeno y un linfocito simultáneamente a o después del pulso conjunto. Aquí, inmunocito designa una célula capaz de reconocer la especificidad de un antígeno y/o de estar implicada en una reacción inmunitaria específica, incluyendo un linfocito T, un linfocito iNKT, un linfocito NK, un linfocito B, un monocito, una célula dendrítica y un macrófago, o una población celular que incluye una clase o dos o más clases de estas células, como se describe anteriormente.

En primer lugar, se lleva a cabo un tratamiento de activación de células presentadoras de antígeno (por ejemplo, células dendríticas) de forma similar a la realización 1 (el proceso (i)). Se añaden entonces simultáneamente o después del pulso conjunto las células presentadoras de antígeno y las células sensibles a un recipiente de cultivo para cultivo conjunto (el proceso (ii)). De este modo, los CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad en las células sensibles podrían activarse en respuesta a una estimulación específica de antígeno de enfermedad por las células presentadoras de antígeno que se han sometido al tratamiento de activación. Adicionalmente, en respuesta a la estimulación con moléculas similares a IPP (difosfato de isopentenilo) que se presentan en la superficie de las células presentadoras de antígeno mediante la inhibición de un sistema metabólico de la célula presentadora de antígeno causada por el pulso de bisfosfonato, podrían activarse los linfocitos T $\gamma\delta$ en las células sensibles. El IFN γ producido a partir de los linfocitos T $\gamma\delta$ es capaz de ayudar a una activación y proliferación adicionales de los CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad. Incidentalmente, las células sensibles aquí son, por ejemplo, linfocitos humanos y preferiblemente son monocitos derivados de sangre periférica. Estas células sensibles son preferiblemente células sensibles autólogas o células sensibles alogénicas que comparten el mismo HLA.

El recipiente de cultivo anteriormente mencionado no está particularmente limitado, y habitualmente puede ser una placa de cultivo, un disco de laboratorio, un matraz, una bolsa o similar usado en la materia. La concentración a que se añade cada población celular puede fijarse libremente según la situación.

En el caso en que las células presentadoras de antígeno sean células dendríticas, las células dendríticas y las células sensibles pueden cultivarse conjuntamente usando un medio AIM-V, por ejemplo. Además del medio AIM-V, es posible usar un medio comercialmente disponible que se use para cultivo celular, tal como un medio RPMI-1640, DMEM, TIL, KBM o IMEM. Adicionalmente, puede añadirse de 5% a 20% de suero tal como suero bovino, FBS, plasma humano o citocina o similar, según sea necesario. El cultivo se lleva a cabo, por ejemplo, a 34 a 38°C, preferiblemente a 37°C, en condiciones de, por ejemplo, 2% a 10% de CO₂, preferiblemente 5% de CO₂. El periodo de cultivo no está particularmente limitado y es preferiblemente de 5 a 21 días, y adicionalmente es preferiblemente de 7 a 14 días. El número de células dendríticas y células sensibles a añadir puede fijarse según el recipiente que se use y su uso pretendido. También, la relación de mezcla entre las células dendríticas y las células sensibles puede fijarse adecuadamente según la situación, sin ninguna limitación particular. Con el fin de aumentar la relación de CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$ en las células sensibles, es preferible que la relación de células sensibles a células dendríticas sea de 20:1 a 2:1.

Con el método de inducción de la presente invención anteriormente descrito, es posible preparar (producir) los inmunocitos de la presente invención que incluyen predominantemente CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$. También, los inmunocitos así obtenidos de la presente invención pueden usarse como tal, o después de estimulaciones repetidas con las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención, como inmunocitos que incluyen CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$ a una relación mayor en una terapia inmunocelular. Por consiguiente, puede esperarse un efecto potenciado del tratamiento y la prevención de cáncer y enfermedades infecciosas.

Sigue la ventaja de preparar los inmunocitos de la presente invención *in vitro*. Al estimular las células sensibles repetidamente con las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención, es posible preparar una gran cantidad de inmunocitos capaces de destruir directamente células de cáncer y células de enfermedad infecciosa de manera simplificada.

Realización 5: Composición médica que comprende inmunocitos de la presente invención

Se describirá ahora una composición médica que comprende inmunocitos de la presente invención.

En primer lugar, se recogen mediante centrifugación los inmunocitos de la presente invención que incluyen predominantemente CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$ obtenidos en la realización 4 descrita anteriormente. A continuación, se lavan las células recogidas. El líquido usado para el lavado puede ser cualquier líquido, a condición de que sea isotónico y pueda usarse en preparaciones farmacéuticas. Considerando la administración posterior a un paciente, es preferible usar una solución salina fisiológica, PBS o similar. Se suspenden entonces los inmunocitos que incluyen predominantemente CTL CD8+ específicos de antígeno de

enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$ en una solución salina fisiológica y se vuelven aplicables como composición médica. También es posible añadir citocinas, según sea necesario. En particular, dicha composición médica se usa preferiblemente como agente de tratamiento y prevención para cáncer y/o enfermedades infecciosas. Por consiguiente, como realización relacionada, la presente invención incluye el uso de la célula presentadora de antígeno activada de la presente invención para producir una composición médica para un cáncer y/o una enfermedad infecciosa.

Realización 6: Método de tratamiento y prevención que usa inmunocitos de la presente invención

Se describirá ahora un método de tratamiento y prevención que usa inmunocitos de la presente invención.

Al administrar los inmunocitos de la presente invención obtenidos en la realización 4 o la composición médica de la presente invención obtenida en la realización 5 descritas anteriormente, es posible tratar y prevenir un cáncer y/o una enfermedad infecciosa.

El número de inmunocitos a administrar puede seleccionarse adecuadamente según el método de administración y las condiciones del paciente, sin ninguna limitación particular. Por ejemplo, se administran preferiblemente de una vez de 10^8 a 10^{12} inmunocitos por persona, y al menos 10^9 inmunocitos por persona más preferiblemente. El número de administraciones varía según las condiciones del paciente y es habitualmente de 4 a 6 veces en una tanda. El intervalo de administraciones no está particularmente limitado, y se prefiere administrar los inmunocitos cada dos semanas o una vez al mes, por ejemplo. El método de administración no está particularmente limitado, sino que puede ser inyección intravenosa, inyección hipodérmica, inyección intracutánea, inyección directa en un nódulo linfático regional, inyección directa en el sitio dañado o administración sistémica por goteo. Como alternativa, también es posible inyectar los inmunocitos en una arteria cercana al sitio dañado. También, los inmunocitos de la presente invención son preferiblemente inmunocitos autólogos del paciente o inmunocitos alogénicos que comparten el mismo HLA. Esto es debido a que, cuando se administran al paciente, pueden exhibir su función sin ser rechazados por la inmunidad del paciente.

Realización 7: Acelerador de la activación de células presentadoras de antígeno en el momento del pulso con antígeno de enfermedad

Se describirá ahora un acelerador de la activación de las células presentadoras de antígeno en el momento del pulso con antígeno de enfermedad de la presente invención.

El acelerador de la activación de células presentadoras de antígeno en el momento del pulso con antígeno de enfermedad de la presente invención contiene bisfosfonato como componente eficaz. El acelerador de la activación anteriormente observado puede contener adicionalmente un vehículo y/o un portador que sean farmacéuticamente aceptables. El acelerador de la activación anteriormente observado puede añadirse en el momento del pulso de las células presentadoras de antígeno con el antígeno de enfermedad *in vivo* y/o *in vitro*, a saber, antes, simultáneamente y/o después del pulso con el antígeno de enfermedad. Los demás aspectos de la presente invención incluyen el uso de un bisfosfonato para producir el acelerador de la activación de células presentadoras de antígeno en el momento del pulso con el antígeno de enfermedad. Adicionalmente, los demás modos de la presente invención incluyen un método de tratamiento y prevención de cáncer y/o enfermedad infecciosa usando bisfosfonato.

Lo siguiente es una descripción detallada de la presente invención a modo de ejemplos. Ni que decir tiene que la presente invención no está limitada en modo alguno a estos ejemplos.

Ejemplo 1

Ejemplo 1-1: Recogida y preparación de células dendríticas

Se recogieron 30 ml de sangre periférica de un donante sano (HLA-A*0201). Se obtuvieron las células mononucleares de esta sangre periférica del donante sano. En ese momento, se recogió una capa de células mononucleares usando una solución de gradiente de densidad para la separación de células sanguíneas. Para eliminar las plaquetas y otros componentes, se lavaron las células recogidas varias veces con AIM-V al que se había añadido 10% de FBS, y se aislaron las células positivas de CD14 como monocitos con MACS.

A partir de los precursores de células dendríticas obtenidos, se llevó a cabo la inducción de la diferenciación de células dendríticas. Se preparó el medio añadiendo GM-CSF (IMMUNEX) 500 U/ml e IL-4 (Osteogenetics GmbH) 500 U/ml a AIM-V al que se habían añadido 10% de FBS o suero AB. Del día 5 al día 7 después de iniciar el cultivo, se obtuvieron células dendríticas inmaduras.

Además, del día 5 al día 7 después de iniciar el cultivo, se añadieron IL-6 100 U/ml o 10 ng/ml (R&D Systems), IL-1 β (CHEMICON) 10 ng/ml, TNF- α (PHARMINGEN) 10 ng/ml y PGE2 (SIGMA) 1 μ g/ml, seguido de cultivo adicional, obteniendo así células dendríticas maduras después de 24 a 48 horas.

Ejemplo 1-2: Confirmación del estado de las células dendríticas

Se detectó un antígeno de superficie de las células dendríticas preparadas usando un citómetro de flujo (EPICS XL-MCL; Beckman Coulter).

Se añadió un anticuerpo diana a una suspensión de células a medir en PBS, teniendo por tanto las células en estado protegido a 4°C durante 15 minutos. El anticuerpo era un anticuerpo anti-CD14, un anticuerpo anti-CD83 o un anticuerpo anti-HLA-DR que se marcó con PE (Beckman Coulter). Como control negativo, se usó un isotipo de cada uno de los anticuerpos. Después de lavar con PBS las células teñidas, se midieron con EPICS XL-MCL.

Los resultados mostraron que las células cultivadas con GM-CSF e IL-4 eran negativas de CD14, negativas de CD83 y positivas de HLA-DR. Por tanto, se confirmó que era una población de células dendríticas inmaduras. También las células cultivadas con GM-CSF, IL-4, IL-6, IL-1 β , TNF- α y PGE2 eran positivas, excepto de CD14. Por tanto, se confirmó que era una población de células dendríticas maduras.

Ejemplo 1-3: Preparación de células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y péptidos antigénicos de enfermedad y preparación de células sensibles

Se añadió ZOMETA™ (Novartis), que era un agente aminobisfosfonato, a una suspensión de las células dendríticas inmaduras o las células dendríticas maduras derivadas de sangre periférica preparadas como se describe anteriormente, en forma de ácido zoledrónico como para conseguir 0,01 μ M y/o se añadieron los péptidos antigénicos A27L de MART-1 (ELAGIGILTV) (de aquí en adelante designados como A27L) como péptidos antigénicos de enfermedad como para conseguir una concentración final de 2 μ g/ml, seguido de cultivo a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante aproximadamente 12 horas. Como control negativo, se usaron células dendríticas que se cultivaron sin adición de ZOMETA™ ni péptidos antigénicos.

Después de aproximadamente 12 horas de cultivo, se recogieron parte de las células dendríticas activadas que se sometieron a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y los péptidos antigénicos, se dispusieron en un tubo de 15 ml (BD Falcon) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se suspendieron las células dendríticas resultantes en forma de aglomerados en 10 ml de medio AIM-V suplementado con 10% de FBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, seguido de lavado. Se repitió dos veces la operación de lavado. Las células dendríticas recogidas de esta manera se usaron como células estimulantes. En otras palabras, se usaron como células estimulantes células dendríticas activadas que se sometieron a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y los péptidos antigénicos de enfermedad, células dendríticas que sometieron a pulsos con cualquiera de ellos y células dendríticas que no se sometieron a pulsos con ninguno de ellos. Las células preparadas suspendiendo aquellas que permanecen después del aislamiento de las células positivas de CD14 (una población de células negativas de CD14 que era principalmente una población de linfocitos T) para preparar las células dendríticas en medio AIM-V suplementado con 10% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y conservándolas congeladas, se descongelaron, se lavaron y se usaron como células sensibles.

Ejemplo 1-4: Caracterización de inmuncitos inducidos por células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y péptidos antigénicos de enfermedad

Se cultivaron 2×10^5 de cada una de las células estimulantes (células dendríticas) obtenidas como se describe anteriormente con 2×10^6 células sensibles de tal modo que la cantidad total fuera de 1 ml en placa de 24 pocillos (SUMILON) (células sensibles:células dendríticas= 10:1). Se llevó a cabo el cultivo aproximadamente a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante 7 días. Cuando se añadió IL-2 20 U/ml a esta solución cultivada conjuntamente, las células proliferaron más favorablemente. En el caso en que las células proliferaron rápidamente, se añadieron 1 ml de medio AIM-V suplementado con IL-2 40 U/ml y 10% de FBS del día 4 al día 6. Entonces, 7 días después del inicio del cultivo conjunto de las células dendríticas y las células sensibles, se midió la relación de los CTL CD8+ específicos de A27L (los CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad) en todas las células con un citómetro de flujo, usando un anticuerpo marcado y un tetrámero específico de antígeno.

El procedimiento de cálculo de la relación de células positivas de tetrámero HLA-A*0201 A27L y positivas de CD8 es como sigue: en primer lugar, se añadió tetrámero A27L, que se marcó con PE (MBL), a células que se habían lavado con PBS después del cultivo. Después de teñir en estado protegido a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió un anticuerpo anti-CD8 marcado con FITC (BD Pharmingen), seguido de tinción en estado protegido a 4°C durante 15 minutos. Como control, se usó un isotipo de cada uno de los anticuerpos. Se midieron las células usando EPICS XL-MCL, y se analizaron los resultados de medida usando EPICS 32.

Los resultados se muestran en la tabla 4a siguiente. Como se muestra en esta tabla, se confirmó que las células dendríticas activadas que se sometían a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ 0,01 μ M y A27L 2 μ g/ml inducían CTL CD8+ específicos de antígeno. Adicionalmente, se confirmó que la relación de CTL CD8+ específicos de antígeno en el caso de uso de estas células dendríticas activadas era aproximadamente 4 veces más alta que la de los CTL inducidos en células dendríticas que se sometieron a pulsos solo con péptidos.

Además, la tabla 4b y la FIG. 1 muestran los resultados de una prueba t cuando se realizó un experimento similar con un número mayor de sujetos. Resultó evidente que la relación de CTL CD8+ obtenidos usando las células dendríticas que se sometieron a pulsos conjuntamente con A27L y ZOMETA™ era mayor que la de los CTL CD8+ obtenidos usando células dendríticas que se sometieron a pulsos con A27L solo, existiendo una diferencia significativa entre ellos.

Tabla 4

(Tabla 4a) Relación (%) de CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad inducidos cultivando células dendríticas inmaduras activadas sometidas a pulsos usando ZOMETA™ y/o A27L y linfocitos

Muestra usada para someter a pulsos células dendríticas		
A27L	ZOMETA™	A27L + ZOMETA™
0,09	0,00	0,39

(Tabla 4b) Relación (%) de CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad inducidos cultivando células dendríticas inmaduras activadas sometidas a pulsos usando ZOMETA™ y/o A27L y linfocitos

Donante	Muestra usada para someter a pulsos células dendríticas		
	A27L	A27L + ZOMETA™	Factor de escala
01	0,05	0,38	7,60
02	0,09	0,61	6,78
03	0,07	0,40	5,71
04	1,02	2,66	2,61
05	0,22	0,94	4,27
06	0,15	1,64	10,93
07	1,15	2,25	1,96
08	0,21	0,43	2,05

Ejemplo 2

Ejemplo 2-1: Caracterización de inmunocitos inducidos cultivando conjuntamente células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente en presencia de ZOMETA™ y A27L y células sensibles

Se añadieron 1×10^5 de cada una de las células dendríticas inmaduras o de las células dendríticas maduras derivadas de sangre periférica preparada en el ejemplo 1 a una placa de 24 pocillos (SUMILON) de tal modo que la cantidad total fuera de 1 ml. Adicionalmente, se añadió ZOMETA™, que era un agente aminobisfosfonato, como para conseguir una concentración final de 0,01 μM y/o se añadió A27L como para conseguir una concentración final de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, seguido de cultivo a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante aproximadamente 24 horas. Como control negativo, se usaron células dendríticas que se cultivaron sin añadir ZOMETA™ ni péptidos antigénicos. Se añadieron entonces, después de cultivar durante 12 horas usando estas células dendríticas sometidas a pulsos como células estimulantes, 2×10^6 células sensibles, seguidas de cultivo conjunto (células sensibles: células estimulantes = 20:1). Se realizó el cultivo aproximadamente a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante 7 días o 14 días. Dependiendo de la proliferación celular, se añadieron 1 a 100 U/ml de IL-2 a la solución cultivada conjuntamente.

Usando el número total de células que proliferaban respectivamente 7 y 14 días después del inicio del cultivo conjunto, un anticuerpo marcado y un tetrámero específico de antígeno, se midió la relación de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno y linfocitos T $\gamma\delta$ en todas las células mencionadas anteriormente con un citómetro de flujo. Se añadió tetrámero A27L marcado con PE (MBL) a las células, que se habían lavado con PBS después de terminar el cultivo conjunto, y se tiñeron en estado protegido a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de ello, se añadió un anticuerpo anti-CD8 marcado con FITC (BD Pharmingen), seguido de tinción en estado protegido a 4°C durante 15 minutos. Se determinó la relación de linfocitos T $\gamma\delta$ usando un anticuerpo V $\gamma 9$ anti-TCR marcado con FITC, un anticuerpo pan α/β anti-TCR marcado con PE y un anticuerpo anti-CD3 marcado con PC5 (todos de Beckman Coulter). Se añadieron estos anticuerpos a las células que se habían cultivado y se lavaron entonces con PBS, seguido de tinción en estado protegido a 4°C durante 15 minutos. Como control negativo, se usó un isotipo de cada uno de los anticuerpos. Se midieron las células usando EPICS XL-MCL y se analizaron los resultados de medida usando EPICS 32.

Se muestran los resultados en las tablas 5 y 6 siguientes. Como se muestra en la tabla 5, se observó que la

5 inducción de los CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad, cuando se cultivaban conjuntamente las células dendríticas y los linfocitos en presencia de ZOMETA™ 0,01 µM y A27L 2 µg/ml, aumentaba en comparación con el caso de cultivo conjunto de células dendríticas y linfocitos en presencia de A27L solo. Estos resultados sugieren un efecto coadyuvante de ZOMETA™ para la inducción de CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad. Se confirmó también que este efecto coadyuvante era mayor en las células dendríticas inmaduras.

10 Adicionalmente, como se muestra en la tabla 6 más adelante, se confirmó que aumentaba también la inducción de los linfocitos T γδ mediante cultivo conjunto de las células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente en presencia de ZOMETA™ 0,01 µM y A27L y los linfocitos.

Tabla 5

15 (Tabla 5) a) Relación (%) de CTL específicos de antígeno de enfermedad inducidos por el cultivo conjunto de células dendríticas sometidas a pulsos usando ZOMETA™ y A27L y linfocitos a todos los linfocitos y b) número de estas células

a)

Estado de las células dendríticas	Periodo de cultivo	Muestra usada para someter a pulsos células dendríticas		
		Péptido antigénico	ZOMETA™	Péptido antigénico + ZOMETA™
Control	0 días	0,03		
Células dendríticas inmaduras	7 días	0,15	0,08	1,64
	14 días	0,05	0,26	5,08
Células dendríticas maduras	7 días	0,97	0,32	2,03
	14 días	2,48	0,39	1,69

b)

Estado de las células dendríticas	Periodo de cultivo	Muestra usada para someter a pulsos células dendríticas		
		Péptido antigénico	ZOMETA™	Péptido antigénico + ZOMETA™
Control	0 días	$6,0 \times 10^2$		
Células dendríticas inmaduras	7 días	$4,1 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$
	14 días	$2,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$1,8 \times 10^5$
Células dendríticas maduras	7 días	$3,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$5,2 \times 10^4$
	14 días	$1,1 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$7,4 \times 10^4$

20

Se calculó el número de células multiplicando el número total de células por la relación.

Tabla 6

25 (Tabla 6) Relación (%) de linfocitos T γδ inducidos cultivando conjuntamente células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente usando ZOMETA™ y péptido antigénico y linfocitos y número de estas células

Estado de células dendríticas	Periodo de cultivo	Muestra usada para someter a pulsos conjuntamente células dendríticas	
		A27L + ZOMETA™	
		Relación de linfocitos T γδ	Número de linfocitos T γδ
Antes de iniciar el cultivo conjunto	0 días	13,0	$2,6 \times 10^5$
Células dendríticas inmaduras	7 días	25,7	$6,1 \times 10^5$
	14 días	26,9	$9,7 \times 10^5$
Células dendríticas maduras	7 días	27,0	$7,0 \times 10^5$

	14 días	35,3	15,0 x 10 ⁵
--	---------	------	------------------------

Se calculó el número de células multiplicando el número total de células por la relación.

5 Ejemplo 2-2: Análisis de la capacidad de producción de IFN γ de inmunocitos inducida por el cultivo conjunto de células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente en presencia de ZOMETA™ y A27 y células sensibles

Posteriormente, se analizó como sigue la capacidad de producción de IFN γ de inmunocitos que se indujeron por el cultivo conjunto anteriormente descrito.

10 Se añadió etanol al 70% a cada pocillo de una placa MultiScreen (MILLIPORE) y se retiró al cabo de 2 minutos. Se lavó cada pocillo de la placa anteriormente observada 5 veces con 200 μ l de PBS. Se diluyó con PBS un anticuerpo de recubrimiento anti-IFN γ (clon: 1-D1K, kit MABTECH ELISpot para interferón γ humano) como para conseguir 15 μ l/ml y se añadieron 100 μ l del mismo por pocillo a la placa anteriormente observada. Se dejó esta placa durante una noche a 4°C. Se lavó esta placa 4 veces con 200 μ l de PBS/pocillo. Se añadieron entonces 200 μ l de un medio AIM-V suplementado con 10% de FBS a cada pocillo, seguido de bloqueo a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Se retiró el medio de bloqueo y se lavó la placa 4 veces con 200 μ l de PBS/pocillo. Se recogió una población celular cultivada conjuntamente en cada condición, obtenida mediante un método similar al cultivo conjunto anteriormente descrito, mediante centrifugación y lavado dos veces con AIM-V.

20 Para la reestimulación, se añadieron 500 células dendríticas inmaduras y A27L obtenido en el ejemplo 1 a 2500 células cultivadas conjuntamente que se recogieron después del precultivo a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante 2 horas. El número de células indica el número por pocillo de una placa de ensayo. Al mismo tiempo, se llevaron a cabo también el precultivo usando células cultivadas conjuntamente solas y el precultivo usando células dendríticas y A27 solo. Se ajustó el volumen de cultivo a 100 μ l por pocillo. Para cada condición de cultivo, se actuó en 300 μ l de cultivo, que corresponden a 3 pocillos. Se añadieron 100 μ l por pocillo de las células precultivadas en cada condición a 3 pocillos de la placa que se había lavado con PBS después del bloqueo, y se cultivaron durante una noche a 37°C en condiciones de 5% de CO₂. Se retiraron las células cultivadas de los pocillos y se lavaron 5 veces con 200 μ l de PBS/pocillo. Se diluyó un anticuerpo anti-IFN γ marcado con biotina (clon: 7-B6-1, kit MABTECH ELISPot™ para interferón γ humano) con PBS suplementado con 0,5% de FBS como para conseguir 1 μ g/ml y se añadieron 100 μ l del mismo por pocillo. Se dejó la placa a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavó esta placa 5 veces con 200 μ l de PBS/pocillo. Se diluyó estreptavidina a la que se había unido fosfatasa alcalina (kit MABTECH ELISPot™ para interferón γ humano) con PBS suplementado con 0,5% de FBS a 1:1000, y se añadieron 100 μ l de la misma por pocillo. Se dejó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavó esta placa 5 veces con 200 μ l de PBS/pocillo. Se añadieron entonces 100 μ l de solución de sustrato BCIP/NBTplus (Wako) por pocillo, que se dejó en un lugar oscuro hasta que se hicieron visibles los puntos. Cuando se hicieron visibles los puntos a simple vista, se lavó suficientemente la placa con agua destilada. Después de comprobar que la membrana de la placa está seca, se midió el número de puntos usando un lector ELISPot™ (AID Autoimmun Diagnostika GmbH), y se analizaron los datos con el software AID versión 3.1 (AID).

40 Se muestran los resultados en la tabla 7 siguiente. Como se muestra en esta tabla, el número de puntos, que indicaban células productoras de IFN- γ , aumentaba mucho en el caso de la población celular cultivada conjuntamente de células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ 0,01 μ M y A27L 2 μ g/ml y los linfocitos se reestimulaban usando las células dendríticas sometidas a pulsos con A27L. Este resultado mostraba correlación con la relación (%) de células positivas de tetrámero A27L mostradas en el ejemplo 1 (véase la tabla 4).

45 Tabla 7

(Tabla 7) Número de células productoras de IFN- γ obtenidas cultivando conjuntamente células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y péptido antigénico y linfocitos en 2500 linfocitos

	Linfocitos solos		Linfocitos + células dendríticas sometidos a pulsos conjuntamente con péptidos	
	Sin ZOMETA™	Con ZOMETA™	Sin ZOMETA™	Con ZOMETA™
Donante A	1	4	55	100
Donante B	2	0	3	50

50 **Ejemplo 3**

55 Caracterización de inmunocitos inducidos cultivando conjuntamente células dendríticas en presencia de ZOMETA™ y células apoptóticas derivadas de una línea celular de cáncer y células sensibles

A partir de un donante sano, se recogieron 200 ml de sangre periférica. Se obtuvieron las células mononucleares de esta sangre periférica del donante sano. En ese momento, se recogió una capa de células mononucleares usando una solución en gradiente de densidad para la separación de las células sanguíneas. Después de varios lavados para retirar las plaquetas, etc. de las células recogidas, se aislaron las células positivas de CD4 en forma de monocitos con MACS. A partir de los precursores de células dendríticas obtenidos, se llevó a cabo la inducción de la diferenciación de células dendríticas. Se preparó el medio añadiendo GM-CSF (IMMUNEX) 500 U/ml e IL-4 (Osteogenetics GmbH) 500 U/ml a AIM-V suplementado con 10% FBS. Del día 5 al 7 después del inicio del cultivo, se obtuvieron células dendríticas inmaduras.

Se recogió una línea celular derivada de cáncer de melanoma positivo de MART-1, se dispuso en un tubo de 15 ml (BD Falcon) y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos. Se suspendió la línea celular resultante en forma de aglomerados en 10 ml de medio AIM-V y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, seguido de lavado. Se repitió dos veces la operación de lavado. Se suspendió de nuevo la línea celular recogida de esta manera en AIM-V como para conseguir 1×10^6 células/ml. Se añadieron entonces 10 μ l de camptotecina (Sigma) a la suspensión celular y se cultivaron a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante 24 horas. Se recogieron las células cultivadas, se dispusieron en un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se suspendió la línea celular resultante en forma de aglomerados en 10 ml de medio AIM-V y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos, seguido de lavado. Se repitió dos veces la operación de lavado. Se usaron las células obtenidas mediante centrifugación y lavado como células apoptóticas.

Se añadió ZOMETA™, que era un agente aminobisfosfonato, a la suspensión de células dendríticas inmaduras como para conseguir 0,01 μ M y/o se añadió a la misma una línea celular de cáncer que contenía como células apoptóticas las células dendríticas, seguido de cultivo conjunto durante aproximadamente 24 horas. Como control, se usaron las células dendríticas que se cultivaron con las células apoptóticas solas durante aproximadamente 24 horas y las células dendríticas que se cultivaron sin añadir ZOMETA™ ni las células apoptóticas. Adicionalmente, se añadieron IL-6 100 U/ml, IL-1 β 10 ng/ml, TNF- α 10 ng/ml y PGE2 1 μ g/ml a las células dendríticas inmaduras que se habían cultivado durante aproximadamente 24 horas, y se cultivaron adicionalmente como para obtener células dendríticas maduras 48 horas después.

Se usaron las células dendríticas maduras aquí obtenidas como células estimulantes. Se cultivaron 1×10^5 de cada una de estas células estimulantes con 2×10^6 células sensibles de tal modo que la cantidad total fuera de 1 ml en una placa de 24 pocillos (SUMILON) (células sensibles: células estimulantes= 20:1). Las células preparadas suspendiendo aquellas que permanecen después del aislamiento de las células positivas de CD14 (una población celular negativa de CD14 que era principalmente una población de linfocitos T) para preparar las células dendríticas en un medio AIM-V suplementado con 10% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y conservándolas congeladas, se descongelaron, se lavaron y se usaron como células sensibles. Se llevó a cabo el cultivo aproximadamente a 37°C en condiciones de 5% de CO₂. Se añadieron IL-2 20 U/ml a esta solución cultivada conjuntamente. En el caso en que las células proliferaran rápidamente, se añadió 1 ml de medio AIM-V suplementado con IL-2 40 U/ml y 10% de FBS del día 4 al día 6.

Usando el número de todos los linfocitos que proliferaron los días 7, 11 y 14 después del inicio del cultivo conjunto, un anticuerpo marcado y un tetrámero específico de antígeno, se midió la relación de CTL CD8+ específicos de antígeno a todos los linfocitos con un citómetro de flujo. Más específicamente, se añadió tetrámero A27L (MBL), que se marcó con PE, a las células que se habían lavado con PBS después de cultivar, seguido de tinción en estado protegido a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después de ello, se marcó un anticuerpo anti-CD8 que se había marcado con FITC (BD Pharmingen), seguido de tinción en estado protegido a 4°C durante 15 minutos. Como control negativo, se usó un isotipo de cada uno de los anticuerpos. Se midieron las células usando EPICS 32.

Se muestran los resultados en la tabla 8 siguiente. Como se muestra en esta tabla, en caso de pulso con la línea celular que contiene células apoptóticas, se determinó un 0,01% de las células positivas de tetrámero el día 11 de cultivo. Adicionalmente, se confirmó que eran un 0,14%, a saber, un aumento de aproximadamente 15 veces, por la adición de ZOMETA™.

Tabla 8

(Tabla 8) Relación de CTL CD8+ específicos de antígeno A27L inducidos por células dendríticas activadas sometidas a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y células apoptóticas

Células dendríticas	CTL CD8+ específicos de A27L	
	Relación de CTL CD8+ (%)	Número de CTL CD8+
Células dendríticas solas	0,00	0
Células apoptóticas + células dendríticas	0,01	$0,6 \times 10^3$
Células apoptóticas + ZOMETA™ + células dendríticas	0,14	$2,7 \times 10^3$

Se calculó el número de células multiplicando el número total de células por la relación.

Ejemplo 4

5 Análisis de la citotoxicidad de linfocitos cultivados con células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y péptidos antigénicos de enfermedad contra una línea celular de melanoma

10 Se añadieron 1×10^5 células dendríticas inmaduras derivadas de sangre periférica preparada en el ejemplo 1 a cada pocillo de una placa de 48 pocillos. Como péptido antigénico de enfermedad, se añadieron péptidos antigénicos A27L de MART-1 (ELAGIGILTV) a cada pocillo, como para conseguir una concentración final de 2 µg/ml. Al mismo tiempo, se prepararon células a las que se añadió ZOMETA™, que era un agente aminobisfosfonato, en forma de ácido zoledrónico como para conseguir 0,01 µM y células a las que no se añadió ZOMETA™. En cada pocillo, se añadieron 1×10^6 linfocitos derivados del mismo donante y se cultivaron con las células dendríticas a 37°C en condiciones de 5% de CO₂.

15 Se recogieron los linfocitos del día 13 al 17 después del inicio del cultivo conjunto. Se marcó la línea celular JCOCB de melanoma humano positiva de HLA-A*0201 y positiva de MART1 con PKH-26 (Sigma) y se usó como células diana. Se usaron los linfocitos recogidos como células efectoras. Se mezclaron con las células diana de modo que células efectoras: células diana= 5:1 o 20:1, y se añadieron a una placa de 24 pocillos. Se realizó el cultivo durante 4 horas a 37°C en condiciones de 5% de CO₂.

20 Se recogieron las células después del cultivo conjunto y se lavaron con PBS que se había enfriado con hielo. Después de centrifugar, se suspendieron las células en tampón de unión de anexina V (BD PharMingen) y se añadieron al mismo anexina V y 7AAD (ambos de Beckman Coulter). Después reacción en hielo durante 15 minutos, se añadió tampón de unión de anexina V a una cantidad de 400 a 500 µl cada vez, y se midió la relación (% de citotoxicidad) de células apoptóticas (células positivas de anexina V) por citometría de flujo (Beckman Coulter).

25 La tabla 9 siguiente muestra el resultado de medir la relación (%) de CTL CD8+ específicos de antígeno A27L inducidos por células dendríticas activadas sometidas a pulsos conjuntamente con A27L y ZOMETA™, la intensidad media de fluorescencia (IMF) a la que se detectan las células positivas de tetrámero y la relación (%) de células apoptóticas con referencia a los dos donantes. Como se muestra en esta tabla, tanto en el donante 1 como en el donante 2, los linfocitos estimulados usando las células dendríticas activadas sometidas a pulsos conjuntamente con A27L y ZOMETA™ mostraron una relación mayor de células positivas de tetrámero que los estimulados con las células dendríticas sometidas a pulsos con A27L solo. También la intensidad media de fluorescencia a la que se detectan las células positivas de tetrámero era mayor en el caso de pulsos conjuntamente con A27L y ZOMETA™. Adicionalmente, cuando se llevó a cabo el cultivo conjunto usando los linfocitos de 13 a 17 días después del inicio del cultivo como células efectoras (E) y la línea celular de melanoma humano positiva de MART1 y positiva de HLA-A*0201 como células diana (T), los linfocitos estimulados usando las células dendríticas activadas sometidas a pulsos conjuntamente con A27L y ZOMETA™ mostraron una mayor citotoxicidad por las células diana que los estimulados usando las células dendríticas sometidas a pulsos con A27L solo tanto en los casos en que las células efectoras: células diana= 5:1 como 20:1.

Tabla 9

45 (Tabla 9) Características de los CTL CD8+ específicos de antígeno A27L inducidos por células dendríticas activadas preparando sometiendo los linfocitos de dos donantes a pulsos conjuntamente con A27L y ZOMETA™

Donante 1

		Linfocitos solos	Linfocitos + células dendríticas sometidos a pulsos con A27L	Linfocitos + células dendríticas sometidos a pulsos conjuntamente con A27L y ZOMETA™
Relación (%) de CTL CD8+ específicos de antígeno A27L		0,00	0,27	0,27
MFI		Ninguno	21,2	36,9
Relación (%) de células apoptóticas	E/T= 5	5,9	9,3	10,2
	E/T= 20	7,4	13,7	19,9

50 Donante 2

		Linfocitos solos	Linfocitos + células dendríticas sometidos a pulsos con A27L	Linfocitos + células dendríticas sometidos a pulsos conjuntamente con A27L y ZOMETA™
Relación (%) de CTL CD8+ específicos de antígeno A27L		0,01	0,99	1,15
MFI		Ninguno	36,3	41,0
Relación (%) de células apoptóticas	E/T= 5	15,9	28,5	37,4
	E/T= 20	50,0	58,5	69,5

Ejemplo 5

Caracterización de inmunocitos inducidos por células dendríticas sometidas a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y péptidos antigénicos de enfermedad

Se añadió ZOMETA™ (Novartis), que era un agente aminobisfosfonato, en forma de ácido zoledrónico a una suspensión de las células dendríticas inmaduras o las células dendríticas maduras derivadas de sangre periférica preparadas en el ejemplo 1 como para conseguir de 0 a 20 µM y, al mismo tiempo, se añadieron los péptidos antigénicos de EBV BMLF1 (GLCTLVAML) (de aquí en adelante designado como BMLF1) como péptidos antigénicos de enfermedad como para conseguir una concentración final de 2 µg/ml, seguido de cultivo a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante aproximadamente 12 horas, efectuando por tanto un tratamiento de activación. Como control negativo, se usaron células dendríticas que se cultivaron sin añadir ZOMETA™ ni péptidos antigénicos.

Después de 12 horas de cultivo, se recogieron parte de las células dendríticas activadas que se sometieron a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y los péptidos antigénicos, se dispusieron en un tubo de 15 ml (BD Falcon) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se suspendieron las células dendríticas resultantes en forma de aglomerados en 10 ml de medio AIM-V suplementado con 10% de FBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, seguido de lavado. Se repitió dos veces la operación de lavado. Se usaron las células dendríticas recogidas de esta manera como células estimulantes. En otras palabras, se usaron como células estimulantes las células dendríticas activadas que se sometieron a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y los péptidos antigénicos de enfermedad, las células dendríticas que se sometieron a pulsos con cualquiera de ellos y las células dendríticas que no se sometieron a pulsos con ninguno de ellos. Las células preparadas suspendiendo aquellas que permanecen después del aislamiento de las células positivas de CD14 (una población de células negativas de CD14, que era principalmente una población de linfocitos T) para preparar las células dendríticas en un medio AIM-V suplementado con 10% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y conservándolas congeladas, se descongelaron, lavaron y usaron como células sensibles. Se cultivaron 1 x 10⁵ de cada una de las células estimulantes obtenidas (células dendríticas) con 1 x 10⁶ células sensibles de tal modo que la cantidad total fuera de 1 ml en una placa de 48 pocillos (CORNING) (células sensibles: células dendríticas= 10:1). Se llevó a cabo el cultivo conjunto aproximadamente a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante 7 días. Cuando se añadió IL-2 20 U/ml a esta solución cultivada conjuntamente, las células proliferaron más favorablemente. En el caso en que las células proliferaron rápidamente, se añadió 1 ml de medio AIM-V suplementado con IL-2 40 U/ml y 10% de FBS del día 4 al día 6. 7 días después del inicio del cultivo conjunto de las células dendríticas y las células sensibles, se midió entonces la relación de CTL CD8+ específicos de BMLF1 (los CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad) en todas las células con un citómetro de flujo, usando un anticuerpo marcado y un tetrámero específico de antígeno.

El procedimiento de cálculo de la relación de células positivas de tetrámero HLA-A*0201 BMLF1 y positivas de CD8 es como sigue: en primer lugar, se añadió tetrámero BMLF1 (MBL), que se marcó con PE, a las células que se habían lavado con PBS después del cultivo. Después de teñir en estado protegido a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añadió un anticuerpo anti-CD8 que se marcó con FITC (BD Pharmingen), seguido de tinción en estado protegido a 4°C durante 15 minutos. Como control, se usó un isotipo de cada uno de los anticuerpos. Se midieron las células usando EPICS XL·MCL, y se analizaron los resultados de medida usando EPICS 32.

Los resultados se muestran en la tabla 10 siguiente. Como se muestra en esta tabla, se confirmó que las células dendríticas activadas que se sometieron a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ 0 a 20 µM y BMLF1 indujeron CTL CD8+ específicos de antígeno. Adicionalmente, se confirmó que la relación de CTL CD8+ específicos de antígeno era aproximadamente 3,2 veces la de los CTL inducidos por células dendríticas que se sometieron a pulsos solo con péptidos.

Tabla 10

(Tabla 10) Relación (%) de CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad inducidos cultivando células

dendríticas inmaduras activadas sometidas a pulsos conjuntamente con BMLF1 y ZOMETA™ y linfocitos

ZOMETA™ (μM)	0 μM	0,01 μM	0,1 μM	1 μM	5 μM	20 μM
Relación de CTL (%)	0,33	0,54	0,56	0,58	0,75	0,72
Número total de células	2,03 x 10 ⁶	2,01 x 10 ⁶	2,17 x 10 ⁶	1,96 x 10 ⁶	2,84 x 10 ⁶	2,94 x 10 ⁶
Número de CTL	6715	10845	12130	11389	21266	21133

Ejemplo 6

5 Ejemplo 6-1: Producción de una línea celular presentadora de antígeno artificial

Se transfectó un gen CD80 humano, que era una molécula coestimulante, mediante un método de lipofección en una línea celular derivada de cáncer de mama MDA-MB-231 (antígeno HLA-A*0201 de clase I) que expresa moléculas MHC de clase I, estableciendo así la línea celular MDA-MB/CD80 que expresa estable y constantemente CD80 humano en células MDA-MB-231. Como se da a conocer en la publicación de EE.UU. US-2005-0048646-A1, las células en esta línea celular MDA-MB/CD80 funcionan como células presentadoras de antígeno y son capaces de inducir CTL.

15 Ejemplo 6-2: Caracterización de inmunocitos inducidos por células presentadoras de antígeno artificiales sometidas a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y péptidos antigénicos de enfermedad

Se añadió ZOMETA™ (Novartis), que era un agente aminobisfosfonato, en forma de ácido zoledrónico a una suspensión de las células presentadoras de antígeno artificiales MDA-MB/CD80 preparadas como se describe anteriormente como para conseguir 0,01 o 1 μM y, al mismo tiempo, se añadieron los péptidos antigénicos A27L de MART-1 (ELAGIGILTV) como péptidos antigénicos de enfermedad como para conseguir una concentración final de 2 μg/ml, seguido de cultivo a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante aproximadamente 12 horas. Como control negativo, se usaron células MDA-MB/CD80 que se cultivaron sin añadir ZOMETA™ ni péptidos antigénicos.

Después de aproximadamente 12 horas de cultivo, se recogieron parte de las células MDA-MB/CD80 activadas que se sometieron a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ y los péptidos antigénicos, se dispusieron en un tubo de 15 ml (BD Falcon) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Se suspendieron las células MDA-MB/CD80 resultantes en forma de aglomerados en 10 ml de medio AIM-V suplementado con 10% de FBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, seguido de lavado. Se repitió dos veces la operación de lavado. Se usaron las células MDA-MB/CD80 recogidas de esta manera como células estimulantes. En otras palabras, se usaron como células estimulantes las células MDA-MB/CD80 activadas que se sometieron a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y los péptidos antigénicos de enfermedad, las células MDA-MB/CD80 que se sometieron a pulsos conjuntamente con cualquiera de ellos y las células MDA-MB/CD80 que no se sometieron a pulsos con ninguno de ellos. Como se describe anteriormente, las células preparadas suspendiendo aquellas que permanecen después del aislamiento de las células positivas de CD14 (una población celular negativa de CD14, que era principalmente una población de linfocitos T, HLA-A*0201) para preparar las células dendríticas en medio AIM-V suplementado con 10% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y conservándolas congeladas, se descongelaron, lavaron y usaron como células sensibles.

Se cultivaron 2 x 10⁵ de cada una de las células estimulantes (células MDA-MB/CD80) obtenidas como se describe anteriormente con 2 x 10⁶ células sensibles de tal modo que la cantidad total fuera de 1 ml en una placa de 24 pocillos (SUMILON) (células sensibles: células estimulantes= 10:1). Se llevó a cabo el cultivo conjunto aproximadamente a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ durante 7 días. Cuando se añadió IL-2 20 U/ml a esta solución cultivada conjuntamente, las células proliferaron más favorablemente. En el caso en que las células proliferaron rápidamente, se añadió 1 ml de medio AIM-V suplementado con IL-2 40 U/ml y 10% de FBS del día 4 al día 6. 7 días después del inicio del cultivo conjunto de las células MDA-MB/CD80 y las células sensibles, se midió entonces la relación de CTL CD8+ específicos de A27L (los CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad) en todas las células con un citómetro de flujo, usando un anticuerpo marcado y un tetrámero específico de antígeno como se describe anteriormente.

Se muestran los resultados en la tabla 11 siguiente. Como se muestra en esta tabla, se confirmó que las células MDA-MB/CD80 activadas que se sometieron a pulsos conjuntamente con ZOMETA™ 0,01 μM o 1 μM y A27L 2 μg/ml indujeron CTL CD8+ específicos de antígeno. Adicionalmente, se confirmó que la relación de CTL CD8+ específicos de antígeno en el caso de uso de estas células MDA-MB/CD80 activadas, era aproximadamente 6 veces la de los CTL inducidos por células MDA-MB/CD80 que se sometieron a pulsos con péptidos solos.

55 Tabla 11

(Tabla 11) Relación (%) de CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad inducidos cultivando células MDA-MB/CD80 activadas

Muestra usada para células MDA-MB/CD80 sometidas a pulsos conjuntamente		
A27L	A27L + ZOMETA™ 0,01 µM	A27L + ZOMETA™ 1 µM
0,12	0,75	0,98

Aplicabilidad industrial

- 5 Como se describe anteriormente, las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención son capaces de inducir los CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad muy eficazmente en comparación con las células dendríticas convencionales que se someten a pulsos solo con péptidos, y de inducir adicionalmente linfocitos T $\gamma\delta$. Por consiguiente, al administrar las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención a un paciente como composición para administración, se inducen *in vivo* CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$, de modo que puede esperarse el efecto de tratamiento y prevención de cáncer y enfermedades infecciosas.
- 10 Además, las células presentadoras de antígeno activadas de la presente invención pueden utilizarse *in vitro* como composición para inducir CTL CD8+ específicos de antígeno de enfermedad y/o linfocitos T $\gamma\delta$.

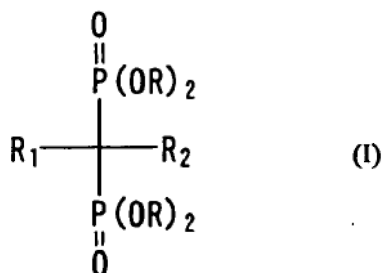
REIVINDICACIONES

1. Un método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno, comprendiendo el método: someter la célula presentadora de antígeno a pulsos conjuntamente con un bisfosfonato y un antígeno de enfermedad.

2. El método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según la reivindicación 1, en el que la célula presentadora de antígeno es al menos una seleccionada del grupo consistente en una célula dendrítica, una célula dendrítica inmadura y una célula presentadora de antígeno artificial.

3. El método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según la reivindicación 1 o 2, en el que el bisfosfonato es un compuesto químico representado por la fórmula (I), una sal del mismo o su hidrato:

Fórmula 1



en la que R es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo arilo o un grupo arilo sustituido, un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido, un grupo alquilamino inferior, un grupo aralquilo, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico, o R₁ y R₂ forman parte de la misma estructura cíclica, y

un sustituyente en R₁ y R₂ se selecciona del grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo alcoxilo, un grupo arilo, un grupo ariltio, un grupo ariloxilo, un grupo alquiltio, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico.

4. El método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el bisfosfonato es al menos uno seleccionado del grupo consistente en un ácido zoledrónico, un ácido pamidrónico, un ácido alendrónico, un ácido risedrónico, un ácido ibandrónico, un ácido incadrónico, un ácido etidrónico, una sal de los mismos o su hidrato.

5. El método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración del bisfosfonato en el pulso conjunto es de 0,001 a 20 μM.

6. El método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según la reivindicación 5, en el que la concentración de bisfosfonato en el pulso conjunto es de 0,001 a 5 μM.

7. El método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el antígeno de enfermedad es al menos uno seleccionado del grupo consistente en una proteína antigénica de cáncer, un péptido antigénico de cáncer, una proteína antigénica de enfermedad infecciosa o un péptido antigénico de enfermedad infecciosa, una célula de cáncer lisada o una célula de enfermedad infecciosa lisada y una célula apoptótica y una célula necrótica de una célula de cáncer o célula de enfermedad infecciosa, y un producto termotratado de los mismos.

8. El método para tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la concentración del antígeno de enfermedad en el pulso conjunto es de 0,01 a 20 μg/ml.

9. El método para el tratamiento de activación de una célula presentadora de antígeno según la reivindicación 8, en el que la concentración del antígeno de enfermedad en el pulso conjunto es de 0,1 a 2 μg/ml.

10. Un método para la producción de una célula presentadora de antígeno activada, comprendiendo el método: tratar la célula presentadora de antígeno con el método para tratamiento de activación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un método para inducir un inmunocito, comprendiendo el método:

(i) someter una célula presentadora de antígeno a pulsos conjuntamente con bisfosfonato y un antígeno de enfermedad, y

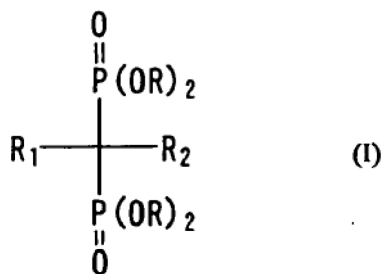
5 (ii) cultivar conjuntamente la célula presentadora de antígeno y un linfocito simultáneamente a o después del pulso conjunto.

12. El método para inducir un inmunocito según la reivindicación 11, en el que el inmunocito a inducir comprende al menos uno de un CTL CD8+ específico de antígeno de enfermedad y/o un linfocito T $\gamma\delta$.

10 13. El método para inducir un inmunocito según la reivindicación 11 o 12, en el que la célula presentadora de antígeno es al menos una seleccionada del grupo consistente en una célula dendrítica, una célula dendrítica inmadura y una célula presentadora de antígeno artificial.

15 14. El método para inducir un inmunocito según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el bisfosfonato es un compuesto químico representado por la fórmula (I) siguiente, una sal del mismo o su hidrato:

Fórmula 1



20 en la que R es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo arilo o un grupo arilo sustituido, un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido, un grupo alquilamino inferior, un grupo aralquilo, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico, o R₁ y R₂ forman parte de la misma estructura cíclica, y

un sustituyente en R₁ y R₂ se selecciona del grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo alcoxilo, un grupo arilo, un grupo ariltio, un grupo ariloxilo, un grupo alquiltio, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico.

30 15. El método para inducir un inmunocito según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que el bisfosfonato es al menos uno seleccionado del grupo consistente en ácido zoledrónico, ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, ácido etidrónico, una sal de los mismos y su hidrato.

35 16. El método para inducir un inmunocito según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que la concentración del bisfosfonato en el pulso conjunto es de 0,001 a 20 μM .

40 17. El método para inducir un inmunocito según la reivindicación 16, en el que la concentración del bisfosfonato en el pulso conjunto es de 0,001 a 5 μM .

45 18. El método para inducir un inmunocito según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que el antígeno de enfermedad es al menos uno seleccionado del grupo consistente en una proteína antigénica de cáncer, un péptido antigénico de cáncer, una proteína antigénica de enfermedad infecciosa o un péptido antigénico de enfermedad infecciosa, una célula de cáncer lisada o una célula de enfermedad infecciosa lisada y una célula apoptótica y una célula necrótica de una célula de cáncer o célula de enfermedad infecciosa, y un producto termotratado de los mismos.

50 19. El método para inducir un inmunocito según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, en el que la concentración del antígeno de enfermedad en el pulso conjunto es de 0,01 a 20 $\mu\text{g/ml}$.

20. El método para inducir un inmunocito según la reivindicación 19, en el que la concentración del antígeno de enfermedad en el pulso conjunto es de 0,1 a 2 $\mu\text{g/ml}$.

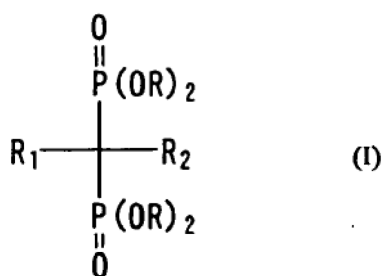
55 21. Un método para la producción de un inmunocito, comprendiendo el método: inducir el inmunocito mediante el método de inducción según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 20.

22. Uso de un bisfosfonato como componente eficaz en un acelerador de la activación en un método que comprende someter una célula presentadora de antígeno a pulsos con dicho acelerador de la activación en el momento del pulso con un antígeno de enfermedad.

5 23. El uso según la reivindicación 22, en el que la célula presentadora de antígeno es al menos una seleccionada del grupo consistente en una célula dendrítica, una célula dendrítica inmadura y una célula presentadora de antígeno artificial.

10 24. El uso según la reivindicación 22 o 23, en el que el bisfosfonato es un compuesto químico representado por la fórmula (I) siguiente, una sal del mismo o su hidrato:

Fórmula 1



15 en la que R es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo inferior, R₁ y R₂ se seleccionan cada uno independientemente entre sí del grupo consistente en un átomo de hidrógeno, un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo amino, un grupo tiol, un grupo arilo o un grupo arilo sustituido, un grupo alquilo o un grupo alquilo sustituido, un grupo alquilamino inferior, un grupo aralquilo, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico, o R₁ y R₂ forman parte de la misma estructura cíclica, y

un sustituyente en R₁ y R₂ se selecciona del grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo alquilo inferior, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, un grupo amino, un grupo alcoxilo, un grupo arilo, un grupo ariltio, un grupo ariloxilo, un grupo alquiltio, un grupo cicloalquilo y un grupo heterocíclico.

25 25. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en el que el bisfosfonato es al menos uno seleccionado del grupo consistente en ácido zoledrónico, ácido pamidrónico, ácido alendrónico, ácido risedrónico, ácido ibandrónico, ácido incadrónico, ácido etidrónico, una sal de los mismos y su hidrato.

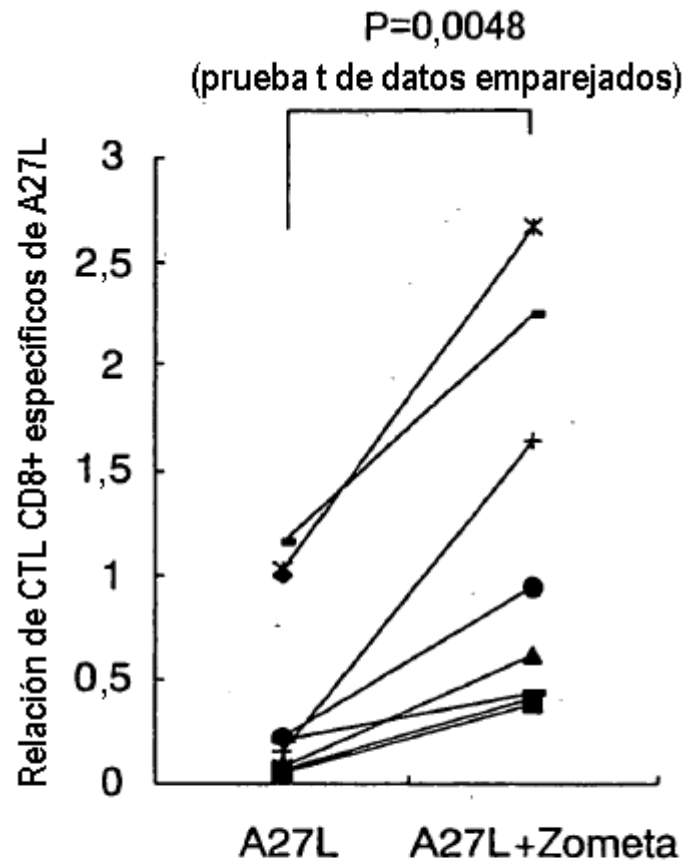


FIG. 1