

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 504**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2010 PCT/US2010/043056**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.01.2011 WO11011688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2010 E 10735417 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2456458**

54 Título: **Vacunas de células dendríticas para tumores que expresan asparaginil-β-hidroxilasa**

30 Prioridad:

09.09.2009 US 240745 P

04.08.2009 US 231127 P

02.09.2009 US 239288 P

24.07.2009 US 228429 P

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

06.05.2019

73 Titular/es:

RHODE ISLAND HOSPITAL (100.0%)

593 Eddy Street

Providence, RI 02903, US

72 Inventor/es:

SHIMODA, MASAFUMI y

WANDS, JACK R.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 711 504 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

Vacunas de células dendríticas para tumores que expresan asparaginil- β -hidroxilasa

Antecedentes de la invención

5 El cáncer de hígado incluyendo carcinoma hepatocelular y colangiocelular es uno de los cánceres más comunes en el mundo. En los Estados Unidos, el cáncer de hígado es la quinta causa más frecuente de muerte por cáncer en hombres y la novena en mujeres. A pesar del drástico progreso en el diagnóstico y el control local del cáncer de hígado, la tasa de mortalidad en los Estados Unidos ha estado creciendo constantemente. Una de las razones de la creciente mortalidad podría ser que, a diferencia de otros cánceres incluyendo los cánceres de mama y colorrectales, el cáncer de hígado es resistente al tratamiento sistémico tal como la quimioterapia. Por lo tanto, no hay tratamiento eficaz para el cáncer de hígado una vez que llega a ser una enfermedad sistémica.

10 El documento US 2005/113329 se centra en la identificación de la sobreexpresión de la aspartil (asparaginil)- β -hidroxilasa (AAH) como marcador de la malignidad e invasividad y sugiere la inhibición antisentido de AAH como planteamiento terapéutico.

15 El documento US 2006/057129 describe cómo generar vacuna de célula dendrítica usando células dendríticas diferenciadas a partir de células madre y posteriormente genéticamente modificadas. El documento se refiere a la expresión o transducción de epítomos inmunogénicos en las células dendríticas.

Hoffman T.K. et al., *Journal of Immunotherapy* 24:162-171 (2001) describen aumentar la capacidad de sensibilización cruzada ("cross-priming") de las células dendríticas por ciertas citoquinas.

20 Xu S. et al., *Surgery* 140:170-178 (2006) describen células dendríticas sensibilizadas con receptor 8 tipo toll y que la generación de linfocito T antitumoral por las células dendríticas sensibilizadas con receptor 8 tipo toll está mediada por la producción de IL-12.

Knippertz I. et al., *Journal of Immunotherapy* 32:524-538 (2009) describen el uso de un vector adenovirico que codifica el ligando CD40 humano para establecer células dendríticas que presentan tanto potencial de migración como secreción prolongada de la citoquina interleuquina-12p70 de auxiliar 1 T clave.

Compendio de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

30 En un primer aspecto, la invención proporciona una célula dendrítica cargada con aspartil (asparaginil)- β -hidroxilasa (AAH) madura aislada para su uso en un método de tratamiento de un tumor que expresa AAH reduciendo el crecimiento de dicho tumor en un sujeto, en donde el crecimiento de dicho tumor que expresa AAH se reduce después de la administración de dicha célula dendrítica, en donde dicha célula dendrítica está sensibilizada con una combinación de citoquinas que comprende GM-CSF y IFN- γ *ex vivo*, antes de administrarse a dicho sujeto.

35 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método de producción de células dendríticas cargadas con AAH maduras sensibilizadas, que comprende poner en contacto las células dendríticas aisladas con un antígeno que comprende AAH, y después de dicha etapa de puesta en contacto con antígeno, poner en contacto dichas células dendríticas con una combinación de citoquinas, comprendiendo dicha combinación GM-CSF y IFN- γ .

En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición de vacuna que comprende células dendríticas sensibilizadas producidas por el anterior método de producción.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una vacuna que contiene células dendríticas maduras cargadas con AAH para su uso en el método de tratamiento de tumores que expresan AAH en un sujeto mamífero.

40 En un quinto aspecto, la invención proporciona células dendríticas autólogas sensibilizadas según la invención para su uso en un método de inhibición del crecimiento del tumor y/o prevención de la metástasis en un mamífero, en donde dichas células dendríticas autólogas sensibilizadas se administran a un sujeto que padece de un tumor portador de AAH.

45 En un sexto aspecto, la invención proporciona células dendríticas autólogas que están sensibilizadas por una combinación de citoquinas que comprende GM-CSF, IFN- γ y CD40L para su uso en un método de prevención del desarrollo de un tumor en un mamífero, en donde dicho sujeto está en riesgo de desarrollar un tumor portador de AAH, debido a un historial familiar de individuos que han sido identificados con dicho tumor.

50 En un séptimo aspecto, la invención proporciona la célula o vacuna para su uso en un método de tratamiento de un tumor que expresa AAH de la presente invención en un sujeto, en donde dicho sujeto o mamífero es un sujeto o mamífero humano, canino, felino, equino, bovino, o porcino.

La invención proporciona una solución al problema de mucho tiempo de una alternativa a la quimioterapia para el tratamiento de pacientes diagnosticados con cáncer. La invención proporciona células dendríticas maduras para su uso en un método de reducción del crecimiento de un tumor que expresa aspartil (asparaginil)- β -hidroxilasa (AAH o ASPH) en un sujeto que implica administrar al sujeto una célula dendrítica cargada con AAH madura aislada o población de células. El crecimiento de un tumor que expresa AAH se reduce después de la administración de tal vacuna de célula dendrítica. Por ejemplo, el crecimiento del tumor y la masa tumoral se reduce en 10 %, 20 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 5 veces, 10 veces, o más. Los métodos se usan para reducir y eliminar tumores que expresan AAH de sujetos mamíferos, tales como pacientes humanos. Las composiciones y los métodos también son adecuados para su uso en animales de compañía y ganado, por ejemplo, sujetos humanos, caninos, felinos, equinos, bovinos o porcinos.

Los tumores que expresan AAH incluyen la mayoría de los tipos de tumor tales como los tumores de tejidos gastrointestinales (por ejemplo, esófago, estómago, colon), páncreas, hígado (por ejemplo, carcinoma colangiocelular, carcinoma hepatocelular), mama, próstata, cérvix, ovario, trompas de Falopio, laringe, pulmón, tiroides, vesícula biliar, riñón, vejiga y cerebro (por ejemplo, glioblastoma) así como numerosos otros descritos más adelante. Los tumores que expresan AAH incluyen tumores primarios que expresan un nivel incrementado de AAH en comparación con el tejido normal así como tumores que surgen por metástasis a partir de tumores primarios que sobreexpresan AAH.

Las células dendríticas usadas en el método de vacunación se activan *ex vivo* con una combinación de citoquinas que comprende GM-CSF y IFN- γ antes de que se administren al sujeto. La última etapa produce una población de células dendríticas con actividad antitumoral mejorada.

Un método mejorado de producción de células dendríticas sensibilizadas se lleva a cabo poniendo en contacto células dendríticas aisladas con un antígeno que comprende AAH o una combinación de antígenos tumorales que comprende AAH y α -fetoproteína (AFP) y tratando las células para producir una población de células presentadoras de antígeno maduras y activadas. Después de la etapa de puesta en contacto con el antígeno, las células dendríticas se ponen en contacto con la combinación de citoquinas. La combinación comprende GM-CSF y IFN- γ . La combinación además puede comprender IL-4. Opcionalmente, la combinación comprende CD40L. Las células dendríticas se ponen en contacto con la combinación de citoquinas durante al menos 10 horas (por ejemplo, 12, 24, 36, 40, 48 horas o más). El antígeno está en una forma soluble o unido a un soporte sólido. Por ejemplo, el soporte sólido comprende una perla de poliestireno tal como una perla o partícula biodegradable. Las células dendríticas se obtienen de un sujeto por métodos conocidos tales como leucaféresis o citoféresis.

El sujeto del cual se obtienen las células está padeciendo de o está en riesgo de desarrollar cáncer. El paciente ha sido diagnosticado con un tumor que expresa AAH. Los pacientes que están en riesgo de desarrollar tumores portadores de AAH incluyen aquellos con un historial familiar de individuos que han sido diagnosticados con tal cáncer.

También dentro de la invención está una composición de vacuna que comprende células dendríticas sensibilizadas producidas como se describió anteriormente. La vacuna es útil para inhibir el crecimiento del tumor, prevenir el crecimiento del tumor, e inhibir o reducir la metástasis. La invención proporciona células dendríticas maduras para su uso en un método de inhibición del crecimiento del tumor en un mamífero que se lleva a cabo identificando un sujeto que padece de un tumor portador de AAH, y administrando al sujeto células dendríticas autólogas, las cuales se han sensibilizado según el método anteriormente descrito. La invención proporciona células dendríticas maduras para su uso en un método de prevención del desarrollo de un tumor en un mamífero, que comprende la etapa de identificación de un sujeto en riesgo de desarrollar un tumor portador de AAH (tal como uno con un historial familiar de cáncer), y administración al sujeto de las células dendríticas autólogas sensibilizadas con antígeno y activadas. La invención proporciona células dendríticas maduras para su uso en un método de prevención de la metástasis de un tumor portador de AAH que se lleva a cabo identificando un sujeto que padece de un tumor portador de AAH, y administrando al sujeto células dendríticas autólogas, como se describió anteriormente.

Los polipéptidos y otras composiciones están purificadas. Por ejemplo, un polipéptido de AAH básicamente puro o variante del mismo se obtiene preferiblemente por la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido o sintetizando químicamente la proteína. Un polipéptido o proteína es básicamente pura cuando se separa de aquellos contaminantes que los acompaña en su estado natural (proteínas y otras moléculas orgánicas de origen natural). Generalmente, el polipéptido es básicamente puro cuando constituye al menos 60 %, en peso, de la proteína en la preparación. Preferiblemente, la proteína en la preparación es al menos 75 %, más preferiblemente al menos 90 %, y lo más preferiblemente al menos 99 %, en peso, de AAH. La pureza se mide por cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía de columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis por HPLC. Por consiguiente, los polipéptidos básicamente puros incluyen polipéptidos recombinantes derivados de un eucariota pero producidos en *E. coli* u otro procariota, o en un eucariota distinto del que originalmente se deriva el polipéptido.

Las células dendríticas u otras células, por ejemplo, células inmunes tales como macrófagos, linfocitos B, linfocitos T usadas en los métodos se purifican o aíslan. Con respecto a las células, el término "aisladas" quiere decir que la célula está básicamente libre de otros tipos de células o material celular con los que se da naturalmente. Por ejemplo, una muestra de células de un tipo de tejido particular o fenotipo es "básicamente pura" cuando es al menos

60 % de la población celular. Preferiblemente, la preparación es al menos 75 %, más preferiblemente al menos 90 %, y lo más preferiblemente al menos 99 % o 100 %, de la población celular. La pureza se mide por cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS, del inglés "Fluorescence-Activated Cell Sorting").

5 Los métodos de generación de DC sensibilizadas con antígeno tienen varias ventajas sobre los métodos anteriores. Las células no solamente se cargan con antígeno sino que la posterior incubación con citoquina produce células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno activadas superiores con actividad antitumoral y antimetastática mejoradas.

10 Estas y otras competencias de la invención, junto con la propia invención, serán completamente entendidas después de una revisión de las siguientes figuras, descripción detallada, y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra la producción de IL-2 por DC aisladas.

La Figura 2 es una serie de gráficos lineales que muestran la expresión de diversos marcadores de DC de superficie sobre DC aisladas.

15 La Figura 3 es un gráfico de barras que muestra la fluorescencia media sobre marcadores de DC de superficie.

La Figura 4 es una serie de gráficos de citometría de flujo y un gráfico de barras que muestra una población incrementada de DC CD8+ cultivadas en presencia de citoquinas.

La Figura 5 es un gráfico de barras que muestra la secreción de IFN- γ .

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra la secreción de IL-4.

20 La Figura 7 es un gráfico lineal que muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad.

La Figura 8 es un diagrama de AAH expresada por una célula.

La Figura 9 es un diagrama de un método de generación de DC cargadas con antígeno maduras.

La Figura 10 es un diagrama de flujo de un calendario de inmunización con DC cargadas con AAH.

25 La Figura 11 es un diagrama que muestra un protocolo para la determinación del efecto terapéutico de la vacunación de AAH sobre el crecimiento del tumor en ratones.

La Figura 12 es una gráfica lineal que muestra el efecto terapéutico de la vacunación de AAH sobre el crecimiento del tumor en ratones.

Descripción detallada

30 AAH es una proteína, cuya expresión está asociada con un número de tipos de cáncer (véase, por ejemplo, USPN 6.815.415; USPN 6.812.206; USPN 6.797.696; USPN 6.783.758; USPN 6.835.370; y USPN 7.094.556). La sobreexpresión de HAAH se ha detectado por tinción inmunohistoquímica (IHC, del inglés "Immunohistochemical Staining") en numerosos cánceres de pulmón (por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma bronquioalveolar, y otros cánceres de pulmón de célula no pequeña tal como el subtipo de carcinoma de célula escamosa (Luu et al., 2009, *Hum. Pathol.* 40:639-644), hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, y cáncer de células epiteliales biliares (Wang et al., 2010, *Hepatology* 52:164-173), tejidos gastrointestinales (por ejemplo, colon, 35 estómago, esófago), páncreas, próstata, ovario, conducto biliar, mama, riñón, vejiga, y cerebro (por ejemplo, glioblastoma y neuroblastoma). Otra supervivencia de las muestras de tejido tumoral y líneas celulares confirmó la expresión de AAH en los siguientes cánceres adicionales (en comparación con tejidos no cancerosos): carcinoma laríngeo, cáncer cervical, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de hígado (por ejemplo, colangiocarcinoma), 40 cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de ovario, carcinoma de las trompas de Falopio, cáncer de laríngeo, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, carcinoma tímico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer esofágico, cáncer gástrico, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de colon y cáncer rectal (Song et al., 2010, *Chinese J. of Cell. and Mol. Immunol.* 26:141-144). HAAH es altamente específica al cáncer; se ha detectado por inmunohistoquímica en >99 % de los especímenes de tumor ensayados (n>1.000) y no está presente en tejido 45 no afectado adyacente, o en muestras de tejido de individuos normales.

La inmunoterapia que usa células sensibilizadas con AAH se administra a pacientes con tumores que expresan AAH sobre su superficie celular. Tales tumores incluyen cánceres de hígado tales como el carcinoma hepatocelular y el colangiocarcinoma, así como adenocarcinomas de mama y colon. Tal estrategia terapéutica es útil para no solamente el tratamiento sino para la prevención de cánceres.

Antes de la invención, no ha habido tratamiento sistémico eficaz del cáncer de hígado, a pesar de los avances en el diagnóstico y el control local de la enfermedad. La inmunoterapia se usa para tratar el cáncer de hígado sistémico y localizado, debido a su especificidad.

5 Se encontró que las vacunas de células dendríticas que usan AAH curan el carcinoma hepatocelular establecido en ratones inmunocompetentes. Las vacunas de células dendríticas con AAH reducen el crecimiento de tumores que expresan AAH para también disminuir la masa tumoral y erradicar los tumores en seres humanos.

Inmunoterapia

10 La inmunoterapia de los tumores malignos es atractiva en términos de la respuesta específica a células tumorales. Un fundamento para la inmunoterapia es que las células cancerosas están saturadas con antígenos potenciales, los cuales llegan a ser inmunogénicos cuando son presentados por células presentadoras de antígeno a linfocitos T auxiliares y citotóxicos. La inmunoterapia para el cáncer de hígado, si es sistémico o no, es un planteamiento clínico viable, debido a que las células cancerosas de hígado expresan varias proteínas asociadas a tumor, las cuales no son o solamente ligeramente expresadas en tejidos normales. Por ejemplo, AFP, que no se expresa en tejidos adultos, se expresa ampliamente en carcinoma hepatocelular (CHC). Varios estudios han mostrado que la reacción inmune específica a AFP se puede inducir no solamente en ratones sino también en seres humanos. Sin embargo, un ensayo clínico de inmunoterapia de CHC dirigida a AFP no mostró ni siquiera respuestas tumorales parciales. Algunas posibles razones son: debido a que AFP no está implicada en la progresión del cáncer, las células cancerosas que no expresan AFP dominaron durante la inmunoterapia dirigida a APP. Para que las células de CHC sean reconocidas por linfocitos T sensibles a AFP, la AFP se debería presentar sobre la superficie celular con la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés "Mayor Histocompatibility Complex") clase I, debido a que AFP no se distribuye sobre la superficie celular. Sin embargo, ya que las moléculas de MHC clase I con frecuencia están reguladas a la baja en muchas células cancerosas, AFP no se puede reconocer apropiadamente por los linfocitos T. Para superar los problemas de inmunoterapia de cáncer de hígado, los estudios se comprometieron a identificar otro antígeno que está asociado con el cáncer de hígado para ser usado para las células sensibilizadas para la terapia basada en célula. Dados los resultados usando AFP como antígeno, los resultados antitumorales con AAH fueron sorprendentes.

30 AAH, también conocida como ASPH, se expresa fuertemente en el carcinoma hepatocelular y colangiocelular, pero no se expresa en equivalentes celulares normales de aquellos tipos de tejido. Por lo tanto, AAH es una proteína asociada a tumor. AAH es útil para la inmunoterapia del cáncer de hígado, debido a su naturaleza única. Primero, AAH confiere a las células cancerosas motilidad, que está asociada con la metástasis del cáncer; por tanto, la terapia que modifica células que expresan AAH es eficaz para suprimir las lesiones metastáticas así como el tumor primario. Segundo, debido a que AAH es una proteína de membrana, cuya mayor parte está expuesta al espacio extracelular, es más fácil para las células inmunes acceder a la proteína incluso cuando las moléculas clase I se regulan a la baja. Tercero, aparte de AAH, no se conoce proteína antigénica específica al carcinoma colangiocelular. Por tanto, AAH está únicamente cualificada como molécula diana de la inmunoterapia frente a cáncer de hígado.

40 Un planteamiento de inmunoterapia implica la inyección de células dendríticas (DC, del inglés Dendritic Cell") cargadas con la proteína de interés. Las DC son células especializadas que capturan, procesan, y presentan antígenos a linfocitos T para inducir y controlar la inmunidad mediada por linfocito T. Las DC se usan mucho para inmunizar no solamente animales de laboratorio sino también pacientes portadores de tumor. Los métodos descritos en la presente memoria incluyen una inmunización basada en DC para la inducción de inmunidad frente a AAH. Los presentes métodos mejoran tras un método previamente descrito para generar DC de ratón inmunogénicas cargadas con la proteína de interés (Gehring et al., 2008, *J. Immunol. Meth.* 332:18-30) en al menos dos maneras. Una es que para estimular las DC, se usaron previamente lipopolisacáridos (LPS), un pirógeno fuerte que puede ser inapropiado para su uso *in vivo*. Segundo es que la estimulación de DC era relativamente débil, a juzgar por la secreción de IL-12 por las DC, y por la expresión de diversos marcadores de DC de superficie. Por lo tanto, las mejoras se realizaron al método para la generación de DC inmunogénicas.

Vacunas de células dendríticas

50 El planteamiento más prometedor para la inmunoterapia de CHC es uno que usa DC, ya que tienen una fuerte capacidad de inducir inmunidad tumoral mediada por linfocito T. Las DC se derivan de células hematopoyéticas, y se especializan en capturar y procesar antígenos, convirtiendo las proteínas en péptidos que están presentes en las moléculas MHC y son reconocidos por los linfocitos T. Las DC fuertemente inducen y controlan la inmunidad mediada por linfocito T.

55 La inmunoterapia basada en DC se basa en el hecho de que los tumores están saturados con antígenos potenciales, y estos llegan a ser inmunogénicos cuando son presentados por DC. Las DC se obtienen de un sujeto, por ejemplo, por citoféresis. Las células, las cuales a continuación se cargan *ex vivo* (es decir, contactan) con antígenos tumorales (por ejemplo, lisados de célula tumoral; células tumorales apoptóticas o necróticas; péptido o proteína antígeno de tumor recombinante, sintética o purificada; o ácido nucleico tal como ARN que codifica antígenos tumorales), se estimulan por maduración, y se reinyectan en pacientes para inducir fuerte inmunidad de linfocito T.

Antígeno de tumor con AAH

5 AAH es proteína de membrana tipo II con un dominio catalítico en una región C-terminal. La mayoría de las partes de la proteína están localizadas en el exterior de la membrana celular, permitiendo el acceso de las células inmunes a esta proteína. La proteína AAH se expresa fuertemente en CHC, colangiocarcinomas, y adenocarcinomas de origen mamario o de colon, y es apenas detectable o completamente indetectable en equivalentes de tejido normal. Por tanto, AAH es una molécula diana ideal para la inmunoterapia basada en DC de CHC y otros tumores portadores de AAH.

10 La sobreexpresión de AAH en células tumorales incrementa la motilidad celular, lo cual confiere fenotipo maligno a las células tumorales. Un estudio clinicopatológico sobre CHC reveló que la sobreexpresión de AAH está asociada con el grado histológico y la metástasis intrahepática. Por lo tanto, la modificación dirigida de la población de célula de tumor que expresa AAH suprime el desarrollo y la progresión de los tumores portadores de AAH.

Tabla 1: Secuencia de aminoácidos de AAH humana

```

MAQRKNAKSS GNSSSSGSGS GSTSAGSSSP GARRETKHGG HKNGRKGGLS GTSFFTWFMV

61    IALLGVWTSV AVVWFBLVDY EEVLCKLGIY DADGDGDFDV DDAKVLGLK ERSTSEPAVP
121    PEEAEPHTEP EEQVPVEAEP QNIEDEAKEQ IQSLLHEMVH AEHVEGEDLQ QEDGPTGEPQ
181    QEDDEFLMAT DVDDRPFETLE PEVSHEETEH SYHVEETVSQ DCNQDMEEMM SEQENPDSSE
241    PVVEDERLHH DTDDVTYQVY EEQAVYEPL ENEGIEITEVT APPEDNPVED SQVIVEEVS I
301    FPVEEQQEV P PETNRKTDDP EQKAKVKKKK PKLLNKFDKT IKAELDAAEK LRKRGKIEEA
361    VNAFKELVRK YPQSPRARYG KAQCEDDLAE KRRSNEVLRG AIETYQEVAS LPDVPADLLK
421    LSLKRRSDRQ QFLGHMRGSL LTLQRLVQLF PNDTSLKNDL GVGYLLIGDN DNAKKVYEEV
481    LSVTPNDGFA KVHYGFILKA QNKIAESIPY LKEGIESGDP GTDDGRFYFH LGDAMQRVGN
541    KEAYKWYELG HKRGHFASVW QRSLYNVNGL KAQPWWTPKE TGYTELVKSL ERNWKLRIDE
601    GLAVMDKAKG LFLPEDENLR EKGDSQFTL WQQGRRNENA CKGAPKTCTL LEKFPETTGC
661    RRGQIKYSIM HPGTHVWPHT GPTNCRLRMH LGLVIPKEGC KIRCANETRT WEEGKVLIFD
721    DSFEHEVWQD ASSFRLIFIV DVWHPELTPQ QRRSLPAI
    
```

15 (SEQ ID NO:1; N.º de acceso de GENBANK S83325; el motivo His está subrayado; las secuencias conservadas dentro del dominio catalítico se designan por negrita; el dominio catalítico comprende los restos 650-700 de la SEQ ID NO:1).

Tabla 2: Secuencia de ADNc de AAH humana

ES 2 711 504 T3

cggaccgtgc aatggcccag cgtaagaatg ccaagagcag eggcaacagc
agcagcagcg 61 gctccggcag cggtagcacg agtgcgggca gcagcagccc
cggggcccgg agagagacaa 121 agcatggagg acacaagaat gggaggaaag
gaggactctc gggaacttca ttcttcacgt 181 ggtttatggt gattgcattg
ctgggcgtct ggacatctgt agctgtcgtt tggtttgatc 241 ttgttgacta
tgaggaagtt ctaggaaaac taggaatcta tgatgctgat ggtgatggag 301
atthtgatgt ggatgatgcc aaagttttat taggacttaa agagagatct acttcagagc
361 cagcagtccc gccagaagag gctgagccac aactgagcc cgaggagcag
gttctctgtg 421 aggcagaacc ccagaatata gaagatgaag caaaagaaca
aattcagtcc cttctccatg 481 aatggtaca cgcagaacat gttgagggag
aagacttgca acaagaagat ggaccacag 541 gagaaccaca acaagaggat
gatgagtttc ttatggcgac tgatgtagat gatagatttg 601 agaccctgga
acctgaagta tctcatgaag aaaccgagca tagttaccac gtggaagaga 661
cagtttcaca agactgtaat caggatatgg aagagatgat gtctgagcag gaaaatccag
721 attccagtga accagtagta gaagatgaaa gattgcacca tgatacagat
gatgtaacat 781 accaagtcta tgaggaacaa gcagtatatg aacctctaga
aatgaaggg atagaaatca 841 cagaagtaac tgctccccct gaggataatc
ctgtagaaga ttcacaggta attgtagaag 901 aagtaagcat ttttctgtg
gaagaacagc aggaagtacc accagaaaca aatagaaaaa 961 cagatgatcc
agaacaaaaa gcaaaagtta agaaaaagaa gcctaaactt ttaaataaat 1021
ttgataagac tattaagct gaacttgatg ctgcagaaaa actccgtaaa aggggaaaaa

ES 2 711 504 T3

```
1081 ttgaggaagc agtgaatgca tttaaagaac tagtacgcaa atacccctcag
agtccacgag 1141 caagatatgg gaagggcgag tgtgaggatg atttggetga
gaagaggaga agtaatgagg 12 1 tgctacgtgg agccatcgag acctaccaag
aggtggccag cctacctgat gtccctgcag 1261 acctgctgaa gctgagtttg
aagcgtcgct cagacaggca acaatttcta ggtcatatga 1321 gaggttcctt
gcttaccctg cagagattag ttcaactatt tcccaatgat acttccttaa 1381
aaaatgacct tggcgtggga tacctcttga taggagataa tgacaatgca aagaaagttt
1441 atgaagaggt gctgagtgtg acacctaata atggctttgc taaagtccat
tatggcttca 1501 tctgaaggc acagaacaaa attgctgaga gcatcccata
tttaaaggaa ggaatagaat 1561 ccggagatcc tggcactgat gatgggagat
tttatttcca cctgggggat gccatgcaga 1621 ggggtgggaa caaagaggca
tataagtggg atgagcttgg gcacaagaga ggacactttg 1681 catctgtctg
gcaacgctca ctctacaatg tgaatggact gaaagcacag ccttggtgga 1741
ccccaaaaga aacgggctac acagagttag taaagtcttt agaaagaac tggaagttaa
1801 tccgagatga aggccttgc gtgatggata aagccaaagg tctcttctg
cctgaggatg 1861 aaaacctgag ggaaaaagg gactggagcc agttcacgct
gtggcagcaa ggaagaagaa 1921 atgaaaatgc ctgcaaagga gtcctaaaa
cctgtacctt actagaaaag tccccgaga 1981 caacaggatg cagaagagga
cagatcaaat attccatcat gcaccccggg actcacgtgt 2041 ggccgcacac
agggcccaca aactgcaggc tccgaatgca cctgggcttg gtgattcca 2101
aggaaggctg caagattcga tgtgccaacg agaccaggac ctgggaggaa ggcaaggtgc
2161 tcatctttga tgactccttt gagcacgagg tatggcagga tgctcatct
ttccggctga 2221 tattcatcgt ggatgtgtgg catccggaac tgacaccaca
gcagagacgc agccttccag 2281 caatttagca tgaattcatg caagcttggg
aaactctgga gaga
```

(SEQ ID NO:2; N.º de Acceso de GENBANK S83325; el codón que codifica la metionina de iniciación está subrayado).

Uso clínico

- 5 Las células presentadoras de antígeno (CPA) tales como las DC se obtienen de sujetos, por ejemplo, pacientes humanos que padecen de o están en riesgo de desarrollar cáncer, usando el proceso de leucaféresis. Tal procedimiento generalmente se lleva a cabo en un centro de aféresis (Día 1). Las células dendríticas se purifican usando métodos conocidos y se ponen en contacto con antígeno, tal como AAH o AAH y AFP juntas. Después del contacto con antígeno, las células se cultivan con una mezcla de citoquinas (Día 2 a 3). A continuación, las DC
- 10 sensibilizadas con antígeno y activadas se administran al paciente (Día 3 a 4). Un trascurso de la terapia ilustrativo incluye tres administraciones de DC durante un periodo de cuatro semanas.

Se usaron los siguientes materiales y métodos para generar los datos descritos en la presente memoria.

Animales

- 15 Se compraron ratones BALB/c (H-2^d) de 7 a 8 semanas de vida de Harlan Sprague Dawley, Inc., y se guardaron bajo condiciones específicas libres de patógeno.

Preparación de microperlas magnéticas

- 20 Las perlas inmunomagnéticas (1,3 µm; Calbiochem) se lavaron tres veces con tampón de borato 50 mM, pH 8,5, y se resuspendieron en tampón de borato 50 mM, pH 9,0, con 0,1 mg/ml de AAH o proteína GFP. A continuación, se incubó la suspensión durante la noche a temperatura ambiente bajo agitación constante. Las perlas se agruparon, se lavaron con PBS, y se resuspendieron en PBS a una concentración de 30 mg de contenido sólido/ml.

Aislamiento de las DC

El aislamiento de DC se realizó usando métodos conocidos (por ejemplo, (Gehring et al., 2008, *J. Immunol. Meth.* 332:18-30)). Las células se obtuvieron opcionalmente por leucaféresis. Se inyectó 10 µg de pUMVC3-hFLex, un plásmido de expresión que codifica ligando del receptor-3 tirosina quinasa tipo Fms (FLT3L), en la vena de la cola del ratón el día 0 y 6. Los esplenocitos se prepararon a partir de los ratones inyectados con FLT3L, usando tampón de lisis de glóbulo rojo de NH₄Cl, y 5x10⁷ células se incubaron en DMEM libre de suero con 10 µl de micropelotas magnéticas durante 4 a 6 horas. Las células se recogieron, se pasaron a través de un campo magnético usando la columna MACS MS (Miltenyi) para enriquecer las células que ingirieron perlas magnéticas. A continuación, las células se sometieron a centrifugación por gradiente de densidad usando Lympholyte M (Cedarlane) para eliminar las perlas libres y las células muertas. Las células viables se recogieron, se lavaron dos veces con solución salina tamponada de Hanks (HBSS, del inglés "Hanks' Buffered Salt Solution"), y se usaron para posteriores experimentos. La viabilidad de las células aisladas era de >90 %, y el porcentaje de la población CD11c positiva en las células aisladas era de 70 a 80 %.

Cultivo celular

Las DC se cultivaron en RPMI1640 tamponado con HEPES complementado con suero de ratón al 10 % (Equitech Bio), L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 µM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 20 ng/ml de GMCSF, 100 ng/ml de IL-4, 20 ng/ml de IFN-γ, y 1 µg/ml de CD40L (todas las citoquinas se compraron de Peprotech) sobre una placa de unión ultra baja de 6 pocillos (Corning) durante 40 h. Para la liberación de la citoquina, los esplenocitos se cultivaron en X-VIVO 15 libre de suero (Lonza) complementado con L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 nM, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina. Para el ensayo de la citotoxicidad, los esplenocitos se cultivaron en el medio completo que consistía en RPMI1640 tamponado con HEPES complementado con suero fetal bovino al 10 % (Atlantic Bio), L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 µM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 1x aminoácidos no esenciales (Lonza), 0,5x solución de aminoácido (Invitrogen), y piruvato de sodio 1 mM. Las células SP2/0 se cultivaron en medio esencial mínimo de Dulbecco complementado con suero fetal bovino al 20 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg/ml de estreptomina.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA)

Se cultivaron DC o esplenocitos en el medio libre de suero con o sin proteína AAH durante 48 h. A continuación, los sobrenadantes de cultivo se recogieron, se centrifugaron, y se sometieron a ensayos ELISA. El ELISA para IL-12, p70, IFN-γ, y IL-4 se realizó usando el kit Ready-SET-GO! de ELISA (eBioscience) según las instrucciones del fabricante.

Citometría de flujo

La expresión de los marcadores de superficie celular se analizó por citometría de flujo como se describió previamente (Gehring et al., 2008). Se usaron 3-6x10⁵ células para la tinción. Las células se lavaron con tampón de tinción (HBSS que contenía FBS al 5 %), se incubaron con 2,5 µg/ml de BD Fc Block de ratón (BD Biosciences) durante 5 min a 4 °C, y además se incubaron con anticuerpos de tinción durante 30 min a 4 °C. Los anticuerpos usados eran anti-CD11c (HL3; BD Biosciences), anti-CD40 (3/23; BD Biosciences), anti-CD54 (3E2; BD Biosciences), anti-CD80 (16-10A1; BD Biosciences), anti-CD86 (GLI, BD Biosciences), anti-I-A^d (AMS-32.1; BD Biosciences), y anti-CD8a (53-6.7; eBioscience), todos los cuales se conjugaron con fluorocromo. También se usaron controles emparejados con isotipo de inmunoglobulina G de hámster, rata y ratón para los controles de tinción. Después de lavar dos veces, las células se resuspendieron en tampón de tinción, y se sometieron a citometría de flujo usando FACSCalibur (BD Biosciences). Las células muertas se eliminaron del análisis tiñendo las células con 7-amino-actinomicina D (eBioscience). Los datos se procesaron con el programa informático CellQuest (BD Biosciences) seguido del programa informático FlowJo (Tree Star).

Vacunación

Después del cultivo con citoquinas durante 40 h, se inyectaron subcutáneamente 2,5x10⁵ células en los costados derecho e izquierdo (5x10⁵ células por ratón) el día 0 y 14. El día 28, se usaron los ratones inmunizados para experimentos adicionales incluyendo liberación de citoquina y el ensayo de citotoxicidad.

Ensayo de citotoxicidad

Los esplenocitos se prepararon a partir de ratones inmunizados, y 5x10⁷ esplenocitos se cultivaron en medio completo con 0,5 µg/ml de proteína AAH durante 2 días y se cultivaron más durante 2 días después de la adición de 10 ng/ml de IL-2. Se mezclaron dos x 10⁴ células SP2/0 diana con 6-60x10⁴ esplenocitos efectoros en el medio libre de suero, se centrifugaron a 200xg durante 5 min, y se incubaron en incubadora de CO₂ durante 4 h. Los sobrenadantes del cultivo se recogieron, y se midió la actividad de la lactato deshidrogenasa liberada en los sobrenadantes usando el kit de detección de citotoxicidad LDH (Roche) de acuerdo con la instrucción del fabricante. El % de lisis de célula diana se calculó usando la siguiente fórmula:

$$((A_{\text{efector+diana}} - A_{\text{efector}}) / (A_{\text{diana+tritonX}} - A_{\text{diana}})) \times 100,$$

en donde A indica la absorbancia a 490 nm.

Secreción de IL-12 por las DC aisladas estimuladas por diversas citoquinas *in vitro*

El protocolo previamente usado incluye la expansión *in vivo* de las DC, la ingestión de las microperlas magnéticas sobre las cuales se recubren un antígeno y los estimulantes de DC incluyendo LPS y anticuerpo anti-CD40, y el aislamiento de las DC pasando a través de una columna magnética. En lugar de estimular las DC con los estimulantes recubiertos sobre las perlas, el método mejorado implicó la estimulación de las DC aisladas mediante el cultivo durante dos días en presencia de diversas citoquinas, debido a que los estimulantes deberían interactuar con los correspondientes receptores sobre la superficie celular, pero los estimulantes sobre las perlas que fueron ingeridas por las DC no pueden. Existen algunas citoquinas que estimulan y promueven la maduración de las DC incluyendo IL-4, IFN- γ y CD40L. Por lo tanto, se examinó el efecto combinatorio de estas citoquinas sobre la maduración de las DC.

Se llevaron a cabo la expansión, ingestión y aislamiento de las DC. Las células aisladas se cultivaron durante 40 horas en presencia de GM-CSF y/o IL-4, y/o IFN- γ y/o CD40L. GM-CSF se añadió siempre debido a que era necesario para la supervivencia de las DC. Las DC maduras, pero no inmaduras, producen vigorosamente IL-12, la cual es básica para polarizar los linfocitos T auxiliares y citotóxicos. Por lo tanto, se usaron los niveles de IL-12 como indicador de la estimulación de DC. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo, se midió la concentración de IL-12 p70 por ELISA. Los resultados indicaron que IL-12 p70 era la mayor cuando todas las citoquinas estaban presentes en el cultivo de DC (Figura 1). Cada una de las citoquinas se usan para la estimulación sola o en combinación. Preferiblemente, todas las citoquinas se usan para estimular las DC. Sin embargo, CD40L es opcional.

Expresión de marcadores de DC madura sobre la superficie de DC estimuladas

Para investigar el efecto de la estimulación de la citoquina sobre la expresión de marcadores de DC madura, se midió la expresión del marcador de DC cultivadas durante 40 h en presencia de las citoquinas a esa de las DC sin cultivo. La expresión de CD11c, un marcador para pan-CD, no se cambió después del cultivo (Figuras 2,3). Sin embargo, todos los marcadores de DC madura incluyendo CD40, CD54, CD80, CD86 y MHC clase II (I-A^d), se regularon significativamente al alza en las DC cultivadas durante 40 h (Figuras 2,3). Las DC CD8a⁺ eran el subconjunto de las DC que pueden estimular eficazmente los CTL. Se evaluó el efecto de la estimulación de la citoquina sobre la población de DC CD8a⁺. Como se muestra en la Figura 4, el porcentaje de la población CD8a⁺ en las DC se incrementó significativamente durante la estimulación. Estos resultados indican que las células generadas por este método sin usar LPS tenían suficiente calidad para la inmunización basada en DC.

Secreción de IFN- γ en respuesta a AAH por los esplenocitos de ratones inmunizados con AAH

Para examinar si se inducía la respuesta de T_H1 por la inmunización con AAH, se midió la producción de IFN- γ , una citoquina de T_H1, en respuesta a la proteína AAH. Los ratones se inmunizaron dos veces con un intervalo de 2 semanas con DC que ingirieron perlas recubiertas con AAH o GFP, o perlas sin ningún antígeno. Dos semanas después de la última inmunización, se prepararon esplenocitos de los ratones inmunizados, se cultivaron durante 48 horas en presencia de AAH, y se midió la concentración de IFN- γ en los sobrenadantes del cultivo para examinar si los esplenocitos de los ratones inmunizados con AAH producen IFN- γ en respuesta a la estimulación con AAH. Los esplenocitos de los ratones inmunizados con AAH produjeron vigorosamente IFN- γ de una manera dependiente de la dosis (Figura 5). Aunque los esplenocitos de los tres grupos produjeron considerable cantidad de IFN- γ en presencia de concanavalina A (Con A), los esplenocitos control produjeron solamente IFN- γ tenue cuando se estimularon con AAH (Figura 5). Este resultado indica que se generaron células T_H1 sensibles a AAH en los ratones inmunizados.

Secreción de IL-4 en respuesta a AAH por los esplenocitos de ratones inmunizados con AAH

Para investigar si se inducía la inmunidad humoral frente a AAH por las DC cargadas con AAH, se midió la concentración de IL-4, una citoquina de T_H2, en las mismas muestras que IFN- γ . Los esplenocitos estimulados con Con-A produjeron gran cantidad de IL-4 independiente de la inmunización (Figura 6). Por el contrario, los esplenocitos preparados de los ratones inmunizados con tres tipos de DC produjeron solamente cantidades trazas de IL-4 (Figura 6), indicando que las células T_H2 sensibles a AAH no eran eficazmente inducidas por las inmunización con AAH.

Actividad de CTL frente a células que expresan AAH en ratones inmunizados con AAH

Para determinar si se inducían CTL sensibles a AAH en ratones inmunizados con AAH, se evaluó la citotoxicidad usando células SP2/0 que expresaban AAH como células diana. Las células SP2/0 se cultivaron conjuntamente durante 4 h con los esplenocitos de los ratones inmunizados después de ser activados con proteína AAH y IL-2. Las eficacias de la lisis de célula diana se estimaron midiendo las actividades de la lactato deshidrogenasa liberada de las células diana agonizantes. Como se muestra en la Figura 7, los esplenocitos de los ratones inmunizados con AAH tenían más actividad de CTL que los otros esplenocitos control, sugiriendo que la inmunización con AAH inducía CTL sensibles a AAH.

Linfocitos T sensibles a AAH en ratones inmunizados con AAH

Cuando los ratones se inmunizaron con DC cargadas con AAH, se indujeron células T_{H1} sensibles a AAH y CTL. La expansión del linfocito T específico a antígeno es otro indicador importante que indica que se produjeron linfocitos T sensibles a antígeno.

5 Efecto antitumoral de la inmunización con AAH *in vivo*

La inmunización con AAH usando DC sensibilizadas con AAH induce inmunidad antitumoral. Los ratones se inmunizan con DC cargadas con AAH dos veces con un intervalo de 2 semanas, y dos semanas después de la última inmunización. Las células SP2/0 se implantan bajo la piel, se mide el crecimiento de los tamaños del tumor implantado. Los datos obtenidos de este modelo de masa tumoral refleja el efecto preventivo de la inmunización.
10 Para evaluar el efecto curativo de la inmunización con AAH, primero se implantan las células SP2/0, a continuación cuando los tumores crecen hasta 5 mm de diámetro, los ratones se inmunizan con DC cargadas con AAH, y se mide el efecto sobre el crecimiento del tumor.

Inmunoterapia dirigida a AAH también suprime la metástasis. Los ratones se inmunizan con DC cargadas con AAH mediante la inyección de células SP2/0 en la vena de la cola. Dos semanas después, se extirpan los pulmones para contar el número de nódulos formados. Una reducción en la cantidad de nódulos en ratones inmunizados en comparación con la cantidad en ratones inmunizados indica que el régimen de inmunización con DC cargada con AAH suprime la metástasis de tumores portadores de AAH.
15

La vacuna con células dendríticas maduras cargadas con AAH redujo drásticamente la masa tumoral (volumen de tumor) de un tumor que expresa AAH. El efecto terapéutico de la vacunación de AAH sobre el crecimiento del tumor en ratones se muestra en las Fig. 11 y 12. 5×10^5 células de hepatoma de ratón BNL 1ME A.7R.1 se implantaron subcutáneamente en los costados de ratones BALB/c de 6 semanas de vida. El día 10 y 15, se inyectaron subcutáneamente 5×10^5 DC maduras cargadas con AAH o GFP, o HBSS en los ratones portadores de tumor. El tamaño del tumor se midió semanalmente. Se determinaron los volúmenes del tumor mediante la siguiente fórmula: $0,52 \times (\text{largo}) \times (\text{ancho})^2$. Cada dato puntual representa el volumen del tumor medio \pm error estándar (n=6). Se encontró que los volúmenes del tumor se redujeron significativamente después de la inmunización con DC cargadas con AAH. Estos datos usando un modelo de tumor reconocido por la técnica indican que un método terapéutico que usa DC maduras cargadas con AAH es eficaz para reducir y eliminar los tumores portadores de AAH *in vivo*. Tales vacunas de célula dendrítica demuestran efectos antitumorales potentes frente a cualquier tumor que expresa AAH.
20
25

Aumento del efecto antitumoral inmunizando simultáneamente con AAH y AFP

AFP es la única proteína asociada a CHC que puede ser antigénica a ratones y seres humanos. Sin embargo, se ha demostrado también que el efecto antitumoral no es suficiente para pacientes con CHC humanos. Sin embargo, la inmunización simultánea con AAH y AFP aumenta la respuesta inmune a tumores que expresan tanto AAH como AFP, tipo CHC.
30

Se producen líneas estables de células SP2/0 que expresaban AFP introduciendo un ADN plásmido de expresión de AFP. Usando las células, se mide la actividad de CTL *in vitro* en los ratones inmunizados con DC cargadas con AFP y cargadas con AAH. La citotoxicidad incrementada después de la inmunización indica que la inmunización conduce a un efecto antitumoral de la inmunización con combinación de AAH y AFP sobre el crecimiento de tumores portadores de AAH y/o AFP.
35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula dendrítica cargada con aspartil (asparaginil)- β -hidroxilasa (AAH) madura aislada para su uso en un método de tratamiento de un tumor que expresa AAH mediante la reducción del crecimiento de dicho tumor en un sujeto, en donde el crecimiento de dicho tumor que expresa AAH se reduce después de la administración de dicha célula dendrítica, en donde dicha célula dendrítica está sensibilizada con una combinación de citoquinas que incluye GM-CSF y IFN- γ *ex vivo*, antes de administrarse a dicho sujeto.
- 10 2. La célula aislada para su uso según la reivindicación 1, en donde el tumor a tratar se selecciona del grupo que consiste en tumores de hígado, gastrointestinales, de páncreas, mama, próstata, cérvix, ovario, trompas de Falopio, laringe, pulmón, tiroides, vesícula biliar, riñón, vejiga, y cerebro.
- 15 3. La célula aislada para su uso según la reivindicación 1, en donde dicha célula dendrítica se activa con una combinación de citoquinas que incluye GM-CSF, IFN- γ y CD40L *ex vivo*, antes de dicha administración a dicho sujeto.
4. Un método de producción de células dendríticas cargadas con AAH maduras sensibilizadas, que comprende poner en contacto las células dendríticas aisladas con un antígeno que comprende AAH, y después de dicha etapa de puesta en contacto con antígeno, poner en contacto dichas células dendríticas con una combinación de citoquinas, comprendiendo dicha combinación GM-CSF y IFN- γ .
5. El método de la reivindicación 4, en donde dicha combinación comprende además CD40L y/o IL-4.
6. El método de la reivindicación 4, en donde dichas células dendríticas se ponen en contacto con dicha combinación de citoquinas durante al menos 10 horas, preferiblemente durante al menos 40 horas.
- 20 7. La célula aislada para su uso según la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 4, en donde dicho antígeno comprende además α -fetoproteína (AFP).
8. La célula aislada para su uso según la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 4, en donde dicho antígeno está en una forma soluble o está unido a un soporte sólido.
- 25 9. La célula aislada para su uso o el método de la reivindicación 8, en donde dicho soporte sólido comprende una perla de poliestireno o dicho soporte sólido es uno biodegradable.
10. La célula aislada para su uso según la reivindicación 1, en donde dichas células dendríticas se obtienen de un sujeto por leucaféresis.
11. La célula aislada para su uso según la reivindicación 10, en donde dicho sujeto está padeciendo de o está en riesgo de desarrollar cáncer.
- 30 12. Una composición de vacuna que comprende células dendríticas sensibilizadas producidas por el método de la reivindicación 4.
13. Una vacuna que contiene células dendríticas maduras cargadas con AAH para su uso en un método de tratamiento de tumores que expresan AAH en un sujeto mamífero, en donde el método se define como en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y 7 a 11.
- 35 14. Células dendríticas autólogas sensibilizadas por el método de la reivindicación 4 o 5 para su uso en un método de inhibición del crecimiento del tumor y/o prevención de la metástasis, en donde dichas células dendríticas autólogas sensibilizadas se administran a un sujeto que padece de un tumor portador de AAH.
- 40 15. Células dendríticas autólogas que están sensibilizadas como se define en la reivindicación 4 para su uso en un método de prevención del desarrollo de un tumor en un sujeto, en donde dicho sujeto es un mamífero en riesgo de desarrollar un tumor portador de AAH debido a una historia familiar de individuos que han sido identificados con tal tumor.
16. Las células para su uso de la reivindicación 1, 14 o 15, o la vacuna para su uso de la reivindicación 13, en donde dicho sujeto es humano, canino, felino, equino, bovino o porcino.

producción de IL-12 por DC aisladas en presencia de diversas citoquinas

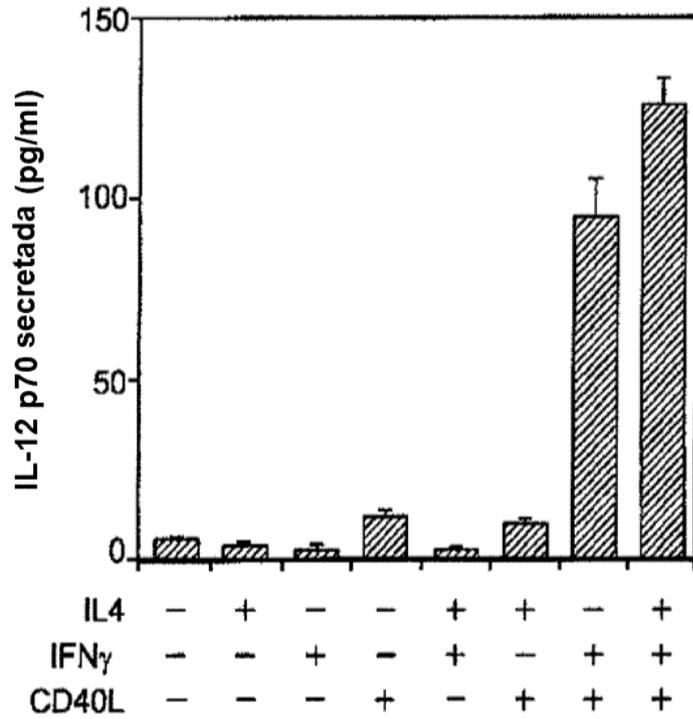


FIG. 1

Intensidades de fluorescencia media de marcadores de DC de superficie.*p<0,001.

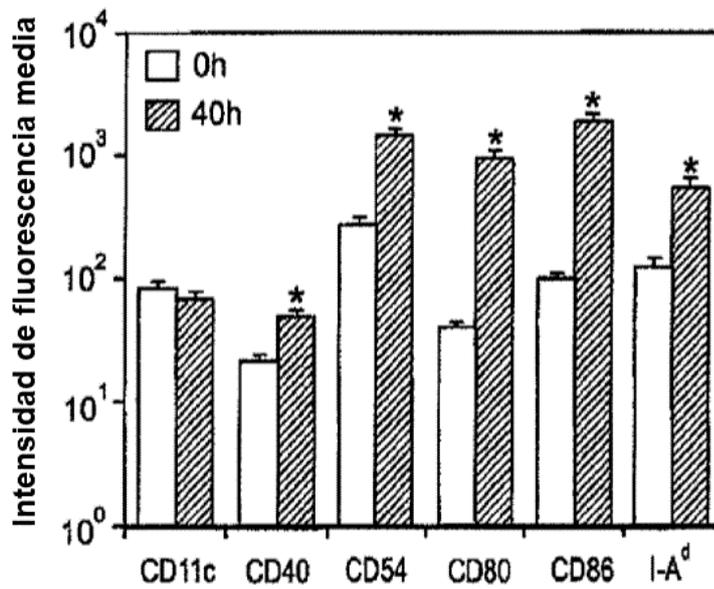
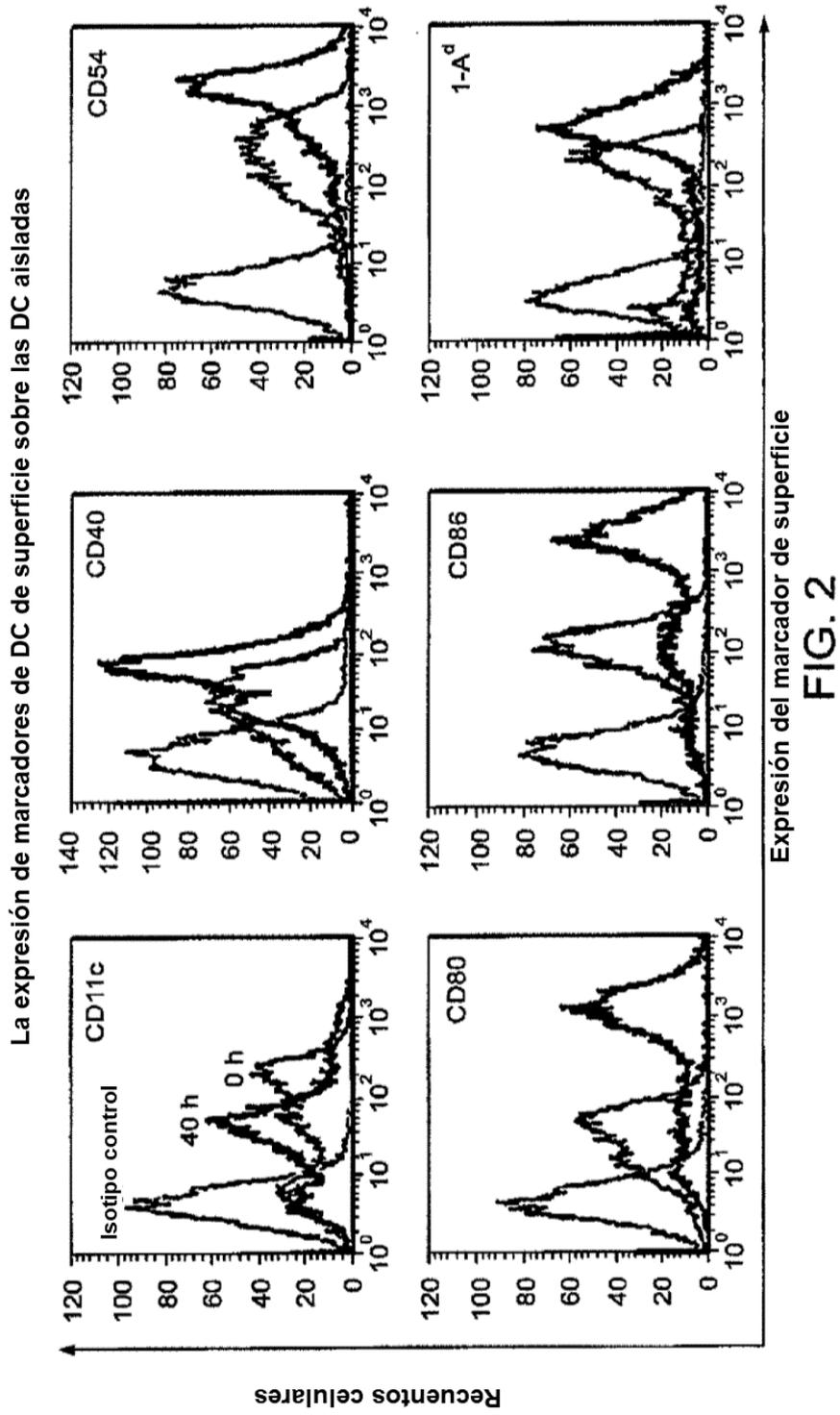


FIG. 3



Población incrementada de DC CD8a+ cultivadas en presencia de las citoquinas

(A) Análisis por citometría de flujo de células **CD11c⁺ CD8a⁺**

(B) Cambio en la relación de células **CD11c⁺ CD8a⁺** y células **CD11c⁺**. *p<0,05

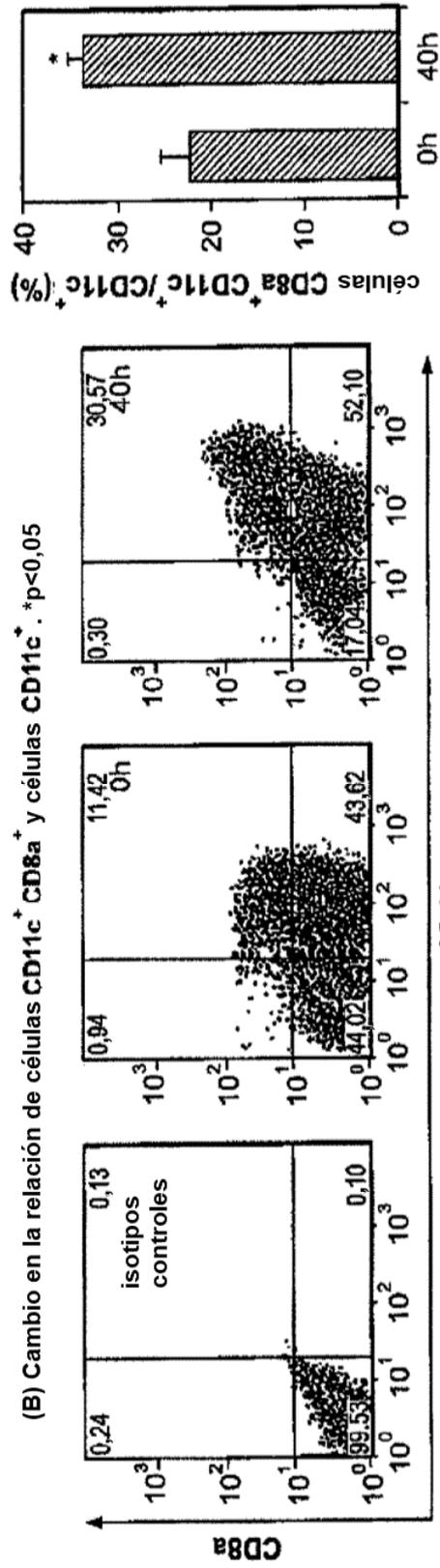


FIG. 4

Secreción de IFN- γ por los esplenocitos preparados de los ratones inmunizados

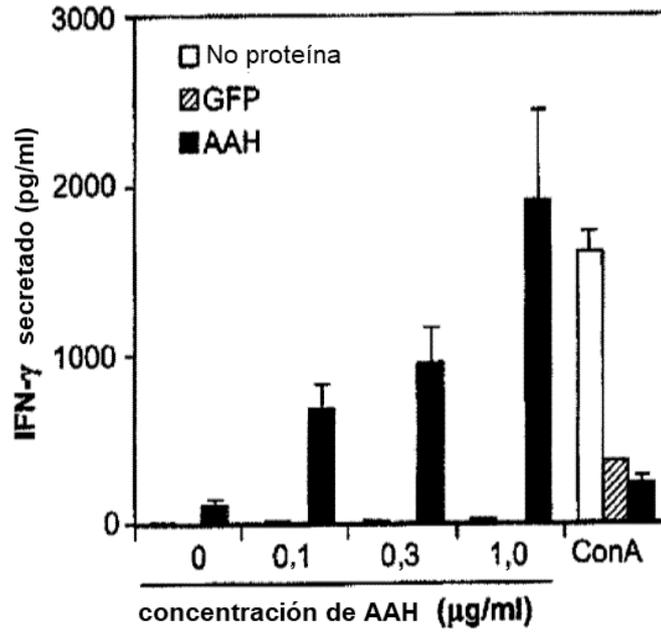


FIG. 5

Secreción de IL-4 por los esplenocitos preparados de los ratones inmunizados

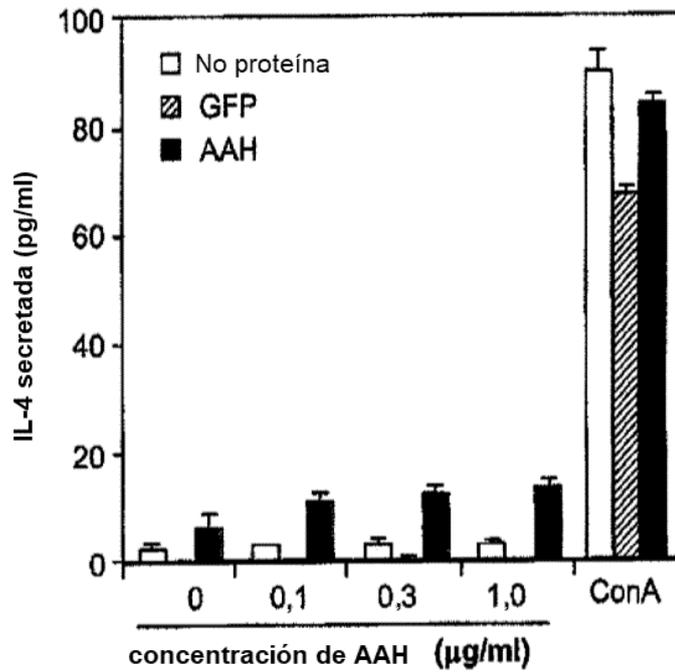


FIG. 6

Ensayo de citotoxicidad usando células SP2/0 que expresan AAH como células diana, y los esplenocitos de los ratones inmunizados como células efectoras

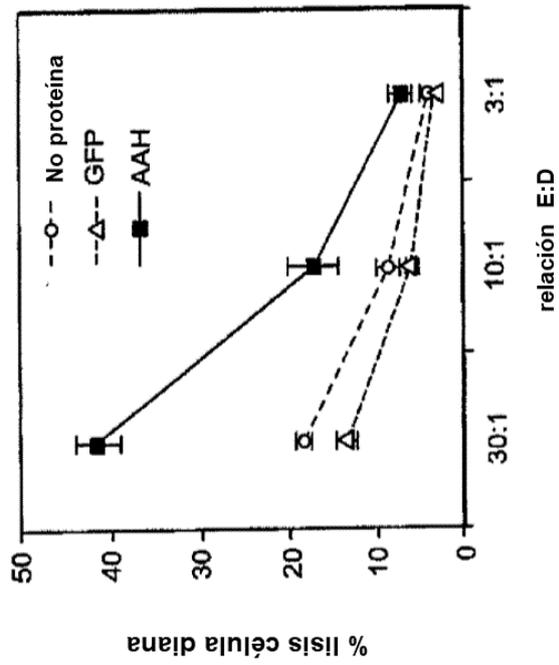


FIG. 7

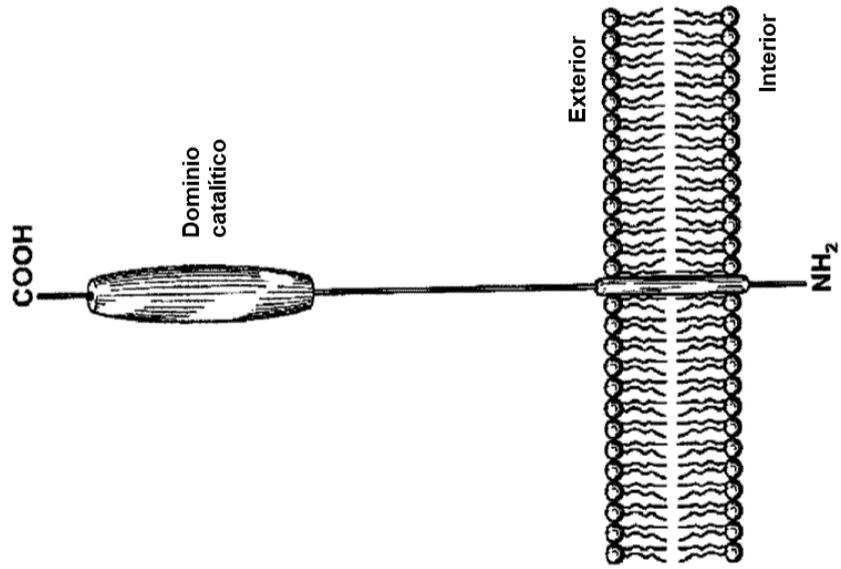


FIG. 8

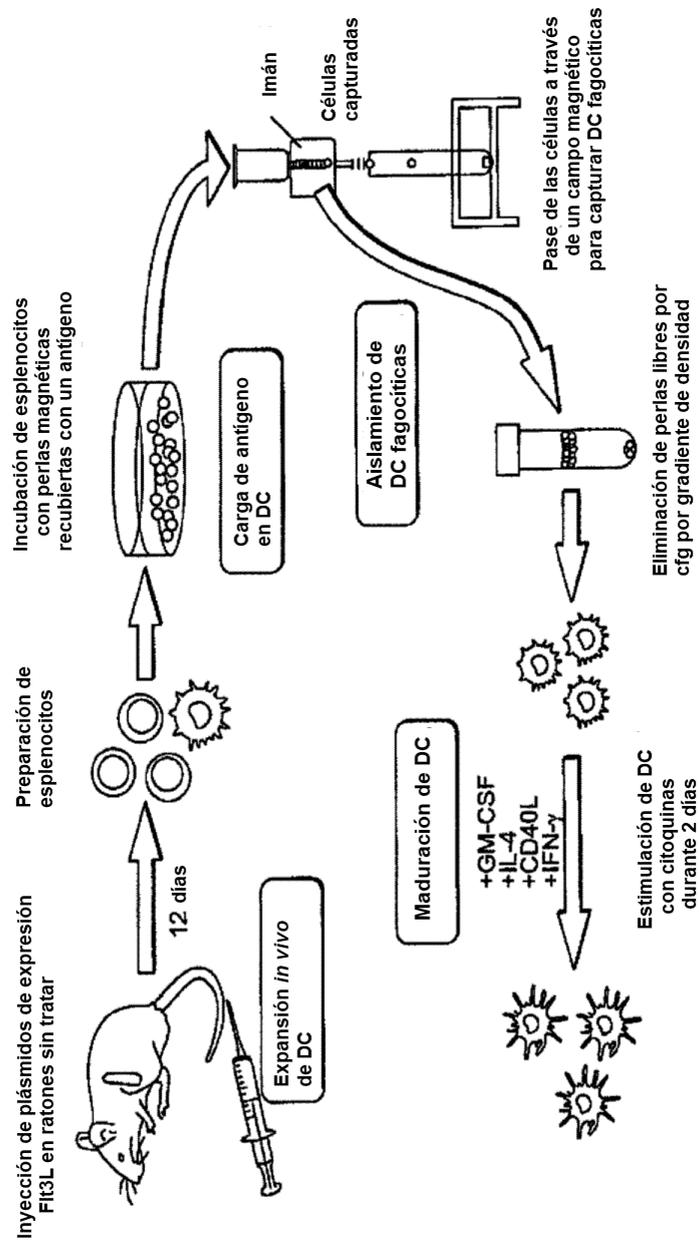


FIG. 9

Inmunización con DC cargadas con AAH

Calendario de inmunización

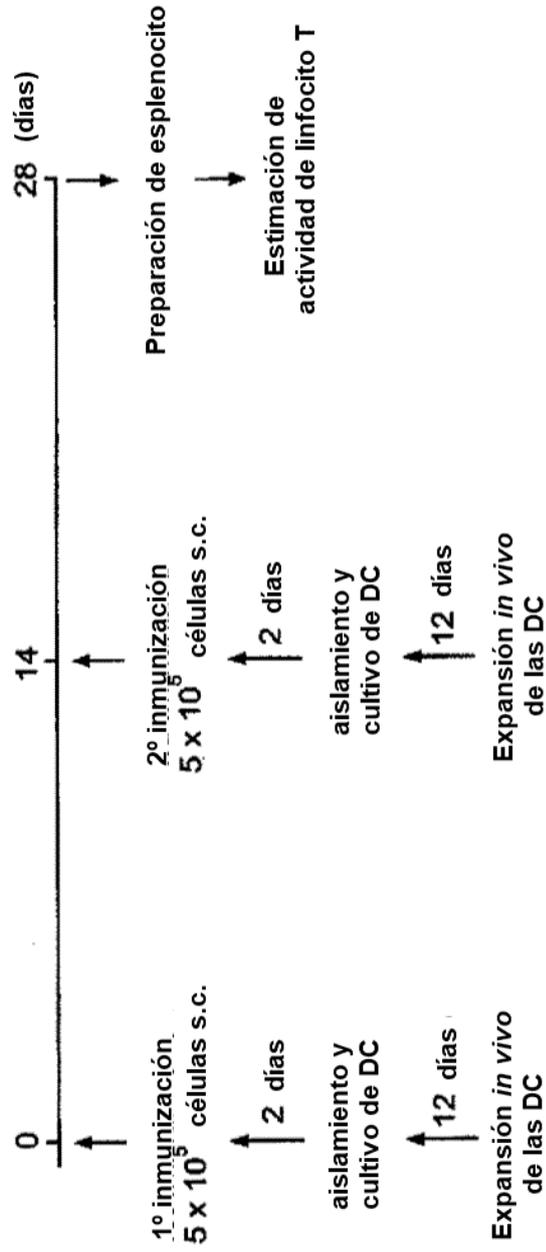


FIG. 10

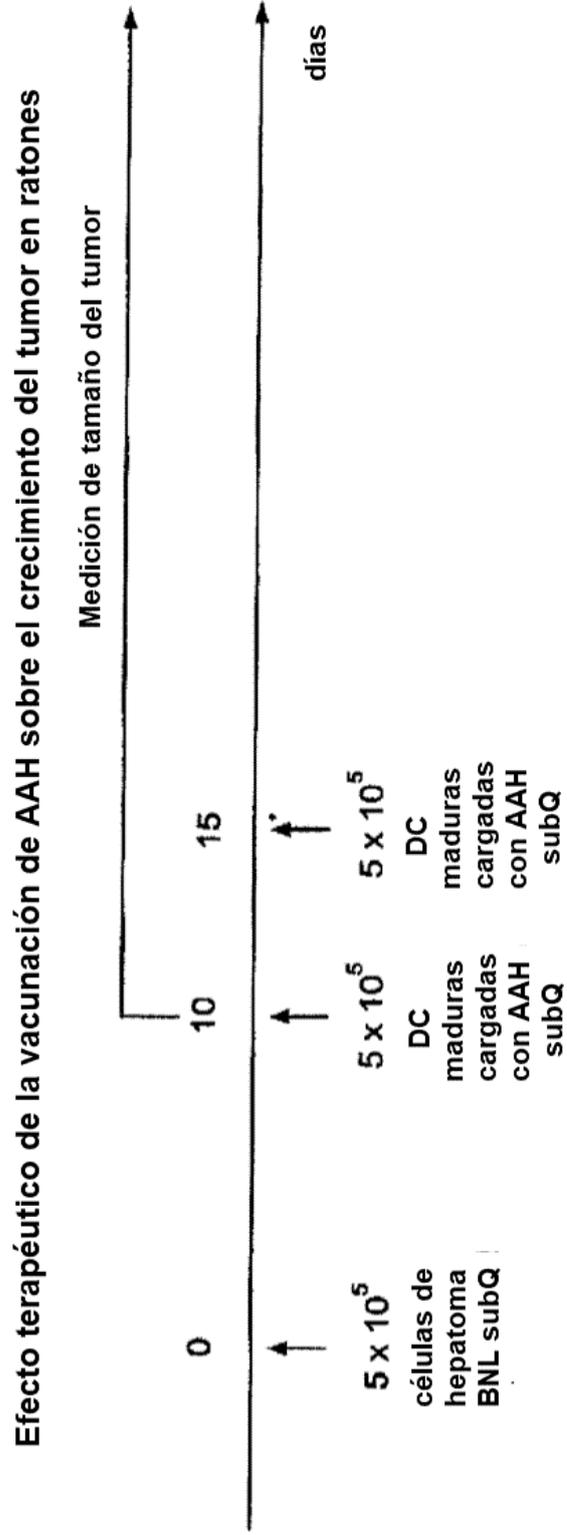


FIG. 11

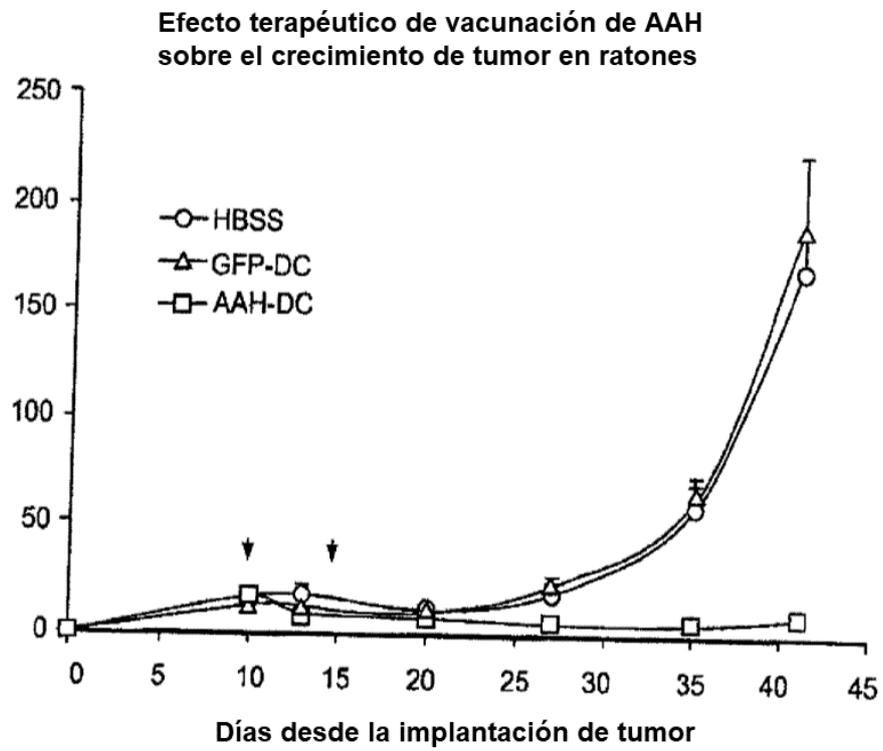


FIG. 12