

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 928**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2008 PCT/AT2008/000443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2017 WO09073905**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2008 E 08860440 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2220214**

54 Título: **Procedimiento para aumentar la inmunorreactividad**

30 Prioridad:

10.12.2007 AT 19962007

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

30.04.2018

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT INNSBRUCK
(50.0%)**

**Christoph-Probst-Platz Innrain 52
6020 Innsbruck, AT y
APEIRON BIOLOGICS AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BAIER, GOTTFRIED;
LOIBNER, HANS;
SCHUSTER, MANFRED;
LAMETSCHWANDTNER, GÜNTHER y
WOLF, DOMINIK**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 665 928 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

Procedimiento para aumentar la inmunorreactividad

La presente invención se refiere a procedimientos para la modulación de la respuesta inmune de las células.

La inmunización activa hizo posible por primera vez una lucha comprensiva contra las enfermedades infecciosas más amenazantes, y aún logró la erradicación mundial en algunos casos utilizando un mecanismo de defensa endógeno poco costoso y altamente eficiente. Por lo tanto, se realizaron y se realizan esfuerzos para desarrollar procedimientos de vacunación profilácticos y terapéuticos contra varias indicaciones. Sin embargo, la inmunización eficiente requiere la inducción de una respuesta inmune, que conduce a una inmunidad protectora. Sin embargo, la falta de inmunogenicidad del antígeno de inmunización conduce a la ausencia del efecto deseado. Las formulaciones de antígeno altamente interesantes y específicas ya se han desarrollado para la prevención y el tratamiento de malaria, HIV, influenza o enfermedades tumorales, por mencionar solamente unos cuantos ejemplos prominentes. Sin embargo, estos tratamientos no han sido exitosos, por ejemplo, debido a la falta de inmunogenicidad del antígeno de inmunización. Además, las vacunas aún ampliamente utilizadas conducen a problemas de falta de inmunogenicidad, tal como las vacunas de hepatitis B, que actualmente construyen un título de respuesta inmune protectora solo para aproximadamente 80% de aquellos tratados. La razón principal para la falta de reactividad del sistema inmune es que estos antígenos no son reconocidos, ya que son "extraños". En mamíferos, son principalmente las células T las que deciden si una estructura presentada por las células que presentan antígenos (APCs) será reconocida como endógena o extraña. Para inducir una respuesta inmune son necesarias esencialmente dos señales separadas, independientemente entre sí. Este mecanismo debe prevenir un exceso del sistema inmune. El primer requisito consiste en que el receptor de célula T reconozca también el antígeno ofrecido por la APC. Si este no es el caso, no tiene lugar una reacción adicional. Además, para la inducción de una respuesta inmune, es absolutamente esencial la interacción del receptor CD28 sobre la superficie de la célula T con B7, que se expresa sobre la APC solamente cuando esta última clasifica la estructura antigénica como peligrosa. En el caso de una vacunación con un antígeno de vacunación que tiene solamente inmunogenicidad marginal, puede no aparecer la coestimulación por la vía de la interacción entre B7 y CD28, lo cual, en consecuencia, no conduce a una respuesta inmune, sino más bien al desarrollo de una tolerancia a nivel de la célula T. Sin embargo, se ha demostrado que la necesidad de coestimulación se puede evitar mediante desactivación de una enzima, la E3-ubiquitina ligasa Cbl-b. Esta enzima es un punto de conmutación decisivo en el control de la inmunorreactividad (Chiang et al., *J Clin Invest* (2007) doi:10.1172/JCI29472). Sin embargo, en la ausencia de Cbl-b, las sustancias administradas, pero apenas inmunogénicas, pueden conducir a la inducción de una fuerte respuesta inmune. Además, los ratones deficientes en Cbl-b (desactivaciones del gen homocigótico) son viables y su sistema inmune es capaz de reconocer eficientemente tumores autólogamente inducidos y la construcción de una respuesta inmune lítica basada principalmente en las células T CD8+ (Loeser et al., *JEM* (2007) doi:10.1084/jem.20061699). Sin embargo, la eliminación completa de la enzima que se ha descrito conduce asimismo a una autoinmunidad incrementada después de la inmunización con superantígenos. De este modo, Loeser y colaboradores han sido capaces de mostrar que Cbl-b como regulador negativo es responsable de la "inmunorreactividad" de las células T de manera decisiva.

La tecnología de siRNA para la atenuación de la expresión génica específica también se ha descrito ya para Cbl-b con menor eficiencia. El documento 2007/0087988 se refiere a un procedimiento para la regulación de HPKI, cuya expresión se puede incrementar mediante el incremento de la expresión de Cbl-b y viceversa (por ejemplo mediante la inhibición de siRNA de Cbl-b).

El documento 2007/00543355 describe péptidos Cbl-b y proteínas asociadas a Cbl-b, en particular POSH, y su uso para el tratamiento de enfermedades asociadas a Cbl-b.

El documento 2004/078130 A2 se refiere a composiciones para el tratamiento de enfermedades asociadas a POSH, tales como enfermedades virales, cáncer y desórdenes neurológicos. POSH se puede hacer disponible junto con una pluralidad de proteínas asociadas a POSH, incluyendo Cbl-b.

El documento 2006/0292119 A1 se refiere a métodos para el aumento de la respuesta inmune de células inmunes mediante la inhibición de inmunorreguladores negativos en la célula. Tales inmunorreguladores negativos se seleccionan entre proteínas, que están asociadas a la estabilidad molecular, por ejemplo, mediante ubiquitinación, desubiquitinación y sumoilación, así como factores de transcripción, que inhiben la expresión de inhibidores de NFκB, o supresores de transcripción de genes objetivo NFκB.

El documento US 2007/0015768 da a conocer compuestos para la inhibición de ubiquitina ligasas, ocasionalmente un siRNA para la inhibición de la expresión de Cbl-b.

Plautz G et al. (*Urol.* 54 (4) (1999): 617-623) describen un procedimiento ex vivo para la activación de linfocitos CD4 y CD8 T aislados en pacientes, tratándose las células inmunes con enterotoxina de estafilococo A IL-2 (SEA), y se inyectaron de nuevo en los pacientes a continuación.

Sin embargo, no se ha descrito el uso de mediadores de Cbl-b para aplicaciones clínicas. Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es hacer disponible un procedimiento para la modulación de la inmunorreactividad, adecuado

para el uso práctico.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método in vitro o ex vivo para el aumento de la inmunorreactividad de células del sistema inmune, que comprende la reducción transiente o la inhibición de la expresión de Cbl-b mediante empleo de una secuencia corta de DNA y/o RNA complementaria a una parte de la secuencia de mRNA de Cbl-b objetivo, poniéndose en contacto las células con un antígeno antes o después de la extracción, y aumentándose la inmunorreactividad de las células frente al antígeno, y comprendiendo las células células que presentan antígeno, PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells), linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, células NK y/o células NKT.

El gen Cbl-b, así como sus productos génicos, se han descrito en detalle en la técnica relacionada (UniGene Id. Hs. 3144 y Hs. 381921). Las secuencias de Cbl-b se han publicado en la base de datos de GenBank, por ejemplo, bajo Acc. No. NM_008279 y NP_009112. Los anticuerpos anti-Cbl-b, siRNAs e inhibidores antisentido están disponibles comercialmente. Ciertos siRNAs adecuados para reducir o inhibir la expresión de Cbl-b y, por lo tanto, también la función de Cbl-b, se dan a conocer, por ejemplo, en el documento US 2007/0054355, con nucleótidos de RNA/DNA mixtos y una longitud de aproximadamente 20 bases.

Para contrarrestar el riesgo de una reacción excesiva del sistema inmune, que puede conducir a la inducción de la reactividad autoinmune, por ejemplo, la inhibición/desactivación de las funciones de Cbl-b en las células T se puede efectuar solamente en un periodo de tiempo estrictamente definido. Por lo tanto, es esencial para un procedimiento de vacunación terapéutico adyuvante atenuar Cbl-b de una manera controlada solamente por un periodo de tiempo limitado, para apoyar el desarrollo de una respuesta inmune específica para un antígeno de inmunización dado, pero para prevenir una enfermedad inmune al restaurar a su debido tiempo el estado inmunológico "normal". Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, solamente una cierta selección de células aisladas del sistema inmune se trata in vitro o ex vivo y luego se devuelve al paciente. Un procedimiento para la atenuación de Cbl-b in vitro o ex vivo eficiente es, por lo tanto, el requisito para incrementar la inmunorreactividad.

Según la invención, la función de Cbl-b se reduce o se inhibe mediante reducción o inhibición de la expresión de Cbl-b. Los términos reducción o inhibición relacionados con la reducción en la función (y/o expresión) de Cbl-b en comparación con la función inalterada, natural hasta la inhibición completa de la función. La función (y/o expresión) de preferencia se reduce en al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%.

, La reducción o inhibición de la función de Cbl-b se efectúa de preferencia por vía transiente. En otras palabras, la función se reduce solo temporalmente como es indicado en lo anterior y, por consiguiente, puede recuperarse, por ejemplo, mediante el consumo o degradación de inhibidores, tal como, por ejemplo, siRNA de Cbl-b o mediante neogénesis o células no dañadas por Cbl-b (in vivo). La reducción transiente de Cbl-b en células inmunes también se puede efectuar repetitivamente en este caso, por ejemplo, hasta que se logra un éxito terapéutico.

La expresión de Cbl-b de preferencia se reduce o se inhibe al utilizar RNA antisentido de Cbl-b o siRNA. Con este fin se emplean secuencias cortas de DNA y/o RNA complementarias a una parte de la secuencia de mRNA de Cbl-b objetivo, de modo que éstas se hibridan y desactivan de este modo. La longitud de estas secuencias es de preferencia al menos 15, 18, 20, 22, 25, 28, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 o 200 de bases hasta la secuencia objetivo completa, de preferencia hasta 2502, 2000, 1500, 1000, 500 o 300 bases. Las secuencias de la SEQ ID nos. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y/o 8 se emplean preferentemente.

Según descripción, la función de Cbl-b se puede reducir o inhibir mediante una pluralidad de otros componentes conocidos, como, por ejemplo, mediante empleo de antagonistas de Cbl-b, inhibidores, en especial aptámeros o intrámeros. Cualquier antagonista o inhibidor que que suprime el efecto y/o la función de Cbl-b se puede utilizar de acuerdo con la descripción para incrementar la inmunorreactividad de las células. En otra forma de realización de la presente descripción se emplean preferentemente antagonistas o inhibidores para producir un agente farmacéutico para el incremento según la invención in vitro, ex vivo, pero también in vivo, de la inmunorreactividad de las células del sistema inmune. Esto permite el tratamiento de enfermedades con un sistema inmune suprimido o ineficiente, en particular cáncer, así como el incremento en la respuesta inmune frente a antígenos (de vacunación), que se pueden poner en contacto con las células del sistema inmune in vivo o ex vivo.

La presente invención también se refiere a un método para reducir la inmunorreactividad de las células del sistema inmune, que comprende la reducción o inhibición de la función de c-Cb1 de las células, de modo que la inmunorreactividad de las células al antígeno se reduce, de preferencia mediante la reducción o inhibición transiente, en particular al utilizar RNA o siRNA de Cbl-b antisentido. Para incrementar la inmunorreactividad, no es absolutamente necesario atenuar c-Cb1 de manera conjunta junto con Cbl-b. Como se muestra en los ejemplos, la atenuación de c-Cb1 en cambio produce una reversión en los efectos logrados por la inhibición de Cbl-b. Cbl-b y c-Cb1, por lo tanto, tienen funciones antagonísticas. C-Cb1 también cumple con una función previamente desconocida en la regulación fina de la reactividad de la célula T, conduciendo su atenuación a una tolerancia inmune incrementada. Por lo tanto, la reducción o la inhibición de la función c-Cb1 es adecuada para la inmunosupresión y, por lo tanto, permite su uso en inflamaciones o alergias, por ejemplo. Puesto que el grado y la dirección de la atenuación dependen de la dosis en la reducción de o inhibición de Cbl-b, o bien c-Cb1 (análogamente a Cbl-b, como es descrito en el presente documento), ambos factores se pueden reducir en su función en combinación. Para

el aumento de la inmunorreactividad, la reducción en Cbl-b prevalece sobre la reducción en c-Cb1, y al contrario para la reducción. C-Cb1 antisentido o siRNA pueden presentar las mismas líneas de secuencia que se describen descritas anteriormente para Cbl-b. Preferentemente se utilizan las secuencias de la SEQ ID Nos. 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y/o 16.

- 5 En formas de realización especiales de la descripción se emplean especialmente células que han absorbido el antígeno y de preferencia presentan un fragmento de antígeno o reconocen mejor un fragmento de antígeno en el contexto de HLA, y de esta manera se activan.

En formas de realización preferentes preferidas, las células que se utilizan de acuerdo con la invención son células que presentan antígeno, PBMCs (células mononucleares de sangre periféricas), linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos y/o células dendríticas, en particular linfocitos T, linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+, en particular Th1, Th2, Th17, Tregs (células T reguladoras) o CTL (células T citotóxicas), células NK o células NKT. Del mismo modo, también es posible usar linfocitos negativos de CD3/CD19 en general. Las células NK forman un grupo especialmente preferido de las mismas. El antígeno de preferencia se absorbió por las células, y éstas presentan de preferencia un fragmento de antígeno. Las PBMCs y células T son especialmente preferidas en combinación para el tratamiento para inducir una reacción específica de antígeno especialmente fuerte. En otras formas de realización, en particular para el incremento general en la inmunorreactividad (por ejemplo para tratar una insuficiencia inmune), varias células T solas son suficientes para lograr un efecto amplio. La inmunorreactividad incrementada de acuerdo con la invención es de preferencia mediada por estas células, en particular células CD8 o CD4 así como células NK y/o NKT.

- 20 La electroporación de preferencia se utiliza para la transfección de células, en particular de células T, o de células NK con un inhibidor de Cbl-b, tal como siRNA de Cbl-b o constructo de Cbl-b de desactivación. Cualquier medio que conduce a la transfección, es decir, a la inhibición de Cbl-b, puede ser adecuado para este propósito. Tal medio es, por ejemplo, Optimem (Gibco, #31985-047).

Además, las células también se pueden tratar, o bien estimular con una sustancia inmunoestimulante, por ejemplo, una citoquina o ligando inmunoestimulante de otros receptores inmunoestimulantes (tales como TLRs, receptores similares a toll) o anticuerpos contra moléculas de superficie, de preferencia CD3 y/o CD28, para promover una respuesta inmune por las células.

La inhibición de Cbl-b también se puede utilizar como parte de una vacunación soportada por células dendríticas, de preferencia una vacunación antitumoral.

- 30 Como una alternativa, o bien adicionalmente, también es posible el cocultivo in vitro de células inhibidas por cbl-b con células dendríticas que se han obtenido del paciente, que se cargaron preferentemente con los antígenos (celulares) tumorales, así como el uso del cocultivo para los fines según la invención.

La “vacunación” como se utiliza en el presente documento no se entenderá en el sentido absoluto – es decir, la administración de un inmunógeno que conduce a una protección absoluta por el sistema inmune –, sino como la administración inmunológica para incrementar la protección por el sistema inmune, o bien activar el sistema inmune, en particular las células del mismo, contra el antígeno de vacuna.

En un aspecto particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una secuencia de DNA y/o RNA corta complementaria a una parte de la secuencia de mRNA de Cbl-b objetivo para aplicación en una terapia, que comprende el aislamiento de las células del sistema inmune de un paciente, comprendiendo las células células que presentan antígeno, PBMCs (células de sangre mononucleares periféricas), linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, células NK y/o células NKT; un incremento in vitro o ex vivo de la inmunorreactividad de las células mediante uso de la secuencia corta de DNA y/o RNA complementaria a una parte de la secuencia de mRNA de Cbl-b objetivo, y reimplantación de las células en los pacientes, aumentándose la inmunorreactividad mediante una reducción transiente o la inhibición de la función de Cbl-b de las células. La invención se refiere además a células aisladas del sistema inmune de un paciente, que se transfectaron con una secuencia corta de DNA y/o RNA complementaria a una parte de la secuencia de mRNA de Cbl-b objetivo por vía transiente, comprendiendo las células células que presentan antígeno, PBMCs (células de sangre mononucleares periféricas), linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, células NK y/o células NKT; y poniéndose en contacto las células con un antígeno antes o después de la extracción, para la aplicación en una terapia que comprende la reimplantación de las células en los pacientes, aumentándose la inmunorreactividad mediante una reducción transiente o la inhibición de la función de Cbl-b de las células.

Una implementación del incremento en la inmunorreactividad, de preferencia por un periodo de tiempo limitado, concurrentemente con una vacunación, la administración del antígeno, se puede inducir al reducir la expresión de Cbl-b en una porción pequeña de las células T circulantes. A tal efecto, las PBMCs (células de sangre mononucleares periféricas) se pueden obtener a partir de sangre completa, o bien células sanguíneas de la médula ósea, y a partir del propio tejido tumoral (TILs) del paciente, que se inmunizó idealmente unos pocos días antes, por ejemplo cinco días, y tratar in vitro o ex vivo con una carga de atenuación de siRNA específico de Cbl-b. Este procedimiento se realiza muy rápidamente. En el caso ideal, esta preparación de células se puede administrar al

paciente nuevamente solo pocos minutos después de su extracción. Las células opcionalmente se pueden multiplicar o expandir por protocolos de estimulación ex vivo adecuadas para las células respectivas antes de que las células sean reimplantadas. Las células T activadas in vitro, que representan solamente un pequeño porcentaje de la población de células T del paciente, encuentran células que presentan antígeno en los ganglios linfáticos en su circulación en el organismo receptor, que, debido a la inmunización ya efectuada, han absorbido antígenos y han migrado allí. Puesto que las células T tratadas in vitro no requieren una señal de coestimulación, éstas proliferan inmediatamente después de reconocimiento del antígeno de inmunización y secretan citoquinas, que contribuyen sistémicamente a la inducción de una respuesta inmune tanto a nivel celular como a nivel humoral. Con esta carga, incluso antígenos débilmente inmunogénicos conducirán al establecimiento de una protección inmune de largo plazo. Del mismo modo, el rechazo de tumores autólogos en pacientes con cáncer se puede inducir de esta manera. Un antagonista de Cbl-b incrementa en este caso la inmunorreactividad, utilizándose éste en un tratamiento de enfermedades oncológicas por quimio/radioterapia exclusivo, o bien concomitante, en combinación con la inmunizaciones pasivas, tal como anticuerpos específicos de antígeno tumoral.

Por lo tanto, este método se utiliza para tratar la insuficiencia inmune congénita o adquirida, en particular SIDA, mieloma múltiple, leucemia linfático crónica, inmunosupresión inducida por fármaco o un cáncer, en caso dado con la selección de antígenos específicos de la enfermedad. El tratamiento de un cáncer que forma tumores sólidos se prefiere en particular.

Para incrementar las posibilidades de éxito de una terapia, el tratamiento de un cáncer se administra preferentemente en combinación con otra terapia antitumoral, en particular quimioterapia, radioterapia, administración de una sustancia biológica terapéutica o la vacunación (tumoral) soportada por células dendríticas. La inhibición de Cbl-b se puede utilizar como parte de una vacunación soportada por células dendríticas, de preferencia una vacunación antitumoral. Como una alternativa, o bien adicionalmente, también el cocultivo in vitro de las células inhibidas por Cbl-b con células dendríticas obtenidas del paciente, que se cargaron de preferencia con antígenos (celulares) tumorales, también es posible, así como el uso de cocultivo para los propósitos según la invención.

El incremento in vitro o ex vivo de la inmunorreactividad se puede realizar en el método terapéutico como es descrito en lo anterior, pudiéndose efectuar la exposición de las células frente a un antígeno ya antes de la extracción de la células, o a continuación.

La secuencia cronológica de presentación del antígeno de inmunización, cuya absorción por las células que presentan antígeno, y además la migración de estas células a los ganglios linfáticos locales, donde las sustancias absorbidas presentan células T activadas, también es importante en la implementación terapéutica. Por lo tanto, el paciente se vacuna de preferencia con el antígeno, de preferencia aún antes del aislamiento de las células, en particular de preferencia antes de al menos 1, 2, 3, 4 o 5 días y/o a lo más 20, 6, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 semana(s) antes del aislamiento de las células. Alternativamente, una vacunación subsecuente o un tratamiento de las células con un antígeno in vitro o ex vivo también es posible.

Además, también es posible usar células que presentan antígeno, que proceden de preferencia del propio paciente y se pueden poner en contacto con el antígeno correspondiente, y luego contribuir al incremento en la inmunorreactividad específica, ya sea conjuntamente o poco antes o después de la administración de las células inmunes inhibidas por Cbl-b, de preferencia células T.

Las células de preferencia son específicas para un cierto antígeno o se seleccionan células que comprenden un cierto antígeno respecto a la especificidad o presencia del antígeno, aumentándose la inmunorreactividad de las células seleccionadas. A través de la selección de un cierto antígeno, o bien de células con una especificidad de aumento inmune para ello, una respuesta inmune puede ser dirigida selectivamente contra un cierto objetivo en el paciente. Tal objetivo sería en particular un tumor (a través de la selección de por lo menos uno o más antígenos tumorales) o un patógeno.

Es concebible que el siRNA correspondiente en la carga de transfección se disponga ya en el mismo tubo desechable estéril en paralelo a la separación de las células. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un recipiente de preferencia estéril, tal como un tubo desechable, que comprende un inhibidor de Cbl-b, en particular para incrementar la inmunorreactividad de las células del sistema inmune contra un antígeno.

Del mismo modo, la presente invención prevé un kit, que comprende un recipiente, en particular un tubo desechable para contener las células del sistema inmune, así como un inhibidor de Cbl-b, tal como siRNA, en particular para incrementar la inmunorreactividad de las células del sistema inmune contra un antígeno mediante el método de acuerdo con la invención.

El recipiente, o bien el kit, también puede comprender adicionalmente una sustancia inmunoestimulante, de preferencia citoquina(s) o ligandos de otros receptores (por ejemplo TLRs) o anticuerpos contra las moléculas de superficie, de preferencia CD3 y/o CD28, para aumentar adicionalmente la estimulación. Del mismo modo, el kit o el recipiente también puede comprender componentes, medios o tampones estabilizantes (para la estabilización de las células), disoluciones de transfección o nucleofección, de preferencia medios celulares, tales como RPMI u

Optimem.

La presente invención se ilustra por medio de las siguientes figuras y ejemplos sin que sea limitada a los mismos.

En las figuras muestran:

5 La Fig. 1 una representación esquemática simplificada de la activación de la célula T mediante la coestimulación (a), o, en el caso de la atenuación de la expresión de Cbl-b, mediante la estimulación única del receptor de célula T (c), que usualmente no conduce a la activación (b);

10 La Fig. 2 un análisis Western-Blot de la expresión de Cbl-b. Las células CD8* se aislaron a partir de PBMC humanas, transfectadas con siRNA de Cbl-b, mantenidas en cultivo, y se compararon con un grupo de control sin estimulación, después de la estimulación anti-CD3 o después de la estimulación anti-CD3 y anti-CD28. Fyn se utilizó como el control de carga;

15 La Fig. 3 muestra la secreción de IFN-gamma de las células CD8+ humanas dos días después del tratamiento de siRNA. La concentración de IFN- γ se midió en sobrenadantes de células T CD8+ sin estimulación (medio) (izquierda) y después de la coestimulación específica de CD3 (centro) o después de la coestimulación específica de CD3 y de CD28 (derecha). Se compararon poblaciones de células de dos días de edad, que se transfectaron por medio de siRNA no específico (1^{ra} barra), siRNA específico de Cbl-b (2^{da} barra), siRNA específico de c-Cbl-b (3^{ra} barra) y siRNA específico de Cbl-b y de c-Cbl-b (4^{ta} barra) ;

20 La Fig. 4 muestra la secreción de IL-2 de las células CD8+ humanas veinte días después del tratamiento de siRNA. Se midió la concentración de IL-2 en los sobrenadantes de las células T CD8+ sin estimulación (medio) (izquierda) y después de la estimulación específica de CD3 (centro) o después de la coestimulación específica de CD3 y de CD28 (derecha). Se compararon poblaciones de células de dos días de edad, que se transfectaron por medio de siRNA no específico (1^{ra} barra), siRNA específico de Cbl-b (2^{da} barra), siRNA específico de c-Cbl (3^{ra} barra) y siRNA específico de Cbl-b y c-Cbl (4^{ta} barra) se compararon; y

La Fig. 5 la secuencia cronológica de la carga de atenuación de Cbl-b in vitro para incrementar la inmunorreactividad;

25 La Fig. 6 la absorción de siRNA por las células T humanas, aisladas a partir de PBMCs (A), la absorción de siRNA por las PBMCs empobrecidas en células CD8 (B);

La Fig. 7 la expresión de mRNA de Cbl-b después del RNAi (A), y la cantidad de proteína Cbl-b producida después de RNAi en un Western Blot (B);

La Fig. 8 la producción de IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2 después de la inhibición de Cbl-b;

30 La Fig. 9 la producción de IFN-gamma después de la inhibición de Cbl-b como un perfil de tiempo;

La Fig. 10 el incremento en la reactividad de célula T medido por medio de la expresión de marcador CD107a + CD69 (A), CD107a, CD3, CD40L, ICAM (B);

La Fig. 11A el crecimiento de tumor en ratones después del tratamiento, con/sin supresión de Cbl-b en células CD8 terapéuticas; B: Mortalidad de ratones con tumores EG7ova después del tratamiento.

35 Ejemplos

Ejemplo 1: Secuencias

Las siguientes secuencias de siRNA se utilizaron para la inhibición de Cbl-b, por separado o en combinación:

1. Secuencia sentido:

G.A.A.C.A.U.C.A.C.A.G.G.A.C.U.A.U.G.A.U.U (SEQ ID No. 1)

40 Secuencia antisentido:

5'-P.U.C.A.U.A.G.U.C.C.U.G.U.G.A.U.G.U.U.C.U.U (SEQ ID No. 2)

2. Secuencia sentido:

G.U.A.C.U.G.G.U.C.C.G.U.U.A.G.C.A.A.A.U.U (SEQ ID No. 3)

Secuencia antisentido:

45 5'-P.U.U.G.C.U.A.A.C.G.G.A.C.C.A.G.U.A.C.U.U. (SEQ ID No. 4)

3. Secuencia sentido:

G.G.U.C.G.A.A.U.U.U.G.G.G.U.A.U.U.A.U.U (SEQ ID No. 5)

Secuencia antisentido:

5'-P.U.A.A.U.A.C.C.C.A.A.A.U.U.C.G.A.C.C.U.U. (SEQ ID No. 6)

5 4. Secuencia sentido:

U.A.U.C.A.G.C.A.U.U.U.A.C.G.A.C.U.U.A.U.U (SEQ ID No. 7)

Secuencia antisentido:

5'-P.U.A.A.G.U.C.G.U.A.A.A.U.G.C.U.G.A.U.A.U.U (SEQ ID No. 8)

Las siguientes secuencias de siRNA se utilizaron para la inhibición de Cbl-b, por separado o en combinación:

10 1. Secuencia sentido:

A.A.U.C.A.A.C.U.C.U.G.A.A.C.G.G.A.A.U.U (SEQ ID No. 9)

Secuencia antisentido:

5'-P.U.U.U.C.C.G.U.U.C.A.G.A.G.U.U.G.A.U.U.U.U (SEQ ID No. 10)

2. Secuencia sentido:

15 G.A.C.A.A.U.C.C.C.U.C.A.C.A.A.U.A.A.U.U (SEQ ID No. 11)

Secuencia antisentido:

5'-P.U.U.U.A.U.U.G.U.G.A.G.G.A.U.U.G.U.C.U.U (SEQ ID No. 12)

3. Secuencia sentido:

U.A.G.C.C.C.A.C.C.U.U.A.U.A.U.C.U.U.A.U.U (SEQ ID No. 13)

20 Secuencia antisentido:

5'-P.U.A.A.G.A.U.A.U.A.A.G.G.U.G.G.G.C.U.A.U.U (SEQ ID No. 14)

4. Secuencia sentido:

G.G.A.G.A.C.A.C.A.U.U.U.C.G.G.A.U.U.A.U.U (SEQ ID No. 15)

Secuencia antisentido:

25 5'-P.U.A.A.U.C.C.G.A.A.A.U.G.U.G.U.C.U.C.C.U.U (SEQ ID No. 16)

Ejemplo 2: Reducción transiente en la expresión de Cbl-b

En este ejemplo se muestra que la inmunorreactividad de las células T pudo ser influenciada ex vivo.

Se extrajo sangre completa de un donante por medio de tubos CPT (Vacutainer), y se separaron las PBMCs de ésta por centrifugación. En otra etapa se concentraron células CD8+ a partir de esta preparación. Éstas se transfectoron por medio de un siRNA específico de Cbl-b utilizando un aparato de transfección Amaxa (protocolo detallado en el Ejemplo 3) y se cultivaron adicionalmente. Como control se transfectó la carga idéntica con un siRNA inespecífico utilizando el protocolo idéntico. Puesto que se supone una superposición potencial de Cbl-b y c-Cb1, dos de otros lotes se trataron mediante siRNA específico de c-Cb1 y una combinación de siRNA específico de c-Cb1 y específico de Cbl-b. Todas las cargas se cultivaron durante dos días. El hecho de que la transfección condujera a la atenuación deseada de la expresión de Cbl-b se demostró mediante el análisis Western Blot subsecuente. Para inducir la expresión de Cbl-b, los cultivos se estimularon con CD3 y en otra carga con anticuerpos específicos de CD3 y específicos de CD28. En todos los experimentos, la expresión de Cbl-b en la preparación transfectada se redujo a menos de 5% de la intensidad de una transfección de control, como se muestra en la Fig. 2. Puesto que la estabilidad del siRNA, y consecuentemente una supresión eficiente de la expresión es de una duración limitada y no es transmitida a otras células, la carga seleccionada es una atenuación transiente de la expresión Cbl-b, que se relaciona estrictamente con la presencia del siRNA de Cbl-b.

Ejemplo 3: Protocolo de transfección

Nucleofección con siRNAs en células T humanas

La nucleofección se realiza al trabajar conjuntamente con otro asistente de laboratorio. Una persona realiza el pipeteo de los oligos de siRNA y otra persona transfiere las muestras a un medio de cultivo. Esto acelera significativamente el procedimiento.

1. Se prepara el medio para el RPMI celular (+pen/strep., +L-glut, +10% FCS).
2. Se pipetea el medio de cultivo en al menos dos tubos Falcon de 50 mL/constructo (uno para recolectar las células nucleofectadas y uno para el medio de lavado de cubeta), 1 mL/L de muestra de nucleofección en cada tubo. Se lleva los tubos a 37°C.
3. Se marcan los tubos Eppendorf para cada muestra de nucleofección.
4. Se centrifugan las células nucleofectadas (410 g) durante siete minutos y se elimina el sobrenadante. Se adiciona Optimem (Gbc, #31985-047),
5. De modo que la densidad celular será de 40×10^6 /mL. Se pipetea 100 μ L (= 4×10^6 células) en cada tubo Eppendorf.
6. Se adicionan 1,5 – 2,5 μ M de oligo de siRNA en los tubos Eppendorf que contienen las células justo antes de la nucleofección. Se mezcla mediante pipeteo y se transfiere la solución a la célula (se evitan burbujas de aire). Se golpea la cubeta contra la mesa para eliminar las burbujas.
7. Se cierra la cubierta y se coloca la cubeta en el dispositivo de transfección Amaxa (electroporador). (Programa U-14 y no V-24 como la mejor opción utilizando la disolución Nucleofectora Optimem). Se presiona el botón x y se retira la cubeta después de la señal OK. (Se presiona el botón x nuevamente antes de la siguiente electroporación).
8. Se añaden inmediatamente 500 μ L de RPMI (37°C) a la cubeta de nucleofección y se mezcla cuidadosamente mediante el pipeteo con la pipeta Pasteur. Se transfieren las células al tubo Falcon de recolección. Se lava la cubeta una vez con 500 μ L de RPMI precalentado y se transfiere el resto de las células al tubo Falcon de recolección.
9. Se repiten las etapas 5-7 con cada muestra.
10. Se colocan los tubos Falcon en la incubadora hasta que todas las muestras estén nucleofectadas. .
11. Se pipetea 4 mL de la suspensión celular en cavidades de placa de 6 cavidades (= 2 muestras) y se colocan las placas en la incubadora.
12. Al siguiente día se recolectan las células, se cuentan y se inicia el cultivo 24 horas después que se realiza la nucleofección como es descrito en lo anterior. Se toma una alícuota de las células para el aislamiento de RNA para verificar si el gen objetivo se ha reducido en cuanto al tiempo de activación. Las muestras de proteínas se toman sobre la base de las cinéticas de expresión de proteína.

Ejemplo 4: Eficiencia de Nucleofección

CD8+ se aisló a partir de sangre humana periférica como se describe en lo anterior. La selección negativa se realizó a través de cuentas.

Resultado (comparación de Amaxa):

Pureza de la población: 97% CD8+ (FACS)

Dispositivo	Viabilidad después de 3,5h negativo a azul de tripano (%)	Viabilidad después de 24h negativo a azul de tripano(%)	Eficiencia siGIO pos en FACS (%)
Amaxa V-24	94	93	96
No tratado	100	99	0

Experimento con Optimem:

Nucleofección en	Programa	Células después en	Viabilidad después de 3,5h negativo a azul de tripano (%)	Viabilidad después de 24h negativo a azul de tripano (%)	Eficiencia siGLO-pos en FACS (%)
Disolución nucleofectora	V-24	hTC	99	92	96
Optimem	V-24	RMPI	92	67	96
Optimem	U-14	RMPI	95	92	96

Así se detectó una expresión de Cbl-b claramente reducida en la química de proteína.

Ejemplo 5: Incremento transiente en la reactividad de célula T-medición de IFN-gamma

5 Así se demostró que la expresión de Cbl-b en células CD8+ humanas se puede suprimir con al menos 95% de eficiencia. Como consecuencia ulterior, ahora será demostrado que la reactividad de la población de células T también se puede incrementar. Para asegurar que el efecto deseado sea exclusivamente específico de Cbl-b y no se pueda evitar en el caso de la atenuación de la expresión de Cbl-b mediante c-Cb1, en otra carga se atenuó igualmente c-Cb1, y en una tercera carga también se atenuaron c-Cb1 y Cbl-b. Todos estos cultivos de células CD8+ se cultivaron durante dos días y se estimularon por una parte mediante CD3, y también mediante CD3 y CD28, y se compararon con un grupo no estimulado. Normalmente, las células T requieren esta coestimulación de CD3 y CD28 para proliferar, lo que se puede detectar fácilmente a través de la secreción de citoquinas inflamatorias en los sobrenadantes de los cultivos. Para detectar esta activación de la célula T se midieron títulos de IFN-gamma en los sobrenadantes. Una representación gráfica de la influencia de la atenuación de la expresión mediante el tratamiento siRNA sobre la reactividad de célula T se muestra en la Fig. 3. Dos días después de la transfección, todos los cultivo de célula CD8+, que se transfectaron con siRNA específico de Cbl-b y/o c-Cb1, se estimularon como es descrito y se compararon con un grupo de control que se transfectó con un siRNA no específico. Las células no estimuladas no mostraron una expresión de IFN-gamma en principio. Después de la estimulación de CD3 exclusiva, todos los cultivos mostraban una reactividad elevada, de modo que se pudieron identificar al menos 500 pg/mL de IFN-gamma en los sobrenadantes. En este caso, las señales para siRNA específico de c-Cb1 y células transfectadas inespecíficamente eran muy similares (bajas). Solamente las células transfectadas con siRNA específico de Cbl-b mostraban una reactividad mucho más alta, que iba acompañada de un título de IFN-gamma de aproximadamente 3 ng/mL. La reactividad de la preparación celular cotransfectada mediante siRNA específico de c-Cb1 y Cbl-b, sin embargo, fue menor que después del tratamiento de siRNA específico de Cb-b, alcanzando solamente 1,2 ng/mL. En todos los casos, la coestimulación específica de CD3 y CD28 produjo, como es esperado, señales claramente más altas que la estimulación únicamente específica de CD3. La preparación de control, que se trató con siRNA inespecífico, produjo un título de IFN-gamma en una cantidad de 1,2 ng/mL, mientras que el cultivo tratado con siRNA específico de Cbl-b presentaba una concentración de IFN-gamma de 3,8 ng/mL. Fue notable que el cultivo coatenado específico de Cbl-b y c-Cb1 mostraba títulos de 1,7 ng/mL, que fueron así claramente menores que el grupo atenuado en el Cbl-b. También fue inesperado que la población celular, que se trató con siRNA específico de c-Cb1, presentaba una reactividad significativamente menor y solamente se midieron 500 pg/mL de IFN-gamma en el sobrenadante. Esta concentración es significativamente menor que la del grupo de control coestimulado tratado inespecíficamente, y es comparable a los valores del grupo de control estimulado solamente con anti-CD3. Así, en contraste con el sistema murino, una redundancia de Cbl-b y c-Cb1 en células T CD8* humanas se excluye experimentalmente, y un procedimiento terapéutico es razonable solo por la vía de Cbl-b (y sus reguladores de línea de entrada), pero no por la vía de las combinaciones de Cbl-b/c-Cb1, para incrementar la inmunorreactividad. Sin embargo, la inhibición de c-Cb1 permite la inmunosupresión para otras aplicaciones, tales como, por ejemplo, el tratamiento de inflamaciones o alergias.

40 Este procedimiento terapéutico concomitante, ya sea concebido como monoterapia o combinado con una vacunación, también es capaz de reconocer células tumorales diseminadas en la periferia y combatir las mismas de manera duradera mediante el desarrollo de una respuesta inmune. Inmediatamente tras diagnóstico de un cáncer, de esta manera se impide igualmente una diseminación de un tumor primario.

Ejemplo 6: Incremento transiente en la reactividad de célula T - Medición de IL-2

45 Un resultado muy similar se obtuvo al medir las concentraciones de IL-2 en los mismos sobrenadantes, como se puede observar de la Fig. 4: Sin la estimulación no hubo respuesta mensurable, mientras que un tratamiento específico anti-CD3 condujo una señal claramente medible en todos los grupos. Así, se midieron >200 pg/ml en el grupo atenuado con Cbl-b. La concentración de IL-2 en la población coatenada con Cbl-b y c-Cb1 fue nuevamente mucho menor y ascendía a >100 pg/mL. La coestimulación específica de anti-CD3 y anti-CD28 a su vez produjo señales más altas. Se midieron concentraciones de IL-2 de >800 pg/mL en todos los grupos, independientemente

del tratamiento de siRNA. El grupo de control produjo títulos muy similares a los títulos atenuados con Cbl-b, de 1,3 y 1,4 ng/mL. Es interesante que las concentraciones de IL-2 después de la atenuación específica de c-Cb1, fueron mucho menores y ascendían solamente a 800 pg/mL, independientemente de que se empleara solo c-Cbl de manera exclusiva, o c-Cbl junto con Cbl-b en el procedimiento.

5 Ejemplo 7: Incremento transiente en la inmunorreactividad

Debido al tratamiento in vitro o ex vivo, la reactividad de célula T se aumenta eficientemente, de modo que es posible inducir la proliferación de células T a través de la estimulación exclusiva de receptor de célula T. Este es un requisito esencial para el procedimiento terapéutico aquí descrito. Esta atenuación es de una naturaleza transiente debido al uso de la tecnología de RNAi.

10 Esta aplicabilidad de estas células modificadas sirve para incrementar la inmunogenicidad de vacunas, así como para incrementar la reactividad del sistema inmune en general. Cinco días después de una inmunización básica, se extrae sangre completa de un paciente en tubos CPT. Después de aproximadamente veinte minutos se aíslan PBMCs a partir de la misma mediante centrifugación. Las preparaciones celulares se transfectan con siRNAs específicos de Cbl-b y se reimplantan de nuevo en el paciente inmediatamente después. En el día 10 se extrae sangre completa nuevamente y se obtiene suero a partir de la misma. En éste se miden títulos de citoquina pro-inflamatorios y se comparan con el grupo de control. Del mismo modo se analiza la naturaleza de la respuesta inmune inducida con respecto a su orientación celular de una respuesta inmune controlada con Th1 (títulos aumentados de IFN-gamma, IL-2 e IL12) o de una tendencia humoral en una respuesta inmune dirigida a Th2 (título aumentado de IL-4, IL5 e IL10). Si es necesario se llevan a cabo otras inmunizaciones de refuerzo con o sin terapia de PBMC en un intervalo de 14 días (Fig. 5).

Ejemplo 8: Nucleofección de células T CD4 y células B CD19

25 Las PBMCs se aislaron como es descrito en lo anterior y se transfectaron bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 3 (U14). El oligo utilizado para transfección (siGIO Red) se utilizó en una concentración de 2 µM, y la captación específica se detectó mediante FACS, la diferenciación de células CD4 y CD8 se realizó mediante el teñido doble simultáneo con CD8-TIFC y CD3-APC (Fig. 6A).

30 Las PBMCs se prepararon como es descrito en lo anterior y sus células CD8 se aislaron. Las células negativas CD8 restantes se transfectaron a continuación con siGIO Red como es descrito en lo anterior (aunque con una concentración de oligo de 3,3 µM). La absorción específica se detectó mediante FACS mediante el teñido doble simultáneo con CD3-FITC y CD19-APC (Fig. 6B). Curiosamente, en este experimento se observó también que en la fracción de linfocitos negativos CD3/CD19, que está constituida por células NK, tuvo lugar igualmente una absorción eficiente del oligo empleado.

Este ejemplo, por lo tanto, muestra que otras células inmunes también pueden ser transfectadas de manera altamente eficiente bajo las mismas condiciones de transfección que las células CD8.

Ejemplo 9: Reducción transiente en la expresión Cbl-b en células CD4 humanas a nivel de mRNA y proteína

35 Las células CD4 se aislaron de las PBMCs mediante depleción de células CD8 y se cultivaron mediante la estimulación de PHA/anti-CD3/28. Después de dos semanas, estas células CD4 se transfectaron mediante un siRNA específico de Cbl-b utilizando el protocolo de transfección Amaxa (véase Ejemplos 3 y 8). Como control se transfectó la carga idéntica con un siRNA inespecífico utilizando el protocolo idéntico. Después de la transfección, las células se cultivaron con IL-2 (5 ng/mL) durante un día más y se estimularon con anti-CD3/28 el siguiente día.

40 La expresión de mRNA de Cbl-b en la preparación transfectada se redujo en aproximadamente 85% en comparación con la transfección de control en las células CD4 estimuladas durante 24 h (Fig. 7A). La reducción aguda de mRNA de Cbl-b se correlacionó en este caso con una reducción comparativamente fuerte de la cantidad de proteína de Cbl-b, como se detectó en el Western Blot (Fig. 7B).

Ejemplo 10: Incremento en la reactividad de célula T CD4 – Medición de citoquinas con actividad antitumoral

45 Una de las tareas principales de las células CD4 en respuestas inmunes mediadas por célula T es la producción de citoquinas inflamatorias. La literatura menciona en particular las citoquinas IL-2, IFN-γ y TNF-α.

La expresión de estas tres citoquinas, por lo tanto, se determinó mediante ELISA. En un tiempo de 24h después de la estimulación de anti-CD2/28, estas tres citoquinas habían aumentado significativamente en las células T CD4 silenciadas con Cbl-b humanas (Fig. 8).

50 Ejemplo 11: Curso transiente del incremento en la reactividad de célula T CD4 a través de la producción incrementada de citoquinas con actividad antitumoral

Para lograr una actividad antitumoral eficiente de las células T silenciadas con Cbl-b, es importante que la producción de citoquina incrementada se mantenga también durante un cierto período de tiempo después de la estimulación de la célula T. Sin embargo, ese período de tiempo también debe ser limitado con el fin de minimizar el

riesgo de establecer permanentemente una autoinmunidad indeseada contra el tejido no maligno del paciente.

Por lo tanto, la producción de IFN- γ también se analizó mediante el teñido intracelular en FACS en distintos momentos. El diagrama en la Fig. 9 muestra claramente que el fuerte incremento en la producción de IFN- γ se mantuvo durante al menos 48h, mientras que seis días después la estimulación descendió nuevamente a un nivel comparable con aquel en los controles.

Ejemplo 12: Incremento en la reactividad de célula T – expresión incrementada de moléculas de superficie con propiedades funcionales y/o función de marcador de estimulación

La determinación respectiva de la producción de citoquina como un marcador para silenciar funcionalmente de manera exitosa el Cbl-b en células T humanas es técnicamente más compleja y, por lo tanto, tiende a no ser ejecutable tan puntualmente. Por lo tanto, también la expresión de los marcadores de superficie funcionalmente importantes se determinó mediante FACS.

CD107a se define en la literatura como un marcador de superficie para la actividad secretoria de células T citotóxicas y, por lo tanto, se determinó en las células T CD8 suprimidas en Cbl-b después de 24h de la estimulación anti-CD3/28. Las células T transfectadas con siRNA de Cbl-b mostraban en este caso actividad secretoria sensiblemente elevada (Fig. 10A).

Puesto que la molécula CD107a es involucrada en el transporte vesicular en células T, ésta también se puede utilizar como el marcador principal para la actividad secretoria de células T CD4. La Fig. 10B muestra que la expresión de CD107a en las células transfectadas con si-RNA de Cbl-b también fue significativa frente a células de control tratadas del mismo modo por lo demás.

CD40L e ICAM son otras dos moléculas de superficie que pueden ser inducidas por la estimulación de célula T. Estas dos moléculas son de relevancia funcional, CD40L en particular para la interacción con las células que presentan antígeno y para la estimulación/proliferación de células B, ICAM para la interacción con células que presentan antígeno y la migración fuera del sistema vascular en el tejido (maligno). La Fig. 10B muestra que la expresión de estas dos moléculas de superficie había aumentado significativamente en las células T CD4 humanas transfectadas con siRNA de Cbl-b.

Uno de los mecanismos descritos, responsable del incremento en la reactividad de célula T, es la atenuación menos pronunciada de los receptores CD3 sobre la superficie de la célula. La Fig. 10B muestra que la cantidad de los receptores CD3 todavía sobre en la superficie de la célula también había aumentado claramente en las células T CD4 humanas transfectadas con si-RNA de Cbl-b.

Sorprendentemente, también la expresión de la superficie celular del marcador de activación de células T tradicional CD69 había aumentado, mientras que la expresión de CD25 permaneció sin cambio. Esto puede ser de relevancia funcional particular, debido a que, aunque CD25 también se define como un marcador de estimulación, su función está especialmente asociada a la presencia y supervivencia de las llamadas células T reguladoras.

En conjunto, la Fig. 10 muestra, por lo tanto, que otras moléculas funcionalmente importantes o útiles como marcadores de superficie se pueden detectar en cantidades claramente mayores sobre la superficie de la célula mediante la transfección de siRNA de Cbl-b.

Ejemplo 13: La transferencia conjunta de células T deficientes en Cbl-b y células dendríticas es un procedimiento terapéutico efectivo en un modelo de tumor in vivo.

Se indujo un tumor en ratones de tipo silvestre mediante la inyección subcutánea 0,1 millones de células EG7ova. A continuación se inyectaron células T CD8 y células dendríticas en los días 5 y 6, y el efecto de esta terapia celular adoptiva se rastreo continuamente al medir el crecimiento del tumor. La Fig. 11A muestra que el crecimiento del tumor podría ser suprimido mucho más fuertemente y por un período más largo de tiempo por la transferencia de las células T deficientes de Cbl-b que por las células T de tipo silvestre.

La Fig. 11B también muestra que el tratamiento con células T deficientes en Cbl-b podía garantizar una supervivencia a largo plazo de una porción significativa de los ratones tratados hasta el final del período de observación de 80 días. En contraste con eso, el tratamiento con las células T de tipo silvestre condujo solo a una prolongación de vida insignificante en comparación con el grupo de control. Por lo tanto, la Fig. 11B muestra que el tratamiento con células T deficientes o inhibidas en Cbl-b tiene una ventaja significativa en comparación con el tratamiento con células T normales.

Listado de secuencias

<110> MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT INNSBRUCK
APEIRON BIOLOGICS FORSCHUNGS- UND ENTWICKLUNGSGESELLSCHAFT M.B.H.

<120> Procedimiento para aumentar la inmunorreactividad

<130> r53419
 <150> AT A 1996/2007
 <151> 2007-12-10
 <160> 16
 5 <170> Patentin version 3.4
 <210> 1
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> RNAi
 <400> 1
 gaacaucaca ggacuaugau u 21
 <210> 2
 15 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> RNAi
 20 <400> 2
 ucauaguccu gugauguucu u 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> RNA
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> RNAi
 <400> 3
 guacuggucc guuagcaau u 21
 30 <210> 4
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> RNAi
 <400> 4
 uuugcuaacg gaccaguacu u 21
 <210> 5
 <211> 21
 40 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> RNAi
 <400> 5
 45 ggucgaauuu ugguauuu u 21
 <210> 6
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 50 <220>

<223> RNAi
 <400> 6
 uaauacccaa aaucgaccu u 21
 5 <210> 7
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> RNAi
 10 <400> 7
 uaucagcauu uacgacuuau u 21
 <210> 8
 <211> 21
 <212> RNA
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> RNAi
 <400> 8
 uaagucguaa augcugauau u 21
 20 <210> 9
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> RNAi
 <400> 9
 aaucaacucu gaacggaau u 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> RNA
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> RNAi
 <400> 10
 35 uuccguuca gagugauuu u 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> RNAi
 <400> 11
 gacaucccu cacauaau u 21
 <210> 12
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 45 <220>
 <223> RNAi
 <400> 12
 50

ES 2 665 928 T3

uuuauuguga gggauugucu u 21
 <210> 13
 <211> 21
 <212> RNA
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> RNAi
 <400> 13
 uagcccaccu uauaucuuau u 21
 10 <210> 14
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> RNAi
 <400> 14
 uaagauauaa ggugggcuau u 21
 <210> 15
 <211> 21
 20 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> RNAi
 <400> 15
 25 ggagacacau uucggauuau u 21
 <210> 16
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> RNAi
 <400> 16
 uaauccgaaa ugugucuccu u 21

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento in vitro o ex vivo para el aumento de la inmunoreactividad de las células del sistema inmune, que comprende la reducción o inhibición transiente de la expresión de Cbl-b mediante empleo de una secuencia corta de DNA y/o RNA complementaria a una parte de la secuencia de mRNA de Cbl-b objetivo, poniéndose en contacto las células con un antígeno antes o después de la extracción, y aumentándose la inmunoreactividad de las células frente al antígeno, y comprendiendo las células que presentan antígeno, PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells), linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, células NK y/o células NKT.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, comprendiendo los linfocitos T linfocitos T CD8+ y/o linfocitos T CD4+..
3. Procedimiento según la reivindicación 2, comprendiendo los linfocitos T CD8+ células T reguladoras (Tregs) y/o células T citotóxicas (CTLs).
4. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, comprendiendo los linfocitos CD4+ Th1, Th2 y/o Th17.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que las células han absorbido el antígeno, y presentan preferentemente un fragmento de antígeno.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que las células se tratan con una sustancia inmunoestimulante, preferentemente una citoquina.
7. Composición farmacéutica que comprende una secuencia corta de ADN y/o ARN complementaria a una parte de la secuencia de ARNm de Cbl-b para la aplicación en una terapia que comprende aislamiento de células del sistema inmune de un paciente, comprendiendo las células que presentan antígeno, PBMCs (células mononucleares de sangre periférica), linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, células NK y/o células NKT; aumento in vitro o ex vivo de la inmunoreactividad de las células mediante uso de la secuencia corta de DNA y/o RNA complementaria a una parte de la secuencia de mRNA de Cbl-b objetivo, preferentemente como se define en una de las reivindicaciones 1 a 6, y reimplantación de las células en los pacientes, aumentándose la inmunoreactividad mediante una reducción transiente o la inhibición de la función de Cbl-b de las células..
8. Células aisladas del sistema inmune de un paciente, que se transfectaron con una secuencia corta de DNA y/o RNA complementaria a una parte de la secuencia de mRNA de Cbl-b o objetivo por vía transiente, comprendiendo las células que presentan antígeno, PBMCs (células mononucleares de sangre periférica), linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, células NK y/o células NKT; y poniéndose en contacto las células con un antígeno antes o después de la extracción, para la aplicación en una terapia que comprende la reimplantación de las células en los pacientes, aumentándose la inmunoreactividad mediante una reducción transiente o la inhibición de la función de Cbl-b de las células, preferentemente como se define en una de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Composición farmacéutica para la aplicación según la reivindicación 7, o células aisladas para la aplicación según la reivindicación 8 para el tratamiento de una insuficiencia inmune congénita o adquirida, en especial SIDA, mieloma múltiple, leucemia linfática crónica, inmunosupresión inducida por fármacos o un cáncer, preferentemente un cáncer que forma tumores sólidos, en especial para el tratamiento de un cáncer en combinación con otra terapia antitumor, preferentemente quimioterapia, radioterapia, administración de una sustancia biológica, o vacunación soportada por células dendríticas, en especial una vacunación antitumoral.
10. Composición farmacéutica o células aisladas para la aplicación según una de las reivindicaciones 7 a 9, comprendiendo los linfocitos T linfocitos T CD8+ y/o linfocitos T CD4+.
11. Composición farmacéutica o células aisladas para la aplicación según la reivindicación 10, comprendiendo los linfocitos T CD8+ células T reguladoras (Tregs) y/o células T citotóxicas (CTLs).
12. Composición farmacéutica o células aisladas para la aplicación según la reivindicación 10 u 11, comprendiendo los linfocitos T CD4+ Th1, Th2 y/o Th17.
13. Composición farmacéutica o células aisladas para la aplicación según una de las reivindicaciones 7 a 12, caracterizada por que las células se tratan con una sustancia inmunoestimulante, preferentemente una citoquina.
14. Composición farmacéutica o células aisladas para la aplicación según una de las reivindicaciones 7 a 13, caracterizado por que el paciente se vacunó con el antígeno, preferentemente antes del aislamiento de las células, de modo especialmente preferente antes de al menos 2 días y/o a lo sumo 8 semanas antes del aislamiento de las células.
15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, o composición farmacéutica o células aisladas para la aplicación según una de las reivindicaciones 7 a 14, caracterizado por que las células se ponen en contacto con el antígeno in vitro o ex vivo.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6 y 15, o composición farmacéutica o células aisladas para la aplicación según una de las reivindicaciones 7 a 15, caracterizado por que se seleccionan células específicamente para un determinado antígeno o células que comprenden un determinado antígeno respecto a la especificidad o presencia del antígeno, y se aumenta la inmunoreactividad de las células seleccionadas, siendo el antígeno

preferentemente un antígeno tumoral.

17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6 y 15 o 16, o composición farmacéutica o células aisladas para la aplicación según una de las reivindicaciones 7 a 16, caracterizado por que las células se expanden antes de la reimplantación.

5

Fig. 1

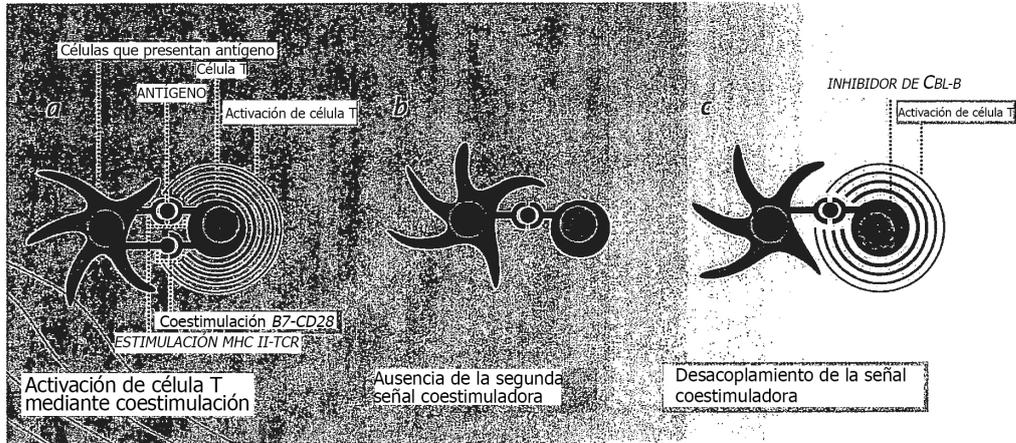
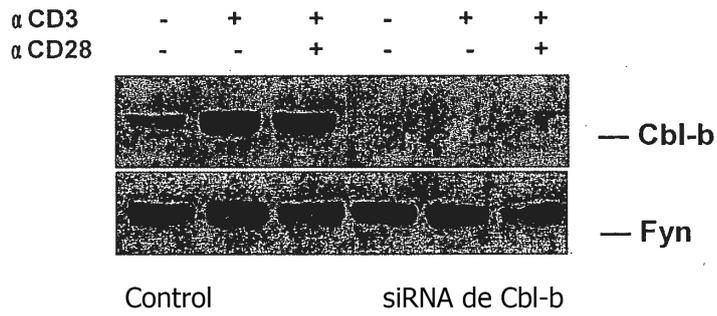


Fig. 2



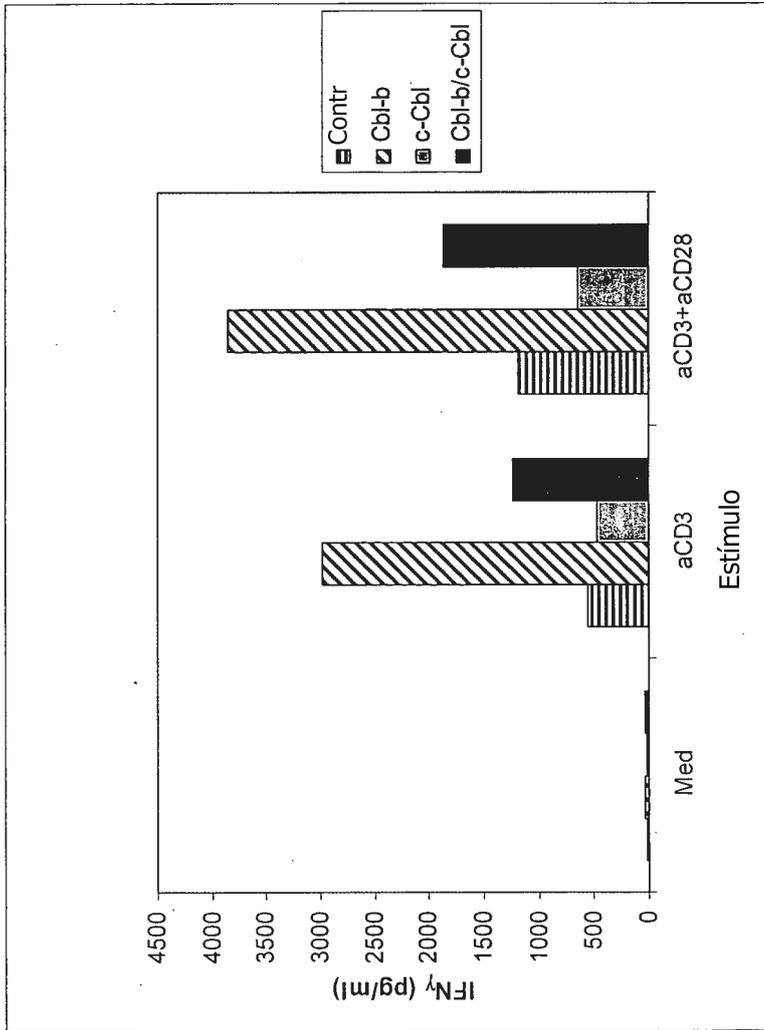


Fig. 3

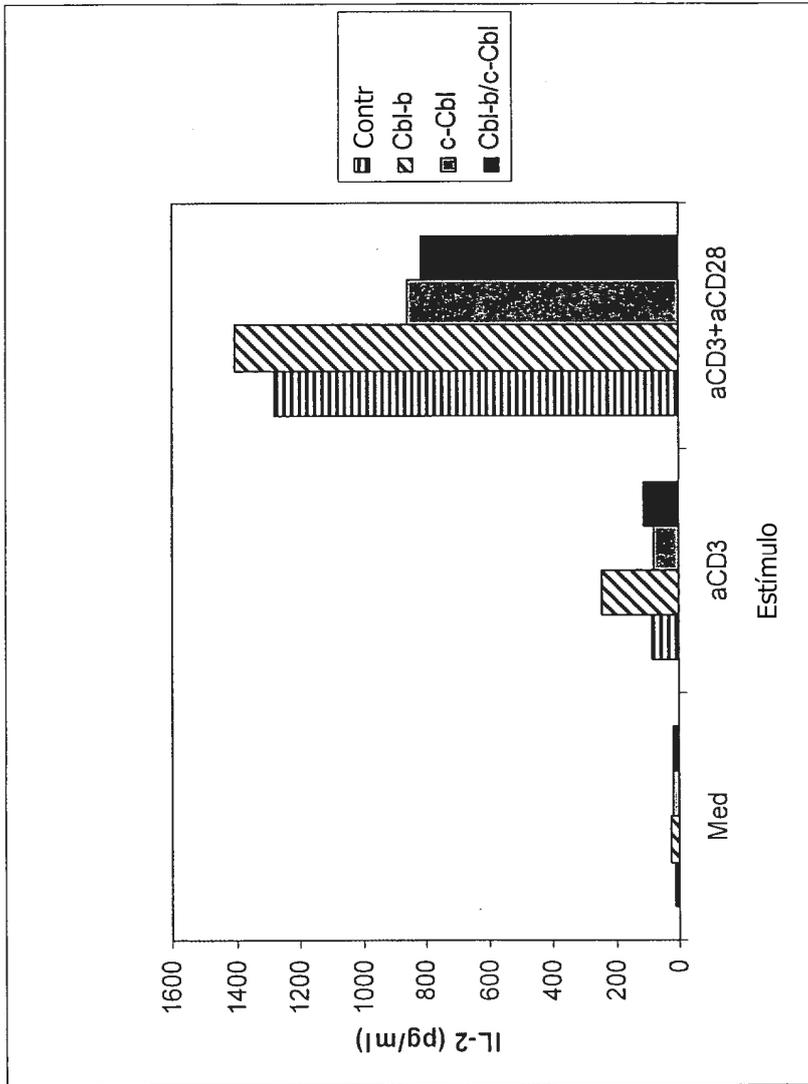


Fig. 4

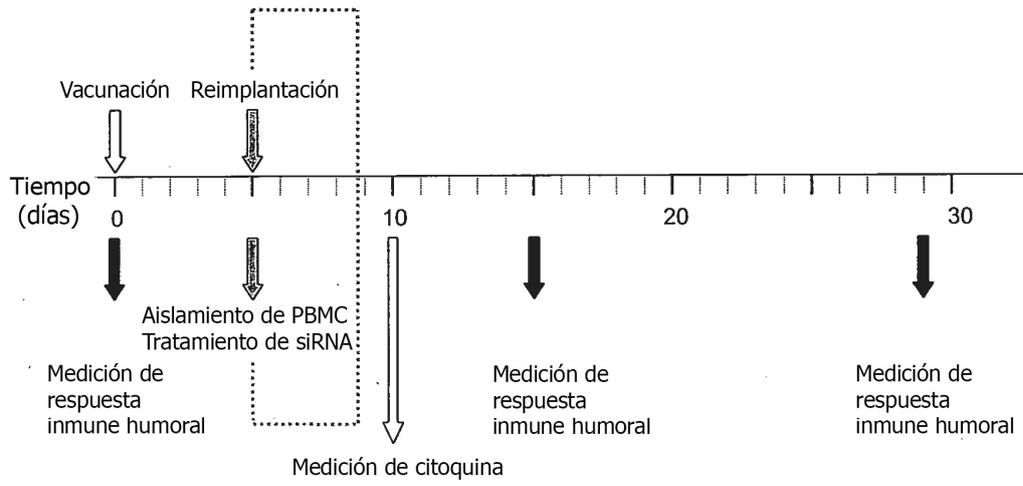


Fig. 5

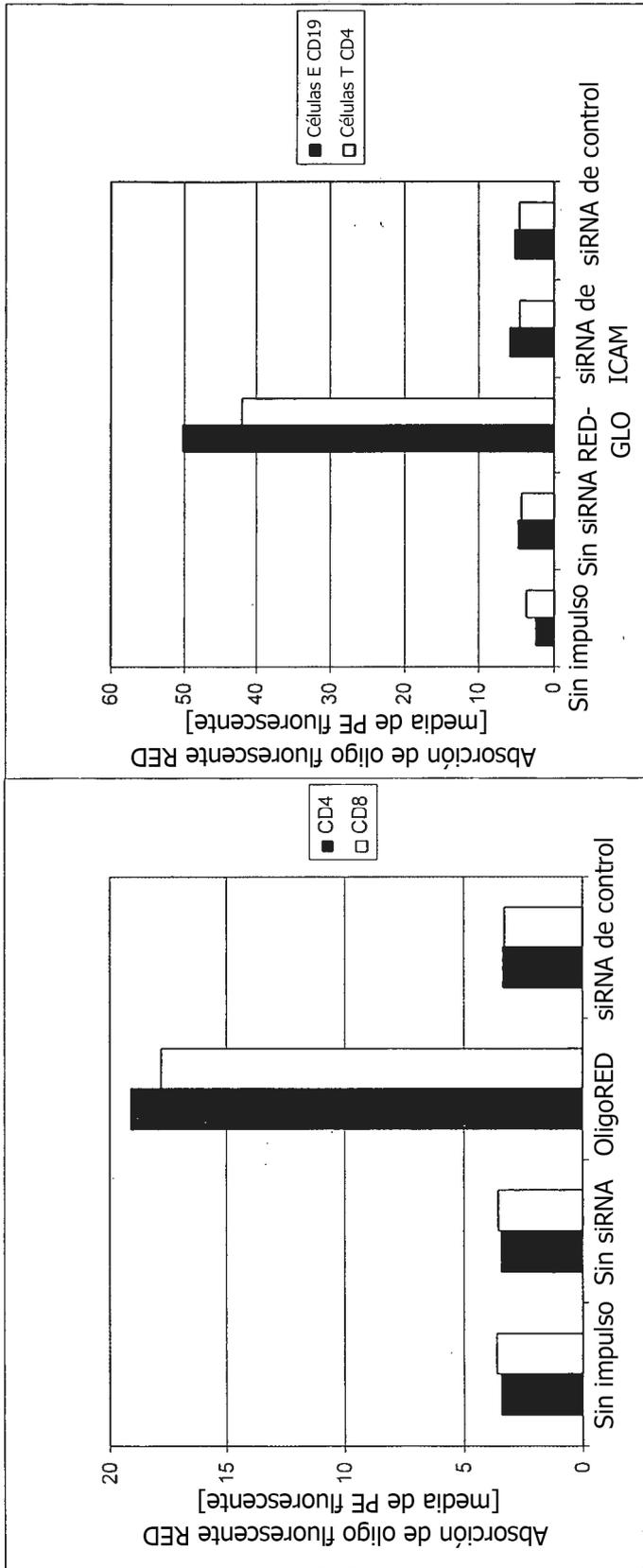


Fig. 6B

Fig. 6A

Control de
cbl-b

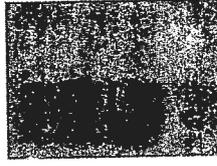


Fig. 7B

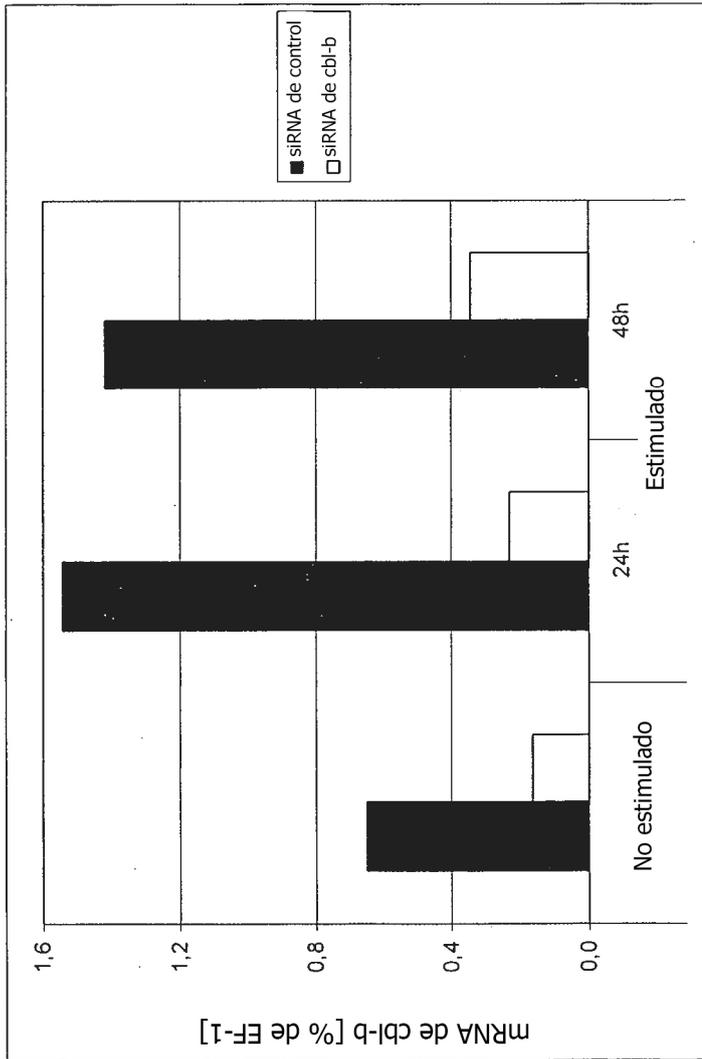


Fig. 7A

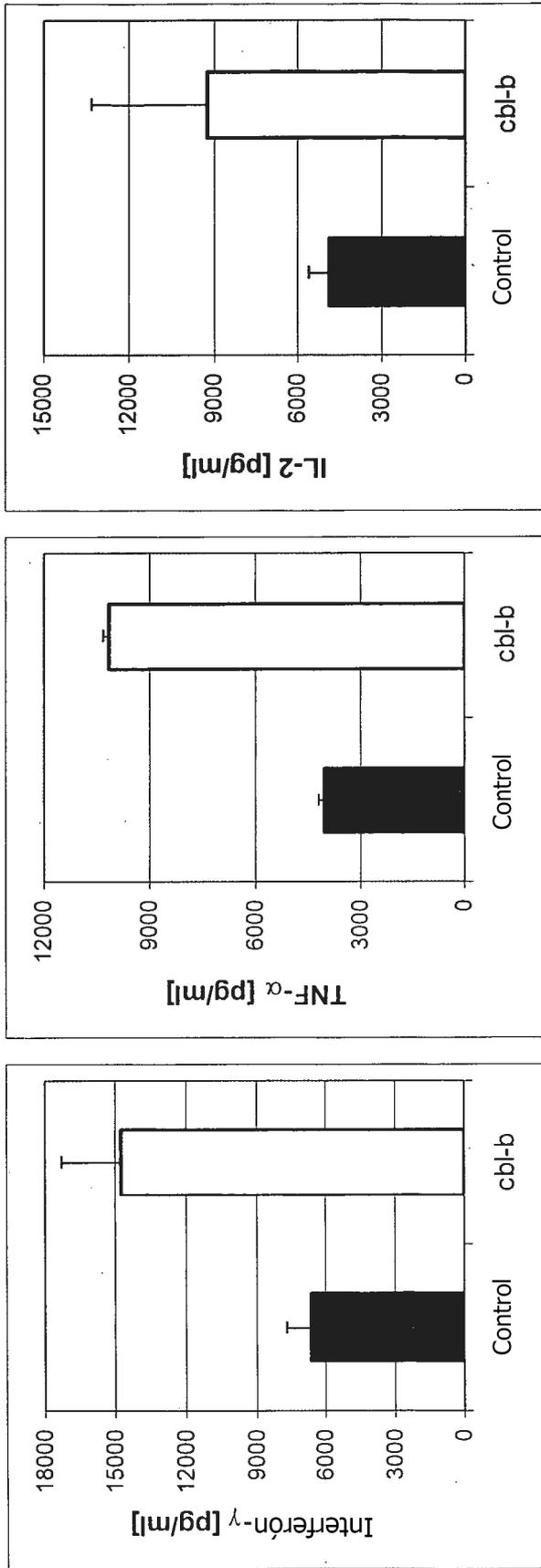


Fig. 8

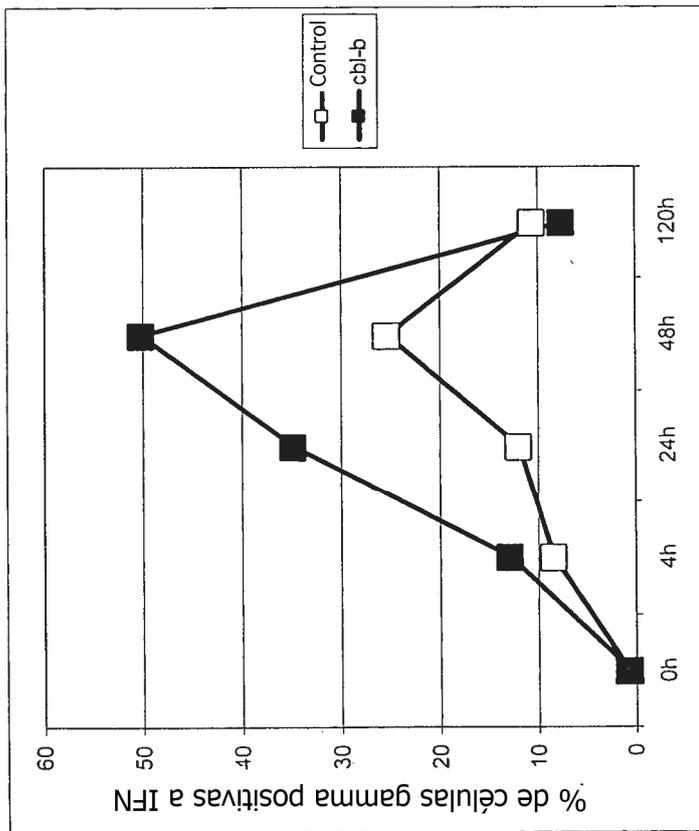


Fig. 9

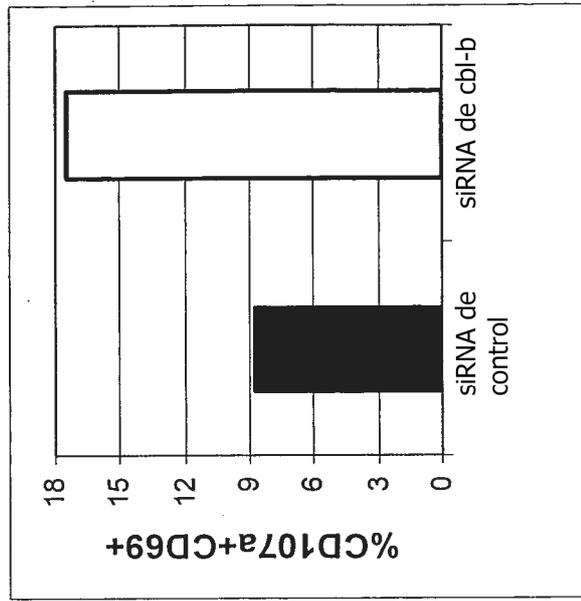


Fig. 10A

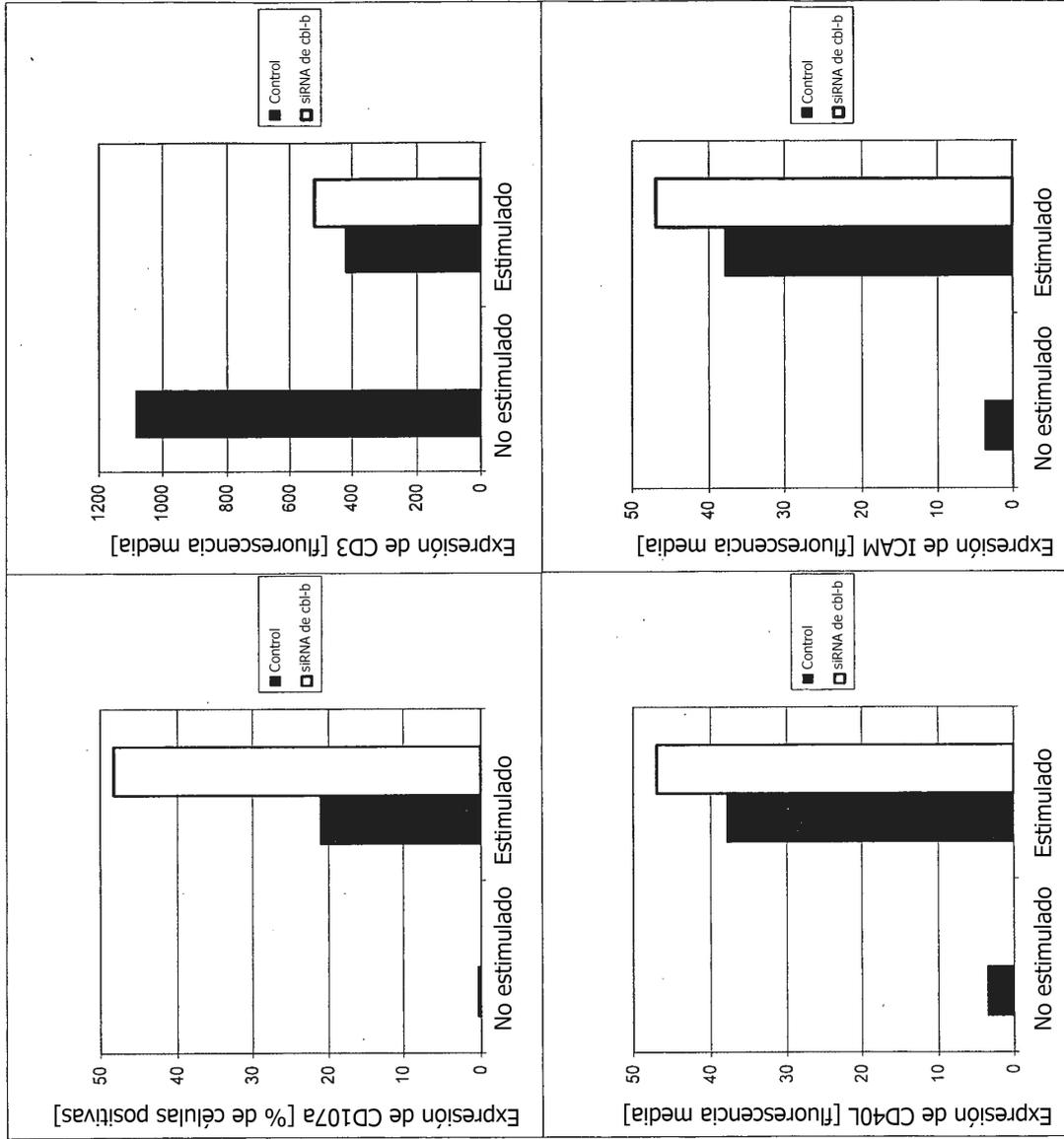


Fig. 10B

Fig. 11A

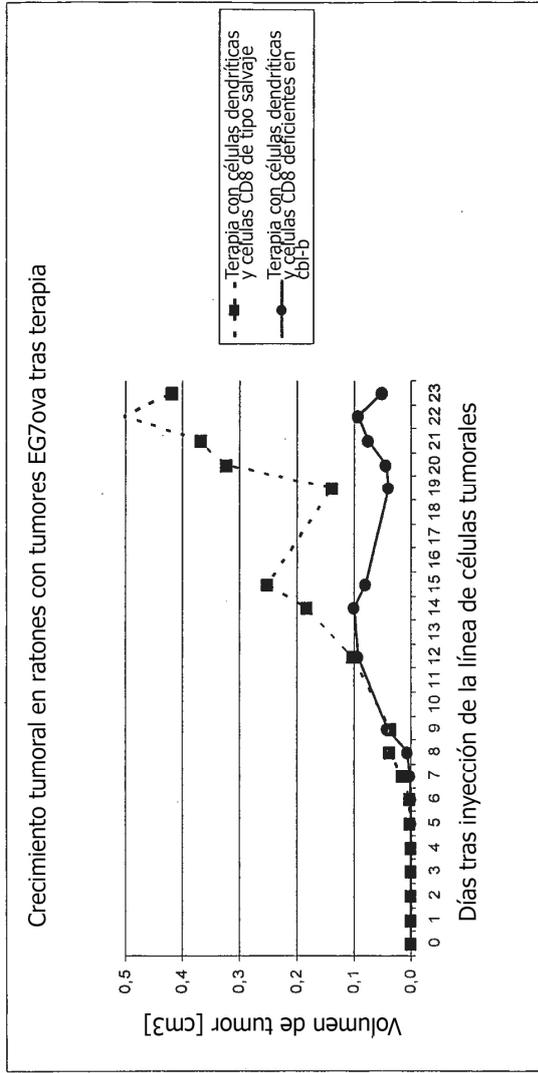


Fig. 11B

