

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 959**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C07K 14/31** (2006.01)  
**C07K 14/715** (2006.01)  
**C07K 16/32** (2006.01)  
**C12N 5/07** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2007 PCT/KR2007/006057**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2009 WO09066824**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2007 E 07834349 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2227253**

54 Título: **Vacuna que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) que se cargan con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno**

30 Prioridad:

**19.11.2007 KR 20070118066**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.11.2017**

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;  
KO, HYUN-JEONG;  
LEE, JUNG-MI y  
KIM, YEON-JEONG**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

ES 2 641 959 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 que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) que se cargan con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales y antígeno para la prevención y tratamiento de una enfermedad infecciosa o cáncer, más concretamente, una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica que comprende monocitos o IMC cargados con  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer), un tipo de glicolípido y un ligando de linfocitos T citolíticos naturales y antígeno.

**Estado de la técnica anterior**

15

Debido al avance de la ciencia médica, la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer está aumentando. Sin embargo, la tasa de desarrollo de cáncer también está aumentando de acuerdo con el cambio de los factores ambientales y el aumento de la esperanza de vida. Hasta la fecha, se han realizado muchos estudios sobre el tratamiento del cáncer y, en consecuencia, se han desarrollado nuevos fármacos y métodos de tratamiento para el cáncer, mejorando el efecto del tratamiento en los pacientes con cáncer. Sin embargo, a pesar del gran avance en los agentes de tratamiento del cáncer y de métodos tales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, el efecto del tratamiento sobre los tumores malignos es todavía limitado. Por otra parte, los efectos secundarios debidos a la citotoxicidad no específica y la recidiva del cáncer son todavía problemas no resueltos. Para superar los problemas anteriores, se ha probado activamente y se está desarrollando un nuevo método de tratamiento como la inmunoterapia. La inmunoterapia tiene la ventaja de que reduce los efectos secundarios causados por la toxicidad sistémica mediante la inducción de la toxicidad específica de tumor y mejora el método de tratamiento convencional del cáncer mediante el establecimiento de una respuesta de memoria positiva frente al antígeno del tumor.

La vacuna celular contra el cáncer que utiliza células presentadoras de antígeno puede activar los linfocitos T CD8+ y los linfocitos T CD4+ de manera efectiva, dando como resultado un efecto excelente contra el cáncer. Las células utilizadas con mayor frecuencia para la vacuna con células presentadoras de antígeno son las células dendríticas, las cuales captan el antígeno captación y lo presentan a las células efectoras, junto con la señal coestimuladora, de modo que las células dendríticas pueden activar las células efectoras e inducir respuestas inmunitarias fuertes. El agente inmunoterapéutico celular que utiliza células dendríticas se prepara y se trata a un paciente mediante las siguientes etapas; separación de las células dendríticas o monocitos, los precursores de las células dendríticas, de la médula ósea o de la sangre periférica de un paciente; proliferación y diferenciación de las mismas; introducción de un antígeno y administración de las células al paciente. Las células dendríticas administradas presentan un antígeno específico a los linfocitos T y de ese modo activan los linfocitos T para inducir respuestas inmunitarias específicas de antígeno eficaces. A pesar de tales ventajas, el desarrollo del agente inmunoterapéutico celular utilizando células dendríticas es todavía limitado debido al pequeño número de células dendríticas que existen en la sangre periférica y en los tejidos linfoides y a la dificultad en el aislamiento de las células dendríticas y a que podría requerirse el cultivo ex-vivo durante varios días cuando las células se diferencian a partir de monocitos. Por lo tanto, se requiere desarrollar un agente inmunoterapéutico celular mejorado alternativo.

Se sabe que los linfocitos T citolíticos naturales invariantes (linfocitos  $\gamma$ NKT) juegan un papel crucial en diversas respuestas inmunitarias y en inmunopatología en su conjunto. La activación mediada por ligando de los linfocitos  $\gamma$ NKT conduce a la activación de los linfocitos T, B y NK, así como de las células dendríticas. La inyección de alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer), un ligando  $\gamma$ NKT, genera inmunidad antitumoral a través de la activación de los linfocitos NK y T (Moodycliffe AM *et al.*, *Nat Immunol* 1:521- 525, 2000). Los linfocitos  $\gamma$ NKT gobiernan la respuesta a los auto-antígenos y antígenos exógenos y determinan si se inducirá una respuesta autoinmunitaria o inmunitaria (Kronenberg M, *Annu Rev Immunol* 23:877-900, 2005; Park SH & Bendelac A, *Nature* 406:788-792, 2000).

La alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) es un tipo de glicolípido extraído de una esponja marina, que es el ligando del linfocito T citolítico natural (linfocito NKT) que tiene el receptor de linfocitos T (TCR) V $\alpha$ 14+ y que se presenta a los linfocitos NKT por la molécula CD1d de las células presentadoras de antígeno (APC) (Kawano *et al.*, *Science* 278:1626, 1997). La activación de los linfocitos T citolíticos naturales por el ligando de linfocitos T citolíticos naturales conduce a la producción en masa de citocinas tales como IFN- $\gamma$  e IL-4, mediante las que se puede controlar la respuesta inmunitaria contra una enfermedad o infección específica (Chen *et al.*, *J Immunol* 159:2240, 1997; Wilson *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10913, 2003).

60

Al contrario de lo que sucede en las personas sanas, el número de células mieloides inmaduras (IMC) aumentan en los pacientes con cáncer, lo que incluye macrófagos inmaduros, granulocitos, células dendríticas inmaduras, monocitos y células mieloides en fase de diferenciación temprana. Un nivel significativamente mayor de IMC también se detectó en la sangre, la médula ósea, el bazo y los tejidos tumorales de un modelo animal trasplantado con células tumorales. En particular, en un modelo de ratón, se observan las expresiones de CD11b y Gr-1 en la

65

superficie de las IMC. El nivel de células CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> en sangre de ratón sano y bazo es de tan solo el 4 %, debido a que las células CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> son los precursores de macrófagos y células dendríticas, de modo que pueden diferenciarse en macrófagos maduros y células dendríticas si se proporciona la citocina adecuada. En pacientes con cáncer, sin embargo, las células CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> no se diferencian más y se acumulan a causa de factores derivados del tumor (IL-6, IL-10, VEGF, GM-CSF, etc.). Dado que las IMC se acumulan en un nivel elevado en sangre de un paciente con cáncer, es fácil de obtener una gran cantidad de las células. Además, cuando se aíslan los monocitos para producir la vacuna de células dendríticas, es difícil obtener un gran número de IMC. Se sabe que las IMC, proliferadas y acumuladas en pacientes con cáncer y animales trasplantados con tumor, inhiben el sistema inmunitario. Sin embargo, existen grandes expectativas para mejorar la inmunogenicidad dando un estímulo adecuado.

Se sabe que los monocitos pueden presentar antígenos glicolípidos sintéticos a través de Cd1d para activar los linfocitos citolíticos T naturales (Spada F M *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 30:3468-3477, 2000). Chang D H *et al.*, *J. Exp. Med.* 201:1503-1517, divulga que la activación de linfocitos citolíticos T naturales podría ayudar a reforzar la inmunidad adaptativa mediada por linfocitos T *in vivo*.

Recientemente, se ha demostrado que la inmunogenicidad de las células dendríticas aumenta mediante la activación de los linfocitos T citolíticos naturales (Kronenberg M *et al.*, *Annu Rev Immunol.* 23:877-900, 2005; Park SH *et al.*, *Nature* 406:788-792, 2000). Teniendo en cuenta esto, los presentes inventores activaron primero linfocitos T citolíticos naturales mediante la presentación del ligando de linfocitos T citolíticos naturales a los linfocitos B e indujeron aún más las respuestas de linfocitos T citotóxicos contra el antígeno cargado en los linfocitos B aumentando la inmunogenicidad de los linfocitos B con la ayuda de los linfocitos T citolíticos naturales, seguido por la confirmación de que el efecto era similar al de la vacuna de células dendríticas (Chung Y *et al.*, *Cancer Res* 66(13):6843-6850, 2006). Sin embargo, no hay ningún trabajo que afirme que pudiera observarse el aumento de la inmunogenicidad por la activación de los linfocitos T citolíticos naturales no solo en los linfocitos B, sino también en los monocitos, los precursores de las células dendríticas, o en las células mieloides inmaduras (IMC). Por lo tanto, con el fin de investigar si los monocitos y las IMC pueden ser utilizadas eficazmente para la vacuna celular contra el cáncer, los presentes inventores cargaron tanto el antígeno peptídico como la  $\alpha$ GalCer en monocitos o IMC o cargaron  $\alpha$ GalCer en monocitos o IMC que se transdujeron con adenovirus que expresa un antígeno y que se administró a continuación a un sujeto. Y aún más, los presentes inventores completaron esta invención confirmando que la inmunización con vacuna a base de monocitos o IMC inducía las respuestas inmunitarias específicas del antígeno y efectos antineoplásicos significativos.

## 35 Divulgación

### Problema técnico

Es un objeto de la presente invención proporcionar una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales, en particular  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) y un antígeno, que puede activar linfocitos T citolíticos naturales e inducir respuestas inmunitarias específicas de antígeno.

### Solución técnica

Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno, en la que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se carga en Cd1d y el antígeno se carga en moléculas MHC, en la que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se selecciona del grupo que consiste en  $\alpha$ -galactosilceramida,  $\alpha$ -glucuronosilceramida, fosfatidilinositol tetramanósido, isoglobotrihexosilceramida, gangliósido GD3, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, sulfátido,  $\beta$ -galactosilceramida, lipofosfoglicano, glicoinositol fosfolípido, derivados de la  $\alpha$ -galactosilceramida, galactosilceramida  $\beta$ -anomérica y galactosilceramida  $\alpha$ -anomérica y antígeno lipídico bacteriano, en la que el antígeno se obtiene de patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos patógenos o de tumores y en la que la vacuna activa linfocitos T citotóxicos específicos de dicho antígeno.

La presente invención también proporciona un activador de linfocitos T citolíticos naturales que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) y un antígeno diana, en la que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se carga en Cd1d y el antígeno diana se carga en moléculas MHC, en la que el antígeno diana se obtiene de patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos patógenos o de tumores y en la que el activador de linfocitos T citolíticos naturales activa linfocitos T citotóxicos específicos de dicho antígeno diana.

La presente invención proporciona además un inductor de la respuesta citotóxica que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) y un antígeno diana, en la que el

ligando de linfocitos T citolíticos naturales se carga en Cd1d y el antígeno diana se carga en moléculas MHC, en la que el antígeno diana se obtiene de patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos patógenos o de tumores y en la que el inductor de la respuesta citotóxica activa linfocitos T citotóxicos específicos de dicho antígeno diana.

5 La presente invención también proporciona un uso de monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con un ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno para la fabricación de una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica para la inmunoterapia del cáncer, en la que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se carga en Cd1d y el antígeno se carga en moléculas MHC, en la que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se selecciona del grupo que consiste en  $\alpha$ -galactosilceramida,  $\alpha$ -glucuronosilceramida, fosfatidilinositol tetramanósido, isoglobotrihexosilceramida, gangliósido GD3, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, sulfátido,  $\beta$ -galactosilceramida, lipofosfoglicano, glicoinositol fosfolípido, derivados de la  $\alpha$ -galactosilceramida, galactosilceramida  $\beta$ -anomérica y galactosilceramida  $\alpha$ -anomérica y antígeno lipídico bacteriano, en el que el antígeno se obtiene de patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos patógenos o de tumores y en la que la vacuna activa linfocitos T citotóxicos específicos de dicho antígeno.

15 La presente invención también proporciona un uso de monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con un ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno para la fabricación de una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica para la prevención inmunitaria del cáncer, en la que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se carga en Cd1d y el antígeno se carga en moléculas MHC, en la que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se selecciona del grupo que consiste en  $\alpha$ -galactosilceramida,  $\alpha$ -glucuronosilceramida, fosfatidilinositol tetramanósido, isoglobotrihexosilceramida, gangliósido GD3, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, sulfátido,  $\beta$ -galactosilceramida, lipofosfoglicano, glicoinositol fosfolípido, derivados de la  $\alpha$ -galactosilceramida, galactosilceramida  $\beta$ -anomérica y galactosilceramida  $\alpha$ -anomérica y antígeno lipídico bacteriano, en la que el antígeno se obtiene de patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos patógenos o de tumores y en la que la vacuna activa linfocitos T específicos de dicho antígeno.

#### Efecto ventajoso

La composición de la presente invención, los monocitos o las células mieloides inmaduras (IMC), son más fáciles de aislar que las células dendríticas. La inmunización con monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales, en particular  $\alpha$ GalCer y un antígeno, no solo induce respuestas de linfocitos T citotóxicos a un nivel significativo, sino que también induce efectos preventivos y terapéuticos sobre los tumores malignos. Por lo tanto, la vacuna que comprende las células puede ser usada efectivamente como un agente preventivo y terapéutico para el cáncer. Además, la vacuna de la presente invención puede inducir respuestas inmunitarias incluso sin la ayuda de linfocitos T CD4+. Por lo tanto, se puede utilizar para inmunizar a un paciente infectado por el VIH que tiene inmunodeficiencia causada por la falta de linfocitos T CD4+.

#### Descripción de los dibujos

40 La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se entiende mejor con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Fig. 1 es un diagrama que ilustra el efecto antineoplásico de una vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y un antígeno peptídico.

45 La Fig. 2 es un diagrama que ilustra el efecto antineoplásico de una vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y transducidos con adenovirus que expresan un antígeno.

La Fig. 3 es un diagrama que ilustra el efecto antineoplásico de una vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y un antígeno peptídico.

La Fig. 4 es un diagrama que ilustra el efecto antineoplásico de una vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y transducidas con adenovirus que expresan un antígeno.

55 La Fig. 5 es un diagrama que ilustra la confirmación de que las células inmunitarias tienen efecto antineoplásico debido a la vacuna IMC:

- a: eliminación de linfocitos NK y,
- b: eliminación de linfocitos CD4 o CD8.

60 La Fig. 6 es un diagrama que ilustra la actividad de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico inducida por la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y un antígeno peptídico.

La Fig. 7 es un diagrama que ilustra la actividad dependiente de la dosis de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico inducida por la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y un antígeno peptídico.

La Fig. 8 es un diagrama que ilustra la actividad de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico inducida por la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y transducidos con adenovirus que expresan un antígeno.

- 5 La Fig. 9 es un diagrama que ilustra la actividad dependiente de la dosis de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico inducida por la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y un antígeno peptídico.

La Fig. 10 es un diagrama que ilustra la actividad de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico inducida por la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y un antígeno peptídico.

10

La Fig. 11 es un diagrama que ilustra la actividad dependiente de la dosis de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico inducida por la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y transducidas con adenovirus que expresan un antígeno.

- 15 La Fig. 12 es un diagrama que ilustra la reacción de producción de anticuerpos específicos del antígeno inducida por monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y transducidos con adenovirus que expresan un antígeno.

La Fig. 13 es un diagrama que ilustra la actividad de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico inducida por la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y un antígeno peptídico OT-1.

20

### Mejor modo

En lo sucesivo, la presente invención se describe en detalle.

- 25 Puesto que ya estaba bien establecido que las células dendríticas (DC) cargadas con alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) activan los linfocitos T citolíticos naturales invariantes (iNKT) (van der Vliet HJ *et al.*, *J Immunol Methods* 1, 247 (1-2):61-72, 2001), los presentes inventores examinaron si los monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer tendrían el mismo efecto.

- 30 Los monocitos son células precursoras originados en la médula ósea y que tienen potencial de diferenciación en células dendríticas (DC) o macrófagos. Los presentes inventores aislaron monocitos que expresan CD11b de un ratón y prepararon una vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y un antígeno peptídico. El efecto antineoplásico de la vacuna se investigó mediante el uso de células HER-2/CT26 (Penichet ML *et al.* *Lab Anim Sci* 49:179-88, 1999) que expresan el antígeno asociado al tumor, Her-2/neu. Como resultado, se confirmó que la  
 35 vacuna tenía un efecto antineoplásico significativo (ver Fig. 1). Para confirmar si la vacuna podría inducir respuestas inmunitarias citotóxicas mediante la activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico, se realizó un ensayo de CTL *in vivo*. Como resultado, no se observó respuesta inmunitaria citotóxica capaz de destruir una diana a un alto nivel (ver Fig. 6). De hecho, solo  $1 \times 10^6$  células fueron suficientes para inducir la respuesta inmunitaria citotóxica efectiva (ver Fig. 7).

40

La vacuna de células cargadas con un antígeno peptídico, sin embargo, está limitada en el uso clínico a un haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Es decir, la vacuna no se puede utilizar en general y puede presentar solamente un único epítipo. A diferencia de la vacuna anterior, la vacuna que usa un virus que expresa un antígeno no se limita a un haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad y se puede aplicar a cada uno, ya

- 45 que ofrece un antígeno completo y, por lo tanto, esta vacuna induce no solo respuestas inmunitarias celulares, sino también respuestas inmunitarias humorales. Por lo tanto, los presentes inventores prepararon una vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y transducidos con adenovirus que expresan un antígeno e investigaron su efecto antineoplásico. Como resultado, el ratón trasplantado con tumor y tratado con la vacuna de monocitos mostró una prolongación significativa del período de supervivencia, lo que sugiere que la vacuna tiene un excelente efecto

- 50 antineoplásico en las células tumorales (ver Fig. 2). Para investigar si la vacuna podría inducir una respuesta inmunitaria citotóxica mediante la activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico, se llevó a cabo un ensayo de CTL *in vivo*. Como resultado, solo fueron necesarias  $2 \times 10^6$  células para inducir la respuesta inmunitaria citotóxica eficaz (ver Fig. 8). En comparación con la vacuna de monocitos cargados con un antígeno peptídico, esta vacuna indujo una respuesta citotóxica a un nivel más bajo, pero esta vacuna amplió el período de

- 55 supervivencia más que la vacuna de monocitos cargados con un antígeno peptídico. El resultado anterior sugiere que la vacuna de adenovirus induce respuestas inmunitarias adicionales además de la respuesta de los linfocitos T citotóxicos. Para confirmar si la vacuna de monocitos transducidos con adenovirus que expresan un antígeno podría inducir tanto respuestas inmunitarias mediadas por células como inmunidad humoral, se investigó la generación de anticuerpos específicos de Her-2/neu mediante la administración de la vacuna de monocitos. Como resultado, la

- 60 generación de anticuerpos más alta se observó en el grupo al que se administró  $2 \times 10^6$  células, observándose también una generación de anticuerpos significativa también en el grupo al que se administró  $1 \times 10^6$  o  $5 \times 10^5$  células (ver Fig. 12). Sin embargo, la generación de anticuerpos no se detectó en el grupo tratado con menos de  $2,5 \times 10^5$  células. Por otra parte, la vacuna de IMC se preparó de la misma manera a la descrita anteriormente, excepto que el antígeno peptídico se sustituyó por ovoalbúmina. La vacuna se administró a ratones C57BL/6 y se investigó la  
 65 citotoxicidad. Como resultado, se confirmó la respuesta citotóxica eficaz contra el antígeno ovoalbúmina, lo que

indica que las respuestas inmunitarias inducidas por la vacuna de IMC no se limitan a un antígeno específico, sino que responden a diversos antígenos (véase Fig. 13).

- En el ratón con tumores trasplantables o inflamación crónica, el nivel de células mieloides inmaduras (IMC) es significativamente mayor en el cáncer y el bazo, etc., y también en la sangre periférica de un paciente con cáncer. Las IMC son los precursores de las células mieloides que tienen potencial de diferenciación en diversas células incluyendo granulocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas y son conocidas por acelerar el crecimiento de las células tumorales mediante la supresión de las funciones de los linfocitos T específicos o no específicos del antígeno tumoral aprovechando la arginasa I, el óxido de nitrógeno, las especies de oxígeno reactivas y TGF- $\beta$ .
- 10 También se sabe que las IMC, que proliferan y se acumulan en el ratón portador del tumor, expresan Gr-1 y CD11b simultáneamente en su superficie y comprenden células de tipo monocitos en un alto porcentaje. Por lo tanto, los presentes inventores investigaron si la vacuna de células a base de IMC preparada mediante un método similar al de la vacuna de monocitos tenía efecto antineoplásico.
- 15 Los inventores aislaron esplenocitos del ratón trasplantado con células Her-2/CT26 y luego eliminaron los linfocitos B y las células dendríticas. Se cargó  $\alpha$ GalCer en las mismas y se separaron las células CD11b+ y a continuación se cargaron con un antígeno peptídico para producir la vacuna de IMC. Durante la preparación de esta vacuna, coexistieron linfocitos T citolíticos naturales y las IMC, lo que significa que los linfocitos T citolíticos naturales reconocen Cd1d cargada en la  $\alpha$ GalCer en las IMC y después activan las IMC, lo que tiene como resultado una
- 20 vacuna de IM más eficaz. El efecto antineoplásico de la vacuna fue investigado usando Her-2/CT26. Como resultado, la vacuna demostró un efecto antineoplásico significativo (ver Fig. 3). Se investigó además si la vacuna inducía respuesta inmunitaria citotóxica mediante la activación de linfocitos T citotóxicos específicos del péptido en el ensayo de CTL *in vivo*. Como resultado, se detectó un nivel significativo de respuesta inmunitaria citotóxica (ver Fig. 9). Los resultados anteriores indican que la vacuna IMC tiene efecto un efecto antineoplásico significativo
- 25 mediante la inducción de la respuesta inmunitaria citotóxica específica del antígeno para destruir las células cancerosas.

Los presentes inventores también prepararon una vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y transducidas con adenovirus que expresa un antígeno e investigaron sus efectos antineoplásicos. Como resultado, la administración

30 de la vacuna de IMC prolongó el período de supervivencia significativamente, lo que indica un excelente efecto antineoplásico en las células tumorales (ver Fig. 4). El efecto antineoplásico de la vacuna de IMC se redujo significativamente en los grupos de linfocitos NK eliminados (ver Fig. 5a) o de linfocitos CD8+ eliminados (ver Fig. 5b), lo que sugiere que los dos subconjuntos inmunitarios juegan un papel clave en la actividad antineoplásica inducida por la vacunación con IMC. Por otro lado, el efecto antineoplásico de la vacuna de IMC no se redujo en el

35 grupo de animales donde se eliminaron los linfocitos CD4+, en comparación con el grupo normal (véase la Fig. 5b), lo que sugiere que la vacuna de IMC puede inducir respuestas inmunitarias en ausencia de linfocitos T CD4+. Por lo tanto, la vacuna se puede usar para tratar eficazmente a los pacientes con VIH para la inmunización cuyos linfocitos T CD4+ están significativamente reducidos. Se investigó además si la vacuna podría inducir una respuesta inmunitaria citotóxica mediante la activación de linfocitos T citotóxicos específicos del péptido mediante el ensayo de

40 CTL *in vivo*. Como resultado, la vacuna indujo un alto nivel de respuesta inmunitaria citotóxica (ver Fig. 10). Este nivel no era tanto alto como el inducido por la vacuna de IMC cargadas con un péptido. Sin embargo, la vacuna celular pulsada con péptido se cargó solo con un solo péptido epitopo, mientras que la vacuna celular transducida con adenovirus podría presentar múltiples péptidos epitopo. Además, la eficiencia de la transducción no era del 100 % y, por lo tanto, la respuesta inmunitaria citotóxica específica del antígeno peptídico específica se estimó

45 comparativamente a bajo nivel. Sin embargo, esta vacuna tenía una ventaja de la inducción simultánea de diversas respuestas inmunitarias. Cuando la inmunización era inducida por  $8 \times 10^6$  células de la vacuna, se indujo casi el 90 % de la respuesta inmunitaria citotóxica, lo que indica que la vacuna de IMC transducida con un virus induce respuestas inmunitarias citotóxicas efectivas (ver Fig. 11).

- 50 La presente invención proporciona una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargadas con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno.

El ligando de los linfocitos T citolíticos naturales incluye alfa-galacturonosilceramida (GSL-1') y alfa-glucuronosilceramida (GSL-1) (Mattner J *et al.*, *Nature* 434:525, 2005; Kinjo Y *et al.*, *Nature* 434:520, 2005), GSL-4

55 (*Eur J Immunol* 35:1692, 2005) procedentes de *Sphingomonas* spp., fosfatidilinositoltetramanósido procedente de *M. tuberculosis* (Fischer K *et al.*, *PNAS* 101:10685, 2004), autoantígenos isoglobotrihexosilceramida (Zhou D *et al.*, *Science* 306:1786, 2004) y el gangliósido GD3 (Wu DY *et al.*, *J Exp Med* 198:173, 2003), fosfatidilcolina (*J Immunol* 175:977, 2005), fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol (*Immunity* 12:211), sulfátido (*J Exp Med* 199:947, 2004), beta-galactosilceramida ( $\beta$ -GalCer, Ortaldo JR *et al.*, *J. Immunol* 172:943), fosfolípidos lipofosfoglicano y glicoinositol

60 con enlace glucosídico a la superficie de *Leishmania* (*J Exp Med* 200:895, 2004), derivados  $\alpha$ GalCer beta-anomérico GalCer y alfa-anomérico GalCer (*J Immunol* 173:3693, 2004), variantes  $\alpha$ GalCer (*Nature* 413:531, 2001; *Angew Chem Int Ed Engl* 43:3818, 2004; *J Am Chem Soc* 126:13602, 2004; *PNAS* 102:1351, 2004; *PNAS* 102:3383, 2005; *J Am Chem Soc* 128:9022, 2006; *J Immunol Methods* 312:34, 2006; *J Med Chem* 50:585, 2007; *PNAS* 104:10299, 2007) y antígeno lipídico bacteriano, tal como monomicolato de glucosa procedente de *Nocardia falcinica* (Moody DB

65 *et al.*, *J Exp Med* 192:965, 2000), pero no siempre limitada a los mismos.

El antígeno de la presente memoria puede ser cualquier antígeno capaz de inducir respuestas inmunitarias como una vacuna, que se ilustra por un antígeno derivado de un patógeno tal como bacterias, virus y parásitos patógenos y un antígeno tumoral. En este momento, se puede utilizar un antígeno de longitud completa o un fragmento de antígeno. El antígeno derivado de la bacteria patógena se ilustra por: antígeno de *Bordetella pertussis* (toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina), toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, antígeno de *Helicobacter pylori* (polisacáridos de la cápsula de serogrupo A, B, C, Y y W-135), antígeno neumocócico (polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* tipo 3), antígeno de la tuberculosis, antígeno del cólera (subunidad B de la toxina del cólera), antígeno estafilocócico (enterotoxina estafilocócica B), antígeno de *Shigella* (polisacáridos de *Shigella*), antígeno de *Borrelia* sp., antígeno de *Candida albicans* y antígeno de *Plasmodium*. El antígeno derivado de un virus se ejemplifica por el antígeno del virus de la gripe (antígenos hemaglutinina y neuraminidasa), antígeno del virus del papiloma humano (HPV) (glicoproteína), antígeno del virus de la estomatitis vesicular (glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular), antígeno del citomegalovirus (CMV), antígeno del virus de la hepatitis (antígenos del virus de la hepatitis A (HAV), B (HBV), C (HCV), D (HDV) y G (HGV)) (antígeno del núcleo y antígeno de superficie), antígeno del virus sincitial respiratorio (RSV), antígeno del virus del herpes simple, antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (GP-120, GP-160, p18, Tat, Gag, Pol, Env) y sus complejos. El antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en Her-2/neu, proteinasa 3, gen asociado al tumor de Wilm (WT-1), murinoglobulina (MUC-I), fosfatasa ácida prostática (PAP), antígeno específico prostático (PSA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), G250, antígeno de melanoma (MAGE), antígeno de melanoma B (BAGE), antígeno de melanoma G (GAGE), NY-ESO-1 (cáncer esofágico de tipo Nueva York 1), tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TRP 1), proteína relacionada con la tirosinasa 2 (TRP-2), gp100 (glicoproteína 100), antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T-1 (MART-1), receptor de melanocortina-1 (MC1R), idiotipo de Ig, quinasa dependiente de ciclina D (CDK4), caspasa-8,  $\beta$ -catenina, artritis inducida por colágeno (CIA), BCR/ABL, virus del papiloma humano (HPV) E6/E7, virus de Epstein-Barr (EBV), proteína latente de la membrana 2A (LMP2a), virus de la hepatitis C (HCV), virus del herpes humano (HHV-8), 5T4, antígeno carcinoembrionario (CEA), p53 y  $\alpha$ -fetoproteína, pero no siempre limitada a los mismos.

El antígeno anterior se puede cargar directamente en los monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) como una forma de péptido, lipopolisacárido, polisacárido, glicoproteína o polinucleótido o se puede introducir en los monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) siendo transportado en un virus recombinante y después expresarse en el mismo. A diferencia de la vacuna de células cargadas con un péptido, la vacuna de células en las que se ha introducido un antígeno completo mediante la transducción con virus que codifica el antígeno no se limita a un haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se puede aplicar a todo el mundo y tiene la ventaja adicional de inducir diversas respuestas inmunitarias específicas del epítipo, en particular la inducción de respuestas inmunitarias humorales y respuestas inmunitarias mediadas por células de forma simultánea.

El virus introducido en los monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) para la expresión de un antígeno puede ser adenovirus, retrovirus, virus vaccinia, virus de la viruela o virus Sindbis, pero no siempre limitado a los mismos. Además de utilizar un virus, un posible método para la administración del gen del antígeno es 1) el método en el que el ADN se une a los liposomas y después se transfecta para proteger el ADN de las enzimas o es absorbido en el endosoma, 2) el método en el que el ADN se une a conjugado molecular o ligando sintético compuesto de proteínas para aumentar la eficiencia de la transfección de ADN (por ejemplo: asialoglicoproteína, transferrina e IgA polimérica), 3) el método que utiliza el nuevo sistema de transfección de ADN con PTD (dominio de transducción de proteína) en la que el gen del antígeno se transmite debido a la mayor eficiencia de transfección de ADN a las células (por ejemplo: Mph-1), y 4) el método en el que un péptido o proteína de antígeno se carga en los monocitos o células mieloides inmaduras (IMC).

La vacuna de la presente invención puede incluir adicionalmente, además del ligando de linfocitos T citolíticos naturales y monocitos o IMC, uno o más componentes eficaces que tienen el mismo o similar efecto con ellos. La vacuna también puede incluir además de los componentes efectivos mencionados anteriormente, uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede seleccionarse o prepararse mezclando más de un componente seleccionados del grupo que consiste en solución salina, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de dextrosa, solución de maltodextrosa, glicerol y etanol. Se pueden añadir otros aditivos generales, como agente antioxidante, solución tampón, agente bacteriostático, etc. Con el fin de preparar soluciones inyectables, tales como solución acuosa, suspensión y emulsión, se pueden añadir de forma adicional diluyentes, agentes dispersantes, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes. La vacuna de la presente invención además se puede preparar en formas adecuadas para cada enfermedad o de acuerdo a los componentes siguiendo un método representado en Remington' Pharmaceutical Science (la edición más nueva), Mack Publishing Company, Easton PA.

La vacuna de la presente invención se puede administrar por vía parenteral y la administración parenteral incluye la inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular e inyección intratorácica. Para preparar la vacuna como una formulación para la administración parenteral, los monocitos o IMC cargados con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales, los monocitos o IMC cargados con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un péptido o monocitos o IMC transducidos con un virus que expresa un antígeno tumoral y cargados con el ligando natural de linfocitos T citolíticos naturales se mezclan con un estabilizador o un agente tamponante para producir

una solución o suspensión, que se formula a continuación como ampollas o viales.

La vacuna de la presente invención se puede preparar de diversas formas de acuerdo con las vías de administración. Por ejemplo, la vacuna de la invención se puede formular como soluciones o dispersiones acuosas esterilizadas para inyección o como preparaciones liofilizadas. La vacuna liofilizada se conserva generalmente a 4 °C y puede ser recuperada usando una solución estabilizante tal como solución salina o/y HEPES que contienen o no contienen suplementos.

En una realización preferida de la presente invención, los factores que pueden afectar a la determinación de la dosis de la vacuna son método de administración, frecuencia de administración, enfermedad específica en tratamiento, gravedad de la enfermedad, historia clínica, otros agentes de tratamiento que se utilizan y las características personales, tales como edad, altura, peso, salud y condiciones corporales. En general, a medida que aumenta el peso de un paciente en tratamiento, incrementa preferiblemente la dosis de la composición.

La vacuna puede ser administrada por dosis eficaz para inducir respuestas inmunitarias en un paciente. Por ejemplo, la vacuna puede ser administrada al ser humano una vez o varias veces al día en la dosis de  $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$  células/kg y más preferiblemente de  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$  células/kg. Para preparar monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer o vacuna IMC, un medio tiene que ser complementado con  $\alpha$ GalCer a la concentración de  $1 \sim 2 \mu\text{g/ml}$  por  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  células/ml. Para preparar la vacuna de monocitos o IMC co-cargados con  $\alpha$ GalCer y péptido, el medio debe suplementarse con  $\alpha$ GalCer a la concentración de  $1 \sim 2 \mu\text{g/ml}$  por  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  células/ml y el péptido a la concentración de  $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$  por  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  células/ml.

$\alpha$ GalCer no parece inducir toxicidad en roedores y monos (Nakata *et al.*, *Cancer Res.* 58:1202-1207, 1998). No se han descrito efectos secundarios cuando se administraba  $2.200 \mu\text{g/kg}$  de  $\alpha$ GalCer se administró en un ratón (Giaccone *et al.*, *Clin Cancer Res* 8:3702, 2000). En los ensayos clínicos, se describió un ligero dolor de cabeza como un efecto secundario de acuerdo con la administración sistémica de  $\alpha$ GalCer (Mie Nieda *et al.*, *Blood* 103:383-389, Giaccone *et al.*, *Clin Cancer Res.* 8:3702, 2000), los cuales se pueden prevenir mediante la administración de paracetamol. Hay muy poca, si acaso, oportunidad de mostrar un ligero efecto secundario sistémico (Giaccone *et al.*, *Clin Cancer Res.* 8:3702, 2002).

La presente invención también proporciona un activador de linfocitos T citolíticos naturales mediado por monocitos o IMC cargados con  $\alpha$ GalCer.

Como se ha explicado anteriormente en la presente memoria, los monocitos o IMC cargados con  $\alpha$ GalCer de la presente invención, como las células dendríticas cargadas con  $\alpha$ GalCer, activan los linfocitos *iNKT in vivo*, lo que podría inducir la inmunidad contra el cáncer. Por lo tanto, los monocitos o IMC cargados con  $\alpha$ GalCer de la presente invención se pueden utilizar como un activador de linfocitos T citolíticos naturales, así como las células dendríticas cargadas con  $\alpha$ GalCer.

La presente invención también proporciona un inductor de la respuesta citotóxica que comprende monocitos o IMC que expresan un antígeno tumoral.

A diferencia de la vacuna de monocitos o IMC cargada con un péptido para inducir la respuesta inmunitaria celular, la vacuna de monocitos o IMC transducidos con adenovirus pueden inducir tanto respuestas inmunitarias celulares como respuestas inmunitarias humorales al mismo tiempo (ver Figs. 8, 10 y 12).

La presente invención también proporciona un uso de monocitos o células mieloides inmaduras cargadas con un ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno para la fabricación de una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica para la prevención inmunitaria y la inmunoterapia del cáncer que comprende la etapa de administrar la vacuna inmunoterapéutica y profiláctica que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargadas con el ligando de los linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno a un sujeto.

El sujeto aplicable de la presente invención es vertebrados y preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente tales animales experimentales tales como ratas, conejos, cobayas, hámster, perro, gato, etc., y lo más preferiblemente simios como los chimpancés y gorilas, pero no siempre limitándose los mismos.

### Modo de la invención

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

#### Ejemplo 1: Actividad antineoplásica de la vacuna de monocitos cargados con $\alpha$ Galcer y un antígeno

Los monocitos son células precursoras inmaduras que se originan en la médula ósea que tienen potencial para diferenciarse en células dendríticas (DC) o macrófagos. En esta invención, se investigó si los monocitos, los

precursores de las células dendríticas o macrófagos, tienen efecto antineoplásico específico del antígeno con la ayuda de linfocitos T citolíticos naturales.

<1-1> Actividad antineoplásica de la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y un péptido antigénico

5

Los monocitos se aislaron de los ratones BALB/c.

En particular, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y el bazo de ratones BALB/c (Orient, Corea), seguido de la homogeneización. Los granulocitos y los eritrocitos (RBC) se eliminaron mediante centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll (Sigma, EE.UU.). Después del agotamiento los linfocitos B220<sup>+</sup> y CD11c<sup>+</sup> utilizando microperlas anti-B220 (Miltenyibiotec, Alemania) y anti-CD11c (Miltenyibiotec, Alemania), los presentes inventores aislaron linfocitos CD11b<sup>+</sup> utilizando microperlas anti-CD11b (Miltenyibiotec, Alemania).

Los monocitos separados y purificados mediante el método anterior se cultivaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> junto con  $\alpha$ GalCer (1,5  $\mu$ g/ml) o vehículo (Tween 0,5 % en PBS) durante 14 horas. Se añadió 2,5  $\mu$ g/ml de Her-2/neu<sub>63-71</sub> (Anygen, Corea), el péptido epítipo de linfocitos T citotóxicos a los medios de cultivo de células durante 1 hora adicional, el cual se cargó en H-2K<sup>d</sup> en los monocitos. El péptido sin carga se retiró por lavado. Como resultado, se preparó la vacuna de monocitos.

El efecto antineoplásico de la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y/o un antígeno peptídico se investigó mediante el uso de Her-2/CT26 (Penichet ML et al., *Lab Anim Sci* 49:179- 88, 1999), el antígeno asociado al tumor que expresa la línea celular de cáncer, Her-2/neu.

En primer lugar, las células HER-2/CT26 se trasplantaron en ratones BALB/c (2 x 10<sup>5</sup> células/ratón) mediante inyección intravenosa. Al día siguiente, se administraron respectivamente monocitos/pep (cargados con un antígeno peptídico solo), monocitos/ $\alpha$ GC (cargados con  $\alpha$ GalCer solo) y monocitos/pep/ $\alpha$ GC (cargados tanto con  $\alpha$ GalCer como con el antígeno peptídico). A continuación, se compararon los períodos de supervivencia.

Como resultado, el período de supervivencia del grupo tratado con monocitos/pep era tan largo como el período de supervivencia del grupo de control provocado con células de cáncer solamente (por inyección intravenosa). Pero, el período de supervivencia del grupo tratado con monocitos/ $\alpha$ GC se prolongó un poco. Por otro lado, el período de supervivencia del grupo al que se administró monocitos/pep/ $\alpha$ GC aumentó de manera significativa, lo que sugiere que la vacuna tenía efecto antineoplásico (Fig. 1).

<1-2> Actividad antineoplásica de la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y transducidos con adenovirus que expresan un antígeno

Los monocitos separados y purificados de la misma manera como se describe en el Ejemplo <1-1> se transdujeron con adenovirus que contiene el gen que codifica el dominio extracelular y el dominio transmembrana de Her-2/neu (AdHM; Viomed Co., Ltd., Corea) en un medio exento de suero durante 90 minutos en un incubador de CO<sub>2</sub> por 100 MOI (multiplicidad de infección). Se añadió suero al mismo y también se añadió  $\alpha$ GalCer (1,5  $\mu$ g/ml) o vehículo (Tween 0,5 % en PBS) y se incubaron durante 14 horas adicionales. Como resultado, se preparó la vacuna de monocitos.

El efecto antineoplásico de la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y/o transducidos con adenovirus que expresan un antígeno se investigó de la misma manera como se describe en el Ejemplo <1-1> mediante el uso de HER-2/CT26.

En primer lugar, se trasplantaron células HER-2/CT26 en ratones BALB/c (2 x 10<sup>5</sup> células/ratón) mediante inyección intravenosa. Al día siguiente, se administraron respectivamente monocitos/AdHM (transducidos con adenovirus que expresan un antígeno), monocitos/ $\alpha$ GC (cargados con  $\alpha$ GalCer solo) y monocitos/AdHM/ $\alpha$ GC (cargados con  $\alpha$ GalCer y transducidos con adenovirus que expresan un antígeno). A continuación, se compararon los períodos de supervivencia.

Como resultado, el período de supervivencia del grupo tratado con monocitos/AdHM era tan largo como el período de supervivencia del grupo de control provocado con células de cáncer solamente (por inyección intravenosa). Pero, el período de supervivencia del grupo tratado con monocitos/ $\alpha$ GC aumentó un poco. Por otro lado, el período de supervivencia del grupo al que se administró monocitos/AdHM/ $\alpha$ GC se aumentó de manera significativa, lo que sugiere que la vacuna tenía efecto antineoplásico (Fig. 2).

60

Ejemplo 2: Actividad antineoplásica de la vacuna de células mieloides inmaduras (IMC) cargadas con  $\alpha$ GalCer y un antígeno

<2-1> Actividad antineoplásica de la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y un péptido antigénico

65

Las células mieloides inmaduras (IMC) se aislaron de ratones BALB/c.

Se trasplantaron células HER-2/CT26 por vía subcutánea en los ratones BALB/c. Cuatro semanas después, cuando el volumen del tumor creció hasta por lo menos 1.500 mm<sup>3</sup>, los bazo se aislaron de los ratones, seguido de  
5 homogeneización. Los linfocitos B B220+ o las células dendríticas CD11c+ se eliminaron mediante el uso de microperlas anti-B220 (Miltenyibiotec, Alemania) y microperlas anti-CD11c (Miltenyibiotec, Alemania).

Estas células se incubaron en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 14 horas en medios que contienen αGalCer (1,5 µg/ml), vitamina A (ATRA, ácido todo trans-retinoico, 20 µM; Sigma, EE.UU.), GM-CSF (factor estimulante de colonias de  
10 granulocitos y macrófagos, 20 ng/ml; R&D systems, EE.UU.) o vehículo (Tween 0,5 % en PBS; Sigma, EE.UU.). Se obtuvieron linfocitos CD11b+ de la misma mediante el uso de microperlas anti-CD11b (Miltenyibiotec, Alemania). A continuación, se cargó 2,5 µg/ml de péptido Her-2/neu<sub>63-71</sub> (Anygen, Corea) a la misma durante una hora. Como resultado, se preparó la vacuna de IMC.

15 El efecto antineoplásico de la vacuna IMC cargado con αGalCer y/o un antígeno peptídico se investigó mediante el uso de Her-2/CT26.

En primer lugar, se trasplantaron células HER-2/CT26 en ratones BALB/c (2 x 10<sup>5</sup> células/ratón) mediante inyección intravenosa. Al día siguiente, se administraron respectivamente IMC/pep (cargadas con un antígeno peptídico solo),  
20 IMC/pep/ATRA (cargadas con un antígeno peptídico e incubadas en medios que contienen vitamina A), IMC/pep/GM-CSF (cargadas con un antígeno peptídico e incubadas en medios que contienen GM-CSF) e IMC/pep/αGC (cargadas con αGalCer y un antígeno peptídico). A continuación, se compararon los períodos de supervivencia.

25 Como resultado, el período de supervivencia del grupo tratado con IMC/pep o IMC/pep/ATRA era tan largo como el período de supervivencia del grupo de control provocado con células de cáncer solamente (por inyección intravenosa). Pero, el período de supervivencia del grupo tratado con IMC/pep/GM-CSF aumentó un poco. Por otra parte, el período de supervivencia del grupo al que se administró IMC/pep/αGC aumentó de manera significativa, lo que sugiere que la vacuna tenía efecto antineoplásico (Fig. 3).

30 <2-2> Actividad antineoplásica de la vacuna de IMC cargadas con αGalcer y transducidas con adenovirus que expresan un antígeno

La vacuna de IMC se cargó con αGalCer y se transdujo con adenovirus que expresan un antígeno.

35 Las células mieloides inmaduras (IMC) separadas y purificadas de la misma manera como se describe en el Ejemplo <2-1> se infectaron con adenovirus que expresa un antígeno en un medio libre de suero durante 60 minutos en un incubador de CO<sub>2</sub> por 100 MOI. A continuación, el suero fue suplementado, seguido de cultivo adicional durante 5 horas para preparar la vacuna de IMC.

40 Se trasplantaron células HER-2/CT26 en ratones BALB/c (2 x 10<sup>5</sup> células/ratón) mediante inyección intravenosa. Al día siguiente, se administraron respectivamente IMC, IMC/AdHM (transducidas con adenovirus que expresa un antígeno) e IMC/AdHM/αGC (cargadas con αGalCer y transducidas con adenovirus que expresa un antígeno). A continuación, se compararon los períodos de supervivencia.

45 Como resultado, el período de supervivencia del grupo tratado con IMC/AdHM aumentó algo, mientras que el período de supervivencia del grupo tratado con IMC/AdHM/αGC aumentó de manera significativa, lo que indica que la vacuna tenía un excelente efecto antineoplásico (Fig. 4).

50 Ejemplo 3: Células inmunitarias requeridas para inducir la actividad antineoplásica mediante la vacunación con IMC

Se investigaron los subconjuntos de células inmunitarias activadas antineoplásicas mediante la vacunación por IMC.

Para eliminar las células inmunitarias, los ratones BALB/c fueron tratados con anticuerpos que eliminan las células  
55 inmunitarias [anticuerpo de eliminación anti-CD4: hibridoma GK1.5 (ATCC, EE.UU.), anticuerpo de eliminación anti-CD8: hibridoma 2.43 (ATCC, EE.UU.), anticuerpo de eliminación anti-NK: anticuerpo anti-α-asialoGM1 (Wako, EE.UU.)] mediante inyección intraperitoneal a intervalos de 4 días a partir de un día antes de trasplantar las células de cáncer HER-2/CT26 en los ratones BALB/c mediante inyección intravenosa. Un día después de la inyección de células de cáncer, a los ratones se les administró la vacuna con IMC/AdHM/αGC preparada de la misma manera  
60 como se describe en el Ejemplo <2-2> mediante inyección intravenosa. Se compararon los períodos de supervivencia.

Como resultado, el período de supervivencia del grupo deficiente en NK (IMC/AdHM/αGC/a-NK) fue similar a la del grupo de control provocado solamente con células de cáncer, lo que sugiere que los linfocitos NK son células  
65 inmunitarias importantes que juegan un cierto papel en la actividad antineoplásica inducida por la vacunación con

IMC (Fig. 5a). El período de supervivencia del grupo deficiente de linfocitos T CD8+ (IMC/AdHM/ $\alpha$ GC/a-CD8) se redujo significativamente, en comparación con el grupo inmunizado normal (IMC/AdHM/ $\alpha$ GC), lo que sugiere que el efecto antineoplásico inducido por la vacunación con IMC está mediado por los linfocitos T CD8+ (Fig. 5b). Sin embargo, el período de supervivencia del grupo deficiente en linfocitos T CD4+ (IMC/AdHM/ $\alpha$ GC/a-CD4) aumentó un poco o sufrió un aumento similar al del grupo inmunizado normal (IMC/AdHM/ $\alpha$ GC), lo que indica que los linfocitos CD4+ son dispensables para inducir el efecto antineoplásico mediante la vacunación con IMC (Fig. 5b).

Ejemplo 4: Activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno por la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y un antígeno

10 Para investigar si la vacuna de monocitos podría activar los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico para inducir la respuesta inmunitaria citotóxica, se realizó un ensayo de CTL *in vivo*.

15 <4-1> Activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico de la vacuna por monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y un péptido antigénico

Para investigar si la vacuna de monocitos podría activar los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico para inducir la respuesta inmunitaria citotóxica, se realizó un ensayo de CTL *in vivo*.

20 En concreto, se inmunizaron ratones BALB/c con los monocitos, monocitos/pep o monocitos/pep/ $\alpha$ GC preparados de la misma manera como se describe en el Ejemplo <1-1>. Nueve días más tarde, se realizó el ensayo citotóxico. En primer lugar, los esplenocitos de los ratones singénicos no inmunizados fueron divididos en dos grupos: un grupo se cargó con péptido Her-2/neu<sub>63-71</sub> (2,5  $\mu$ g/ml) y marcado con CFSE (diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster, Invitrogen, EE.UU.) (CFSE<sup>alta</sup>) 20  $\mu$ M y el otro grupo se marcó con CFSE 2,5  $\mu$ M sin carga de péptido  
25 (CFSE<sup>baja</sup>, utilizado como control). Cantidades iguales de los dos grupos de células se mezclaron y se administraron a los ratones inmunizados. Al día siguiente, se analizaron las poblaciones celulares CFSE<sup>alta</sup> y CFSE<sup>baja</sup> en los esplenocitos por citometría de flujo. Cuanto menor sea el porcentaje de las células CFSE<sup>alta</sup>, mayor será la respuesta inmunitaria citotóxica.

30 La inmunización también se realizó con diferentes concentraciones de células de monocitos/pep/vacuna  $\alpha$ GC (5 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, 2 x 10<sup>5</sup> y 4 x 10<sup>4</sup>). Nueve días más tarde, el ensayo de CTL *in vivo* se realizó de la misma manera como se describió anteriormente.

Como resultado, las respuestas inmunitarias citotóxicas casi no se detectaron en los grupos tratados con monocitos solo y monocitos/pep, mientras que la destrucción de la diana cargada con el péptido se detectó en el grupo tratado con monocitos/pep/ $\alpha$ GC (Fig. 6). El ensayo de CTL *in vivo* se realizó con diferentes concentraciones de células de la vacuna de monocitos/pep/ $\alpha$ GC de la misma manera como se describió anteriormente. Como resultado, solo 1 x 10<sup>6</sup> células indujeron una respuesta inmunitaria citotóxica (Fig. 7).

40 <4-2> Activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico por la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y transducidos con adenovirus que expresan un antígeno

Para investigar si la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y transducidos con adenovirus que expresa un antígeno podría activar los linfocitos T citotóxicos específicos del péptido para inducir la respuesta inmunitaria  
45 citotóxica, se realizó un ensayo de CTL *in vivo*.

En concreto, se inmunizaron ratones BALB/c con la vacuna de monocitos/AdHM/ $\alpha$ GC preparados de la misma manera como se describe en el Ejemplo <1-2> a diferentes concentraciones celulares de 2 x 10<sup>6</sup>, 1 x 10<sup>6</sup>, 5 x 10<sup>5</sup> y 2,5 x 10<sup>5</sup>. Diez días más tarde, se realizó un ensayo de CTL *in vivo* de la misma manera como se describe en el  
50 Ejemplo <4-1>.

Como resultado, no se detectó una respuesta inmunitaria citotóxica eficaz en los ratones inmunizados con 2 x 10<sup>6</sup> células de la vacuna de monocitos. Sin embargo, cuando la inmunización se realizaba con menos de 1 x 10<sup>6</sup> células, se detectó una ligera respuesta inmunitaria citotóxica (Fig. 8), que fue menor que la respuesta inmunitaria citotóxica  
55 inducida por la vacuna de monocitos/pep/ $\alpha$ GC. Pero, en cuanto al efecto antineoplásico, el período de supervivencia del grupo aumentó en comparación con la del grupo tratado con la vacuna de monocitos/pep/ $\alpha$ GC. Los resultados anteriores sugieren que la vacuna de adenovirus no solo induce una respuesta de linfocitos T citotóxicos, sino también otras respuestas inmunitarias.

60 Ejemplo 5: Activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno por la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y un antígeno

Para investigar si la vacuna de IMC podría activar los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico, se realizó un ensayo de CTL *in vivo*.

65

<5-1> Activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico por la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y un péptido antigénico

5 Para investigar si la vacuna de IMC podría activar los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico, se realizó un ensayo de CTL *in vivo*.

En concreto, se inmunizaron ratones BALB/c con IMC/pep, IMC/pep/ $\alpha$ GC, IMC/pep/ATRA o IMC/pep/GM-CSF preparados de la misma manera como se describe en el Ejemplo <2-1>. Diez días más tarde, se realizó un ensayo de CTL *in vivo* de la misma manera como se describe en el Ejemplo <4-1>.

10

Como resultado, se detectó un bajo nivel de respuestas inmunitarias citotóxicas en los grupos tratados con IMC/pep y con IMC/pep/ATRA, mientras que se detectó una respuesta inmunitaria citotóxica algo mayor en el grupo tratado con IMC/pep/GM-CSF. Sin embargo, el grupo tratado con la vacuna de IMC/pep/ $\alpha$ GC indujo un alto nivel de respuesta inmunitaria citotóxica (Fig. 9). Los resultados anteriores indican que la vacuna de IMC/pep/ $\alpha$ GC indujo una  
15 respuesta inmunitaria citotóxica específica del antígeno lo suficientemente efectiva para destruir células diana, lo que sugiere que la vacuna tenía un excelente efecto antineoplásico, como se describe en el  
Ejemplo <2-1>.

15

<5-2> Activación de linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico de la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y transducidas con adenovirus que expresa un antígeno

20

Para investigar si la vacuna de IMC podría activar los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico para inducir la respuesta inmunitaria citotóxica, se realizó un ensayo de CTL *in vivo*.

25 En concreto, se inmunizaron ratones BALB/c con IMC, IMC/AdHM, IMC/ $\alpha$ GC o IMC/AdHM/ $\alpha$ GC preparado de la misma manera como se describe en el Ejemplo <2-2>. Diez días más tarde, se realizó un ensayo de CTL *in vivo* de la misma manera como se describe en el Ejemplo <4-1>.

Y, se inmunizaron ratones BALB/c con la vacuna de IMC/AdHM/ $\alpha$ GC a diferentes concentraciones celulares de 8 x  
30  $10^6$ , 2 x  $10^6$ , 5 x  $10^5$  y 1,25 x  $10^5$ . Diez días más tarde, se realizó un ensayo de CTL *in vivo* de la misma manera como se describe en el Ejemplo <4-1>.

Como resultado, la respuesta inmunitaria citotóxica fue significativamente mayor en el grupo tratado con IMC/AdHM, en comparación con los grupos tratados con IMC solo e IMC/ $\alpha$ GC y la respuesta inmunitaria citotóxica aumentó más  
35 significativamente en el grupo tratado con IMC/AdHM/ $\alpha$ GC (Fig. 10). El nivel no fue tan alto como el del resultado del tratamiento con la vacuna celular cargada con el péptido del Ejemplo <5-1>, lo que parece ser debido a que la vacuna celular cargada con el péptido solamente se cargó con el epítipo de linfocitos T CD8 +, mientras que la vacuna de linfocitos transducidos con virus que comprenden un antígeno completo no expresa un único epítipo específico y a que la eficiencia de la transducción no es completa, lo que tiene como resultado un nivel  
40 comparativamente bajo de respuesta inmunitaria citotóxica específica del antígeno peptídico.

El ensayo de CTL *in vivo* se llevó a cabo de nuevo con diferentes concentraciones celulares de la vacuna de IMC/AdHM/ $\alpha$ GC. Como resultado, cuando la inmunización se realizó con 8 x  $10^6$  células, se detectó una respuesta  
45 inmunitaria citotóxica cercana al 90 %, lo que indica que la vacuna de IMC/AdHM/ $\alpha$ GC inducía eficazmente una respuesta inmunitaria citotóxica específica del antígeno (Fig. 11).

Ejemplo 6: Respuesta de anticuerpos específicos del antígeno inducida por la vacuna de monocitos cargados con  $\alpha$ GalCer y transducidos con adenovirus que expresa un antígeno

50 Para investigar si la vacuna de monocitos transducidos con adenovirus que expresa un antígeno podría inducir tanto respuestas inmunitarias celulares como humorales, se examinó la producción de anticuerpos específicos de Her-2/neu por la vacuna de monocitos transducidos con ADHM.

En concreto, se administró a ratones BALB/c la vacuna de monocitos/ADHM/ $\alpha$ GC preparada de la misma manera  
55 como se describe en el Ejemplo <1-2> por inyección intravenosa a diferentes concentraciones celulares. Se utilizó como control el suero de los ratones no inmunizados. Diez días más tarde, se recogió sangre mediante sangrado del ojo, el cual se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas, seguido de centrifugación a 8.000 rpm durante 10 minutos para separar el suero. Para examinar la producción de anticuerpos anti-Her-2/neu en suero, la línea celular de cáncer murino que expresa HER-2/CT26, Her-2/neu se tiñó con el suero a 4 °C durante 60 minutos. La capacidad  
60 de unión del anticuerpo de ratón a las células HER-2/CT26 se investigó usando anticuerpos anti-ratón secundarios marcados con FITC por citometría de flujo.

Como resultado, la mayor producción de anticuerpos se observó en el grupo tratado con 2 x  $10^6$  células y en el grupo tratado con 1 x  $10^6$  o 5 x  $10^5$  células (Fig. 12). Sin embargo, la producción de anticuerpos no se detectó en el  
65 grupo tratado con menos de 2,5 x  $10^5$  células.

Ejemplo 7: Activación de los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno peptídico por la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y péptido de ovoalbúmina

- Para investigar si la vacuna de IMC podría activar los linfocitos T citotóxicos específicos del antígeno contra otros diversos antígenos excepto Her-2/neu, con el fin de inducir respuestas inmunitarias citotóxicas, se realizó un ensayo de CTL *in vivo* usando la vacuna de IMC cargadas con  $\alpha$ GalCer y el péptido OT-1 (péptido 257-264 péptido de ovoalbúmina presentado por H-2K<sup>b</sup>, SEQ ID NO: 1, SIINFEKL) de la ovoalbúmina, el cual ha sido generalmente usado como un antígeno modelo.
- 10 En concreto, la línea celular de timoma murino, las células EL4 (ATCC, EE.UU.) se trasplantaron a ratones C57BL/6 (Oriente, Corea). Aproximadamente 4 semanas después, cuando el volumen del tumor alcanzó al menos 1.500 mm<sup>3</sup>, se aislaron esplenocitos de los ratones, seguido de homogeneización. Los linfocitos B B220+ fueron eliminados mediante el uso de microperlas anti-B220 (Miltenyibiotec, Alemania).
- 15 Estas células se incubaron en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 14 horas junto con  $\alpha$ GalCer (1,5  $\mu$ g/ml) o vehículo (Tween 0,5 % en PBS). Se obtuvieron células CD11b+ de la misma usando microperlas anti-CD11b (Miltenyibiotec, Alemania). Después, se cargó 2  $\mu$ g/ml de péptido OT-1 a las mismas durante una hora. Como resultado, se preparó la vacuna de IMC.
- 20 En concreto, se inmunizaron ratones C57BL/6 con IMC/pep o IMC/pep o IMC/pep/ $\alpha$ GalCer preparado de la misma manera como se describió anteriormente. Diez días más tarde, se realizó un ensayo de CTL *in vivo*. En primer lugar, los esplenocitos no estimulados se dividieron en dos grupos: un grupo se cargó con péptido OT-1 péptido (2  $\mu$ g/ml; Anygen, Corea) y se marcó con CFSE 20  $\mu$ M (diacetato de carboxifluoresceína succinimidil éster, Invitrogen, EE.UU.) (CFSE<sup>alta</sup>) y el otro grupo se marcó con CFSE 2,5  $\mu$ M sin carga de péptido (CFSE<sup>baja</sup>, utilizado como control). Cantidades iguales de los dos grupos de células se mezclaron y se administraron a los ratones inmunizados. Al día siguiente, se analizaron por citometría de flujo los grupos de células de CFSE<sup>alta</sup> y CFSE<sup>baja</sup> en los esplenocitos.

Como resultado, como se muestra en la Fig. 13, la respuesta inmunitaria citotóxica apenas se detectó en el grupo tratado con IMC/pep, de manera similar a lo que sucede con el grupo no tratado. Por el contrario, en el grupo inmunizado con IMC/pep/ $\alpha$ GalCer se detectó una respuesta inmunitaria citotóxica significativa cercana al 100 %. Es decir, la administración de IMC/pep/ $\alpha$ GalCer indujo una respuesta inmunitaria citotóxica eficaz en el modelo ovoalbúmina, antígeno extraño, en comparación con la vacuna de IMC cargadas con un antígeno peptídico solo (IMC/pep). Los resultados anteriores indican que las respuestas inmunitarias eficaces inducidas por la vacuna IMC no se limitan a un antígeno específico sino que se puede aplicar a diversos antígenos.

Ejemplo de fabricación 1: Un método para producir una solución inyectable que comprende la vacuna de monocitos/AdHM/ $\alpha$ GC como principio activo

- 40 La solución inyectable de la vacuna antineoplásica de la presente invención se preparó como sigue.

Se disolvió en agua destilada  $\alpha$ -galactosilceramida (1 ~ 2  $\mu$ g/ml), vacuna de monocitos AdHM/ $\alpha$ GC (5 x 10<sup>6</sup> células/ml), péptido (1 ~ 2  $\mu$ g/ml), 5'-cloro-3,2'- dihidroxicalcona o clorhidrato de 5'-cloro-2,3'-dihidroxicalcona (1 g), cloruro de sodio (0,6 g) y ácido ascórbico (0,1 g), lo que resulta en 100 ml de solución. La solución se introdujo en una botella, que se esterilizó a 120 ° C durante 30 minutos.

Ejemplo de Fabricación 2: Un método para producir una solución inyectable que comprende vacuna de IMC/AdHM/ $\alpha$ GC como principio activo

- 50 Las soluciones inyectables de la vacuna antineoplásica de la presente invención se prepararon como sigue.

Se disolvió  $\alpha$ -galactosilceramida (1~2  $\mu$ g/ml), vacuna de IMC/AdHM/ $\alpha$ GC (8 x 10<sup>6</sup> células/ml), péptido (1~2  $\mu$ g/ml), 5'-cloro-3,2'- dihidroxicalcona o clorhidrato de 5'-cloro-2,3'-dihidroxicalcona (1 g), cloruro de sodio (0,6 g) y ácido ascórbico (0,1 g) en agua destilada, dando como resultado 100 ml de solución. La solución se introdujo en una botella, que se esterilizó a 120 ° C durante 30 minutos.

Texto de la lista de secuencia

SEQ. ID. NO: 1 es la secuencia del péptido 257-264 de la ovoalbúmina presentado por H-2Kb.

- 60 Los expertos en la técnica apreciarán que las concepciones y realizaciones específicas divulgadas en la memoria descriptiva anterior pueden utilizarse fácilmente como base para modificar o diseñar otras realizaciones para llevar a cabo los mismos fines de la presente invención.

65

# ES 2 641 959 T3

<110> Seoul national university industry foundation

<120> Vacuna basada en monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) que se cargan con el ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno

5

<130> 7FPO-11-57

<160> 1

10 <170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido que corresponde a los aminoácidos 257-264 de la ovoalbúmina presentado por H-2Kb

20 <400> 1

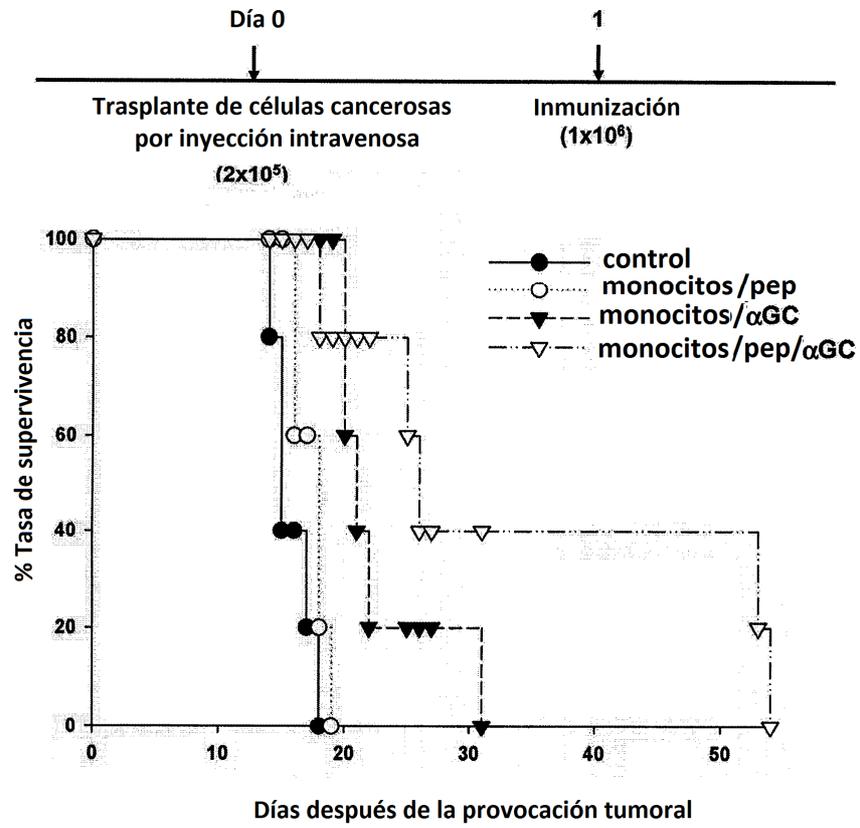
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu  
1 5

## REIVINDICACIONES

1. Una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con un ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un antígeno,  
 5 en la que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se carga en CD1d y el antígeno se carga en moléculas MHC, en la que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se selecciona del grupo que consiste en  $\alpha$ -galactosilceramida,  $\alpha$ -glucuronosilceramida, fosfatidilinositoltetramanósido, isoglobotrihexosilceramida, gangliósido GD3, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, sulfátido,  $\beta$ -galactosilceramida, lipofosfoglicano, glicoinositol fosfolípido, derivados de la  $\alpha$ -galactosilceramida, galactosilceramida  $\beta$ -anomérica y galactosilceramida  $\alpha$ -anomérica y antígeno  
 10 lipídico bacteriano,  
 en la que el antígeno se obtiene de patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos patógenos o de tumores y en la que la vacuna activa linfocitos T citotóxicos específicos de dicho antígeno.
2. La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno derivado de  
 15 una bacteria patógena se selecciona del grupo que consiste en el antígeno de *Bordetella pertussis* (toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa y pertactina), toxoide del tétanos, antígeno de la difteria (toxoide de la difteria), antígeno de *Helicobacter pylori* (polisacáridos de la cápsula de serogrupo A, B, C, Y y W-135), antígeno neumocócico (polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* tipo 3), antígeno de la tuberculosis, antígeno del cólera (subunidad B de la toxina del cólera), antígeno estafilocócico (enterotoxina estafilocócica B), antígeno de *Shigella*  
 20 (polisacáridos de *Shigella*), antígeno de *Borrelia* sp., antígeno de *Candida albicans* y antígeno de *Plasmodium*.
3. La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno derivado de un virus se selecciona del grupo que consiste en el antígeno del virus de la gripe (antígenos hemaglutinina y neuraminidasa), antígeno del virus del papiloma humano (HPV) (glicoproteína), antígeno del virus de la estomatitis  
 25 vesicular (glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular), antígeno del citomegalovirus (CMV), antígeno del virus de la hepatitis (antígenos del virus de la hepatitis A (HAV), B (HBV), C (HCV), D (HDV) y G (HGV)) (antígeno del núcleo y antígeno de superficie), antígeno del virus sincitial respiratorio (RSV), antígeno del virus del herpes simple (HSV), antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (GP-120, GP-160, p18, Tat, Gag, Pol y Env) y combinaciones de los mismos.
- 30 4. La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno tumoral se selecciona del grupo que consiste en Her-2/neu, proteinasa 3, gen asociado al tumor de Wilm (WT-1), murinoglobulina (MUC-I), fosfatasa ácida prostática (PAP), antígeno específico prostático (PSA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), G250, antígeno de melanoma (MAGE), antígeno de melanoma B  
 35 (BAGE), antígeno de melanoma G (GAGE), NY-ESO-1 (cáncer esofágico de tipo Nueva York 1), tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TRP-1), proteína relacionada con la tirosinasa 2 (TRP-2), gp100 (glicoproteína 100), antígeno de melanoma reconocido por linfocitos T-1 (MART-1), receptor de melanocortina-1 (MC1R), idiotipo de Ig, quinasa dependiente de ciclina D (CDK4), caspasa-8,  $\beta$ -catenina, artritis inducida por colágeno (CIA), BCR/ABL, virus del papiloma humano (HPV) E6/E7, virus de Epstein-Barr (EBV), proteína latente de la membrana 2A (LMP2a),  
 40 virus de la hepatitis C (HCV), virus del herpes humano (HHV-8), 5T4, antígeno carcinoembrionario (CEA), p53 y  $\alpha$ -fetoproteína.
5. La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno está caracterizado en la forma de péptido, lipopolisacárido, polisacárido, glicoproteína o polinucleótido.  
 45
6. La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el antígeno se expresa por transducción con un virus recombinante.
7. La vacuna inmunoterapéutica y profiláctica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el virus recombinante se  
 50 selecciona del grupo que consiste en adenovirus, retrovirus, virus vaccinia, poxvirus y virus Sindbis, introducido con un gen que codifica un antígeno.
8. Un activador de linfocitos T citolíticos naturales que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados con alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) y un antígeno diana, en el que el ligando de linfocitos T citolíticos  
 55 naturales se carga en CD1d y el antígeno diana se carga en moléculas MHC, en el que el antígeno diana se obtiene de patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos patógenos o de tumores y en el que el activador de linfocitos T citolíticos naturales activa linfocitos T citotóxicos específicos de dicho antígeno diana.
9. Un inductor de la respuesta citotóxica que comprende monocitos o células mieloides inmaduras (IMC) cargados  
 60 con  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) y un antígeno diana, en el que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se carga en CD1d y el antígeno diana se carga en moléculas MHC, en el que el antígeno diana se obtiene de patógenos, incluyendo bacterias, virus y parásitos patógenos o de tumores y en el que el inductor de la respuesta citotóxica activa linfocitos T citotóxicos específicos de dicho antígeno diana.
- 65 10. Uso de monocitos o células mieloides inmaduras cargados con un ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un

- antígeno para la fabricación de una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica para la inmunoterapia del cáncer,  
en el que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se carga en CD1d y el antígeno se carga en moléculas MHC,  
en el que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se selecciona del grupo que consiste en  $\alpha$ -galactosilceramida,  
 $\alpha$ -glucuronosilceramida, fosfatidilinositol tetramanósido, isoglobotrihexosilceramida, gangliósido GD3, fosfatidilcolina,  
5 fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, sulfátido,  $\beta$ -galactosilceramida, lipofosfoglicano, glicoinositol fosfolípido,  
derivados de la  $\alpha$ -galactosilceramida, galactosilceramida  $\beta$ -anomérica y galactosilceramida  $\alpha$ -anomérica y antígeno  
lipídico bacteriano,  
en el que el antígeno se obtiene de tumores y  
en el que la vacuna activa linfocitos T citotóxicos específicos de dicho antígeno.
- 10
11. Uso de monocitos o células mieloides inmaduras cargados con un ligando de linfocitos T citolíticos naturales y un  
antígeno para la fabricación de una vacuna inmunoterapéutica y profiláctica para la prevención inmunitaria del  
cáncer,  
en el que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se carga en CD1d y el antígeno se carga en moléculas MHC,  
en el que el ligando de linfocitos T citolíticos naturales se selecciona del grupo que consiste en  $\alpha$ -galactosilceramida,  
15  $\alpha$ -glucuronosilceramida, fosfatidilinositol tetramanósido, isoglobotrihexosilceramida, gangliósido GD3, fosfatidilcolina,  
fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, sulfátido,  $\beta$ -galactosilceramida, lipofosfoglicano, glicoinositol fosfolípido,  
derivados de la  $\alpha$ -galactosilceramida, galactosilceramida  $\beta$ -anomérica y galactosilceramida  $\alpha$ -anomérica y antígeno  
lipídico bacteriano,  
20 en el que el antígeno se obtiene de tumores y  
en el que la vacuna activa linfocitos T específicos de dicho antígeno.

**Fig. 1**



**Fig. 2**

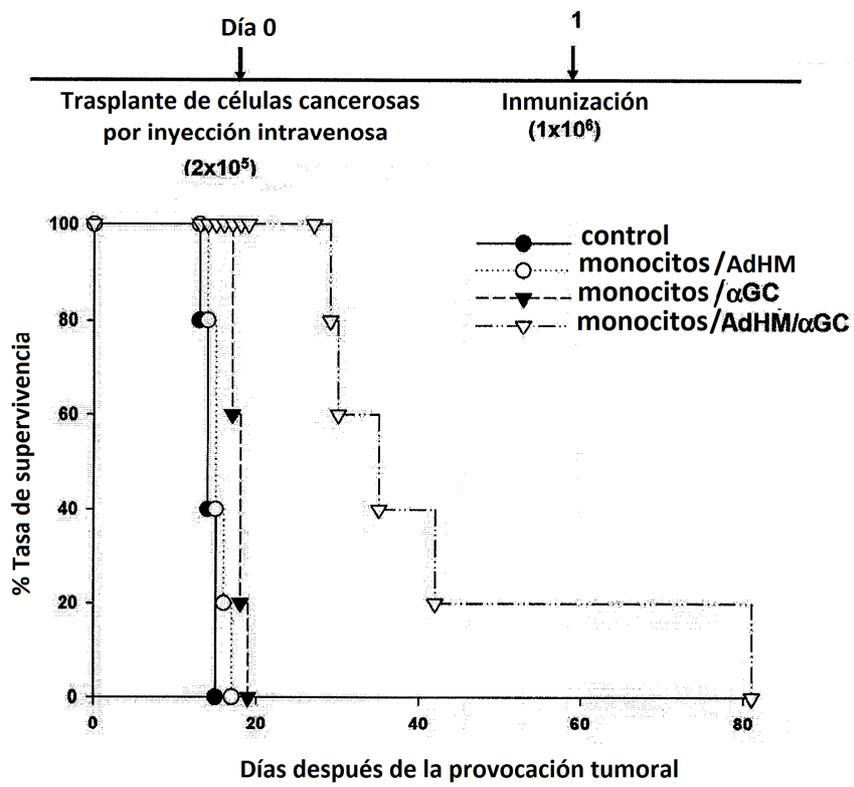
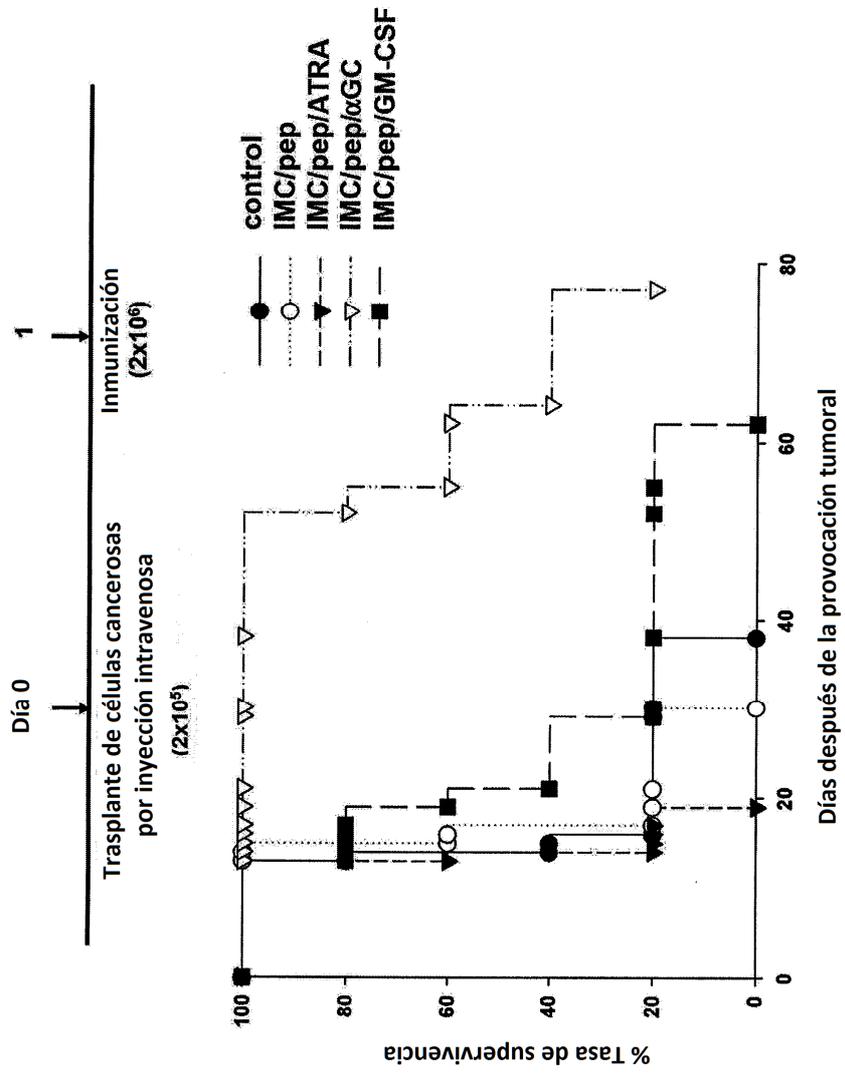
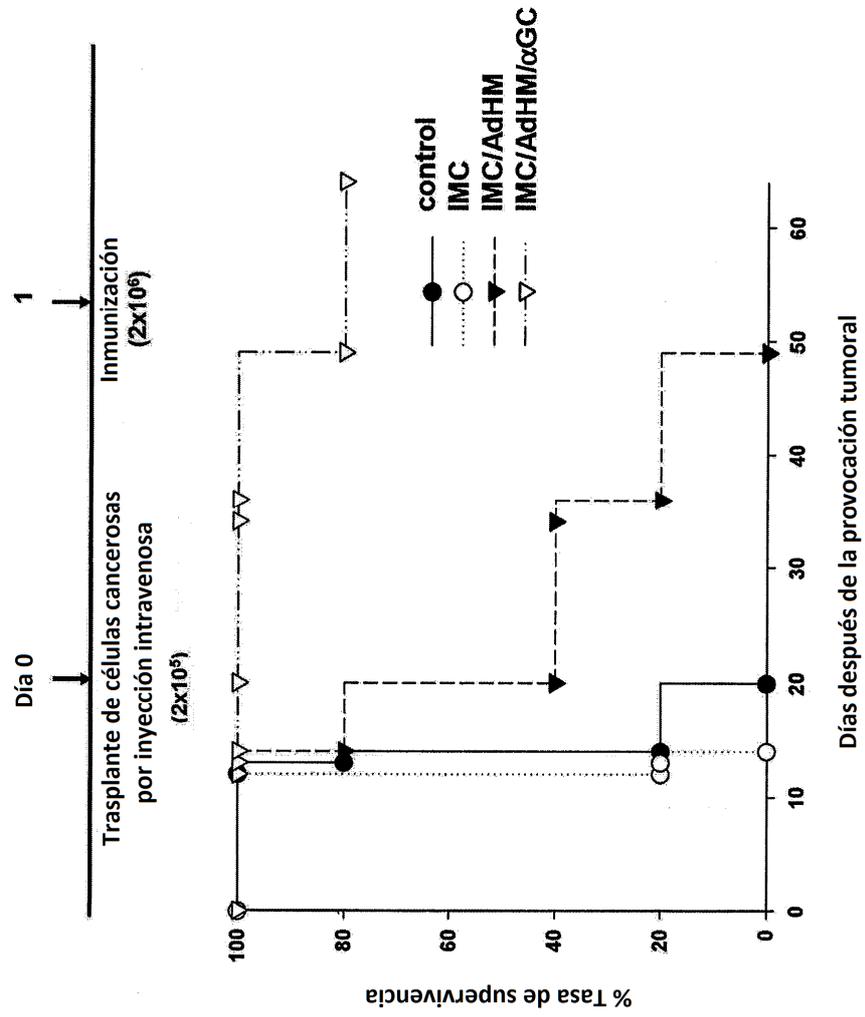


Fig. 3



**Fig. 4**





**Fig. 6**

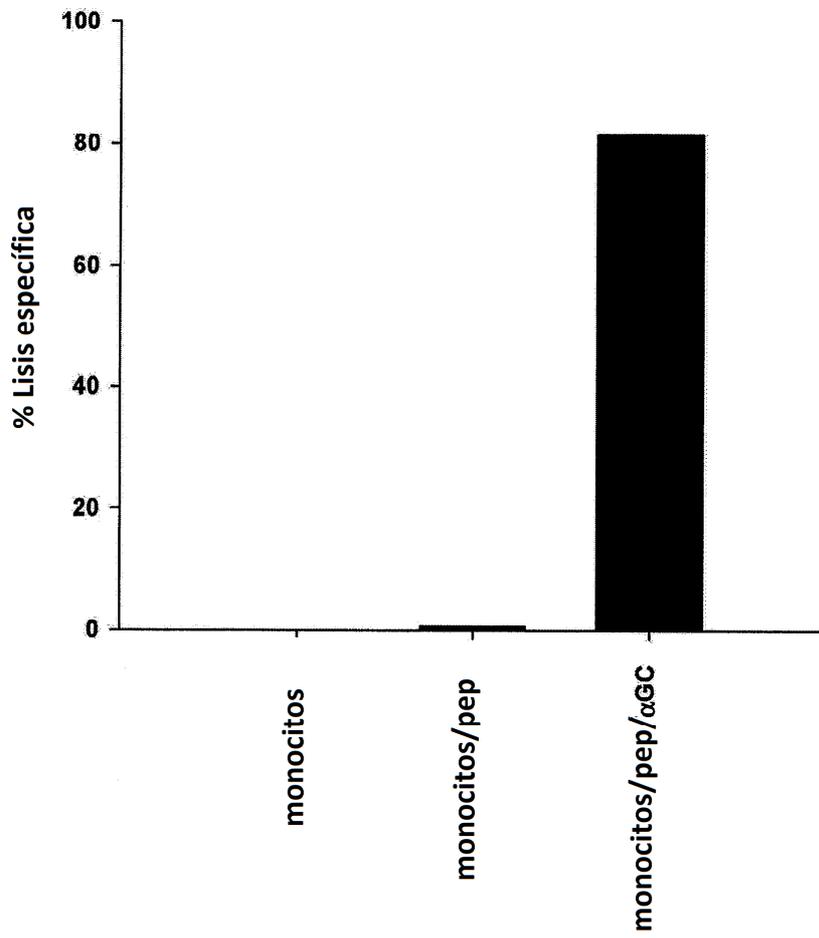


Fig. 7

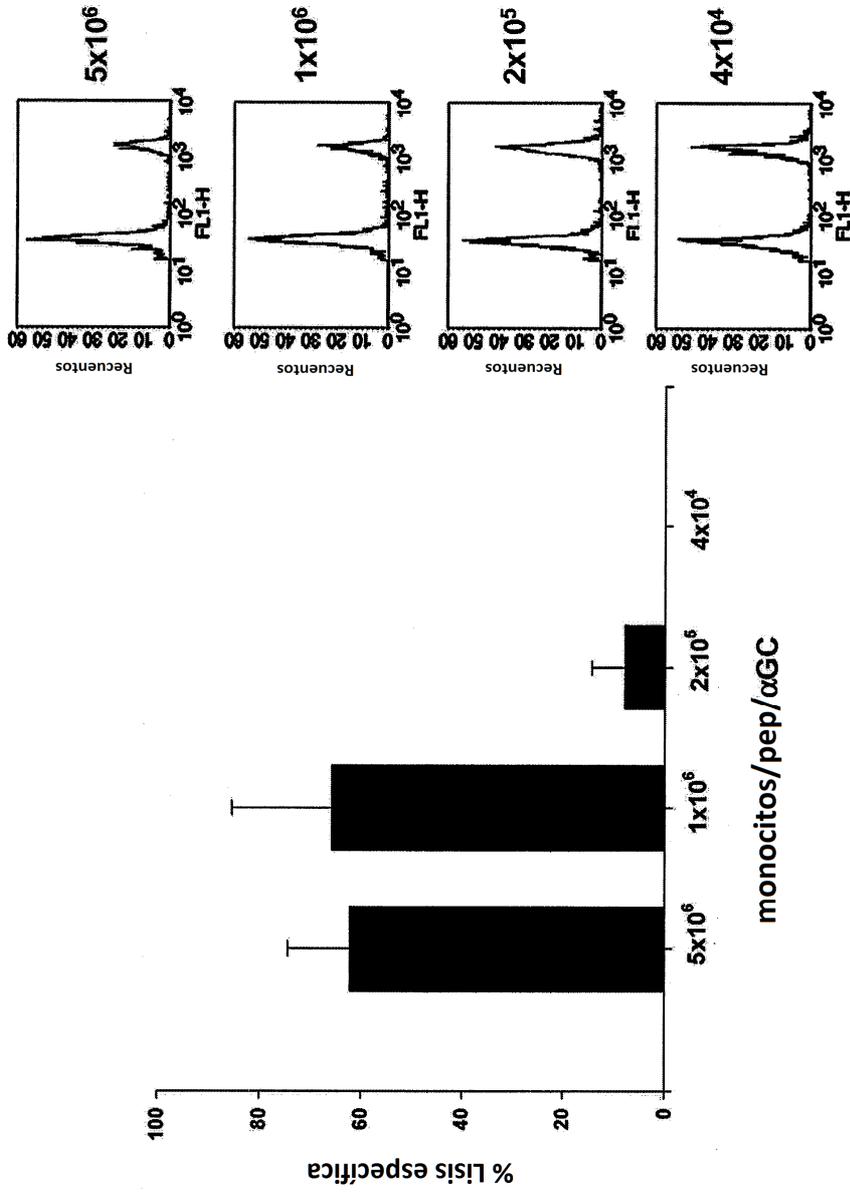
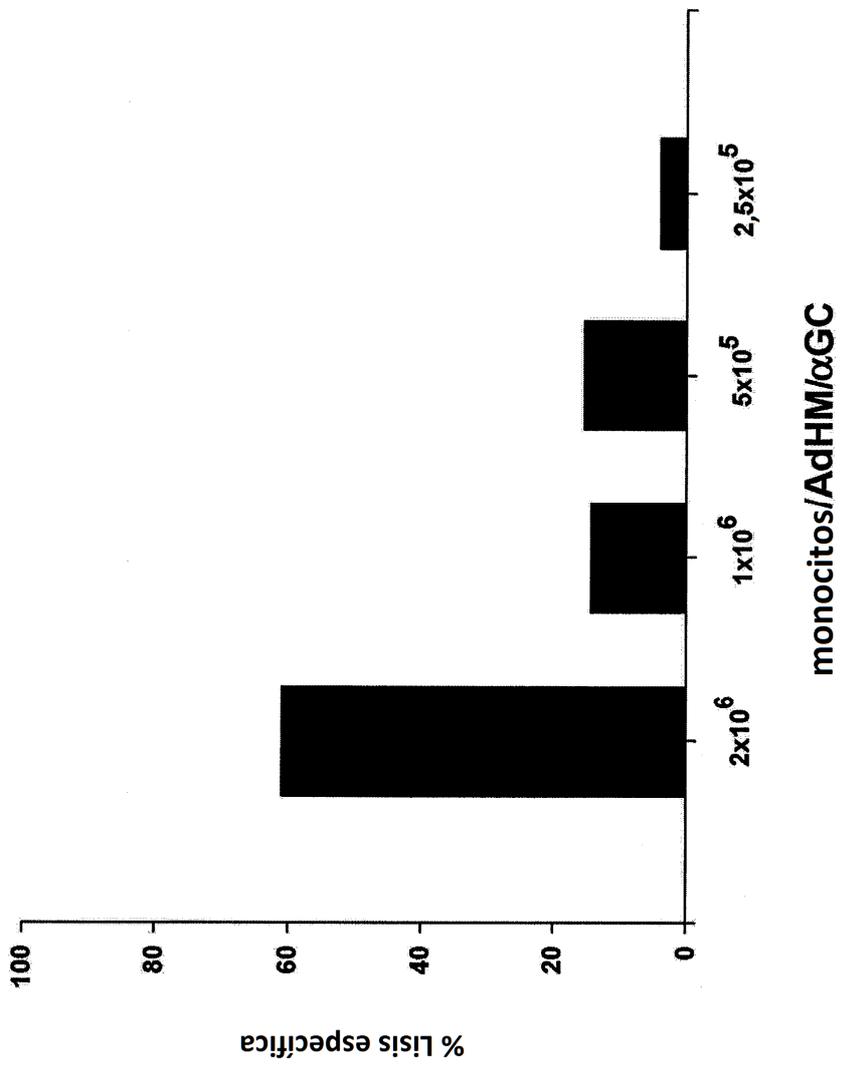
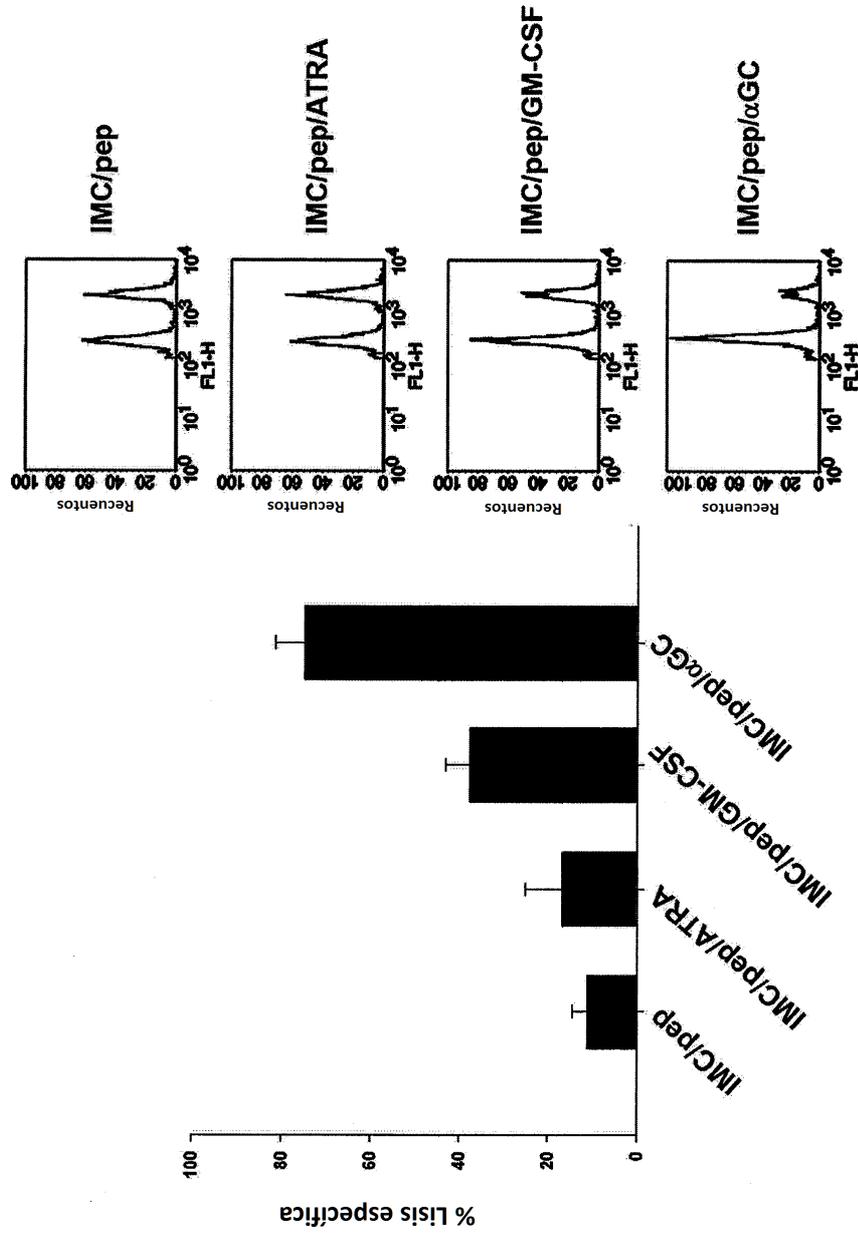


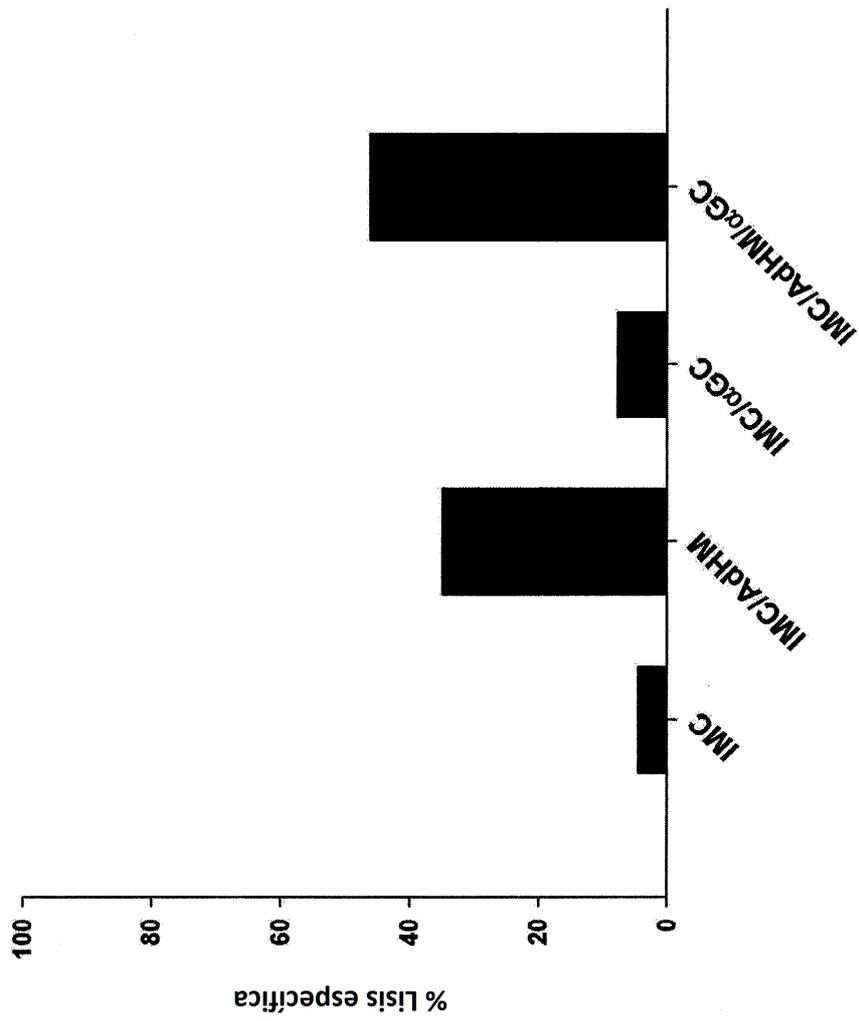
Fig. 8



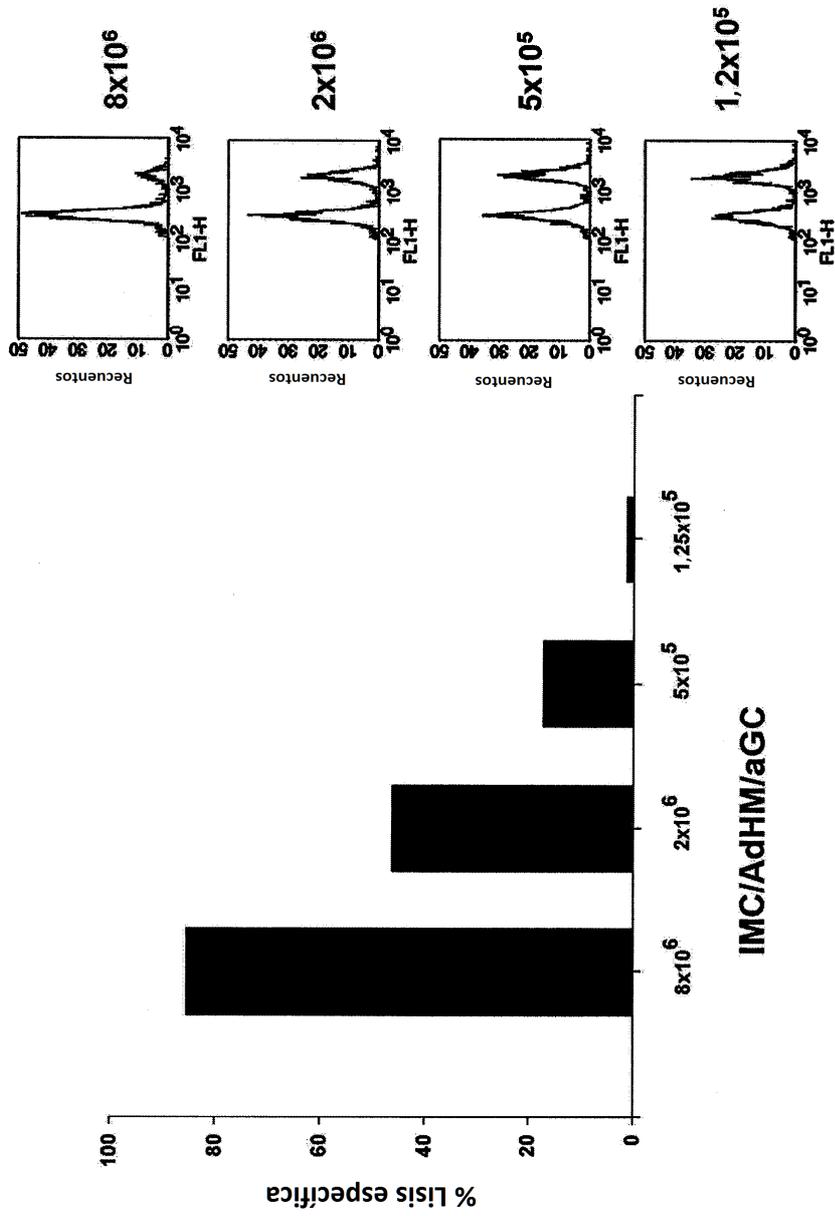
**Fig. 9**



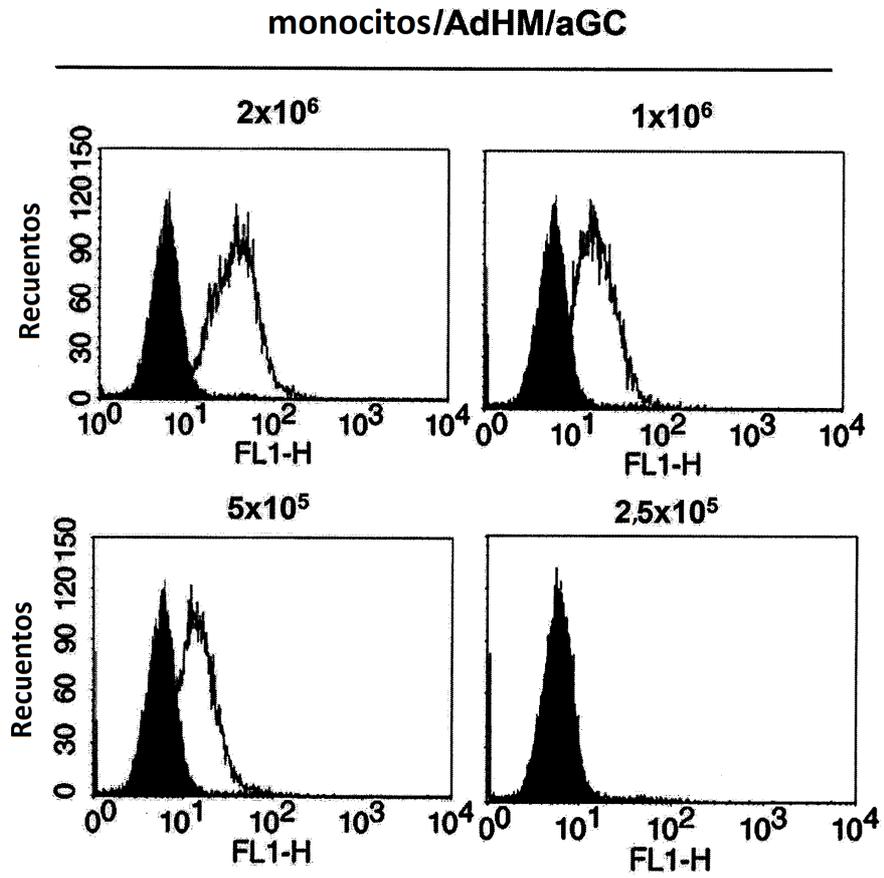
**Fig. 10**



**Fig. 11**



**Fig. 12**



**Fig. 13**

