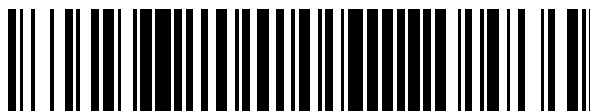


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 257**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2006** **E 06757562 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014** **EP 2029165**

54 Título: **Vacuna basada en células B cargadas con el ligando de células T asesinas naturales y antígeno**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2015

73 Titular/es:

CELLID CO., LTD (100.0%)
College of Pharmacy, Seoul National University,
Building 142, Room 504, 1, Gwanak-ro, Gwanak-
gu
Seoul 151-742 , KR

72 Inventor/es:

KANG, CHANG-YUIL;
CHUNG, YEONSEOK;
KO, HYUN-JEONG;
KIM, YEON-JEONG;
KIM, BYUNG-SEOK y
KO, SUNG-YOUL

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 529 257 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

Vacuna basada en células B cargadas con el ligando de células T asesinas naturales y antígeno

[Campo de la invención]

5 La presente invención se refiere a una vacuna basada en células B cargada con el ligando de las células T asesinas naturales y con antígeno para la prevención y tratamiento de enfermedad infecciosa y cáncer, de forma más precisa, una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica mediada por células B cargadas con α -galactosilceramida, una clase de glucolípido que puede estimular célula T asesina natural, conjuntamente con antígeno.

[Antecedentes de la invención]

10 En general, los antígenos tumorales no se pueden presentar de forma eficiente por una célula presentadora de antígenos, es decir, la respuesta inmune no se induce de forma eficaz. Una vacuna antitumoral es una vacuna terapéutica novedosa que se caracteriza por activar sistema inmune específico de tumores (por ejemplo, presentando antígenos tumorales a células presentadoras de antígenos) para inducir una respuesta inmune fuerte para destruir las células cancerosas.

15 De los enfoques de vacunas disponibles, las vacunas celulares que usan células presentadoras de antígenos (APC) tales como células dendríticas (DC) se conocen por ser fiables en generar inmunidad de células T efectiva (Rosenberg, S. A. et al., Nat. Med., 10, 909-915, 2004). Debido a que las vacunas basadas en DC en particular han estado mostrando inducir eficientemente células T de memoria y células T efectoras específicas de antígeno, se están tomando en cuenta para inmunoterapia antitumoral en un número de ensayos clínicos (Rosenberg, S. A. et al., Nat. Med., 10, 909-915, 2004). Las células dendríticas son células presentadoras de antígenos (APC) ideales para
20 inmunoterapia debido a que ellas capturan antígeno y después migran dentro de los órganos linfoides, donde presentan el antígeno a la célula T relevante. De forma más importante, ellas proporcionan fuerte co-estimulación a las células T (Figdor, C. G. et al., Nat. Med., 10, 475-480, 2004; y Banchereau, J. et al., Cell, 106, 271-274, 2001). El enfoque de la vacuna de DC está bien establecido tanto para estudios experimentales como para estudios clínicos. Sin embargo, las DC son relativamente escasas en la sangre y en los tejidos linfoides y es difícil incrementar sus números
25 ex vivo a partir de los monocitos de la sangre, ambas de estas cosas presentan inconvenientes principales para su uso amplio en vacunas (Schultze, J. L. et al., Trends Immunol., 25, 659-664, 2004).

Las células B ofrecen una fuente alternativa atractiva a vacunas celulares porque son abundantes en tejidos linfoides y sangre y se expanden fácilmente ex vivo (Schultze, J. L. et al., Trends Immunol., 25, 659-664, 2004; von Bergwelt-Baildon, M.S. et al., Blood, 99, 3319-3325, 2002; y Schultze, J. L. et al., J. Clin. Invest., 100, 2757-2757,
30 1997) y se dirigen a los órganos linfoides después de administración parenteral.

A pesar de estas ventajas, las células B se han ignorado como fuente de vacunas celulares debido a que son pobremente inmunógenas. De hecho, la evidencia acumulativa muestra que inducen tolerancia inmune tanto en células T CD4 como en células T CD8 directamente, debido probablemente a la falta de co-estimulación (Bennett, S. R. et al., J. Exp. Med., 188, 1977-1983, 1998; y Eynon, E. E. et al., J. Exp. Med., 175:131-138 (1992)). Sin embargo, las
35 células B 'activadas' pueden cebar tanto células T CD4 como células T CD8 (von Bergwelt-Baildon, M. S. et al., Blood, 99, 3319-3325, 2002; Schultze, J. L. et al., J. Clin. Invest., 100, 2757-2765, 1997; Lapointe, R. et al., Cancer Res., 63, 2836-2843, 2003; y Heit, A. et al., J. Immunol., 172, 1501-1507, 2004), sugiriendo que, cuando se activan por los estímulos apropiados, las células B pueden actuar como APC inmunógenas capaces de inducir inmunidad de células T específicas de antígeno.

40 Está bien establecido que las células iNKT juegan un papel crucial en una diversidad de respuestas inmunes y en inmunopatología como un todo. Aunque ellas representan menos del 1 % de los linfocitos en ratones, las células iNKT rigen la respuesta a autoantígenos y a antígenos externos y determinan si se induce tolerancia o inmunidad (Kronenberg, M., Annu. Rev. Immunol., 23, 877-900, 2005; y Park, S. H. & Bendelac, A., Nature, 406, 788-792, 2000). Ellas actúan como supresores de inmunidad en tumor, diabetes y en sitio de privilegio inmune (Sonoda, K. H., et al., J. Exp. Med., 190: 1215-1226 (1999)).
45

En contraste, la activación mediada por ligandos de células iNKT conduce a la activación de células T, B y NK así como de DC. La inyección de α GalCer, un ligando de iNKT, genera inmunidad antitumoral por medio de la mediación de células NK y células T (Moodycliffe, A. M., et al., Nat. Immunol., 1, 521-525, 2000).

50 La alfa-galactosilceramida (α GalCer) es una clase de glucolípido extraído de esponja marina, que es el ligando de células asesinas naturales que tienen receptor de células T Va14+ (TCR) y presentado por CD1d en una célula presentadora de antígenos (APC) (Kawano et al., Science, 278: 1626, 1997). La activación de las células T asesinas naturales conduce a la producción masiva de IFN- γ e IL-4, por la que las respuestas inmunes contra enfermedad infecciosa o cáncer se pueden controlar (Chen et al., J. Immunol., 159: 2240, 1997; Wilson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 100: 10913, 2003).

55 Fujii et al., Nat Immunol. 002 Sep.; 3 (9): 867-74 describe una respuesta de NTK que producen IFN- γ prolongada inducida con DC cargadas con α -galactosilceramida así como mayor resistencia a metástasis del melanoma B16, que

la respuesta vista con fármaco solo.

Los ratones a los que se han coadministrado antígeno proteico y α GalCer desarrollan inmunidad humoral y mediada por células incluyendo respuestas de células T citotóxicas (Hermans, I. F., et al., J. Immunol, 171, 5140-5147, 2003; y Stober, D. et al., J. Immunol., 170, 2540-2548, 2003). Además, un estudio reciente ha demostrado que DC cargadas con α GalCer generan respuestas celulares de iNKT que resisten durante un tiempo más largo de lo que lo hace la forma libre de α GalCer, sugiriendo que la coadyuvancia de iNKT-ligandos podría potenciarse para APC profesional.

Los inventores presentes confirmaron que la presentación de las iNKT-ligando en células B pudo convertir a las células B de tolerogénicas a inmunogénicas, generando de este modo inmunidad fuerte contra el antígeno mostrado en moléculas MHC de las células B. Para verificar la confirmación y completar de este modo esta invención, los inventores presentes confirmaron adicionalmente la eficiencia de células cargadas con α GalCer, células B sometidas a un pulso peptídico y células B cargadas con α GalCer, células B transducidas por adenovirus en generar inmunidad específica de antígenos y actividad antitumoral.

[Divulgación]

[Problema técnico]

Es un objeto de la presente invención proporcionar una vacuna inmunoterapéutica/profiláctica y una vacuna antitumoral que es capaz de inducir respuestas inmunes específicas de antígeno mediadas por células B presentadoras de antígenos. Las células T asesinas naturales estimuladas con α GalCer en molécula CD1d de células B cargadas de antígeno convierten células B tolerogénicas en células presentadoras de antígenos inmunogénicas.

[Solución técnica]

La presente invención proporciona una vacuna inmunoterapéutica/profiláctica y una vacuna antitumoral mediada por células B cargadas con el ligando de la célula T asesina natural y el antígeno.

La presente invención también proporciona una vacuna antitumoral mediada por células B cargadas con el ligando de célula T asesina natural y que expresan un antígeno tumoral.

La presente invención proporciona adicionalmente un activador de células T asesinas naturales mediado por células B cargadas con α GalCer.

A continuación, la presente invención proporciona un inductor de respuesta citotóxica mediada por células B que expresan antígeno tumoral.

En adelante, la presente invención se describe en detalle.

La presente invención proporciona una vacuna inmunoterapéutica/profiláctica y una vacuna antitumoral mediada por células B cargadas con el ligando de la célula T asesina natural o con antígeno.

El ligando de células T asesinas naturales incluye alfa-galacturonosilceramida y alfa-glucuronosilceramida originadas a partir de Sphingomonas spp. (Mattner, J. et al. Nature 434: 525, 2005, Kinjo, Y. et al. Nature 434: 520, 2005), fosfatidilinositoltetramanósido originado a partir de M. tuberculosis (Fischer, K. et al. PNAS 101: 10685, 2004), autoantígenos isoglobotrihexosilceramida (Zhou, D. et al. Science 306:1786, 2004) y gangliósido GD3 (Wu, D. Y. et al. J. Exp. Med. 198: 173 (2003); fosfatidilcolina (J. Immunol. 175: 977, 2005), beta-galactosilceramida (β GalCer, Ortaldo JR et al. J. Immunol. 172: 943), fosfolípidos lipofosfoglicano y glucoinositol de enlace glucosídico de superficie de Leishmania (J. Exp. Med. 200: 895, 2004), derivados de α GalCer GalCer beta-anomérica y GalCer alfa-anomérica (J. Immunol. 173: 36 93, 2004), variantes de α GalCer (J. Am. Chem. Soc. 126: 13602, 2004) y antígeno lipídico bacteriano tal como mono-micolato de glucosa originado a partir de Nocardia falcinica (Moody, D.B. et al. J. Exp. Med. 192: 965, 2000).

Dado que se ha establecido ya que DC cargadas con α GalCer activan células iNKT (van der Vliet HJ, et al., J Immunol Methods., 1; 247(1-2): 61-72, 2001), los inventores presentes examinaron si células B cargadas con α GalCer lo harían asimismo.

Se aislaron células DC y células B CD19+ (Fig. 1) de un ratón. Cada célula se sometió a pulsos con diversas concentraciones de α GalCer después se co-cultivaron con un hibridoma de NKT. Después, se midió el nivel de IL-2 en el sobrenadante de cultivo. Como resultado, tanto células B cargadas con α GalCer (B/ α GalCer) como DC cargadas con α GalCer (DC/ α GalCer) estimularon el hibridoma de NKT para producir IL-2 (véase Fig. 30). Por lo tanto, se confirmó que tanto B/ α GalCer como DC/ α GalCer pueden activar células iNKT ex vivo.

Para investigar si B/ α GalCer y DC/ α GalCer administradas in vivo podrían activar o no células inmunes, los inventores presentes inyectaron B/ α GalCer o DC/ α GalCer de ratones C57BL/6 i.v. en ratones singénicos y midieron el nivel de células productoras de IL-4 y de IFN- γ por ELISPOT. Particularmente, ratones C57BL/6 o Ja281-/- de tipo silvestre se inyectaron intravenosamente con vehículo, α GalCer, células B cargadas con α GalCe o DC cargadas con α GalCer. Una semana más tarde, las células del bazo se separaron para preparar células individuales, que se situaron en placa

de ELISPOT. Un vehículo o α GalCer se añadió sobre la placa, seguido por cultivo durante 6 horas para estimulación. Se llevó a cabo ensayo de ELISPOT para medir las células que segregan IL-4 e IFN- γ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ELISPOT de IL-4, kit de ELISPOT de IFN- γ , R&D system).

Como resultado, la inyección de tanto B/ α GalCer como DC/ α GalCer indujeron altos números de células productoras de IL-4 e IFN- γ (Fig. 2). Sin embargo, debe destacarse que un número considerable de estas células productoras de citocinas se detectaron incluso en ausencia de reestimulación con α GalCer. No obstante, los inventores presentes informaron que la inducción de células que producen IL-4 e IFN- γ es dependiente de células iNKT, dado que no ocurre en ratones Ja 281-/-, que carecen de población de iNKT (véase Fig. 2).

Los inventores presentes administraron intravenosamente B/ α GalCer marcadas con CFSE (éster de succinimidil carboxifluoresceína) en ratones no inmunizados y luego 24 o 48 horas después de la administración los inventores analizaron las moléculas coestimuladoras en las células CFSE+ por citometría de flujo para determinar si cualesquiera cambios se indujeron en células B cargadas con α GalCer después de inyección. Como resultado, se indujeron altos niveles de expresión de CD86 pero no de expresión de CD80 en el plazo de 24 horas (Fig. 3). CD40 y MHC II estaban también reguladas al alza ligeramente. En conclusión, la administración in vivo de B/ α GalCer indujo la activación de células B en el plazo de 24 o 48 horas.

A continuación, los inventores presentes trataron si la realización de pulsos conjuntos de α GalCer y péptido MHC-I-restringido en células B podría cebar células T CD8+ específicas de péptidos. Para este fin, los inventores primero transfirieron de forma adoptiva células T CD8+ específicas marcadas con OVA en ratones, después administraron células B sometidas a pulso con vehículo (B solas), células B sometidas a pulso con α GalCer (B/ α GalCer), células B sometidas a pulso con vehículo + péptido (B/pep), o células B sometidas a pulso con α GalCer + péptido (B/ α GalCer/pep). Después, se obtuvieron los linfocitos a partir de bazo y nódulos linfáticos seguido por medir respuesta de células T CD8+ en ratones transferidos con células B. Como resultado, se indujo un poco de división de células T CD8+ específicas de OVA en ratones que recibieron células B solas; sin embargo una división débil de células T CD8+ específicas de OVA, probablemente con un origen no específico de antígeno, se notó en el grupo de B/ α GalCer. La inyección de B/pep indujo una división sustancial de células T CD8+ específicas de OVA. Y los ratones a los que se dio B/ α GalCer/pep mostraron una división potenciada de células T CD8+, con más del 40 % de las células resultantes produciendo IL-2 y lo más sorprendentemente, más del 90 % de las células resultante produciendo IFN- γ a niveles mucho mayores que el grupo de B/pep (véase Fig. 4). Estos resultados sugieren que se pudo lograr una tasa mucho mayor de activación de células T CD8+ por la carga de α GalCer sobre B/pep.

Los inventores presentes investigaron si el enfoque de vacuna basada en células B podría inducir inmunidad citotóxica. Particularmente, los inventores inyectaron i.v. grupos de ratones C57BL/6 con B solas, B/ α GalCer, B/pep, o B/ α GalCer/pep y después determinaron la actividad de CTL in vivo. Como resultado, solo B/ α GalCer/pep lisaron completamente las dianas sometidas a pulso con péptidos (Fig. 5). Y el grupo tratado con B/ α GalCer/pep mostró un incremento significativo en el número de células T CD8+ que producen IFN- γ contra el péptido (Fig. 6, izquierda). Cuando se llevó a cabo inmunización subsiguiente con esplenocitos singénicos revestidos de OVA para trazar el grado de respuesta de CTL, los ratones a los que se dio B solas o B/ α GalCer respondieron normalmente al cebado y generaron células T CD8+ que producen IFN- γ de forma específica de péptido de forma sustancial (Fig. 6, derecha). Sin embargo, cuando se reestimularon con un péptido relevante in vitro los esplenocitos de ratones inmunizados con B/pep, el número de células T CD8+ que producen IFN- γ se disminuyó comparado con aquellos de los ratones inyectado con B solas, sugiriendo que esos ratones fueron tolerantes frente al péptido. En contraste, los ratones vacunados con B/ α GalCer/pep adquirieron número mucho más alto de células T CD8+ reactivas que lo hicieron bien el grupo que recibió B/ α GalCer o bien el grupo que recibió B solas, sugiriendo que esta es una respuesta de memoria.

Los inventores presentes compararon la eficacia de la estrategia de vacunas basadas en células B en generar citotoxicidad con aquella de vacuna de DC. Para este fin, los inventores determinaron el número mínimo de células requerido para lograr la lisis de células diana completa in vivo. Considerando que el área de superficie de DC es mucho más grande que aquella de las células B, B/ α GalCer/pep fue tan eficiente como DC/ α GalCer/pep en generar citotoxicidad. Mientras tanto, el patrón de citotoxicidad in vivo del grupo tratado con DC/pep fue muy similar a aquel del grupo tratado con DC/ α GalCer/pep, indicando que la carga de α GalCer sobre DC no potenció adicionalmente la eficacia de vacuna de DC/pep.

Los inventores presentes examinaron a continuación que tipos de células inmunes están implicados en la generación de la respuesta de CTL. Para este fin, los inventores inyectaron a ratones con depleción de Ab 4 días antes o 4 días después de que se vacunasen con B/ α GalCer/pep y después se llevó a cabo un ensayo de CTL in vivo. Como resultado, la generación de actividad de CTL no se obstaculizó ni por la depleción de CD4+ ni por la depleción de células NK1.1+ independientemente de la programación temporal de la depleción. Por otro lado, la depleción de CD8 bloqueó completamente la matanza de células diana (Fig. 9).

Podría argumentarse que las células B sometidas a pulso con péptidos no actúan como APC sino como reservorios de péptido a partir de los que el DC huésped retira péptidos con el fin de inducir respuestas de CTL. Para explorar esta posibilidad, los inventores presentes usaron ratones bm-1. Las células de estos ratones pueden cargar péptido OVA sobre sus moléculas de MHC de clase I, pero el complejo resultante no está reconocido por las células T CD8+ relacionadas debido a una mutación en la región H-2K. Las células B a partir de esta línea expresaron CD1d

normalmente y estimularon activación de iNKT en respuesta a α GalCer, indicando que la interacción entre B e iNKT estuvo intacta. De nuevo, cuando B/ α GalCer/pep se preparó usando células B de ratones de tipo silvestre y después se inyectó en ratones de tipo silvestre, se generó citotoxicidad específica de OVA completa in vivo. Sin embargo, cuando B/ α GalCer/pep derivada de células B de ratones bm-1 se inyectó en ratones de tipo silvestre, ello falló en generar actividad citolítica específica de OVA, sugiriendo que DC u otra APC profesional en el ratón receptor no fueron responsables de la generación de CTL (Fig. 11).

Los inventores presentes examinaron a continuación si era posible generar CTL cuando se dieron pulsos con α GalCer y péptido por separado y después se inyectaron juntos. Como resultado, los ratones vacunados con "B/ α GalCer más B/pep" fallaron al generar citotoxicidad in vivo (Fig. 12). Este resultado demuestra que el péptido y α GalCer deben estar presentes en la misma célula B para generar la citotoxicidad específica de OVA.

Los inventores presentes también investigaron si la vacunación con B/ α GalCer/pep generaría inmunidad antitumoral. Para poner a prueba la actividad antitumoral profiláctica, se vacunaron grupos de ratones una vez con B solas, B/ α GalCer, B/pep, B/ α GalCer/pep, DC/pep, o DC/ α GalCer/pep antes de que un melanoma transfectado con OVA se transfectase s.c. en ellos. Como resultado, se observó patrón ligeramente retardado de crecimiento tumoral en ratones vacunados con B/ α GalCer, todos los ratones desarrollaron finalmente tumores. En contraste, ningún ratón que recibió B/ α GalCer/pep, DC/pep o DC/ α GalCer/pep desarrolló tumores (véase Fig. 13). Para examinar si estos ratones establecieron actividad antitumoral a largo plazo, los inventores realizaron una prueba de provocación repetida a los ratones libres de tumores supervivientes con las mismas células tumorales 70 días después de la primera inoculación tumoral. Los inventores no observaron ningún crecimiento tumoral, demostrando que la vacunación con B/ α GalCer/pep estableció inmunidad de memoria contra el tumor (véase Fig. 14).

A continuación, los inventores presentes examinaron si la vacunación con B/ α GalCer/pep erradicaría un tumor preexistente. Como resultado, el crecimiento del tumor estaba completamente reprimido en ratones vacunados con DC/pep, DC/ α GalCer/pep o B/ α GalCer/pep (véanse Fig. 15 y Fig. 16).

Para determinar si este régimen de vacunas basado en células B se puede aplicar a antígenos de tumores reales, los inventores presentes eligieron el modelo de *Her-2/neu*. Los inventores observaron un nivel significativo de citotoxicidad específica de Her-2/neu in vivo en ratones a los que se dieron células B sometidas a pulso con *Her-2/neu*₆₃₋₇₁ cargadas con α GalCer (véase Fig. 17). Para examinar la actividad antitumoral terapéutica en este modelo, los inventores presentes inyectaron células tumorales que expresan Her-2/neu en ratones antes de vacunarlos con células B sometidas a pulso con *Her-2/neu*₆₃₋₇₁ cargadas con α GalCer. Después de inoculación tumoral, las tasas de supervivencia fueron ligeramente mejores para aquellos ratones vacunados con B/ α GalCer o con B/pep que para aquellos vacunados con B solas (véase Fig. 18). En contraste, todos los ratones vacunados con B/ α GalCer/pep sobrevivieron a lo largo del experimento. En el modelo de tumor sólido, los ratones trasplantados con tumores se vacunaron con vacuna basada en células B o con vacuna basada en DC. Como resultado, el crecimiento de células tumorales estuvo inhibido en ratones vacunados con células B sometidas a pulso con *Her-2/neu*₆₃₋₇₁, cargadas con α GalCer, igual que en ratones vacunados con vacuna de DC (véase Fig. 19).

Por lo tanto, la vacuna basada en células B de la presente invención demostró ser tan efectiva como las vacunas basadas en DC en generar tanto inmunidad anti-tumoral profiláctica como inmunidad anti-tumoral terapéutica.

La presente invención también proporciona una vacuna inmunoterapéutica/profiláctica y una vacuna antitumoral mediada por células B cargadas con el ligando de las células T asesinas naturales y que expresan antígeno.

A diferencia de las vacunas sometidas a pulso con péptidos, una vacuna de células transducidas con vector vírico para expresar un antígeno completo se puede aplicar a todo el mundo sin limitación de haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad y puede inducir las diversas respuestas inmunes específicas de epítomos, en particular tanto respuesta inmune humoral como respuesta inmune mediada por células simultáneamente. Las células B se transdujeron con adenovirus (AdHM) que tienen un gen que codifica el dominio extracelular y transmembrana de *Her-2/neu*, un antígeno asociado a tumor. Como resultado, la presentación de α GalCer de células B no estaba afectada por transducción con AdHM (véase Fig. 21). Una semana después de inmunización, no se observó la lisis de células diana en ratones inmunizados con células B y B/ α GalCer. Por el contrario, se observó una respuesta inmune de células T citotóxicas potente en ratones inmunizados con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer (véanse Fig. 22 y Fig. 24).

La respuesta de linfocitos T citotóxicos mediada por células B transducidas por adenovirus, cargadas con α GalCer (B/AdHM/ α GalCer) se continuó más alta y durante más tiempo que aquella por células B transducidas con adenovirus (B/AdHM), aunque la diferencia no fue significativa. Estos resultados indican que cargar α GalCer en células B, a diferencia de realización de pulsos con péptidos, no afectan la inducción de respuesta de células T citotóxicas. Sin embargo, cuando la vacuna de células B cargadas con α GalCer se administró a ratones, las células NKT se estimularon y de este modo las células NK se activaron al fin in vivo, a diferencia de en los ratones administrados con vacuna de células B transducidas por adenovirus (véase Fig. 25).

Para medir la eficiencia de la estrategia de vacunas basadas en células B en generar respuesta de linfocitos T citotóxicos, los inventores presentes investigaron la lisis de células objetivo vacunando ratones con una dosis subóptima que no fue suficiente para inducir respuestas de linfocitos T citotóxicas completas. Como resultado, las

células B transducidas con adenovirus para expresar antígeno pudieron inducir una respuesta de linfocitos T citotóxicos de forma eficaz, aún cuando se requiera número alto de células B, comparado con vacunas de células B sometidas a pulso con péptidos. Dado que aproximadamente el 20 % de las células B totales transducidas con adenovirus expresaron realmente Her-2/neu, la eficacia de células B transducidas con adenovirus se ha forzado para subestimarse en efecto. En el caso de transferir un número pequeño de células B, la activación de células NKT inducidas por células B cargadas con α GalCer fue útil para la lisis del objetivo inducido por células B transducidas por adenovirus.

Un virus que infecta células B para expresar un antígeno tumoral se puede ejemplificar por adenovirus, retrovirus, virus de la vacuna, virus de la varicela y virus sindbis, pero no siempre está limitado a ellos. Además de usar un vector vírico, se pueden usar los siguientes procedimientos para transferir un gen que codifica un antígeno; 1) unir ADN a liposoma para proteger el ADN de descomponerse por una enzima o de absorberse en endosoma; 2) unir ADN a un conjugado molecular o a un ligando sintético para incrementar la eficacia de transfección (ejemplo: asialoglicoproteína, transferrina e IgA polimérica); 3) construir un nuevo sistema de transducción usando PTD (dominio de transducción proteica) para incrementar eficiencia de transducción de gen que codifica antígeno (ejemplo: Mph-1); y 4) introducir péptido o proteína a células B para presentar el antígeno.

La presente invención proporciona adicionalmente un activador de células T asesinas naturales mediado por células B cargadas con α GalCer.

Como se explica anteriormente, las células B cargadas con α GalCer de la presente invención, como células dendríticas cargadas con α GalCe, estimulan hibridoma de células T asesinas naturales in vitro e inducen así la secreción de IL-2 (véase Fig. 30) y de forma eficaz activan células NKT que podrían inducir la activación de diversas células inmunes in vivo (véase Fig. 2). Por lo tanto, las células B α GalCer cargadas de la presente invención se pueden usar como un activador de células T asesinas naturales justo como se puede con células dendríticas cargadas con α GalCer.

La presente invención también proporciona un inductor de respuesta citotóxica mediada por células B que expresan antígenos tumorales.

A diferencia de la vacuna de células B sometida a pulso con un péptido para inducir respuesta inmune mediada por células, la vacuna de células B transducida con adenovirus puede inducir tanto respuesta inmune mediada por células como respuesta inmune humoral simultáneamente. Para confirmar si la vacuna de células B transducida con AdHM podría inducir anticuerpo específico de Her-2/neu, se inmunizaron ratones con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer, respectivamente y después se midió anticuerpo anti-Her-2/neu en sueros. Como resultado, se mantuvo título de anticuerpo anti-Her-2/neu alto durante mucho tiempo en ambos grupos inmunizados con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer (véase Fig. 27). A diferencia de los grupos inmunizados con células B solas (B) y con B/ α GalCer, la respuesta humoral se generó en ambos grupos inmunizados con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer (véase Fig. 28).

Una semana después de inmunización con la vacuna basada en células B, los inventores presentes llevaron a cabo inyección intravenosa de células tumorales murinas que expresan Her-2/neu (TAUF), seguido por investigación de la tasa de supervivencia. Como resultado, los ratones administrados bien con células B cargadas con α GalCer (B/ α GalCer) o bien con células B transducidas con AdHM (B/AdHM) sobrevivieron más que aquellos administrados con células B solas. Además, el efecto antitumoral de ratones administrados con las células B transducidas con adenovirus que expresa Her-2/neu y cargadas con α GalCer fue más significativo que aquella de ratones inmunizados con B/AdHM (véase Fig. 29). Por lo tanto, se confirmó que la vacuna de células B cargadas con α GalCer y transducidas con adenovirus puede inducir de forma eficaz respuestas para evitar tumores.

Para confirmar el efecto terapéutico de las vacunas de células B, se inmunizaron los ratones BALB/c con B, B/ α GalCer, B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer, respectivamente, tras inyección intravenosa de TAUF a la vena del rabo para crear cáncer de pulmón. Como resultado, el tiempo de supervivencia más corto se observó en el grupo de ratones tratados solo con células B y el resultado del grupo tratado con vacuna de B/ α GalCer fue corto de manera similar. Mientras tanto, el tiempo de supervivencia se prolongó más o menos en el grupo de ratones tratados con vacuna de B/AdHM, comparado con los grupos tratados con B o con B/ α GalCer, pero la formación de tumores no se inhibió completamente. Pero el tiempo de supervivencia fue mucho más largo en el grupo tratado con B/AdHM/ α GalCer, comparado con todos los otros grupos y así el efecto antitumoral del grupo B/AdHM/ α GalCer fue mayor que el de cualesquiera otros grupos inmunizados (véase Fig. 29).

La vacuna de la presente invención puede incluir adicionalmente, además del ligando de las células T asesinas naturales y de células B, uno o más ingredientes efectivos que tienen el mismo efecto o efecto similar con ellas. La vacuna puede incluir también, además de los ingredientes efectivos anteriormente mencionados, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración. El transportador farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar o se puede preparar mezclando más de un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en solución salina, agua esterilizada, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de dextrosa, solución de maltodextrosa, glicerol y etanol. Otros aditivos generales tales como agente antioxidante, solución tampón, agente bacteriostático, etc., se pueden añadir. Con el fin de preparar soluciones inyectables tales como solución acuosa, suspensión acuosa y emulsión acuosa, se pueden añadir adicionalmente diluyentes, agentes dispersantes,

tensioactivos, aglutinantes y lubricantes. La vacuna de la presente invención puede prepararse adicionalmente en formas adecuadas para cada enfermedad o de acuerdo con los ingredientes siguiendo un procedimiento representado en Remington's Pharmaceutical Science (la edición más reciente), Mack Publishing Company, Easton PA.

La vacuna de la presente invención puede administrarse parenteralmente y la administración parenteral incluye inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular e inyección intratorácica. Para preparar la vacuna como una formulación para administración parenteral, las células B cargadas con el ligando de células T asesinas naturales, las células B cargadas con el ligando de células T asesinas naturales y un péptido o las células B transducidas con un virus que expresa un antígeno tumoral se mezclan con un agente estabilizador o con un agente tamponante para producir una solución o suspensión, que se formula después como ampollas o viales (véase el estándar para la producción de un vector vírico usado para la transducción de células dendríticas).

La vacuna se puede administrar por dosis efectiva para inducir respuesta inmune en un paciente. Por ejemplo, la vacuna se puede administrar a seres humanos una vez al día o unas pocas veces al día por la dosificación de $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$ células/kg y más preferentemente 1×10^4 células/kg $\sim 1 \times 10^8$ células/kg. Para preparar vacuna de células B cargadas con α GalCer, hubo de complementarse un medio con α GalCer a la concentración de 1-2 μ g/ml por $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ células B/ml. Para preparar vacuna de células B sometidas a pulsos conjuntos con α GalCer y péptidos, hubo de suplementarse un medio con α GalCer a la concentración de 1-2 μ g/ml por $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células B/ml y péptido a la concentración de 1-10 μ g/ml por $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células B/ml.

α GalCer no parece inducir toxicidad en roedores y simios (Nakata et al., Cancer Res., 58: 1202-1207, 1998). No se han comunicado efectos secundarios cuando se administraron 2200 μ g/kg de α GalCer en un ratón (Giaccone et al., Clin. Cancer Res., 8: 3702, 2002). A partir del ensayo clínico, se comunicó un dolor de cabeza como un efecto secundario de acuerdo con la administración sistémica de α GalCer (Mie Nieda et al., Blood, 103: 383-389, 2004, Giaccone et al., Clin. Cancer Res., 8: 3702, 2002), que puede evitarse con la administración de paracetamol. Hay una pequeña, o ninguna, posibilidad de mostrar un efecto secundario sistémico ligero (Giaccone et al., Clin. Cancer Res., 8: 3702, 2002). En la presente invención, α GalCer no causó toxicidad que limite la dosis (50-4800 μ g/m²) y mostró resistencia durante todo un estudio de aumento de dosis, indicando que α GalCer es una sustancia muy segura.

El péptido en el presente documento incluye virus, bacterias, hongos, parásitos y péptido antigénico originado por tumor y el antígeno introducido a células B mediado por vector vírico incluye virus, bacterias, hongos, parásitos y antígeno originado por tumor.

Un "antígeno" quiere decir cualquier sustancia (por ejemplo proteína, péptido, células tumorales, glucoproteína, glucolípido, virus vivo, virus destruido, ADN etc.) que es capaz de inducir respuesta inmune que se reconoce por el sistema inmune cuando ello invade el interior de un huésped. El antígeno puede prepararse como una forma purificada o no purificada pero se prefiere una forma purificada. El antígeno de la presente invención incluye proteína de patógeno, proteína recombinante, péptido, polisacárido, glucoproteína, lipopolisacárido y molécula de ADN (polinucleótido), células tumorales, virus vivos y virus destruidos.

Los antígenos presentados en la lista de antígenos de abajo pueden proporcionarse como una herramienta para inducir respuesta inmune en vez de el antígeno asociado a tumores de Ejemplos de la invención. La lista incluye antígeno del virus de la gripe (antígenos de hemaglutinina y neuraminidasa), antígeno de Bordetella pertussis (toxina pertúsica, hemaglutinina filamentososa y pertactina), antígeno del virus del papiloma humano (HPV) (glucoproteína), antígeno de Helicobacter pylori (polisacáridos de cápsula de serogrupo A, B, C, Y y W-135), toxoide del tétanos, antígeno de difteria (toxóide de la difteria), antígeno neumocócico (polisacárido capsular de tipo 3 de Streptococcus pneumoniae), antígeno de tuberculosis, antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (GP-120, GP-160, p18, Tat, Gag, Pol y Env), antígeno del cólera (subunidad B de la toxina cólerica), antígeno estafilocócico (enterotoxina estafilocócica B), antígeno de Shigella (polisacáridos de Shigella), antígeno del virus de la estomatitis vesicular (glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular), antígeno de citomegalovirus (CMV), antígeno de la hepatitis (antígenos de la hepatitis A (HAV), de la hepatitis B (HBV), de la hepatitis C (HCV), de la hepatitis D (HDV) y de la hepatitis G (HGV) (antígeno del núcleo y antígenos de la superficie), antígeno del virus respiratorio sincitial (RSV), antígeno del virus herpes simplex o sus combinaciones (por ejemplo, de difteria, tos ferina y tétanos, DPT), antígeno de Borrelia sp. (por ejemplo, antígenos OspA, OspB y OspC), antígeno de Candida albicans (por ejemplo, MP65) y antígeno de Plasmodium (por ejemplo, proteína CS).

Un antígeno tumoral se genera por la mutación somática de un gen de tipo silvestre. El antígeno de cáncer incluye un antígeno específico de tumores atribuido a la inestabilidad genética de una célula tumoral y un antígeno asociado a tumores, un autoantígeno endógeno que se expresa más en células tumorales y que se expresa temporalmente en fase de desarrollo tumoral o que se expresa en tejido específico de forma limitada. Un antígeno específico de tumores se ejemplifica por HPV E6/E7 que es un antígeno originado por virus del cáncer y un antígeno asociado a tumores se ejemplifica por gp100, tirosinasa, TRP-1 (proteína-1 relacionada con la tirosinasa), TRP-2 (proteína 2 relacionada con la tirosinasa), MAGE, MUC-1, CEA (antígeno carcinoembrionario), p53, alfa-fetoproteína y *Her-2/neu*, etc. (Rosenberg SA., Nature, 17; 411(6835): 380-4, 2001).

[Breve descripción de los dibujos]

La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se entiende mejor con referencia a las figuras acompañantes, en las que:

Fig. 1 - Fig. 3 son gráficos que ilustran la activación recíproca entre células iNKT y células B cargadas con α GalCer,

- 5 Fig. 1 es un conjunto de gráficos que ilustran que las células B se purifican a partir del bazo después de depleción de células CD11c⁺, seguido por medir las expresiones de CD19, CD11c y CD1d por citometría de flujo.

Fig. 2 es un conjunto de gráficos que ilustran que los ratones C57BL/6 de tipo silvestre o los ratones J 281^{-/-} se inyectaron i.v. con el vehículo solo, con una forma libre de α GalCer, o con células B cargadas con α GalCer (B/ α GalCer) o DC (DC/ α GalCer) y después se obtuvieron esplenocitos a partir de los ratones receptores y se analizaron células que producen IL-4-e IFN- γ por ensayo de ELISPOT,

- 10 Fig. 3 es un conjunto de gráficos que ilustran que las células B cargadas con vehículo o con α GalCer se tiñeron con CFSE y se inyectaron en ratones C57BL/6. Las células CFSE⁺ de esplenocitos se analizaron.

Fig. 4 - Fig. 6 son gráficos que muestran que las células B sometidas a pulsos conjuntos con α GalCer y péptido (OVA₂₅₇₋₂₆₄) activan las células T CD8⁺ específicas de péptido, Fig. 4 es un grupo de gráficos que ilustran que células T CD8⁺ específicas de OVA₂₅₇₋₂₆₄ marcadas con CFSE (células T OT-I) se transfirieron en ratones C57BL/6, a las que se administró respectivamente B/vehículo, B/ α GalCer, B/pep o B/ α GalCer/pep. Después, la proliferación de células T OT-1 y la secreción de citocinas T se investigaron por citometría de flujo.

- 15 Fig. 5 es un conjunto de gráficos que ilustran que los ratones C57BL/6 se vacunaron con las formas indicadas de células B (B solas, B/ α GalCer, B/pep o B/ α GalCer/pep). Una, tres o cinco semanas más tarde, se llevaron a cabo ensayos de CTL in vivo inyectando dianas singénicas marcadas por CFSE, CFSE^{alto}: diana sometida a pulsos con péptido, CFSE^{bajo}: control no sometido a pulsos.

Fig. 6 es un conjunto de gráficos que ilustran que la respuesta por células t CD8⁺ que producen IFN- γ a reestimulación con OVA₂₅₇₋₂₆₄ in vitro se calculó 7 días después de la administración de vacunas basadas en células B (izquierda) o cebado de CTL adicional 7 días después con esplenocitos singénicos cargados con OVA₂₅₇₋₂₆₄ (derecha),

- 25 Fig. 7 y Fig. 8 son gráficos que comparan la eficiencia en generación de linfocitos T citotóxicos entre vacuna celular basada en células B y vacuna celular basada en DC.

Fig. 7 es un conjunto de gráficos que ilustran que B/ α GalCer/pep y DC/ α GalCer/pep sometidas a pulso con péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ se diluyeron en serie, lo que se administró después a ratones y después se midió citotoxicidad frente a OVA₂₅₇₋₂₆₄ in vivo,

- 30 Fig. 8 es un conjunto de gráficos que ilustran que B sometidas a pulso con OVA₂₅₇₋₂₆₄/vehículo/pep y DC/vehículo/pep se administraron de la misma manera que se describe en Fig. 7 y después se midió citotoxicidad frente a OVA₂₅₇₋₂₆₄,

Fig. 9 y Fig. 10 son gráficos que muestran los tipos de células inmunes implicados en respuesta CTL inducida por la vacuna basada en células B,

- 35 Fig. 9 es un conjunto de gráficos que ilustran que células B sometidas a pulsos conjuntos con α GalCer y OVA₂₅₇₋₂₆₄ se inyectaron en ratones. Los ratones receptores recibieron mAb de depleción de células inmunes, después se pusieron a prueba para determinar citotoxicidad in vivo frente a OVA₂₅₇₋₂₆₄.

Fig. 10 es un gráfico que ilustra que las células B sometidas a pulsos conjuntos con α GalCer y péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ se inyectaron en ratones de tipos silvestre, ratones Ja281^{-/-} o ratones de MHC clase II^{-/-}, seguidos por ensayo de liberación de ⁵¹Cr estándar para investigar citotoxicidad in vitro frente a OVA₂₅₇₋₂₆₄,

- 40 Fig. 11 y Fig. 12 son gráficos que muestran que las células sometidas a pulsos conjuntos con α GalCer y péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ actúan como células presentadoras de antígenos por vía directa para células T CD8⁺,

Fig. 11 es un conjunto de gráficos que ilustran que las células B de ratones de tipo silvestre o de ratones bm-1 se sometieron a pulsos conjuntos con α GalCer y OVA₂₅₇₋₂₆₄ antes de inyectarse en ratones de tipo silvestre, después, se midió citotoxicidad in vivo frente a OVA₂₅₇₋₂₆₄,

- 45 Fig. 12 es un conjunto de gráficos que ilustran que los ratones C57BL/6 se vacunaron con células B sometidas a pulsos conjuntos con α GalCer y OVA₂₅₇₋₂₆₄ o con "una combinación de células B sometidas a pulsos con OVA₂₅₇₋₂₆₄ y de células B sometidas a pulsos con α GalCer", después, se midió la citotoxicidad in vivo frente a OVA₂₅₇₋₂₆₄,

Fig. 13 - Fig. 16 son gráficos que ilustran que la vacuna basada en células B puede ofrecer tanto inmunidad antitumoral profiláctica como terapéutica frente a melanoma B16 transfectado con OVA,

- 50 Fig. 13 es un gráfico que ilustra que los ratones C57BL/6 se vacunaron con la vacuna celular indicada (B sola,

B/ α GalCer, B/pep, B/ α GalCer/pep, DC/pep o DC/ α GalCer/pep). Siete días más tarde, se inyectaron subcutáneamente las células tumorales MO-5 dentro de los ratones y después se midió la masa tumoral.

Fig. 14 es un gráfico que ilustra que el crecimiento de células tumorales sometidas a una prueba de provocación repetida estaba inhibido en ratones libres de tumores mostrados en Fig. 13. Setenta días después de la primera inoculación tumoral, los ratones libres de tumores se sometieron a una prueba de provocación repetida subcutáneamente con células MO-5 (2×10^5) y se midió la masa tumoral,

Fig. 15 y Fig. 16 son gráficos que ilustran que los ratones C57BL/6 se vacunaron con la vacuna celular indicada (B solas, B/ α GalCer, B/pep, B/ α GalCer/pep, DC/pep o DC/ α GalCer/pep). Un día o nueve días más tarde, se inyectaron subcutáneamente las células tumorales MO-5 dentro de los ratones y después se midió la masa tumoral.

*, $p < 0,05$ en comparación con el grupo control "B solas" (Fig. 13, Fig. 15 y Fig. 16) o con ratones no inmunizados emparejados por edad (Fig. 14).

Fig. 17 - Fig. 19 son gráficos que ilustran que la vacuna basada en células B activó inmunidad antitumoral terapéutica contra tumor que expresa Her-2/neu, Fig. 17 es un conjunto de gráficos que ilustran que los ratones BALB/c se vacunaron con células B o DC después de cocultivar con α GalCer o vehículo más Her-2/neu₆₃₋₇₁(hP63) según se indica y después se llevaron a cabo los ensayos de CTL in vivo,

Fig. 18 y Fig. 19 son gráficos que ilustran que los ratones BALB/c se pusieron a prueba i.v. (Fig. 18) o s.c. (Fig. 19) con CT26-Her2/neu de la misma manera que se describe anteriormente, seguido por inmunizar los ratones con células B o DC y se midieron las tasas de supervivencia (Fig. 18) o el crecimiento tumoral (Fig. 19) de estos ratones,

Fig. 20 y Fig. 21 son gráficos que ilustran el ensayo para poner a prueba si la ruta de transducción de las células B con un antígeno completo usando un vector vírico se puede aplicar a la vacuna de células B o no,

Fig. 20 es un conjunto de gráficos que ilustran que las células B se infectaron con los adenovirus (AdHM) que expresan el dominio extracelular y el dominio transmembrana de Her-2/neu, un antígeno asociado a tumores y después se midió la expresión de Her-2/neu en la superficie de célula B,

Fig. 21 es un gráfico que ilustra que células transducidas con AdHM y células B cargadas con α GalCer pudieron activar células DN32.D3. Particularmente, las células DN32.D3 se cultivaron respectivamente con células B solas, células B cargadas con α GalCer, células B transducidas con AdHM y transducidas con AdHM y cargadas con α GalCer después el nivel de IL-2 en cada sobrenadante se midió por ELISA,

Fig. 22 - Fig. 24 son gráficos que ilustran que las células B transducidas con el antígeno asociado a tumores Her-2/neu inducen respuesta inmune citotóxica de forma eficaz,

Fig. 22 es un gráfico que ilustra que los ratones se inmunizaron respectivamente con células B aisladas del bazo de ratones BALB/c y después se transdujeron con el adenovirus (B/AdHM), con células B cargadas adicionalmente con α GalCer (B/AdHM/ α GalCer), con solo células B y con células B cargadas con α GalCer (B/ α GalCer). Cada ratón se transfirió con células diana cargadas con epítipo de células T citotóxicas para investigar respuesta de linfocitos B citotóxicos específicos de antígeno in vivo,

Fig. 23 es un gráfico que compara las duraciones de respuesta de células T citotóxicas en cada grupo de ratones inmunizado con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer,

Fig. 24 es un gráfico que compara los niveles de IFN- γ secretado por células T CD8+ antes y después de estimular cada ratón inmunizado con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer con péptido de células T citotóxicas in vitro, no inmunizado: un grupo de ratones que no se ha tratado con vacuna

Fig. 25 y Fig. 26 son gráficos que ilustran que las vacunas de célula B transducidas por adenovirus (B/AdHM/ α GalCer) pudieron de forma eficaz activar células asesinas naturales e inducir respuesta de células T citotóxicas,

Fig. 25 es un gráfico que muestra la activación de células asesinas naturales,

Fig. 26 es un gráfico que muestra la lisis de dianas celulares dependiendo de la dosis de la vacuna celular, que se investiga para comparar la eficiencia en inducir células T citotóxicas,

Fig. 27 y Fig. 28 son gráficos que ilustran que la vacuna de células B transducida con AdHM (B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer) podría inducir anticuerpo específico de Her-2/neu,

Fig. 27 es un gráfico que ilustra que los ratones BALB/c estaban inmunizados con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer respectivamente y después se midió título de anticuerpo anti-Her-2/neu para investigar la unión de anticuerpo anti-Her-2/neu en suero a la célula tumoral murina que expresa Her-2/neu en su superficie (TAUF),

Fig. 28 es un gráfico que muestra la respuesta inmune humoral de cada grupo,

Fig. 29 es un grupo de gráficos que muestran la actividad antitumoral de la vacuna de células B transducidas con el adenovirus. Particularmente, se indujo cáncer de pulmón en un ratón inoculando con TAUF, seguido por inmunización con la vacuna de células B,

5 Fig. 30 es un conjunto de gráficos que ilustran la secreción de IL-2, que es un índice para la activación de células T asesinas naturales, por la activación de células T asesinas naturales inducida por células B cargadas con α GalCer, -de acuerdo con la concentración de α GalCer y la activación de células T asesinas naturales inducidas por células B o con DC cargadas con α GalCer de acuerdo con la concentración celular,

Fig. 31 - Fig. 35 son gráficos que ilustran que células inmunes específicas podrían eliminarse por la administración de un anticuerpo que es capaz de deplecionar célula CD4+, célula CD8+ o célula NK1.1 in vivo,

10 Fig. 36 es un gráfico que muestra la actividad inmune antitumoral contra timoma (EG-7) inducida por la vacuna basada en células B.

*,p < 0,001 : significancia estadística, comparada con un grupo tratado solo con células B.

[Modo de la invención]

15 Las realizaciones preferidas prácticas y en la actualidad de la presente invención son ilustrativas como se muestra en los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Activación bidireccional de células B cargadas con α GalCer y de células /NKT

<1-1> Comparación de activación de células /NKT inducida por células B y que se inducen por DC

20 Dado que ya está bien establecido que una DC cargada con Gal-Cer activa células iNKT (Kim, S., et al., Synthesis, 847, 2004), los inventores presentes investigaron si células B cargadas con α GalCer tienen efecto similar con células DC cargadas con α GalCer o no.

25 Se usaron ratones hembra C57BL/6 y BALB/c a la edad de 6-10 semanas. Los ratones OT-I y C57BL/6^{bm1} (bm1) se adquirieron de The Jackson Laboratory, mientras que los ratones J 281^{-/-} y los ratones MHC II^{-/-} se proporcionaron amablemente por el Dr. Chung (Universidad Nacional de Seúl, Corea) (Kim JH et al., Am J Pathol., 167(5): 1231-41, 2005) y por el Dr. Park (Universidad de Corea, Corea) (Park, S. H., et al., J. Exp. Med. 193: 893, 2001) respectivamente. Todos los ratones se mantuvieron según condiciones específicas libres de patógenos en el Centro de Animales para la Investigación Farmacéutica en la Universidad Nacional de Seúl, Corea. Los anticuerpos a partir de hibridomas, a saber GK1.5 (anti-CD4: número ATCC: TIB-207), 2.43 (anti-CD8; número ATCC: TIB-210) y PK136 (anti-NK1.1; número ATCC: HB-191) se obtuvieron e inyectaron i.p. (150 μ g/ratón) para deplecionar los subgrupos respectivos de linfocitos in vivo.

30 Particularmente, para separar células B de cada ratón, el bazo se aisló de un ratón, seguido por homogeneización. Después de deplecionar las células CD11c+ del bazo por microperlas (Miltenyibiotec), los inventores presentes aislaron células B usando microperlas de anti-B220 (Miltenyibiotec). Estas células fueron CD19-positivas en más de un 99 % (véase Fig. 1).

35 Para separar células dendríticas del bazo, el bazo extirpado de un ratón se colocó en un medio de 7 ml conteniendo colagenasa D (1 mg/ml, Roche) y ADNasa I (50 μ g/ml, Sigma-Aldrich), seguido por reacción a 37 °C durante 30 minutos. Se añadió EDTA (concentración final. 10 mM, pH 7,2) al medio, seguido por reacción adicional durante 5 minutos más. Las células dendríticas se separaron de los esplenocitos por gradiente de densidad de Accudenz del 15,5 % (Accurate Chemical & Scientific).

40 Las células purificadas (células B o DC) se cocultivaron con α GalCer (1 μ g/ml) o con el vehículo (polisorbato al 0,5 %) durante 14 horas en un incubador de CO₂. Después, las células se co-cultivaron con un hibridoma de células T asesinas naturales, DN32.D3 (Claire Forestier et al., The Journal of Immunology, 171: 4096, 2003); IL-2 se midió después como un indicador de activación de NTK por ELISA en sándwich.

45 Como resultado, DC cargadas con α GalCer (DC/ α GalCer) estimularon DN32.D3 para producir IL-2. De forma similar, las células B cargadas con α GalCer (B/ α GalCer) estimularon eficientemente células DN32.D3 para producir IL-2, igualando la velocidad de grupo de DC de producción de IL-2 cuando están a tasas más altas para el hibridoma pero quedando por debajo cuando están a tasas más bajas (véase Fig. 30).

<1-2> Activación de respuesta inmune dependiente de células T asesinas naturales

50 Para investigar si B/ α GalCer y DC/ α GalCer administradas in vivo podrían activar o no células inmunes, los inventores presentes inyectaron B/ α GalCer o DC/ α GalCer de ratones C57BL/6 i.v. en ratones singénicos y midieron el nivel de células productoras de IL-4 y de IFN- γ por ELISPOT. Particularmente, ratones C57BL/6 de tipo silvestre o ratones Ja281^{-/-} se inyectaron intravenosamente con vehículo, α GalCer, células B cargadas con α GalCer o DC cargadas con α GalCer. Una semana más tarde, el bazo se separó para preparar células individuales, que se situaron en placa de ELISPOT. Un vehículo o α GalCer se añadió sobre la placa, seguido por cultivo durante 6 horas para estimulación. Se

llevó a cabo ensayo de ELISPOT para medir las células que segregan IL-4 e IFN- γ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ELISPOT de IL-4, kit de ELISPOT de IFN- γ , R&D system).

Como resultado, la inyección de tanto B/ α GalCer como DC/ α GalCer indujeron altos números de células productoras de IL-4 e IFN- γ (Fig. 2). Sin embargo, debe destacarse que un número considerable de estas células productoras de citocinas se detectaron incluso en ausencia de reestimulación con α GalCer. No obstante, los inventores presentes creen que la inducción de células que producen IL-4 e IFN- γ es dependiente de células iNKT, dado que no ocurre en ratones J 281-/-, que carecen de población de iNKT (véase Fig. 2).

<1-3> Activación de células B por activación de células T asesinas naturales

Para determinar si se indujeron cualesquiera cambios en células B después de la inyección, los inventores presentes administraron intravenosamente CFSE (éster succinimidilo de carboxifluoresceína) marcado B/ α GalCer y después se analizaron las moléculas coestimuladoras en las células CFSE+. Particularmente, se obtuvieron linfocitos a partir del bazo y el nódulo linfático de ratones C57BL/6 y se eliminaron células CD11c+ usando microperlas de anti-CD11c (Miltenyibiotec). Las células B se separaron usando microperlas de anti-B220 (Miltenyibiotec). Las células B separadas se marcaron con 10 mM de CFSE, que se inyectaron en la vena del rabo de un ratón singénico. Para marcar con CFSE, se diluyó (Sonda Molecular) en medio RPMI a concentración apropiada, seguido por reacción a 37 °C durante 15 minutos para marcar. Las células se lavaron con medio RPMI tres veces para eliminar CFSE que queda. Veinticuatro y cuarenta y ocho horas después de marcar, se investigaron por citometría de flujo moléculas coestimuladoras en células CFSE+ del bazo y el nódulo linfático del ratón.

Como resultado, se indujeron altos niveles de expresión de CD86 pero no de expresión de CD80 en el plazo de 24 horas. CD40 y MHC II estaban también reguladas al alza ligeramente (Figura 3). Incluso 48 horas después de la inyección, no se observó ninguna regulación al alza de CD80 y otros resultados permanecieron principalmente consistentes con el nivel de 24 horas. Es decir, se activaron células B por las células T asesinas naturales activadas por B/ α GalCer en el plazo de 24 horas.

Considerando los resultados de Ejemplos <1-1>, <1-2> y <1-3>, se confirmó, que tanto DC/ α GalCer como B/ α GalCer son capaces de activar totalmente las células iNKT tanto in vitro como in vivo y la activación es bi-direccional in vivo (dado que se activaron tanto células iNKT como células B).

<Ejemplo 2> B/ α GalCer sometidas a pulso con péptidos promueven la activación de células CD8+ específicas de péptido

Los inventores presentes examinaron si la realización de pulsos conjuntos de α GalCer y péptido MHC-I-restringido en células B podría cebar células T CD8+ específicas de péptidos. Para este fin, los inventores transfirieron de forma adoptiva primero células T CD8+ específicas de OVA marcadas con CFSE (OT-I) en ratones C57BL/6, después se administraron células B sometidas a pulso con vehículo (B solas), B/ α GalCer, vehículo y células B pulsadas con péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (B/pep), o células B sometidas a pulsos con péptidos α GalCer y OVA₂₅₇₋₂₆₄ (B/ α GalCer/pep). Cuarenta y ocho horas más tarde, se obtuvieron células individuales a partir del bazo y después se observó proliferación celular de OT-I. Mientras tanto, las células OT-I que segregan IL-2 e IFN- γ se cultivaron con 1 mM de péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ y 1 μ l/ml de GolgiPlug durante cuatro horas y después se llevó a cabo tinción con citocina celular usando kit Cytoperm/Cytofix (BD Pharmingen).

Como resultado, se indujo un poco de división de células T CD8+ específicas de OVA en ratones que recibieron células B solas; sin embargo una división débil de células T CD8+ específicas de OVA, probablemente con un origen no específico de antígeno, se notó en el grupo B/ α GalCer (Fig. 7, $1,2 \pm 0,5$ % frente a $5,4 \pm 1,8$ %). La inyección de B/pep indujo una división sustancial de OT-I, pero solo muy pocas de estas células produjeron IL-2 (< 4 %) y relativamente pocas produjeron IFN- γ (al 38 %) después de reestimulación in vitro. En contraste, los ratones a los que se dio B/ α GalCer/pep mostraron una división potenciada de OT-I, con más del 40 % de las células resultantes produciendo IL-2 y lo más sorprendentemente, más del 90 % de las células resultantes produciendo IFN- γ a niveles mucho mayores que el grupo de B/pep (Fig. 4).

Estos resultados sugieren que se pudo lograr una tasa mucho mayor de activación de células T CD8+ por la carga de α GalCer sobre B/pep.

<Ejemplo 3> Respuesta de células T citotóxicas de larga duración y superación de tolerancia inmune por B/ α GalCer/pep

<3-1> Respuesta de células T citotóxicas de larga duración inducida por B/ α GalCer/pep

Los inventores presentes investigaron si el enfoque de vacuna basada en células B podría inducir inmunidad citotóxica. Para este fin, los inventores inyectaron i.v. grupos de ratones C57BL/6 con B solas, B/ α GalCer, B/pep, o B/ α GalCer/pep y después determinaron la actividad de CTL in vivo. Además, los inventores investigaron si se podría continuar la respuesta inmune inducida por la vacuna basada en células B. Particularmente, los ratones C57BL/6 se inmunizaron con B solas, B/ α GalCer, B/pep y B/ α GalCer/pep respectivamente. En la primera, tercera y quinta semanas de inmunización, se llevó a cabo ensayo de CTL in vivo. Los linfocitos singénicos bien se cargaron con

péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ o bien se dejaron intactos antes de marcarse con 20 μ M (CFSE^{alto}) o con 2 μ M (CFSE^{bajo}) de CFSE. Se mezclaron e inyectaron números iguales de las dos poblaciones i.v. en ratones. Al día siguiente, las células individuales se obtuvieron y se midieron CFSE^{alto} y CFSE^{bajo} por citometría de flujo. Cuanto más bajo es el número de CFSE^{alto} ello quiere decir que la respuesta inmune citotóxica es más alta.

- 5 Como resultado, solo B/ α GalCer/pep lisaron completamente dianas y ello también mantuvo citotoxicidad completa incluso 5 semanas después de una inyección única. Mientras tanto, ni B/pep ni B/ α GalCer indujeron respuesta CTL específica de péptido alguna en ratones. Solo el grupo tratado con B/ α GalCer/pep mostró un incremento significativo en el número de células T CD8+ que producen IFN- γ frente a OVA₂₅₇₋₂₆₄ (Fig. 6, izquierda).

<3-2> Confirmación de la superación de la tolerancia inmune por B/ α GalCer/pep

- 10 En general, la administración de un solo antígeno induce tolerancia inmune. Así, los inventores presentes investigaron si la tolerancia inmune inducida por un antígeno podría superarse o no cuando α GalCer se cargó conjuntamente con un péptido en células B. Particularmente, los ratones C57BL/6 se inmunizaron de la misma manera que se describe en el Ejemplo <3-1>. Una semana más tarde; se obtuvieron los esplenocitos, seguidos por estimulación con esplenocitos singénicos revestidos con OVA durante una semana. Las células T CD8+ T que segregan IFN- γ en los esplenocitos estimulados se midieron por la tinción de citocinas intracelular.

Como resultado, los ratones que recibieron B solas o B/ α GalCer respondieron normalmente al cebado y generaron células T CD8+ que producen IFN- γ específicas de péptidos sustanciales. (Fig. 6, derecha). Sin embargo, los ratones a los que se dio B/pep no mostraron ningún incremento en el número de células T CD8+ que producen IFN- γ , sugiriendo que estos ratones fueron tolerantes del péptido.

- 20 En contraste, los ratones vacunados con B/ α GalCer/pep adquirieron número mucho mayor de células T CD8+ reactivas a péptidos de lo que lo hizo cada grupo al que se dio B solas o

B/ α GalCer. En este momento, a los ratones vacunados con B solas o B/ α GalCer no se les administró antígeno alguno, de tal forma que la respuesta inmune específica de antígenos no se indujo en los ratones y la estimulación in vitro con esplenocitos revestidos de OVA fue la primera y la única estimulación que causó respuesta inmune. Sin embargo, a los ratones vacunados con B/ α GalCer/pep ya se les había administrado un antígeno, de forma que la estimulación in vitro con esplenocitos revestidos de OVA fue respuesta de memoria. En conclusión, B/ α GalCer/pep supera tolerancia inmune, mostrando inmunogenicidad y fuerte respuesta de memoria.

<Ejemplo 4> La vacuna basada en células B es un generador de CTL tan eficiente como la vacuna basada en DC

- 30 Los inventores presentes compararon la eficacia de la vacuna basada en células B en generar citotoxicidad con aquella de la vacuna de DC.

Para este fin, los inventores determinaron el número de células mínimo requerido para lograr la lisis de dianas completa in vivo. Particularmente, las células B o DC se cocultivaron con α GalCer o vehículo durante 16 - 18 horas y después se sometieron a pulso con 1 mg/ml de OVA₂₅₇₋₂₆₄ durante una hora. Se inyectaron i.v. células divididas en serie en ratones singénicos y se llevó a cabo ensayo de CTL in vivo. Como se explica en el Ejemplo anterior, las dianas sometidas a pulso con péptidos se marcaron como CFSE^{alto} y las células control no sometidas a pulso con un péptido se marcaron como CFSE^{bajo}. Se mezclaron e inyectaron números iguales de las dos poblaciones i.v. en ratones. Pasados unos momentos, los esplenocitos de los ratones se examinaron por citometría de flujo para calcular la proporción de CFSE^{bajo}: CFSE^{alto} para medir la lisis de células diana específicas de antígeno.

- 40 Como resultado, los ratones inyectados con DC/ α GalCer/pep mostraron una lisis de células diana completa con tan solo 16.000 células. De interés, una vacunación individual con 80.000 células B/ α GalCer/pep fue suficiente para establecer una lisis específica de péptido completa, mientras que la vacunación con 16.000 células generó una citotoxicidad moderada (Fig. 7). Sin embargo, dado que el área de superficie de DC es mucho mayor que aquella de las células B, se puede decir que B/ α GalCer/pep es tan eficiente como DC/ α GalCer/pep en generar citotoxicidad. DC/pep generó eficientemente citotoxicidad específica de OVA mientras que el tratamiento de B/pep, independientemente del número de células tumorales no lo hizo (Fig. 8). Digno de mención, el patrón de citotoxicidad in vivo del grupo tratado con DC/pep fue muy similar a aquel del grupo tratado con α GalCer/pep, indicando que la carga α GalCer sobre DC no potenció la eficacia de vacuna de DC/pep.

<Ejemplo 5> Requerimiento de la generación de CTL por B/ α GalCer/pep

- 50 Los inventores presentes examinaron que tipo de células inmunes están implicadas en la generación de la respuesta de CTL. Para este fin, los inventores inyectaron a ratones con Ab de depleción (anticuerpo de depleción anti-CD4: GK1.5, anticuerpo de depleción anti-CD8; 2.43, anticuerpo de depleción anti-NK1.1; PK136). Cuatro días antes o cuatro días después se vacunaron con B/ α GalCer/pep y después se llevó a cabo un ensayo de CTL in vivo.

- 55 Como resultado, la programación temporal de la depleción no hizo ninguna diferencia, ya que la generación de actividad CTL no estuvo impedida en ningún caso por la depleción de células CD4+ o NK1.1+ (Fig. 9). Por el contrario,

la depleción de CD8 bloqueó completamente la matanza de células diana. De forma consistente con estos resultados, los ratones MHC II^{-/-} (carentes de células T CD4⁺) desarrollaron respuestas normales de CTL, mientras que los ratones Ja281^{-/-} (carentes de células iNKT) no lo hicieron (Fig. 10).

<Ejemplo 6> Inducción por células B de linfocitos T presentadores de antígenos y citotóxicos

- 5 Podría argumentarse que las células B sometidas a pulso con péptidos no actúan como APC sino como reservorios de péptido a partir de los que el DC huésped retira péptidos con el fin de inducir respuestas de CTL. Para explorar esta posibilidad, los inventores presentes usaron ratones bm-1 (Norbury, C. C. et al., Science 304, 1318-1321, 2004). Las células de estos ratones pueden cargar péptido OVA sobre sus moléculas de MHC de clase I, pero el complejo resultante no está reconocido por las células T CD8⁺ relacionadas debido a una mutación en la región H-2K. Las
- 10 células B a partir de esta línea expresaron CD1d normalmente y estimularon activación de iNKT en respuesta a α GalCer, indicando que la interacción entre B e iNKT estuvo intacta.

- De nuevo, cuando B/ α GalCer/pep se preparó usando células B de ratones de tipo silvestre y después se inyectó en ratones de tipo silvestre, se generó citotoxicidad específica de OVA completa in vivo. Sin embargo, cuando B/ α GalCer/pep derivada de células B de ratones bm-1 se inyectó en ratones de tipo silvestre, ello falló en generar
- 15 actividad citotóxica específica de OVA, sugiriendo que DC u otra APC profesional en el ratón receptor no fueron responsables de la generación de CTL (Fig. 11).

Los inventores presentes investigaron si era posible generar CTL cuando se dieron pulsos con α GalCer y péptido por separado y después se inyectaron juntos. Para este fin, los ratones C57BL/6 se inyectaron i.v. con "B/ α GalCer más B/pep" o con B/ α GalCer/pep solo y se llevó a cabo ensayo de CTL in vivo.

- 20 Como resultado, los ratones vacunados con "B/ α GalCer más B/pep" fallaron al generar citotoxicidad in vivo (Fig. 12). Este resultado demuestra que el péptido y α GalCer deben estar presentes en la misma célula B para generar la citotoxicidad.

<Ejemplo 7> Efecto antitumoral de B/ α GalCer/pep <7-1> Prueba in vivo usando modelos de OVA

- Los inventores presentes examinaron si la vacunación con B/ α GalCer/pep podría generar inmunidad antitumoral. Para
- 25 poner a prueba la actividad profiláctica anti-tumoral, se vacunaron grupos de ratones una vez con B solas, B/ α GalCer, B/pep, B/ α GalCer/pep, DC/pep, o DC/ α GalCer/pep antes de que un melanoma B16 transfectado con OVA (MO-5) (Dr. Kenneth Rock, Universidad de Massachusetts: Faló, L. D., et al., Nat. Med. 1: 649, 1995) se trasplantara s.c. en ellos. Como resultado, se observó un patrón ligeramente retardado de crecimiento tumoral en ratones vacunados con B/ α GalCer, todos los ratones desarrollaron finalmente tumores (Fig. 13). En contraste, ningún ratón que recibió
- 30 B/ α GalCer/pep, DC/pep o DC/ α GalCer/pep desarrolló crecimiento tumoral.

- Para examinar si estos ratones establecieron actividad antitumoral a largo plazo, los inventores realizaron una prueba de provocación repetida a los ratones libres de tumores supervivientes con los mismos tumores MO-5 70 días después de la primera inoculación tumoral. Como resultado, los inventores no observaron ningún crecimiento tumoral en esos ratones (Fig. 14), demostrando que la vacunación con B/ α GalCer/pep estableció inmunidad de memoria contra el
- 35 tumor. Cuando los inventores llevaron a cabo experimentos similares usando un tumor de origen diferente, el timoma transfectado con OVA (EG-7), se obtuvieron resultados muy similares y consistentes (Fig. 36).

Los inventores presentes investigaron si la vacunación con B/ α GalCer/pep podría erradicar un tumor preexistente. Para este fin, los inventores establecieron dos modelos terapéuticos; los ratones se vacunaron (i) un día o (ii) nueve días después de trasplante s.c., cuando los tumores llegaron a ser palpables.

- 40 En el modelo de un día, la vacunación bien con DC/pep o bien con DC/ α GalCer/pep suprimió casi completamente el crecimiento tumoral. De forma interesante, el crecimiento tumoral se disminuyó completamente en ratones vacunados con B/ α GalCer/pep (Fig. 15). En el modelo de nueve días, ninguna de estas vacunaciones destruyó completamente el tumor en crecimiento, debido a la naturaleza muy agresiva del melanoma B16. Sin embargo, en ratones vacunados con B/ α GalCer/pep, el crecimiento tumoral fue menos pronunciado que en el grupo de "B solas" de ratones y se
- 45 parecían a aquello observado en grupos vacunados con DC/pep o con DC/ α GalCer/pep (Fig. 16).

<7-2> Prueba in vivo usando modelos Her-2/neu

- Para investigar si la vacuna basada en células B podría aplicarse al antígeno de tumores reales, se llevaron a cabo experimentos usando TAUF (Penichet ML et al., Lab Anim Sci., 49: 179-88, 1999), una línea celular tumoral que expresa Her-2/neu de la misma manera que se describe en el Ejemplo <7-1> anterior. Este antígeno tumoral está bien
- 50 caracterizado y se conoce su epitopo CTL. De nuevo, los inventores observaron un nivel significativo de citotoxicidad específica de Her-2/neu₆₃₋₄₁ cargadas con α GalCer (Fig. 17).

- Para examinar actividad anti-tumoral en este modelo, los inventores presentes inyectaron células tumorales que expresan Her-2/neu (TAUF) i.v. o s.c. en ratones BALB/c antes de vacunarlos con células B cargadas con α GalCer sometidas a pulso con Her-2/neu₆₃₋₇₁. Después de inoculación tumoral i.v., las tasas de supervivencia fueron
- 55 ligeramente mejores para aquellos ratones vacunados con B/ α GalCer o con B/pep que para aquellos vacunados con B

solas (Fig. 18). En contraste, todos los ratones vacunados con B/ α GalCer/pep sobrevivieron a lo largo del experimento. Estos ratones supervivientes también resistieron prueba de provocación repetida con TAUF. Se observaron resultados similares en el modelo de crecimiento tumoral s.c. (Fig. 19).

- 5 De forma colectiva, el régimen de vacunas basadas en células B demostró ser tan efectivo como las vacunas basadas en DC en generar tanto inmunidad anti-tumoral profiláctica como inmunidad anti-tumoral terapéutica.

<Ejemplo 8> Introducción del antígeno completo usando vector vírico que expresa antígeno

Una vacuna de células sometidas a pulso con péptidos no puede usarse de forma general debido a que la aplicación del péptido está limitada a haplotipos de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y puede presentar solo un epítipo simple. Por otro lado, un antígeno completo mediado por virus puede usarse ampliamente sin limitación en haplotipos de MHC y puede inducir tanto respuesta inmune humoral como respuesta inmune mediada por células, indicando que ello puede inducir diversas respuestas inmunes específicas de epítipos. Basándose en eso, los inventores investigaron si las células B transducidas con antígeno completo por vector vírico podrían inducir respuesta inmune de forma eficaz. Primero, los inventores presentes prepararon el adenovirus (AdHM) administrando un gen que codifica el dominio extracelular y el dominio transmembrana de antígeno asociado a tumores Her-2/neu (HM) y después inyectaron en un modelo de ratón.

Particularmente, las células B se separaron de los esplenocitos de ratones BALB/c y después se cultivaron para transducción con 100 MOI del adenovirus introduciendo HM (AdHM, Viomed) en condición libre de suero a 37 °C durante 90 minutos. Después, un suero se suplementó a ello, seguido por cultivo adicional durante 8 horas, durante 24 horas y durante 48 horas respectivamente. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-Her-2/neu marcado con PE (BD biosciences número 340552) para citometría de flujo. Se midió el nivel de Her-2/neu expresado en la superficie de la célula (se investigaron la eficiencia de transducción de adenovirus para células B y el porcentaje de células PE+ en células B totales).

Después de cultivo de 8 horas, 24 horas y 48 horas de células B con adenovirus, se confirmó que la eficiencia de transducción fue más del 20 % en cada condición de cultivo (Fig. 20). Particularmente, cuando se co-cultivaron células B con AdHM durante más de 8 horas, las células B se transdujeron completamente con AdHM y así se expresó Her-2/neu en las superficies de las células B. La expresión de Her-2/neu en la superficie de células B no se afectó por cultivo con α GalCer. Además, la capacidad de las células B para presentar α GalCer no se afectó, tampoco (Fig. 21). Como se explica anteriormente, los resultados anteriores indican que cuando α GalCer se presenta a células DN32.D3 por molécula CD1d en célula B, las células DN32.D3 segregan IL-2. Así, medir el nivel de IL-2 en el sobrenadante de cultivo puede confirmar si las células B son capaces de presentar α GalCer y en la presente invención, se confirmó la secreción de IL-2 en el sobrenadante de cultivo, respaldando que las células B pueden presentar α GalCer.

<Ejemplo 9> Respuesta de células T citotóxicas inducida por células B transducidas por adenovirus

Se aislaron células B a partir de esplenocitos de ratones BALB/c, que se transdujeron con 100 M.O.I. del adenovirus que expresa dominio extracelular de Her-2/neu y el dominio transmembrana en condición libre de suero en un incubador a 37 °C durante 60 minutos. Después, un suero se suplementó a ello, seguido por cultivo adicional durante 24 horas para preparar células B/AdHM. Las células B transducidas con AdHM se cultivaron en un medio conteniendo suero complementado con 1-2 μ g/ml de α GalCer durante 23 horas, dando como resultado células B cargadas con α GalCer (B/AdHM/ α GalCer). Las células B preparadas se lavaron con RPMI más de tres veces para eliminar el adenovirus que queda y α Gal-Cer que queda.

Los inventores presentes administraron la vacuna de células B intravenosamente a ratones para investigar si las células B transducidas con el AdHM podrían inducir respuesta inmune citotóxica. Los ratones administrados con células B solas (B) y células B cargadas con α GalCer (B/ α GalCer) se usaron como un control negativo. Se midieron respuestas de células T citotóxicas específicas de Her-2/neu inducidas por células B transducidas con AdHM (B/AdHM) y células B sometidas a pulsos conjuntos con α GalCer y AdHM (B/AdHM/ α GalCer). Después de inmunización, células diana cargadas con péptido de epítipo de células T citotóxicas (Her-2/neu63-71, Anygene) se inyectaron, seguido por investigación de actividad de CTL in vivo.

Como resultado, después de una semana después de la inmunización, no se observó lisis de células diana en el grupo inmunizado con B solas y con B/ α GalCer, mientras que se observó respuesta de células T citotóxicas en el grupo de ratones inmunizados con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer (Fig. 22). La activación de células B transducidas con adenovirus puede inducir de forma efectiva respuesta de células T citotóxicas in vivo sin la ayuda de células T asesinas naturales, indicando que pueden usarse como células presentadoras de antígenos. La respuesta de células T citotóxicas inducida por B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer se redujo gradualmente, pero hasta 7 semanas después de la inmunización, la respuesta continuó hasta el nivel significativo (Fig. 23). Una semana después de la inmunización, se midió la secreción de IFN- γ en células T CD8+ junto con respuesta de células T citotóxicas. Como resultado, el número de células T CD8+ activadas se incrementó en el grupo de ratones tratado con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer, comparado con aquel en el grupo tratado solo con células B y más específicamente el número de células T CD8+ en el grupo tratado con B/AdHM/ α GalCer fue un poco más alto que aquel en el grupo tratado con B/AdHM (Fig. 24).

<Ejemplo 10> Activación de células asesinas naturales por células B cargadas con α GalCer y mejora de

efecto vacunal de vacuna de células B transducidas por adenovirus**<10-1> Activación de células asesinas naturales por células B cargadas con α GalCer**

Las células asesinas naturales se calcularon en base a aquellas que segregan IFN- γ . Específicamente, las células B se aislaron a partir de los esplenocitos de ratones y después se cultivaron en un medio conteniendo 1 mg/ml de GolgiPlug durante 5 horas. Las células se tiñeron con anticuerpo de IFN- γ :APC, CD3:PE y CD49b:FITC antirratón (todos de Biolegend). Las células asesinas naturales estaban compuestas por aquellas que expresaban CD49b, un marcador de células asesinas naturales, pero no CD3.

La respuesta de células T citotóxicas en el grupo tratado con adenovirus y células B sometidas a pulsos conjuntos de α GalCer (B/AdHM/ α GalCer) fue más alta y continuó más tiempo que en el grupo tratado con células B transducidas con adenovirus (B/AdHM), pero la diferencia no fue significativa. Estos resultados indican que la carga de α GalCer no potencia la respuesta de células T citotóxicas, a diferencia de la vacuna basada en célula B sometida a pulso con péptidos. A pesar de eso, la administración de la vacuna basada en células B cargadas con α GalCer estimuló células T asesinas naturales in vivo, a diferencia de la vacuna basada en células B transducida por adenovirus y de este modo activó células asesinas naturales (Fig. 25). El efecto antitumoral puede esperarse activando células asesinas naturales e induciendo de este modo respuesta a células T citotóxicas.

<10-2> Mejora de efecto vacunal de la vacuna basada en células B co-cargadas con α GalCer y adenovirus

Para investigar la eficiencia de inducir respuesta de células T citotóxicas de la vacuna de células B, los inventores presentes administraron la vacuna de células en una dosis subóptima que no es suficiente para inducir respuesta a células T citotóxicas completa ni para inducir la lisis de células diana medida. Se trató un grupo control positivo con células B cargadas con α GalCer y péptido de epítipo de células T citotóxicas (B/ α GalCer/pep). Una semana después de la inmunización con cada vacuna de células B, la eficiencia de inducir respuesta de células T citotóxicas se comparó entre los grupos tratados respectivamente con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer (Fig. 26). En el grupo administrado con B/ α GalCer/pep, se consideró que la mayoría de las células B presentaban un antígeno, pero solo el 20 % de las células B totales transducidas con adenovirus podrían trabajar como células presentadoras de antígenos. Por lo tanto, se juzga que la vacuna de células B transducida con adenovirus para introducir el antígeno completo puede inducir la respuesta de células T citotóxicas específica de antígeno eficientemente aún cuando la dosificación es más alta que aquella de la vacuna de células B sometidas a pulso con péptidos. Además, cuando la cantidad pequeña de células B (dosis no plenamente efectiva) se administró, ello podría inducir también la lisis de células diana con la ayuda de células T asesinas naturales activadas por la α GalCer cargada.

<Ejemplo 11> Vacuna de células B transducidas por adenovirus que induce respuesta de anticuerpos específica de antígenos

La vacuna basada en células B transducidas por adenovirus tiene una ventaja de inducir simultáneamente respuesta inmune humoral y respuesta inmune mediada por células, a diferencia de vacunas de células B sometidas a pulso con péptidos que inducen solo respuesta inmune mediada por células. Para confirmar si la vacuna de células B transducida por AdHM podría inducir anticuerpo específico de Her-2/neu, los ratones BALB/c se inmunizaron con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer respectivamente. Para medir título de anticuerpos anti-Her-2/neu en suero, la unión de anticuerpo a células TAUF, células tumorales murinas que expresan Her-2/neu en la superficie, se investigó por citometría de flujo.

Para medir la respuesta a anticuerpos, se prepararon las muestras de sangre en la semana 1^a, 3^a, 5^a y 7^a a partir de la inmunización por sangrado ocular. Las muestras de sangre de ratones se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 horas, seguidas por centrifugación a 8.000 durante 10 minutos para separar suero. Para medir título de anticuerpo anti-Her-2/neu en el suero, el suero se diluyó de forma seriada a la mitad cada vez a partir de 1:50 (con PBS conteniendo FBS al 1 %, azida al 0,09 %), seguido por cultivar con TAUF, células tumorales que expresan Her-2/neu, a 4 °C durante 60 minutos. Las células TAUF incubadas con suero de ratón se lavaron con un tampón, seguido por tinción de la unión del anticuerpo de ratón a células TAUF usando anticuerpo IgG antirratón de cabra marcado con FITC como un anticuerpo secundario. Después, la cantidad de anticuerpo de ratón unido a TAUF se midió por citómetro de flujo (FACSCaliber, BD Biosciences) y el título de anticuerpo se calculó estandarizando suero de ratón no inmunizado y considerando intensidad de fluorescencia media incrementada más de 1,8 veces como una respuesta positiva.

Como resultado, consistente con el resultado de inducir células T citotóxicas, los títulos de anticuerpos anti-Her-2/neu en los grupos inmunizados con B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer se mantuvieron como altos (Fig. 27) y la respuesta humoral se indujo también en los dos grupos anteriores, a diferencia de en los grupos tratados con células B y B/ α GalCer (Fig. 28).

<Ejemplo 12> Efecto profiláctico y terapéutico sobre cáncer por la inmunización con la vacuna basada en células B transducidas por adenovirus cargado con α GalCer

Las células 2×10^5 de TAUF se inyectaron en la vena del rabo de ratones BALB/c, un modelo de tumor de Her-2/neu, para inducir un tumor. Después, los ratones que llevan el tumor se inmunizaron con vacunas de células B, seguido por investigación de tasa de supervivencia.

Los inventores presentes examinaron si la vacuna de células B transducidas con adenovirus podría inducir respuesta inmune mediada por células y respuesta inmune humoral conjuntamente y de este modo si tiene una actividad antitumoral. Las células TAUF se inyectaron intravenosamente en ratones para inducir cáncer de pulmón, en lo que se midió el efecto profiláctico y terapéutico de la vacuna de células B. La vacuna de células B se administró para inmunización a la concentración de 2×10^6 y 7 días más tarde se inyectaron intravenosamente 2×10^5 células tumorales en el ratón, seguido por investigar la tasa de supervivencia. El periodo de supervivencia se prolongó en los grupos tratados con células B cargadas con α GalCer (B/ α GalCer) y células B transducidas con adenovirus que expresan antígeno tumoral (B/AdHM), comparado con aquel en el grupo tratado solo con células B (B). Cuando los ratones se inmunizaron con la vacuna de células B transducidas con adenovirus cargado con α GalCer que expresa un antígeno tumoral (B/AdHM/ α GalCer), los ratones sobrevivieron a lo largo de todo el experimento. Estos resultados indican que la vacuna B/AdHM/ α GalCer tuvo mejor efecto antitumoral que la vacuna B/ α GalCer o la vacuna B/AdHM (Fig. 29, parte superior). Y se juzgó que la respuesta inmune inducida por la vacuna de células B puede evitar el crecimiento tumoral de forma eficaz.

A continuación, para confirmar el efecto terapéutico de la vacuna de células B, se inyectaron 5×10^4 células tumorales (TAUF) en la vena del rabo para inducir cáncer de pulmón. Tres días más tarde, los grupos de ratones se inmunizaron con 1×10^6 células B, B/ α GalCer, B/AdHM y B/AdHM/ α GalCer respectivamente. El tiempo de supervivencia más corto se observó en el grupo tratado solo con células B y el tiempo de supervivencia del grupo B/ α GalCer fue similar. Mientras tanto, el tiempo de supervivencia del grupo inmunizado con vacuna B/AdHM se prolongó algo, comparado con aquellos de los grupos tratados solo con células B y con B/ α GalCer. Por el contrario, el tiempo de supervivencia se prolongó significativamente en el grupo inmunizado con B/AdHM/ α GalCer, que fue consistente con el resultado de modelo profilácticos, indicando que la vacuna B/AdHM/ α GalCer tuvo mejor efecto antitumoral que vacuna de células B, vacuna de B/ α GalCer o vacuna de B/AdHM (Fig. 29, parte inferior).

<Ejemplo de formulación> Preparación de solución inyectable

La solución inyectable de la vacuna antitumoral de la presente invención se preparó como sigue.

1 - 2 μ g/ml de α GalCer, 5×10^6 células/ml de células B, 1 - 2 μ g/ml de un péptido, 1 g de 5'-cloro-3,2'-dihidroxichalcona o de clorhidrato de 5'-cloro-2,3'-dihidroxichalcona, 0,6 g de NaCl y 0,1 g de ácido ascórbico se disolvieron en agua destilada, dando como resultado solución de 100 ml para inyección. La solución se vertió en una botella, que se esterilizó a 120 °C durante 30 minutos.

[Aplicabilidad industrial]

Como se explica anteriormente, las células B de la presente invención que están cargadas con el ligando de células T asesinas naturales, en particular α GalCer y un antígeno no solo inducen respuesta de linfocitos T citotóxicos a nivel similar a como lo hace la vacuna de DC convencional sino que también tienen efecto profiláctico y terapéutico sobre tumor sólido y tumor metastásico. Las células B transducidas con adenovirus que codifican un antígeno tumoral pueden inducir las respuestas inmunes específicas de antígeno, de tal forma que una vacuna mediada por las células B se puede usar como un agente profiláctico y terapéutico para tumor. Además, la vacuna de la invención puede inducir respuesta inmune incluso sin la ayuda de células T CD4+. Por lo tanto, ello puede administrarse de forma eficaz a un paciente infectado con VIH quien tiene inmunodeficiencia causada por la falta de células T CD4+.

Los expertos en la técnica apreciarán que las realizaciones específicas divulgadas en la descripción anterior se pueden utilizar fácilmente como una base para modificar o diseñar otras realizaciones para llevar a cabo la presente invención.

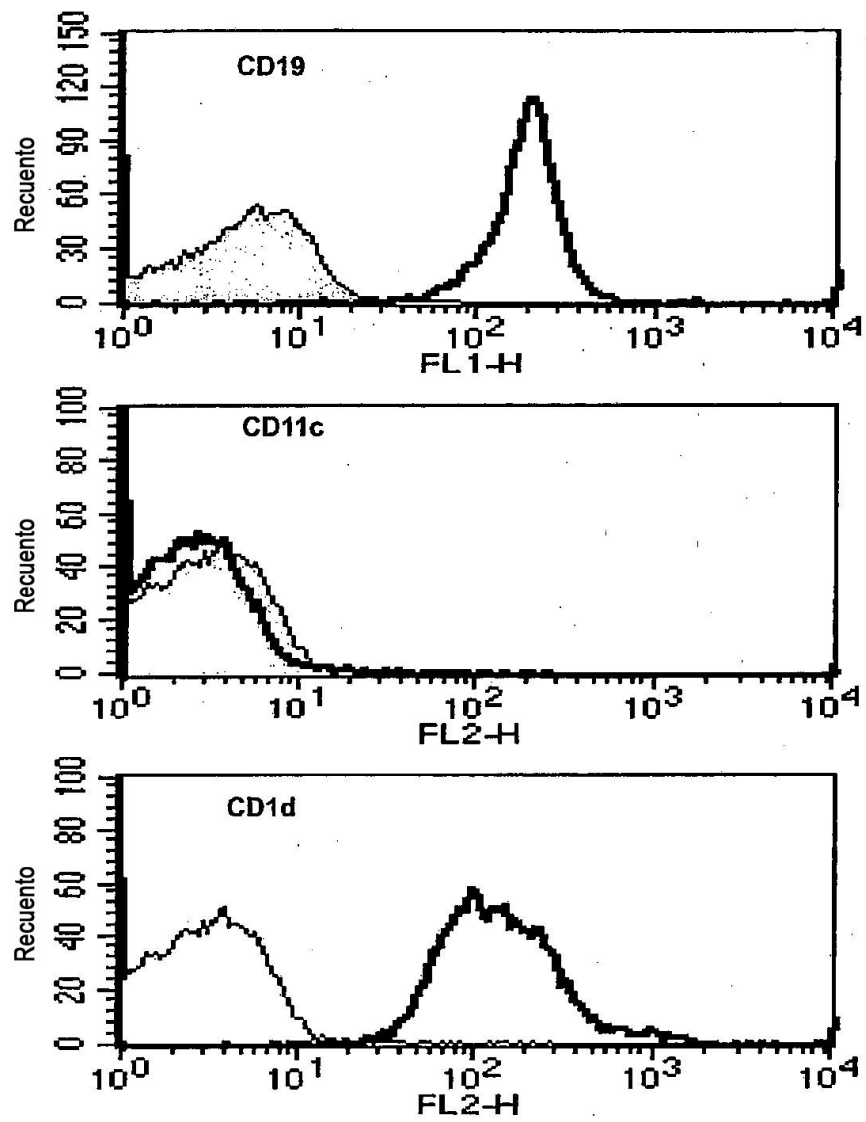
REIVINDICACIONES

1. Una vacuna inmunogénica y profiláctica que comprende:

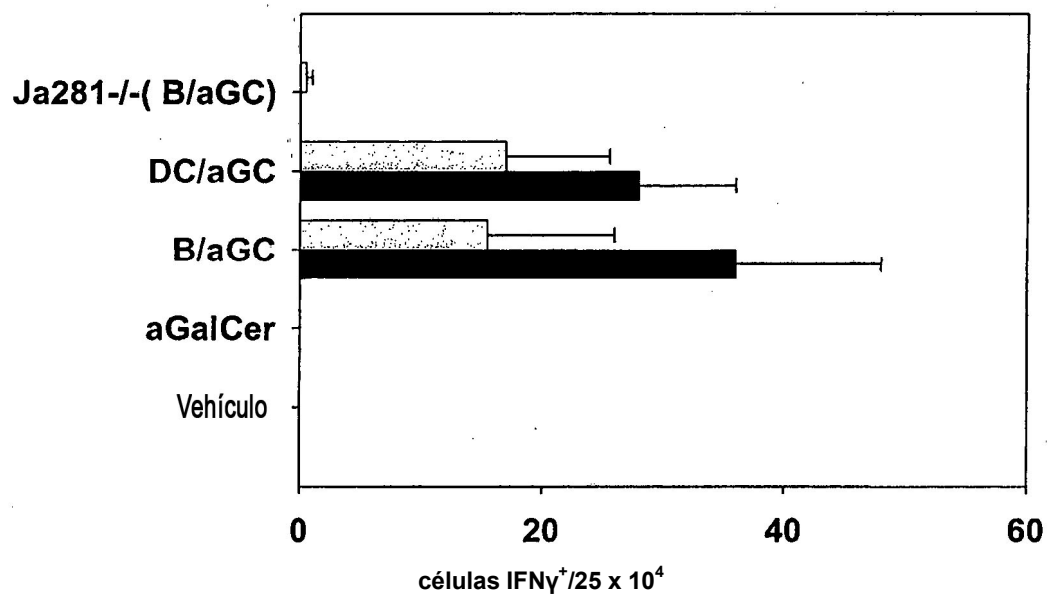
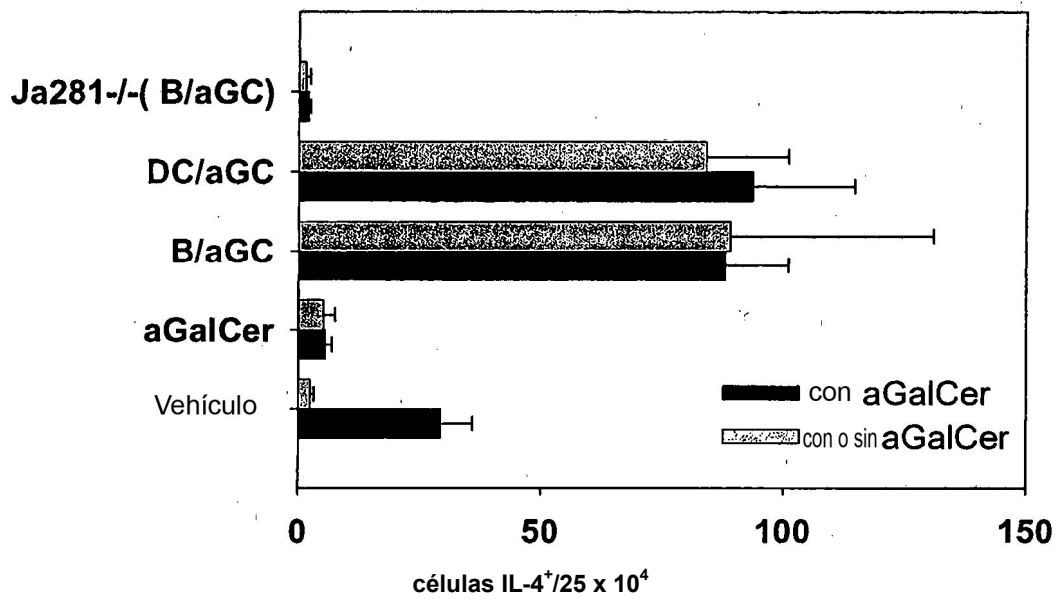
ligando de células T asesinas naturales y células B sometidas a pulsos conjuntos con antígenos o las células B que expresan antígeno cargadas con ligando.

- 5 **2.** La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el ligando de las células T asesinas naturales es seleccionado de un grupo que consiste en α -galacturonosilceramida, α -glucuronosilceramida, fosfatidilinositol tetramanósido, isoglobotrihexosilceramida, gangliósido GD3, fosfatidilcolina, b-galactosilceramida, lipofosfoglicano, fosfolípido de glucoinositol, derivados de α GalCer galactosilceramida b-anomérica y galactosilceramida α -anomérica, antígeno lipídico de bacterias y variantes de α GalCer.
- 10 **3.** La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno es originario bien a partir de patógenos que incluyen bacterias patógenas, virus y parásitos o bien a partir de antígeno tumoral.
- 15 **4.** La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el antígeno derivado de las bacterias patógenas es seleccionado de un grupo que consiste en antígeno de Bordetella pertussis (toxina pertúsica, hemaglutinina filamentosa y pertactina), toxoide del tétanos, antígeno de la difteria (toxóide de la difteria), antígeno de Helicobacter pylori (polisacáridos de cápsula de serogrupo A, B, C, Y y W-135), antígeno pneumocócico (polisacárido capsular de tipo 3 de Streptococcus pneumoniae), antígeno de la tuberculosis, antígeno del cólera (subunidad B de toxina colérica), antígeno estafilocócico (enterotoxina estafilocócica B), antígeno de Shigella (polisacáridos de Shigella), antígeno de Borrelia sp., antígeno de Candida albicans y antígeno de Plasmodium.
- 20 **5.** La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el antígeno derivado de virus es seleccionado de un grupo que consiste en virus de la gripe (antígeno de hemaglutinina y antígeno de neuraminidasa), antígeno del virus del papiloma humano (HPV) (glucoproteína), antígeno del virus de la estomatitis vesicular (glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular), antígeno del citomegalovirus (CMV), antígeno del virus de la hepatitis (antígenos de la hepatitis A (HAV), de la hepatitis B (HBV), de la hepatitis C (HCV), de la hepatitis D (HDV) y de la hepatitis G (HGV) (antígeno del núcleo y antígeno de la superficie), antígeno del virus respiratorio sincitial (RSV), antígeno del virus herpes simplex (HSV), antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (GP-120, GP-160, p18, Tat, Gag, Pol y Env) y las combinaciones de los mismos.
- 25 **6.** La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el antígeno tumoral es seleccionado de un grupo que consiste en HPV E6/E7, gp100, tirosinasa, TRP-1 (proteína-1 relacionada con tirosinasa), TRP-2 (proteína-2 relacionada con tirosinasa), MAGE, MUC-1, CEA (antígeno carcinoembrionario), p53, alfa-fetoproteína y Her-2/neu.
- 30 **7.** La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno está característicamente en forma de péptido, lipopolisacárido, glucoproteína polisacárido, glucoproteína o polinucleótido.
- 35 **8.** La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno es expresado por transducción con un virus recombinante.
- 40 **9.** La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el virus recombinante es seleccionado de un grupo que consiste en adenovirus, virus adeno-asociado, retrovirus, virus de la vacuna, poxvirus y virus Sindbis para introducir un gen que codifica un antígeno.
- 10.** Un activador de células T asesinas naturales que comprende células B que expresan antígeno cargado con α GalCer o α GalCer y células B que expresan antígeno.
- 11.** Un inductor de respuesta citotóxica que comprende células B que expresan antígeno tumoral cargado con α GalCer.

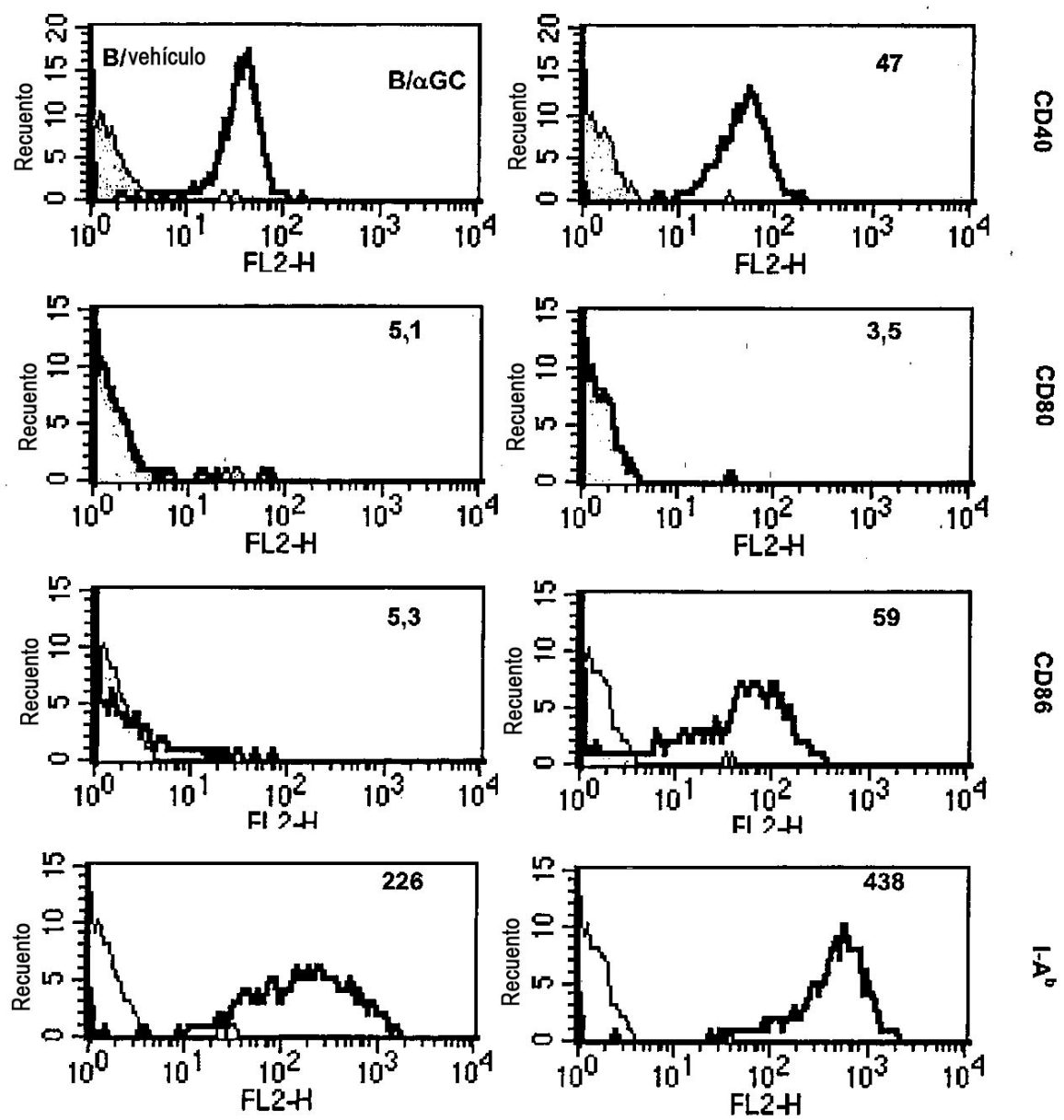
[Fig. 1]



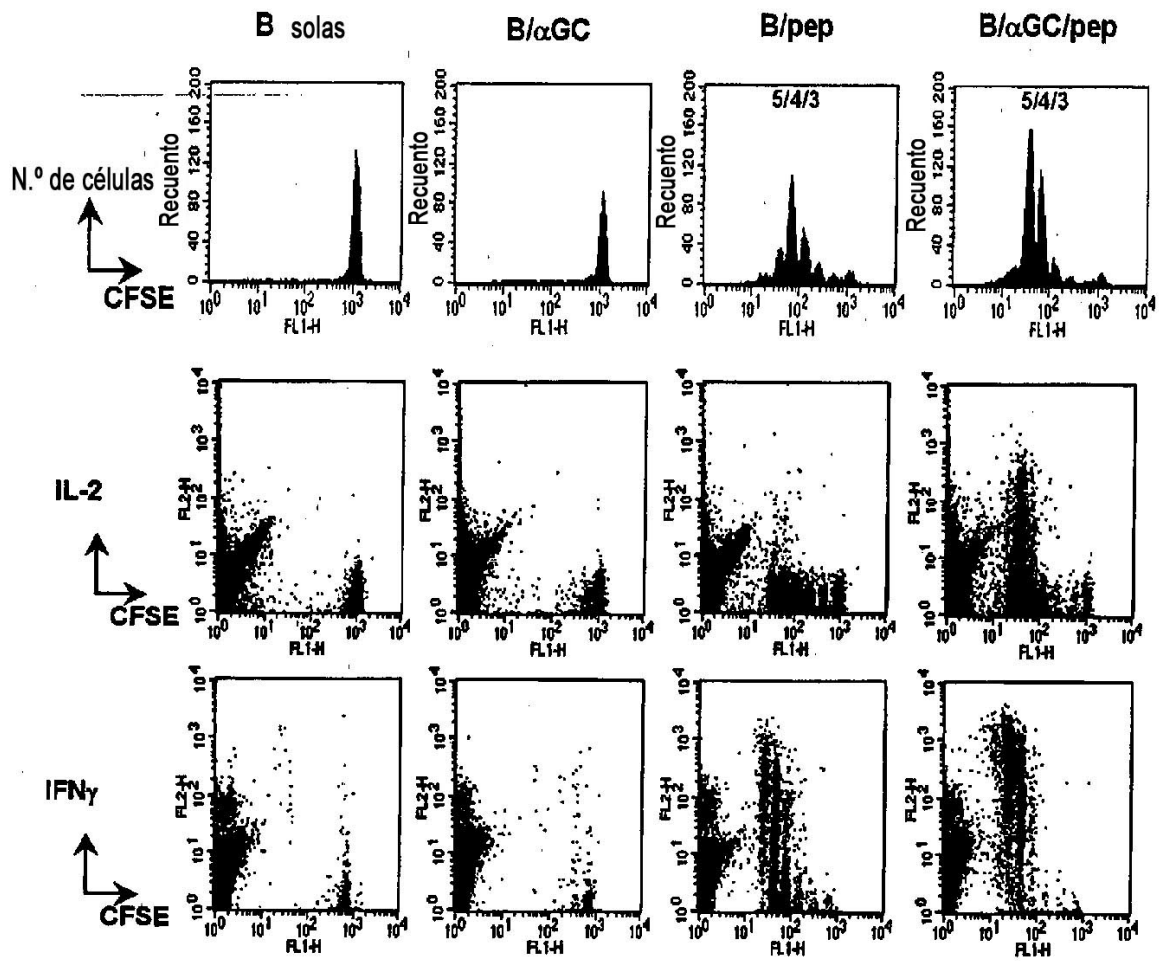
[Fig. 2]



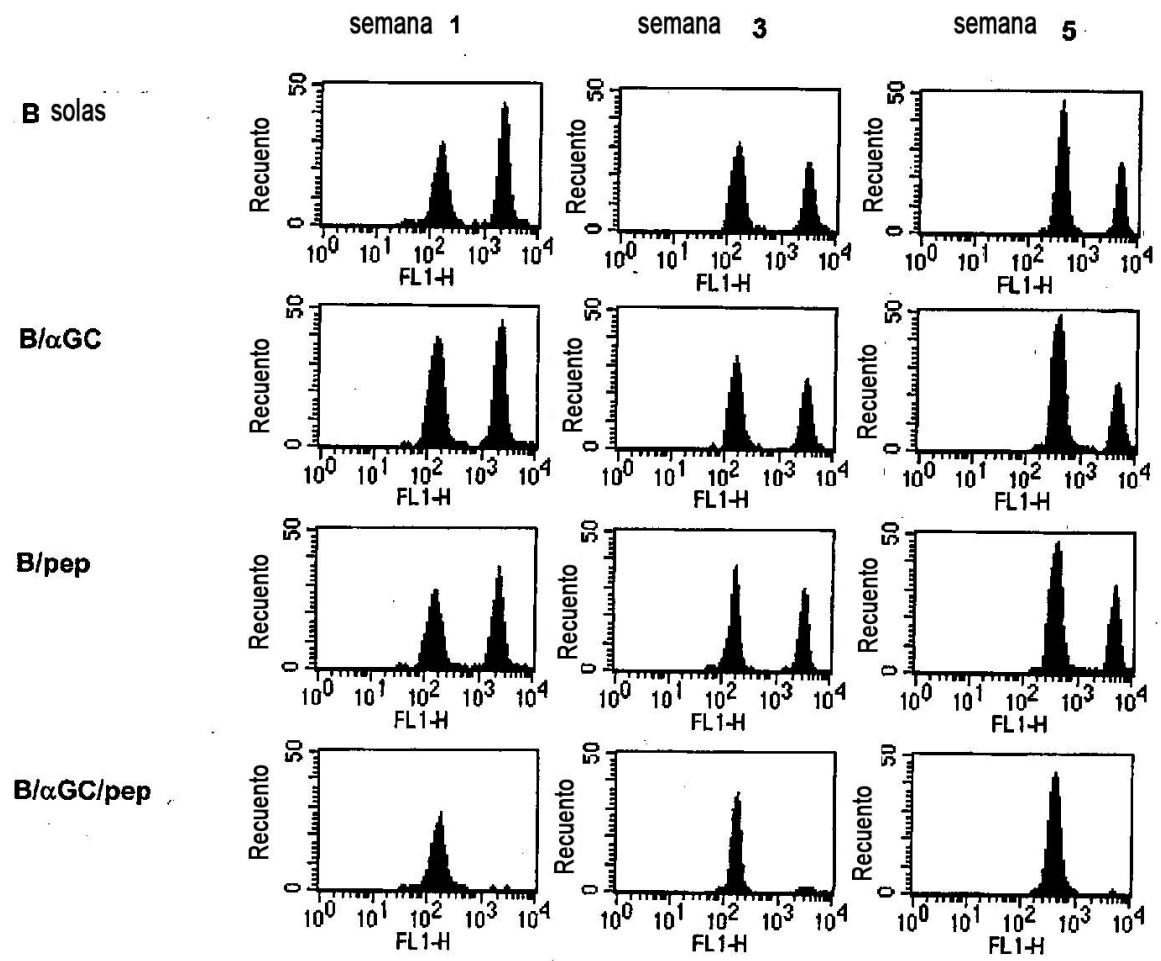
[Fig. 3]



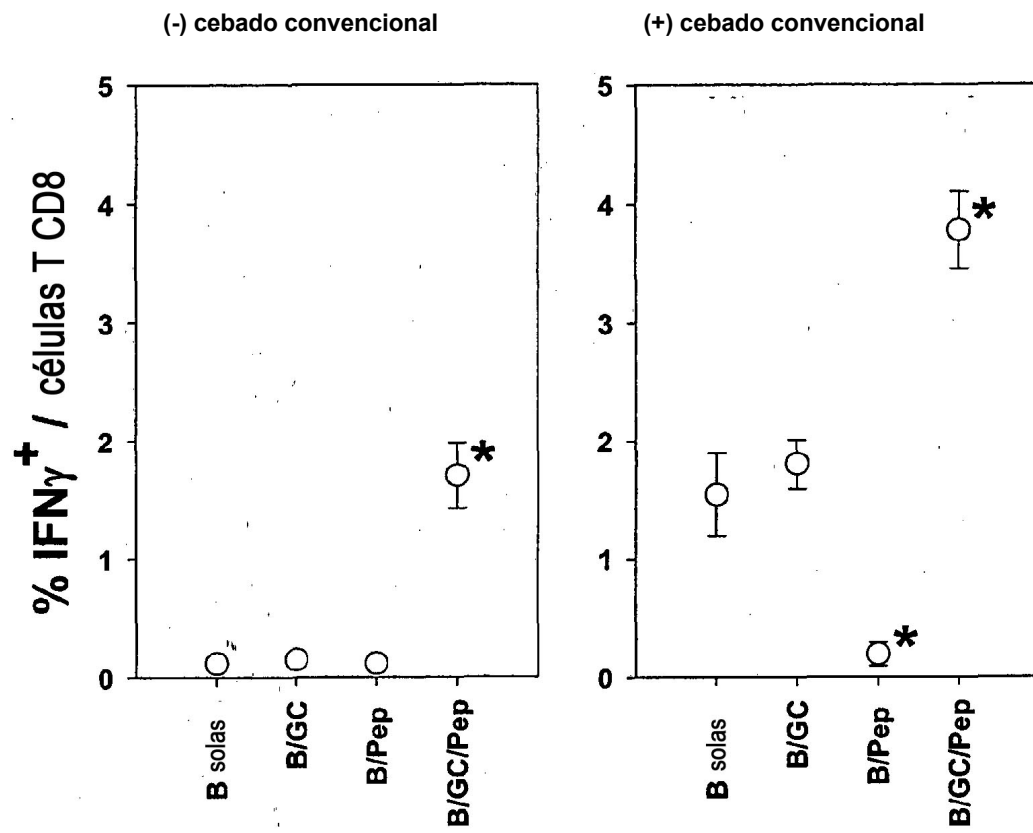
[Fig. 4]



[Fig. 5]

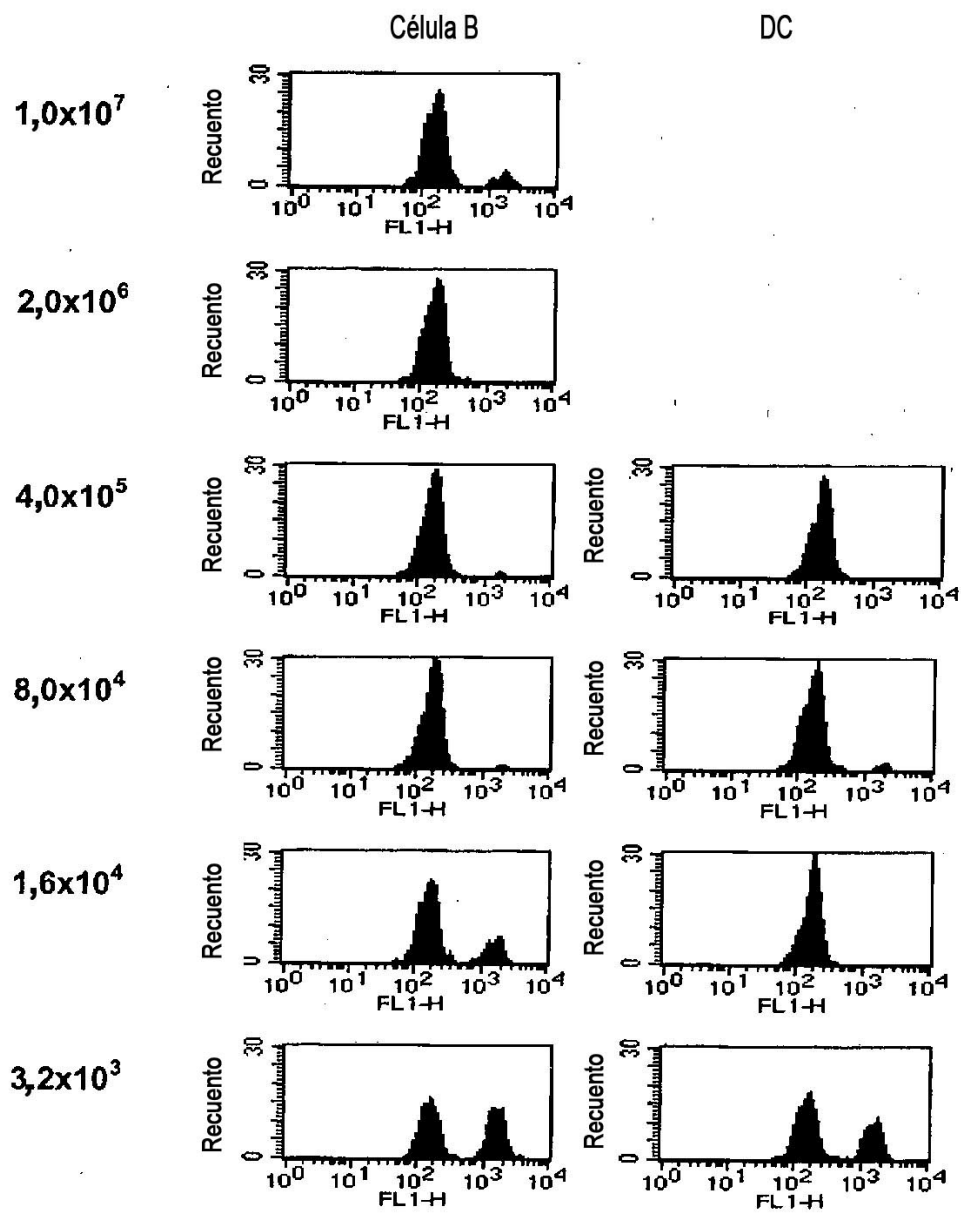


[Fig. 6]



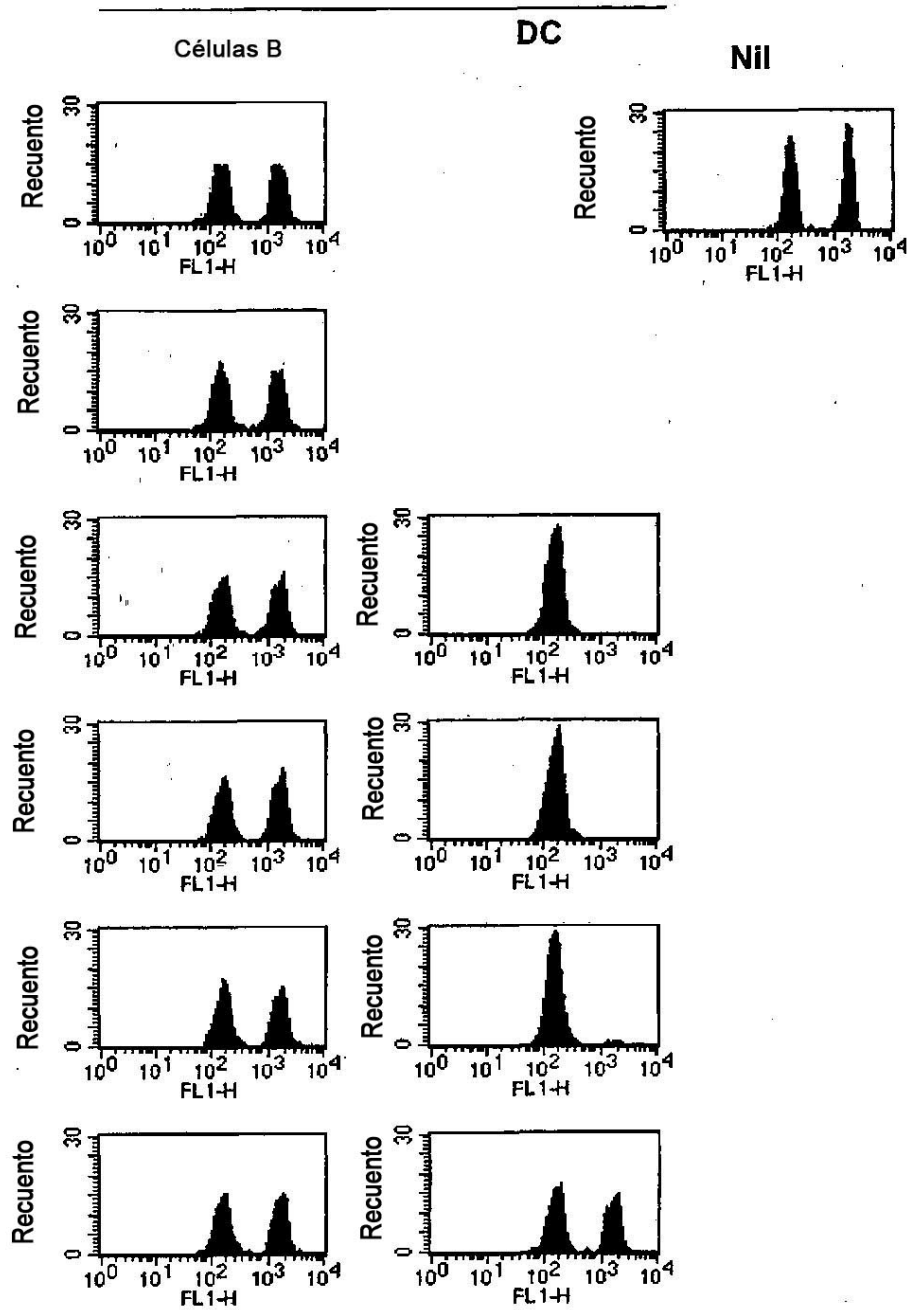
[Fig. 7]

Sometidas a pulso con α GC + péptido



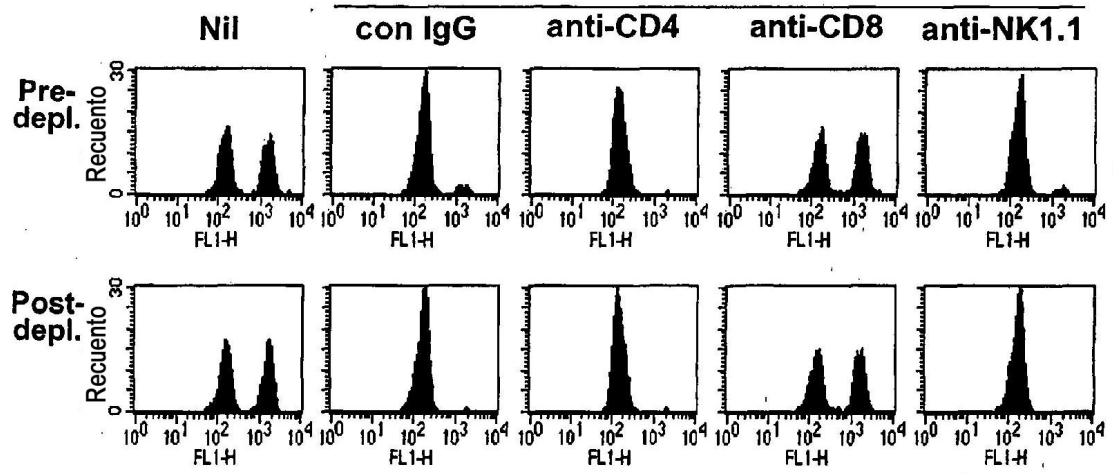
[Fig. 8]

Sometidas a pulso con vehículo + péptido

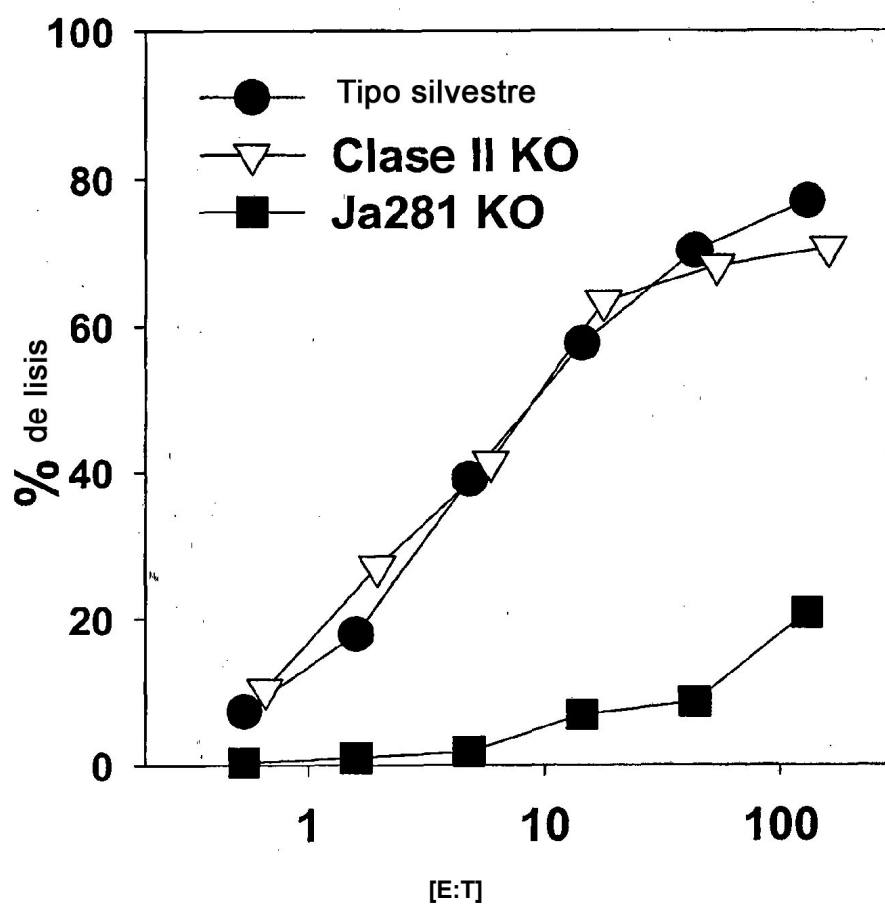


[Fig. 9]

B/ α GC/pep

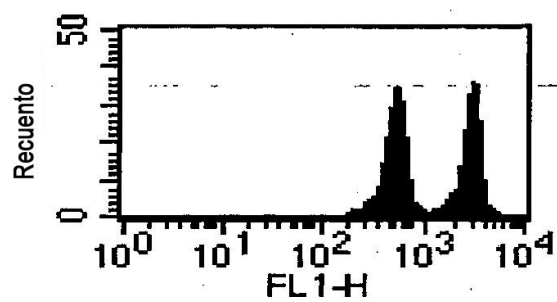


[Fig. 10]

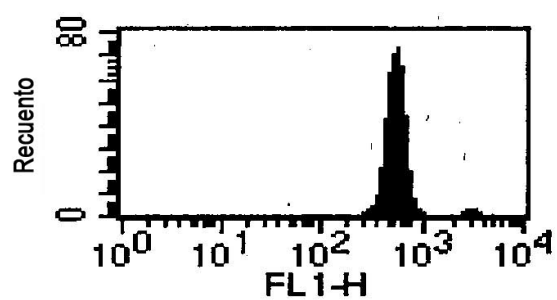


[Fig. 11]

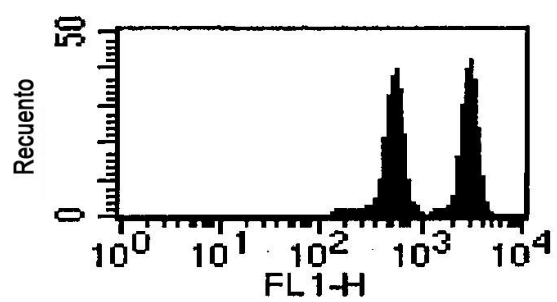
NII



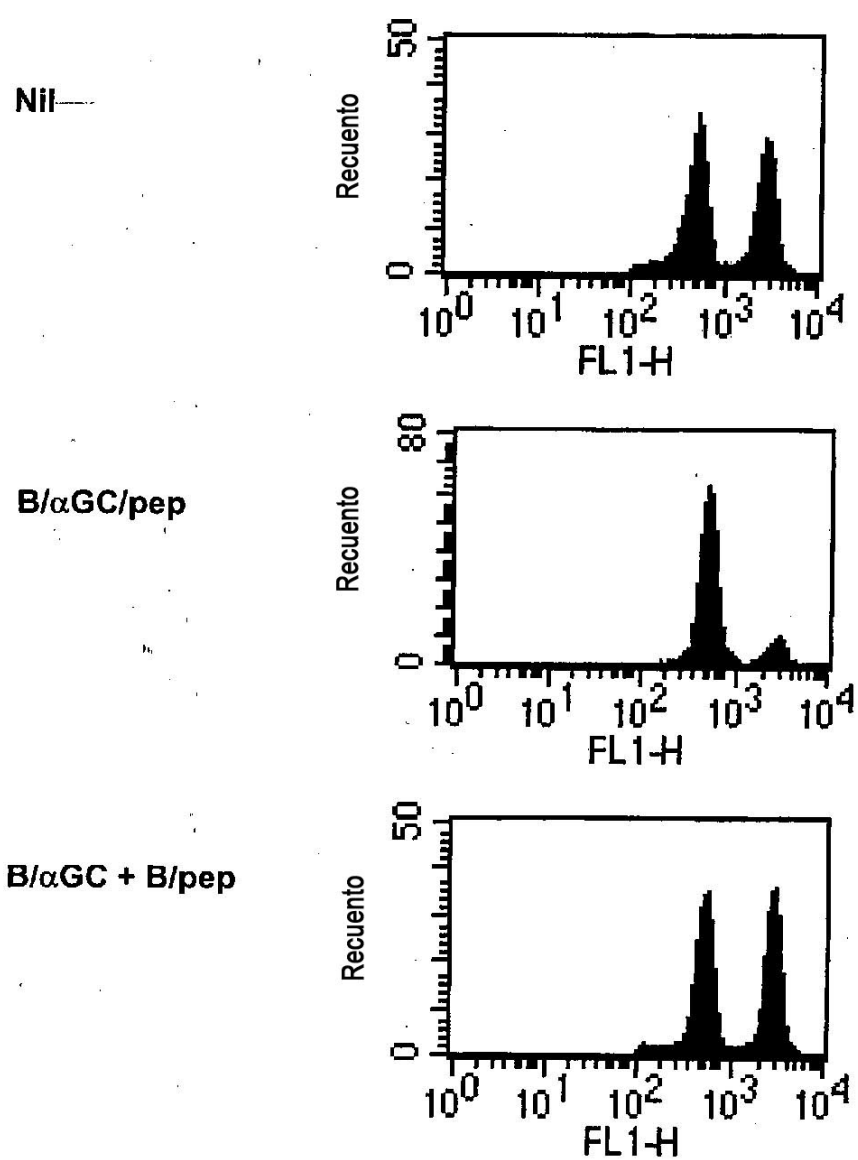
tipo silvestre → tipo silvestre



bm1 → wt

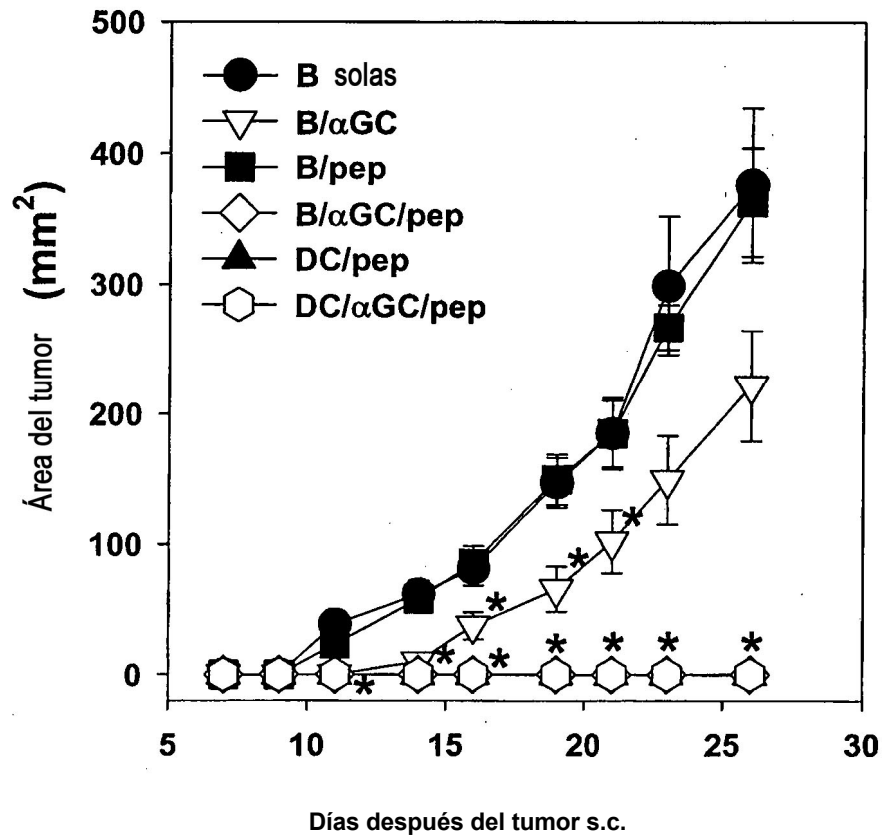


[Fig. 12]



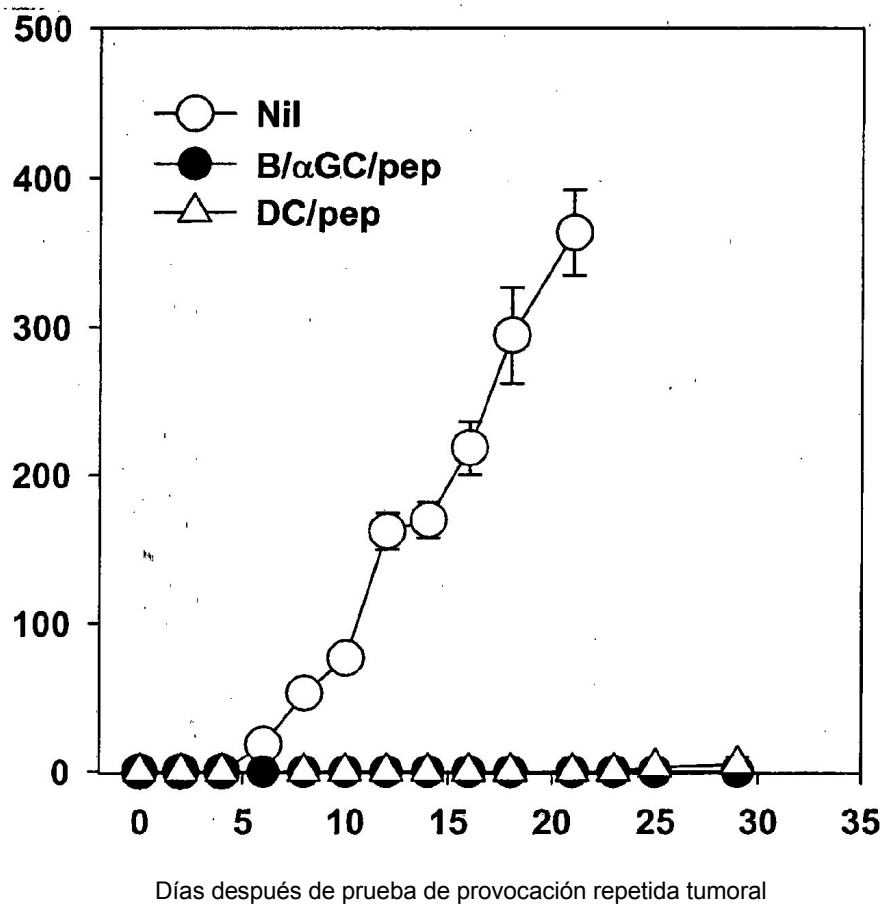
[Fig. 13]

Modelo profiláctico



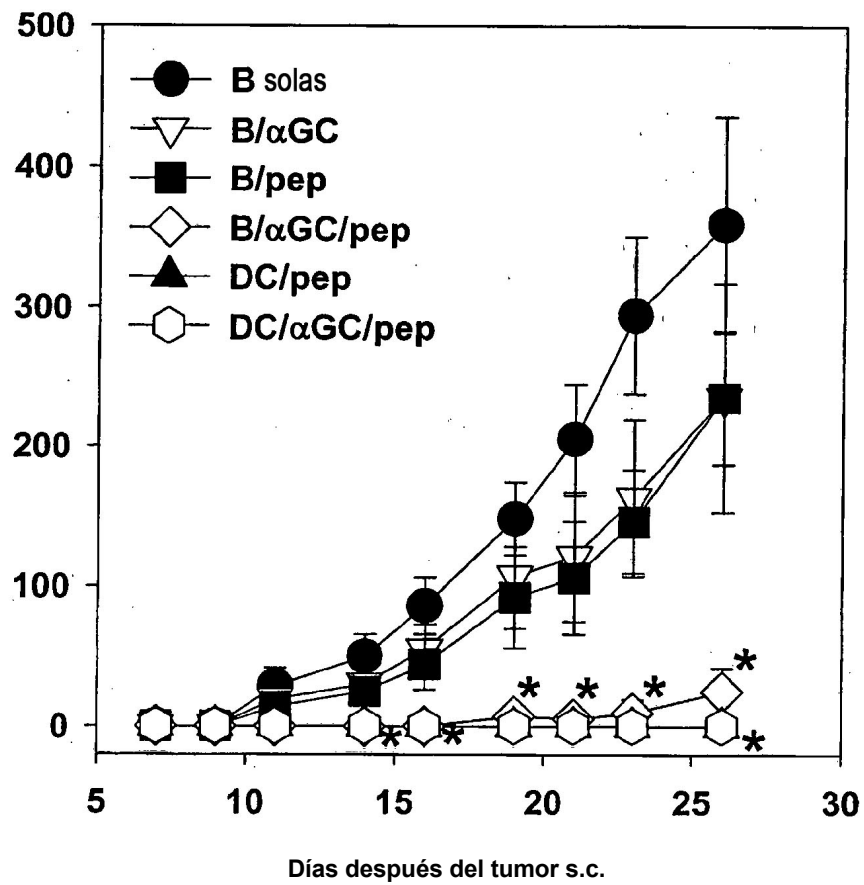
[Fig. 14]

Prueba de provocación repetida tumoral



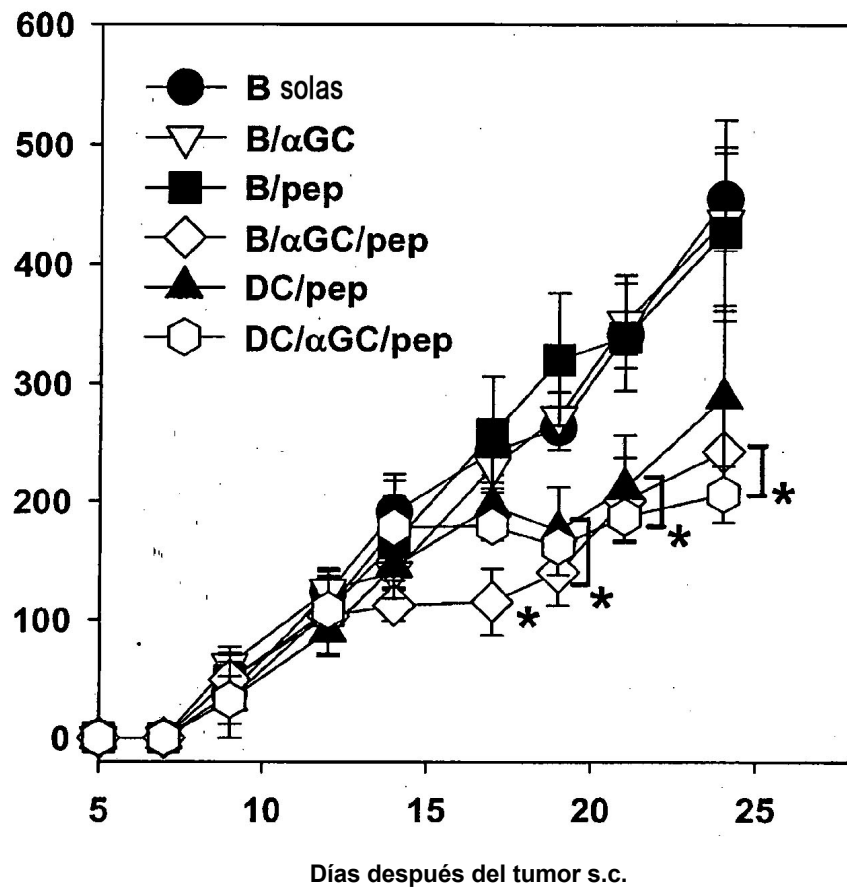
[Fig. 15]

Modelo terapéutico-día 1

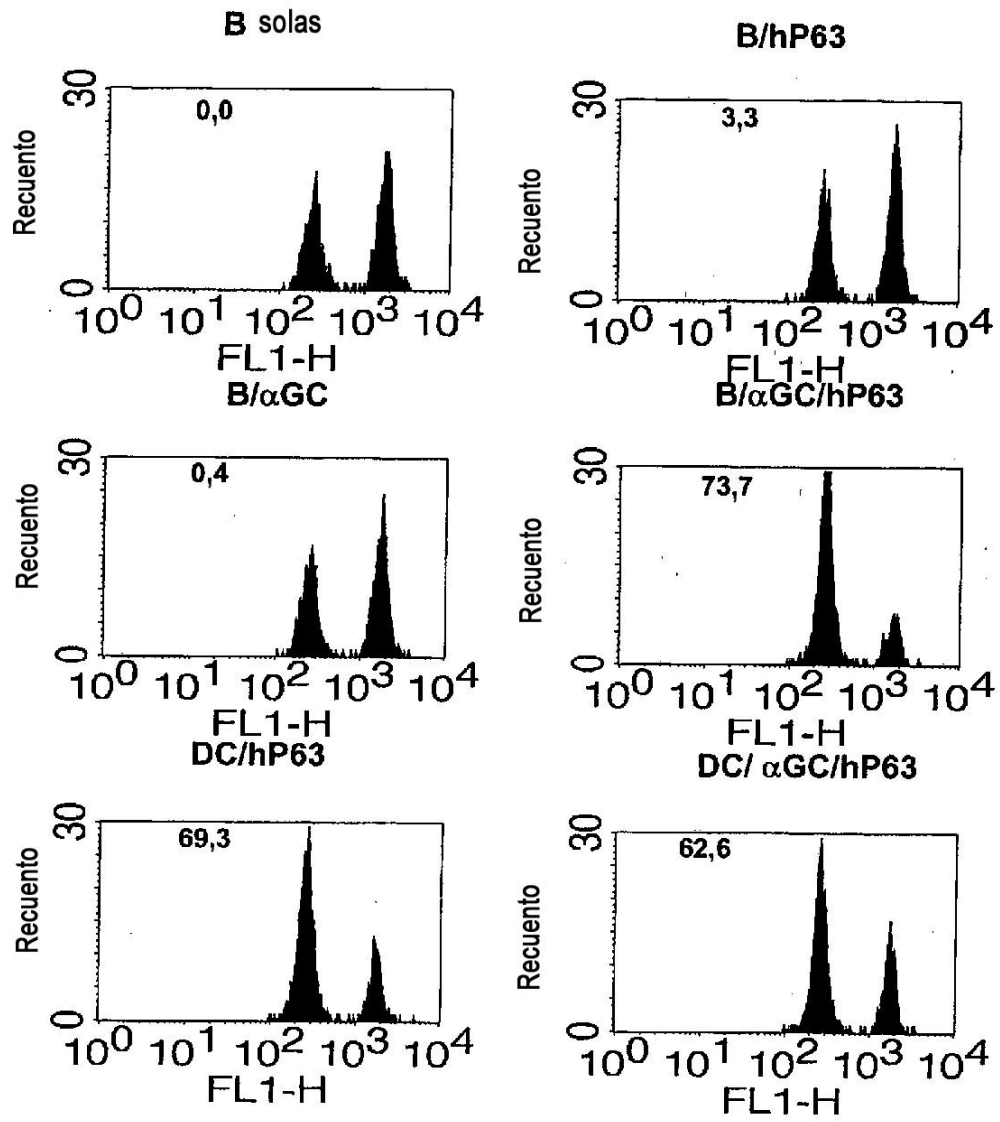


[Fig. 16]

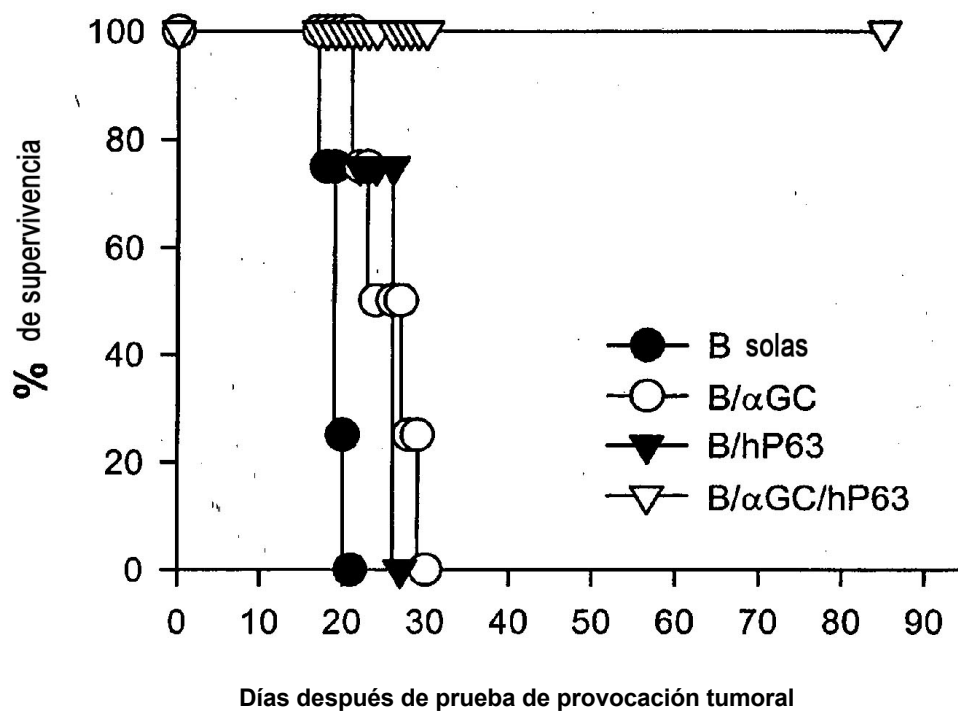
Modelo terapéutico-día 9



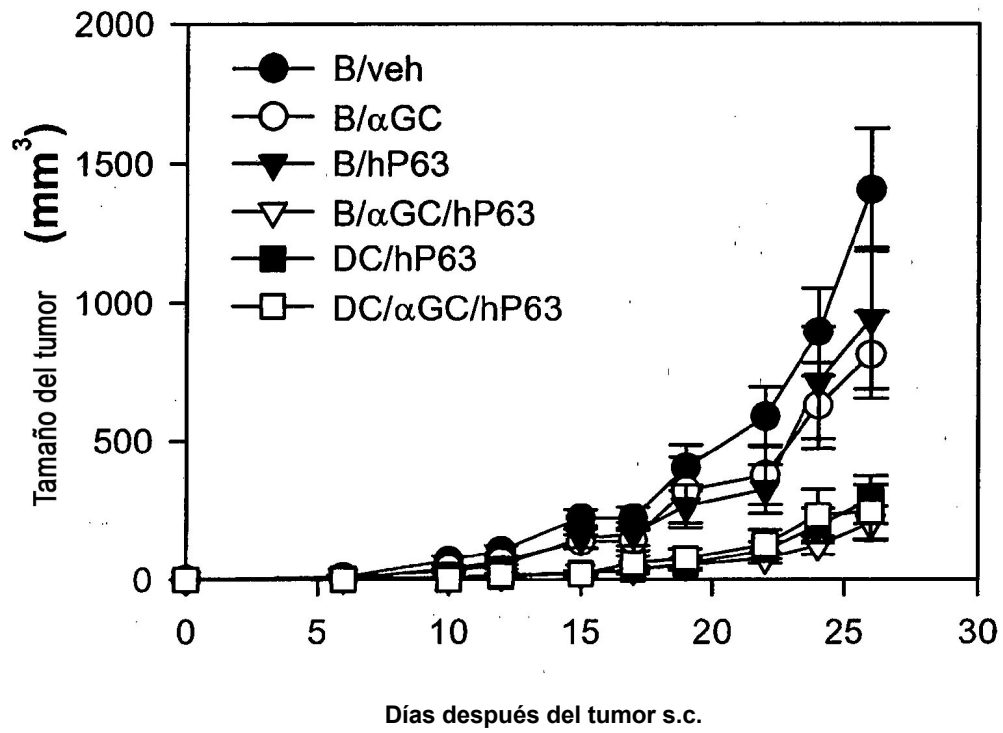
[Fig. 17]



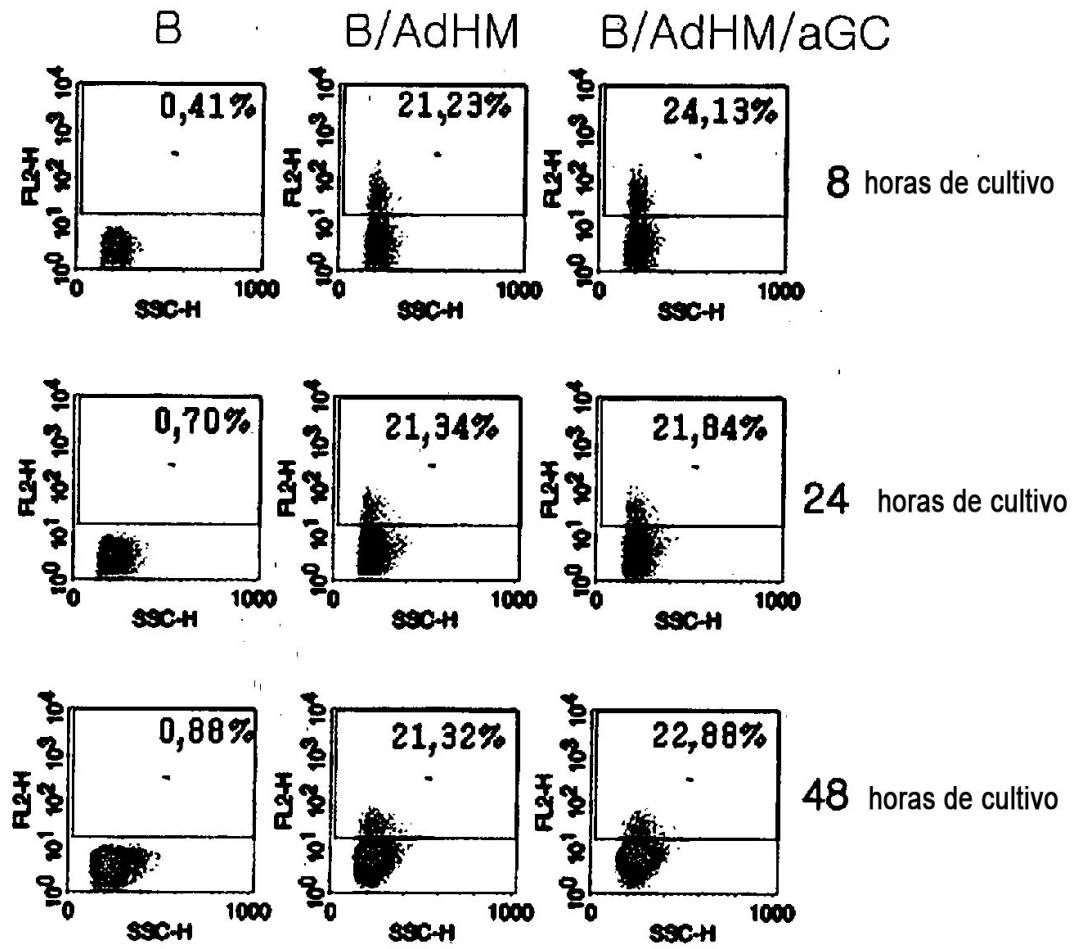
[Fig. 18]



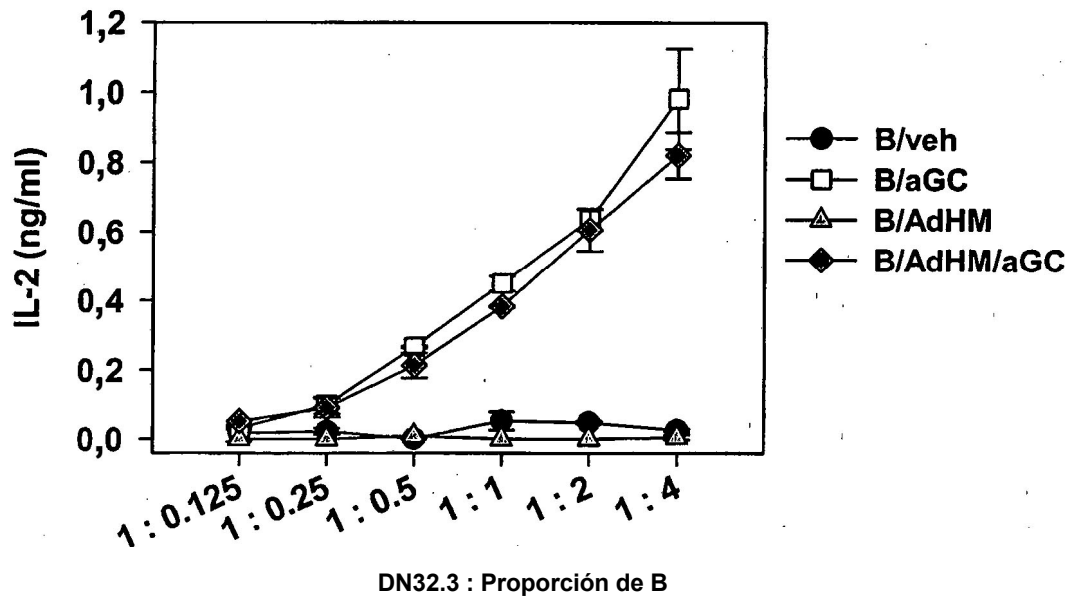
[Fig. 19]



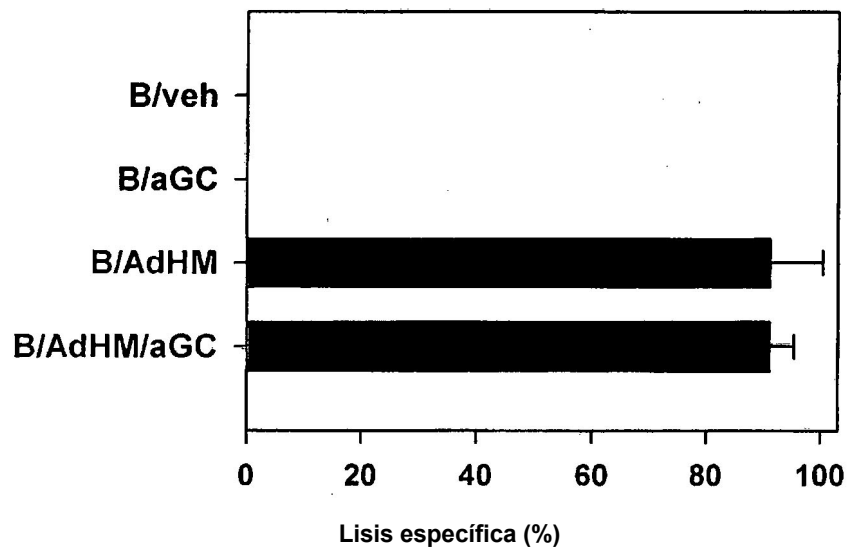
[Fig. 20]



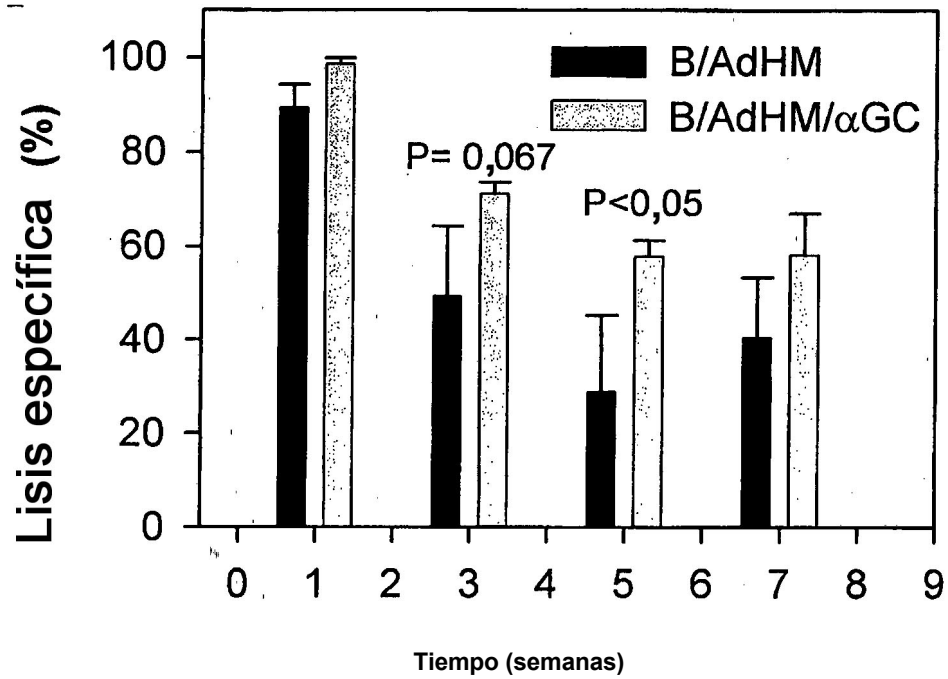
[Fig. 21]



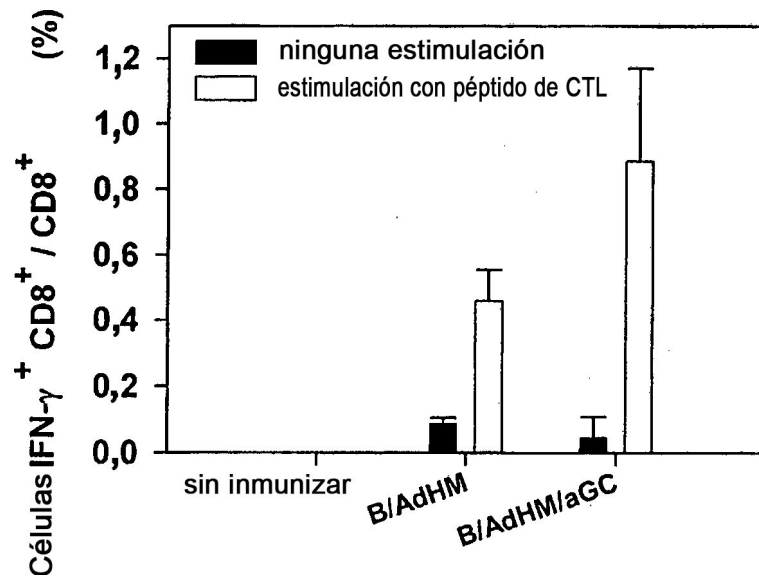
[Fig. 22]



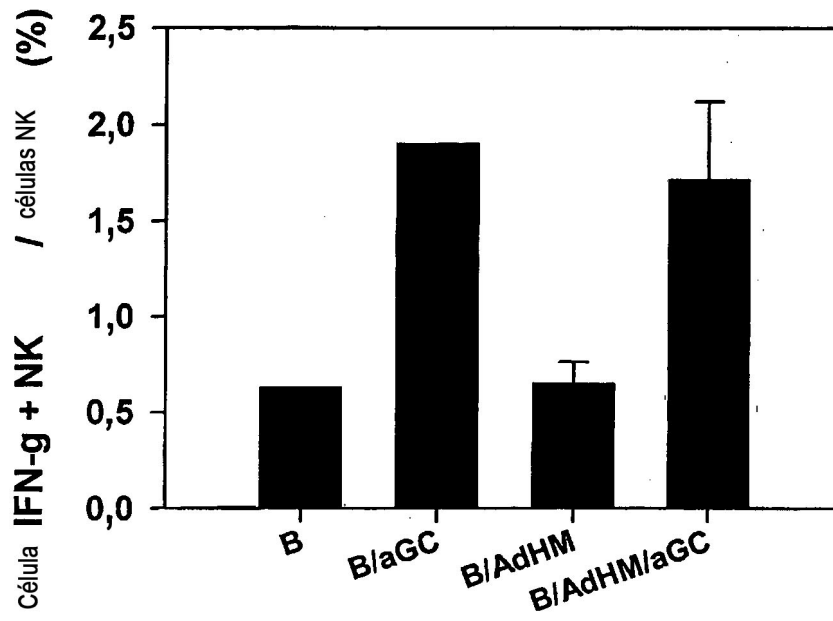
[Fig. 23]



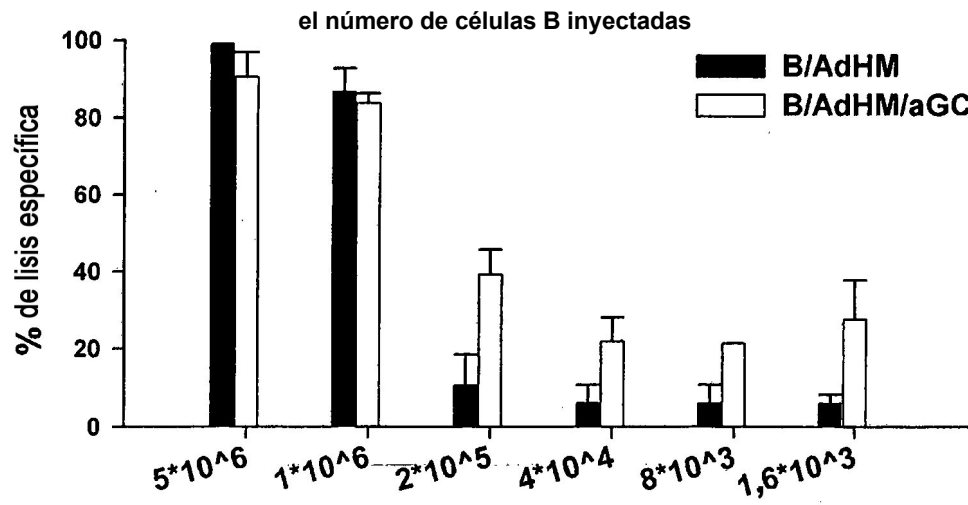
[Fig. 24]



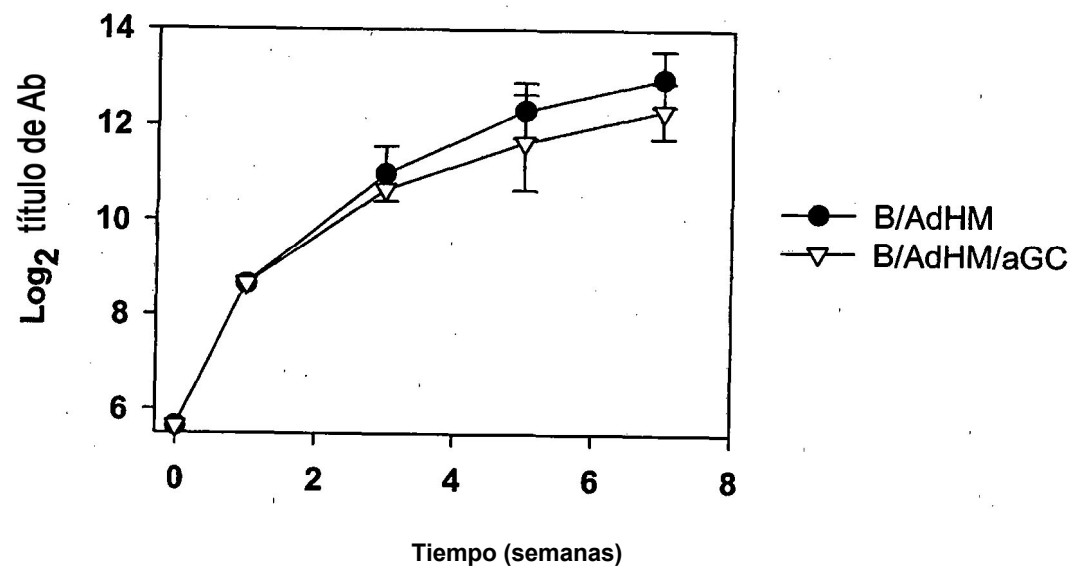
[Fig. 25]



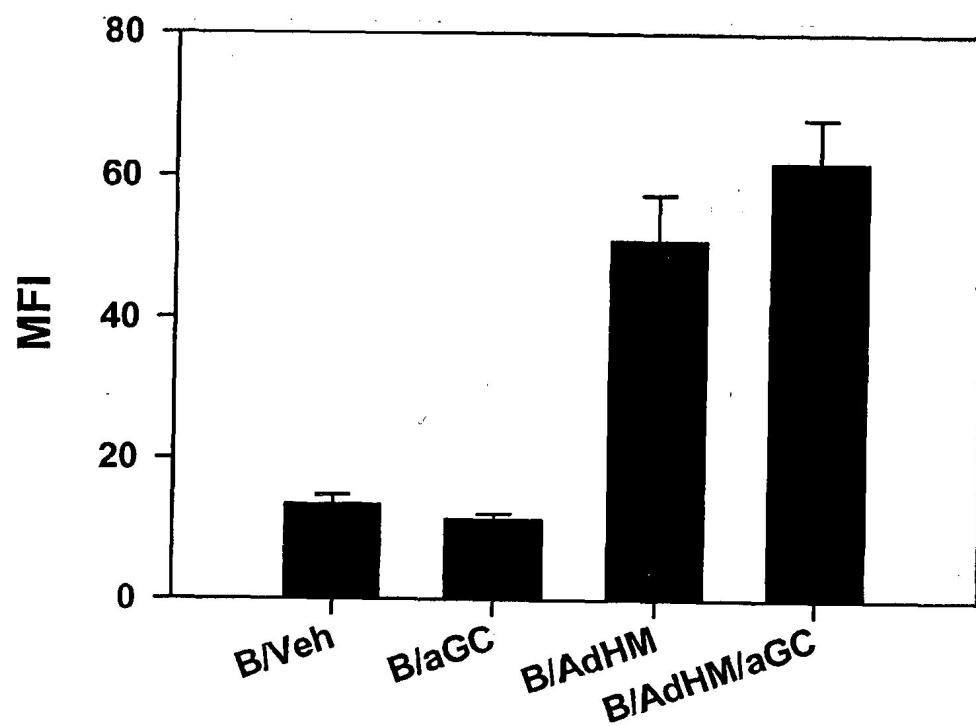
[Fig. 26]



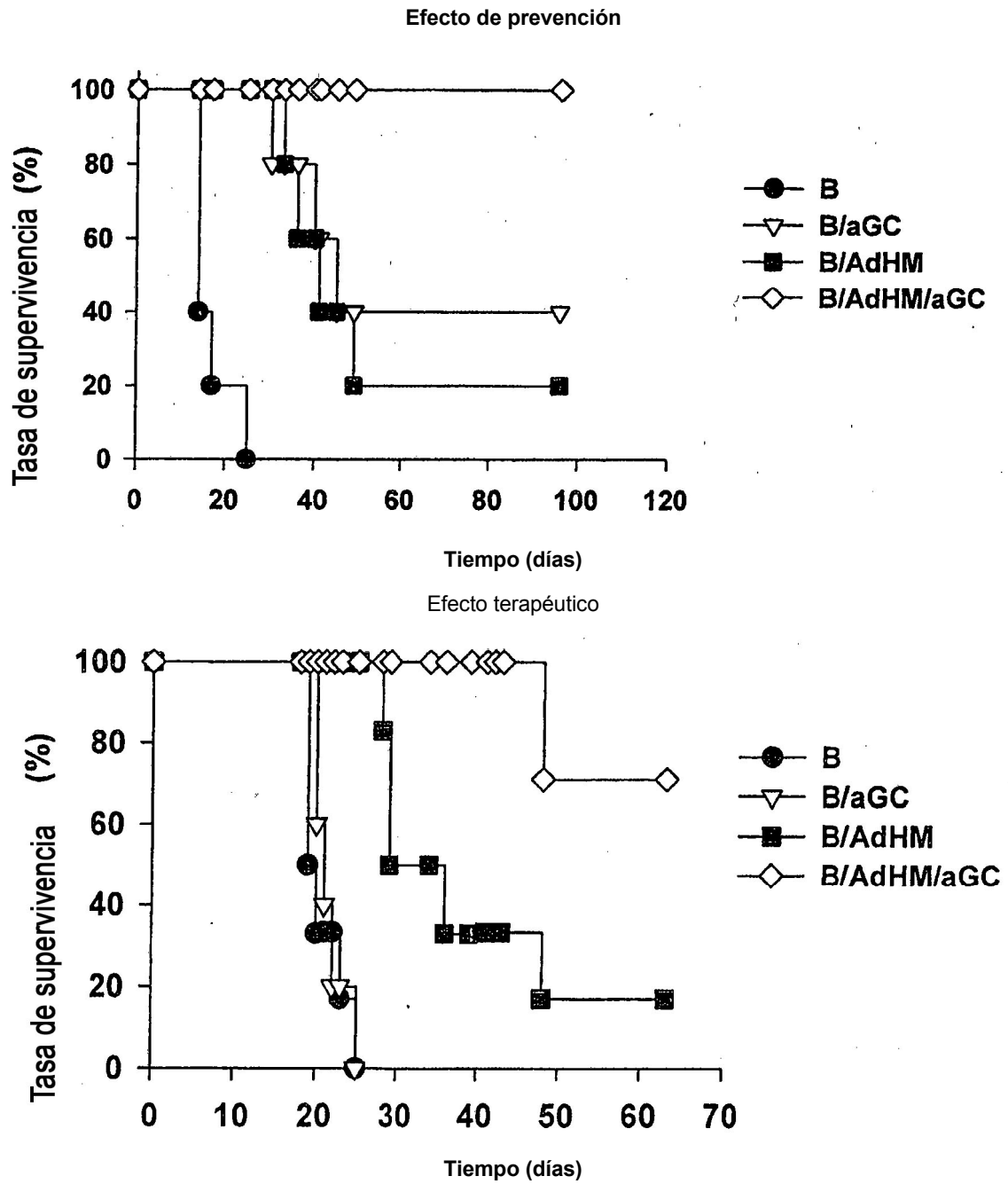
[Fig. 27]



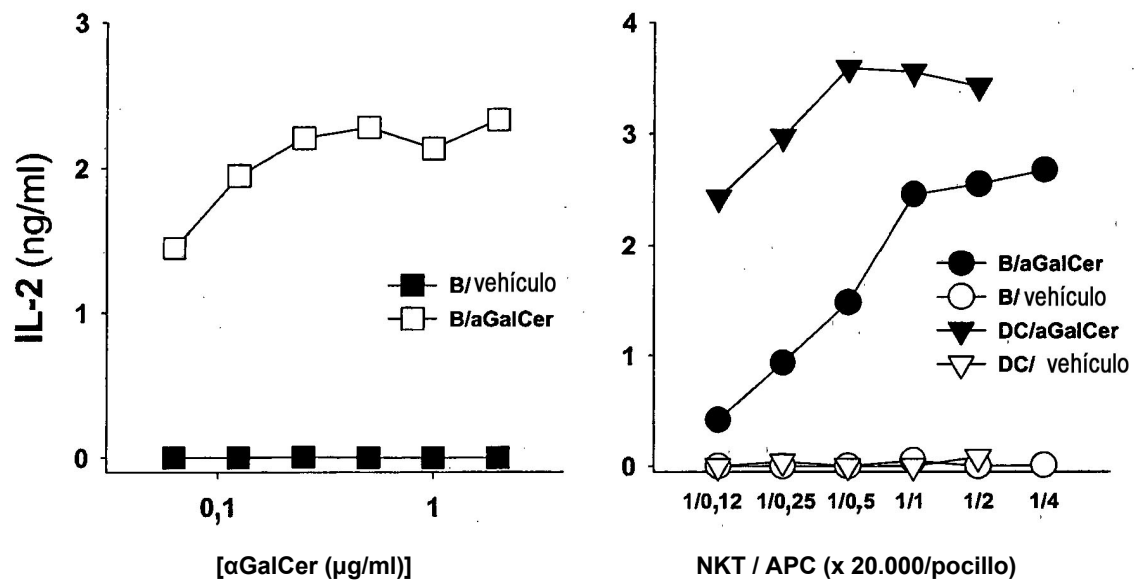
[Fig. 28]



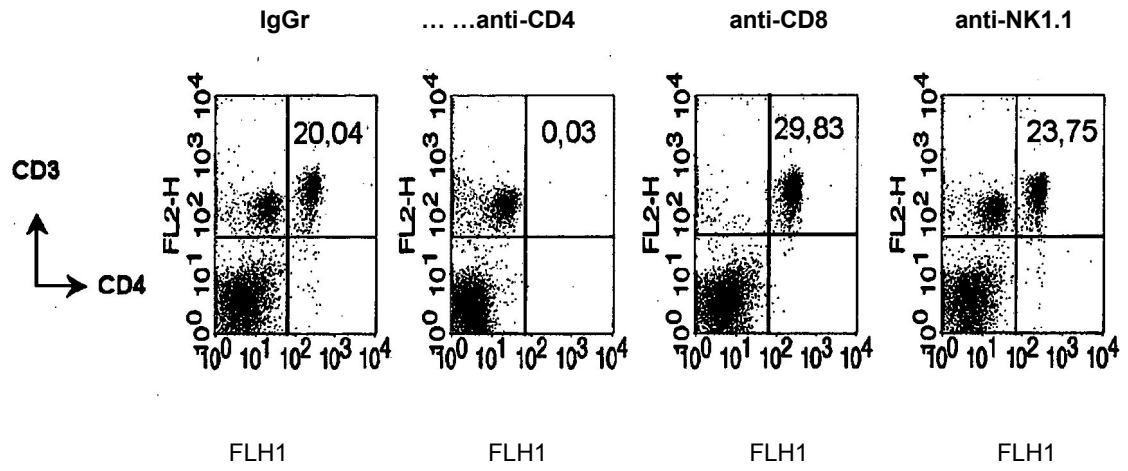
[Fig. 29]



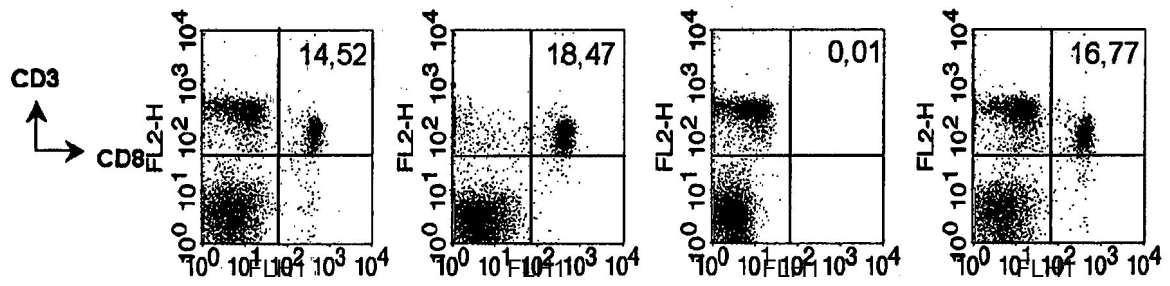
[Fig. 30]



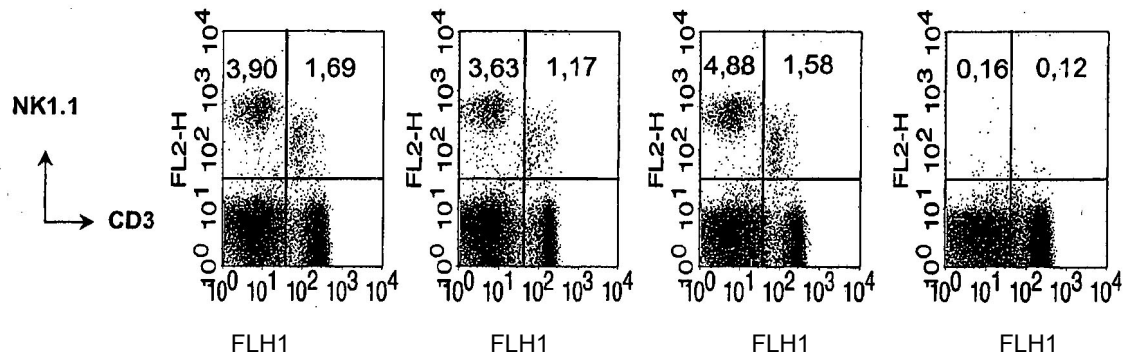
[Fig. 31]



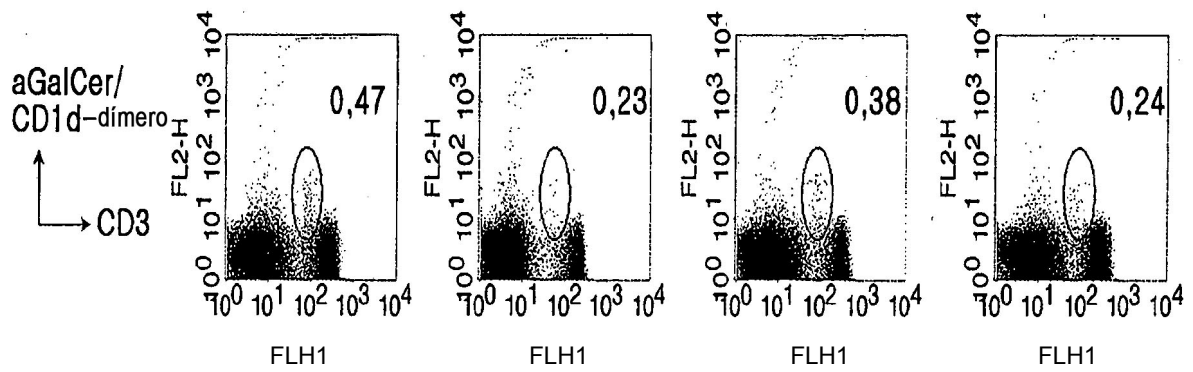
[Fig. 32]



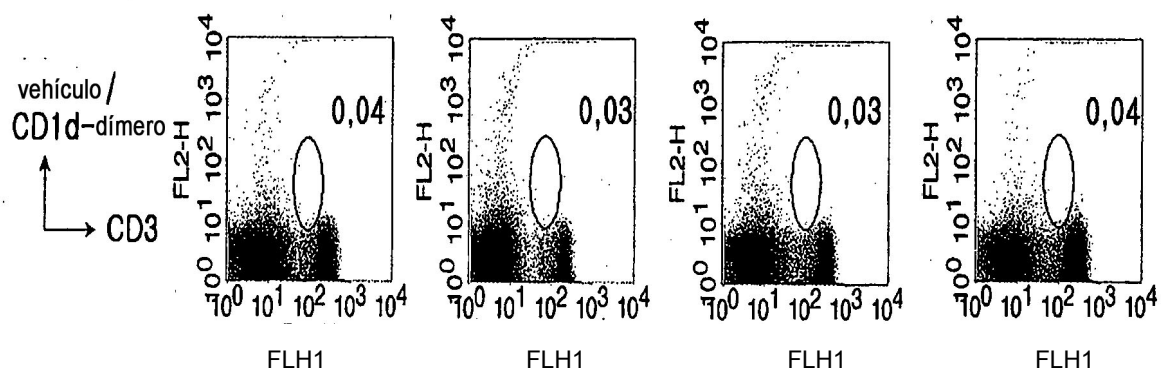
[Fig. 33]



[Fig. 34]



[Fig. 35]



[Fig. 36]

