

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 299**

51 Int. Cl.:

C12N 5/078 (2010.01)

A61K 35/12 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2015 PCT/KR2015/007892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016 WO16018053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2015 E 15828295 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3176258**

54 Título: **Método para preparar una célula dendrítica, célula dendrítica preparada mediante el mismo y uso del mismo**

30 Prioridad:

01.08.2014 KR 20140099281

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

26.11.2020

73 Titular/es:

**JW CREAGENE INC. (100.0%)
2F., 5cha, 137, Sagimakgol-ro, Jungwon-gu,
Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13202, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, YOON;
KIM, YOUNG-MOK;
KIM, SO-YEON;
HAN, SEUNG-SOO y
BAE, YONG-SOO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 796 299 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para preparar una célula dendrítica, célula dendrítica preparada mediante el mismo y uso del mismo

Campo Técnico

5 La presente invención se refiere a un método para preparar una célula dendrítica, a una célula dendrítica preparada mediante el mismo y a un uso del mismo y, más específicamente, a un método para preparar una célula dendrítica, que incluye: tratar una célula dendrítica en una fase de maduración en lugar de una fase inmadura con un antígeno unido a un péptido que tiene una permeabilidad a través de la membrana celular para preparar una célula dendrítica con capacidad de presentación de antígeno mejorada, a una célula dendrítica preparada mediante el método y a uno de sus agentes inmunoterapéuticos, a un uso para vacunas antitumorales o a una composición farmacéutica para el uso en un método para tratar tumores, que contiene la misma.

Técnica Anterior

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno (APCs) profesionales y representan un papel importante en la inducción inmunitaria y la regulación inmunitaria en un cuerpo.

15 Las células dendríticas en un cuerpo humano son solo el 0,3% de los glóbulos blancos totales, pero son células inmunitarias capaces de activar células T vírgenes que nunca han entrado en contacto con antígenos para inducir una respuesta inmunitaria primaria e inducir una inmunidad de memoria adquirida específica de los antígenos. La razón por la que las células dendríticas son capaces de servir como las células presentadoras de antígeno profesionales es que moléculas coestimulantes tales como CD80 y CD86 y moléculas de adherencia tales como ICAM-1 además del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) I/II se expresan altamente sobre una superficie celular, y diversas citocinas (interferón, IL-12, IL-18, etc.) relacionadas con la activación de células T se secretan en una gran cantidad.

20 Según se describe anteriormente, puesto que las células dendríticas son capaces de inducir o regular eficazmente la actividad de células T específica de antígeno, se ha estudiado desde hace mucho tiempo una posibilidad en la que las células dendríticas se usen como un agente terapéutico para el cáncer o enfermedades inmunitarias intratables. Se ha encontrado que cuando las células dendríticas se separan directamente de tejido o sangre o células dendríticas diferenciadas de monocitos se sensibilizan con un antígeno y células dendríticas maduras se inyectan de nuevo en el cuerpo, esto induce un linfocito T citotóxico (CTL) específico de antígeno profesional y, así, se ha estudiado desde hace mucho tiempo una posibilidad de desarrollar las células dendríticas como una vacuna para el tratamiento del cáncer o enfermedades infecciosas (Inaba, K. y cols., 3. Exp. Med., 178:479, 1993; Inaba, K. y cols., Int. Rev. Immunol., 6:197, 1990; Hsu, F. y cols., Nature Med., 2:52, 1996).

30 Basándose en estos resultados de estudios iniciales, se han efectuado en todo el mundo estudios clínicos de terapia con células dendríticas para el tratamiento del cáncer, y se han presentado resultados en diversos carcinomas. Sin embargo, los efectos clínicos con una monoterapia son menores que los esperados inicialmente.

35 La razón conocida por la que la terapia con células dendríticas no ha sido satisfactoria todavía se debe a una baja inmunogenicidad de células tumorales y sustancias inmunosupresoras secretadas por células cancerosas. En este caso, si las células dendríticas son capaces de inducir más inmunidad anticancerosa profesional para vencer la baja inmunogenicidad de las células tumorales y para inducir inmunidad anticancerosa que sea capaz de sobrepasar una capacidad inmunosupresora de las células tumorales, los efectos terapéuticos se pueden mejorar mucho. Bajo estas circunstancias, los presentes inventores encontraron que cuando las células dendríticas en una fase de maduración en lugar de una fase inmadura se sensibilizaban con un agente recombinante en el que un antígeno está unido a un péptido funcional que tiene una permeabilidad a través de la membrana celular tal como un péptido de transducción citoplásmica [CTP: Kim, D. y cols. Exp Cell Res. 312(8):1277-88, 2006], era posible preparar células dendríticas que tuvieran una capacidad de migración a nódulos linfáticos, una capacidad de proliferación de células T, una capacidad de inducción de linfocitos T citotóxicos, etc. notablemente mejoradas, con respecto a células dendríticas convencionales, y se confirmó que era posible proporcionar uno de sus agentes inmunoterapéuticos usando las mismas, y una composición farmacéutica para prevenir o tratar tumores usando las mismas, y completaron la presente invención.

Divulgación

Problema Técnico

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para preparar una célula dendrítica que tenga capacidad de inducción de linfocitos T citotóxicos mejorada y una función mejorada, una célula dendrítica preparada

mediante el método y una vacuna antitumoral o una composición farmacéutica para el uso en un método para tratar tumores que contiene la misma.

Solución Técnica

5 A fin de alcanzar los objetivos precedentes, la presente invención proporciona un método para preparar una célula dendrítica que comprende cultivar una célula dendrítica inmadura hasta una célula dendrítica madura en presencia de un factor de maduración, en donde la célula dendrítica se sensibiliza con un antígeno unido a un péptido que tiene permeabilidad celular después de que se complete la maduración, en donde el antígeno se trata en de 6 a 48 horas
10 después de que se trate el factor de maduración, y en donde la sensibilización con un antígeno se realiza menos de 8 horas.

La presente invención también proporciona una célula dendrítica preparada mediante el método.

15 La presente invención también proporciona un agente inmunoterapéutico que comprende la célula dendrítica.

La presente invención también proporciona una vacuna antitumoral que comprende la célula dendrítica.

20 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para el uso en un método para tratar tumores que comprende la célula dendrítica.

Descripción de los Dibujos

Las FIGS. 1a a 1d muestran resultados como sigue.

25 La FIG. 1a muestra la capacidad de migración de una célula dendrítica preparada en una realización ejemplar de la presente invención al tratar un péptido que tiene permeabilidad celular con una célula dendrítica inmadura desde una fase inmadura hasta O/N (20 horas) y al tratar el mismo antígeno a las 4 horas antes de la recolección celular durante un procedimiento de maduración.

30 La FIG. 1b muestra los resultados de análisis de la concentración de IL-12 en un medio de cultivo de células dendríticas de la FIG. 1a.

La FIG. 1c muestra los resultados de análisis de la capacidad de proliferación de células T cuando se cocultivan las células dendríticas de la FIG. 1a y células T autólogas.

35 La FIG. 1d muestra los resultados de análisis de ELISA de IFN- γ en el medio de cultivo de la FIG. 1c.

Las FIGS. 2a a 2e muestran los resultados como sigue.

40 La FIG. 2a muestra los resultados de análisis del número de linfocitos T citotóxicos (CTL) inducido con células dendríticas preparadas en diferentes momentos de sensibilización con antígeno según una realización ejemplar de la presente invención.

45 La FIG. 2b muestra el resultado de análisis de la concentración de IFN- γ secretado en un medio de cultivo durante la inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) según un Ejemplo (FIG. 2a).

La FIG. 2c muestra los resultados de examinar una actividad citotóxica del CTL (célula efectora) preparado en el Ejemplo (FIG. 2a).

50 La FIG. 2d muestra los resultados de análisis de la concentración de IFN- γ secretado en el medio de cultivo cuando se cocultivan el CTL (célula efectora) del Ejemplo (FIG. 2c) y células diana.

La FIG. 2e muestra los resultados de análisis de especificidad antigénica del CTL inducido en el Ejemplo (FIG. 2a), usando un ensayo de ELISPOT de IFN- γ .

55 La FIG. 3 muestra resultados del análisis fenotípico de células dendríticas preparadas según una realización ejemplar de la presente invención.

Las FIGS. 4a a 4f muestran resultados como sigue.

60 La FIG. 4a muestra resultados del análisis fenotípico de células dendríticas sensibilizadas con el antígeno combinadas con o sin CTP (péptido de transducción citoplásmica) O/N (20 horas) o 4 horas antes de la recolección celular.

La FIG. 4b muestra resultados de análisis de ELISA de IFN- γ en un medio de cultivo cuando se cocultivan la célula dendrítica del Ejemplo (FIG. 4a) y una célula T autóloga.

5 La FIG. 4c muestra los resultados de análisis de células CD8 positivas de CTL inducido por la célula dendrítica del Ejemplo (FIG. 4a).

La FIG. 4d muestra resultados de análisis de ELISA de IFN- γ en un sobrenadante durante un procedimiento de inducción del CLT con la célula dendrítica del Ejemplo (FIG. 4a).

10 La FIG. 4E muestra los resultados de análisis de la respuesta inmunitaria específica de antígeno de células T inducida por la célula dendrítica del Ejemplo (FIG. 4a), usando ELISPOT de IFN- γ .

La FIG. 4f muestra resultados de prueba obtenidos al examinar células CD8 positivas que expresan gránulo (Granzyme B) entre células T inducidas por la célula dendrítica del Ejemplo (FIG. 4a), usando un método de tinción intracelular.

15 La FIG. 5 muestra resultados de análisis comparativos de la capacidad de captación de antígeno (CTP-PSA o X-PSA) entre células dendríticas inmaduras (imDCs) y células dendríticas maduras (mDCs) usando Ag marcado con rodamina.

20 La FIG. 6 muestra resultados de análisis comparativos de una capacidad inmunitaria de la célula dendrítica según el momento de tratamiento con CTP-antígeno, la FIG. 6a muestra un diagrama de un método de tratamiento con CTP-GPC3, y la FIG. 6b muestra los resultados de análisis de IFN- γ en el medio de cultivo cuando se cocultivan células dendríticas respectivas y célula T autóloga, usando un método de ELISA.

Mejor Modo

25 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que los conocidos generalmente por los expertos en la técnica de la que trata la presente invención. Generalmente, la nomenclatura usada en la presente es bien conocida y se emplea comúnmente en la técnica.

30 Una capacidad de captación de antígeno de células dendríticas maduras es mucho menor que la de células inmaduras en un método convencional para preparar células dendríticas, de modo que se utiliza un método para aportar un antígeno antes de la maduración de las células dendríticas (Publicación de Solicitud de Patente Coreana N° 2004-0025690). Además, los tipos de antígenos que se van a aportar son ARNm, ADN, lisado de células o tejidos cancerosos, células cancerosas que son destruidas o inducidas a la apoptosis, proteínas recombinantes y péptidos cortos, y estos antígenos se tratan directamente sobre las células dendríticas o estos antígenos se aportan a las células dendríticas usando métodos tales como cocultivo con las células dendríticas, electroporación, Lipofectamine, etc. En particular, según la electroporación, la eficacia de transfección varía mucho dependiendo de las células aportadas y, aunque se muestra una alta viabilidad celular después de 24 horas de cultivo mediante electroporación, se muestra que la relación de recuperación celular es baja. Un método para aportar un antígeno usando vesículas lipídicas tales como liposomas también muestra baja eficacia de transfección, inestabilidad fisicoquímica, bajas estabilidad de emulsión y eficacia de recogida, y requiere un procedimiento para retirar disolventes, y, así, existe un número de problemas en los que se complica un procedimiento de fabricación, y el coste de fabricación se incrementa, etc.

45 Según la presente invención, un antígeno recombinante unido a un péptido que tiene una permeabilidad a través de la membrana celular simplemente se trata en un medio de cultivo durante el cultivo de células dendríticas al tratar un factor de maduración, de modo que el antígeno pase a través de una membrana celular y permanezca en el citoplasma sin una capacidad captadora de antígeno de la célula dendrítica, y el péptido preparado mediante proteasoma se carga en el MHC I y, así, es posible inducir muy eficazmente una actividad de linfocito T citotóxico (CTL) cuando se administre a un cuerpo. Además, son utilizables proteínas de longitud completa, que no tienen limitación por el HLA a diferencia del péptido y, así, el método de preparación según la presente invención se puede utilizar ampliamente para preparar un agente terapéutico de células dendríticas. En vista de la función, es posible inducir inmunidad contra diversos epítomos de CTL de la proteína de longitud completa en comparación con células dendríticas preparadas usando péptidos de CTL cortos convencionales y, así, se puede esperar un fuerte efecto terapéutico.

55 Los presentes inventores encontraron que, cuando las células dendríticas se sensibilizan usando un antígeno unido a un péptido que penetra en la membrana celular después de que células dendríticas inmaduras se maduren en presencia del factor de maduración, a diferencia del método convencional en el que las células dendríticas inmaduras se sensibilizan con el antígeno en primer lugar y a continuación se maduran con factores de maduración, se mejora una capacidad de migración, se mejora la capacidad de secreción de IL-12 cuando las células dendríticas se reestiman, se mejora la capacidad de proliferación de células T en cocultivo con células T, se mejora la reactividad de Th1 y se mejora la capacidad de inducción de linfocitos T citotóxicos, etc., en comparación con las células dendríticas convencionales obtenidas al tratar las células dendríticas inmaduras con el antígeno.

60 Según estos resultados, se considera que las células dendríticas maduras se descomponen inmediatamente y presentan el antígeno introducido en las células sin un proceso de captura de antígeno, de modo que se reduce la

pérdida del péptido en un estado de unión de MHC-péptido, y las células se aportan directamente a la célula T, dando como resultado una fuerte inducción de una reacción específica para antígeno.

5 El término "célula dendrítica", según se usa en la presente, se refiere a una célula presentadora de antígeno profesional que absorbe un antígeno en una célula, y trata de que la célula presente el antígeno o un péptido derivado del antígeno, junto con un complejo del MHC clase I o un complejo del MHC clase II. La célula dendrítica incluye células presentadoras de antígeno tanto inmunogénicas como tolerogénicas, y se clasifica en una célula dendrítica inmadura ("imDC") y una célula dendrítica madura (o célula dendrítica madurada: "mDC") dependiendo de la madurez.

10 El término "célula dendrítica inmadura" usado en la presente se refiere a una célula dendrítica que se encuentra en una fase temprana de maduración, y no expresa marcadores de la superficie celular tales como CD14 similares a la célula dendrítica madura, y expresa HLA-DR, CD86, CD80, CD83 o CD40 en un alto nivel, y expresa CD1a y CCR1, CCR2, CCR5 y CXCR1 en un nivel normal. El nivel de estos marcadores de rasgos superficiales se puede confirmar a través de Ejemplos de la presente invención. Se confirmaba bajo las condiciones de los Ejemplos según la presente invención que la expresión de CD80 y CD83 tenía un nivel de aproximadamente 20% o menos en la célula dendrítica inmadura y, en particular, la expresión de CD83 que es un marcador de maduración representativo era menor de 10%. La diferenciación de la célula dendrítica inmadura se inicia al recibir una variedad de señales, lo que conduce a una diferenciación completa o diferenciación parcial dependiendo de la combinación de señales que se vaya a recibir. La célula dendrítica inmadura no es capaz de activar la célula T ni siquiera en contacto con la célula T debido a que se expresa un bajo nivel de citocina inflamatoria.

25 El término "célula dendrítica madura" usado en la presente se refiere a una célula formada mediante la maduración de la célula dendrítica inmadura, y significa una célula en la que marcadores de la superficie celular implicados en la actividad de células B y T, por ejemplo, MHC clase I o MHC clase II (HLA-DR), factores de ligazón celular (CD54, CD18, CD11), factores coestimulantes (por ejemplo, CD86, CD80, CD83 o CD40) se expresan a un nivel alto o relativamente incrementado en comparación con la célula dendrítica inmadura. Típicamente, la célula dendrítica madura expresa CCR7 y CXCR4 a altos niveles. Por ejemplo, cuando la célula dendrítica inmadura se cultiva en presencia de los factores de maduración para inducir la maduración de la célula dendrítica en una realización ejemplar de la presente invención, se podría confirmar que las relaciones de expresión de CD83 y CD80 se incrementaban notablemente. Además, la célula dendrítica madura libera citocinas proinflamatorias e incrementa la proliferación de células T alogeneicas y células T singeneicas y/o incrementa la secreción para la expresión de citocinas relacionadas con otras respuestas inmunitarias en una reacción linfocítica mixta.

35 En el método de preparación de la presente invención, la célula dendrítica se sensibiliza con el antígeno en una forma de un antígeno recombinante unido a un péptido que penetra en la membrana celular, en donde el tiempo de sensibilización puede ser, por ejemplo, 24 horas o menos, para sensibilizar la célula dendrítica según la presente invención, preferiblemente, 12 horas o menos, y más preferiblemente 8 horas o menos, para sensibilizar la célula dendrítica según la presente invención. El tiempo de sensibilización del antígeno se puede controlar mediante los tipos de antígeno y un grado de maduración de la célula dendrítica inmadura. Un tiempo de sensibilización mínimo del antígeno es preferiblemente, por ejemplo, 1 hora o más, o 3 horas o más. Sin embargo, el tiempo de sensibilización mínimo se puede controlar mediante un método para cultivar células dendríticas sensibilizadas con antígeno, tal como el tamaño, la especie del antígeno y el número de células sensibilizadas.

45 Un instante en el que se trata el antígeno no está particularmente limitado con la condición de que sea en un procedimiento en el que la célula dendrítica inmadura se cultive y se madure, o antes de que las células dendríticas maduras se recojan o recolecten después de que se complete la maduración, pero, por ejemplo, puede ser de 1 a 48 horas, de 2 a 48 horas, de 6 a 48 horas, de 12 a 48 horas, de 1 a 40 horas, de 2 a 40 horas, de 6 a 40 horas, de 1 hora a 24 horas, de 2 a 24 horas, de 6 a 24 horas o de 12 a 24 horas después de que se trate el factor de maduración.

50 Cuando el antígeno se trata después de la maduración dentro del intervalo de tiempo descrito anteriormente, es posible obtener un efecto de potenciación de inmunidad de Th1 específica para antígeno y una capacidad de inducción de CTL. Sin embargo, cuando el instante en el que se trata el antígeno está más allá del intervalo de tiempo descrito anteriormente, puede existir el problema de que las funciones de la célula dendrítica se agoten más allá de la fase de maduración.

55 Además, el tiempo de cultivo para inducir la maduración de la célula inmadura según se describe anteriormente se puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo, y el instante en el que se trata el antígeno se puede determinar basándose en el marcador de la superficie celular tal como CD80, CD83 o CD40 del que se incrementa una cantidad de expresión durante la maduración de la célula dendrítica. Por ejemplo, la célula dendrítica puede mostrar un nivel de expresión incrementado de CD80, CD83 y CD40 de aproximadamente 50% o más, y preferiblemente aproximadamente 60% o más de incremento en comparación con el de la célula dendrítica inmadura (FIG. 3). Si es posible alcanzar un nivel de maduración, el tiempo de cultivo no está limitado con las susodichas condiciones.

65 En un ejemplo, el péptido que tiene una permeabilidad a través de la membrana celular puede ser al menos un dominio de transporte proteínico seleccionado del grupo que consiste en CTP (péptido de transducción citoplásmica), HP4,

Hph-1, Mph-1, Sim-2, Tat, VP22, Antp (Antennapedia), Pep-1 (péptido), PTD-5, R9 (arginina) y péptido que incluye el dominio 7R. Según esto, al unir el péptido que permanece en el citoplasma mientras que tiene la excelente permeabilidad a través de la membrana celular al antígeno, es posible preparar una vacuna de células dendríticas profesionales que tenga una capacidad de inducción de linfocitos T citotóxicos mejorada.

Entre los péptidos anteriores, el péptido de transducción citoplásmica exhibe un fenómeno de permeación a través de la membrana celular incluso después de un tratamiento con enzimas proteolíticas (por ejemplo, tripsina, quimotripsina y subtilisina) después de que haya transcurrido un tiempo adecuado requerido para la permeación a través de la membrana celular, de modo que el péptido sea capaz de penetrar a través de membranas celulares sin ser afectado por el tratamiento de las enzimas proteolíticas.

Por ejemplo, el péptido de transducción citoplásmica puede ser un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1 a 14, preferiblemente, un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1 a 6, 8 a 10 y 13 a 14, y, más preferiblemente, un péptido que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1 a 2 y 13 a 14.

La unión del péptido al antígeno se puede alcanzar con la condición de que sea un tipo de unión intermolecular conocido en la técnica, pero, por ejemplo, el péptido se une al antígeno a través de un enlace covalente del péptido y el antígeno, o una forma de conjugación del péptido y el antígeno usando un conector específico.

El antígeno unido covalentemente al péptido de transducción citoplásmica puede estar unido a un extremo N o un extremo C del péptido de transducción citoplásmica. El método del enlace covalente se puede realizar mediante un método conocido en la técnica dependiendo de los tipos de antígeno. Por ejemplo, se realiza al clonar un gen que codifica proteína de péptido de transducción citoplásmica y expresar el gen en una célula. Además, se puede usar un conector que no interfiera con la transportabilidad del péptido de transducción citoplásmica y la persistencia citoplásmica y una actividad de moléculas biológicamente activas. El conector puede ser, por ejemplo, yodoacetato de N-succinimidilo, éster de N-maleimidobutiriloxisuccinamida, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno, disdiazobencidina, 3,3-ditio-bis-(propionato de sulfosuccinimidilo), bis(sulfosuccinimidilsuccinato) de etilenglicol, dicitohexilcarbodiimida, etc., pero no está limitado a estos. Por otra parte, cuando la actividad se exhibe solamente cuando el antígeno se descompone del péptido de transducción citoplásmica, se usa el conector que sea capaz de escindir in vivo. Por ejemplo, se puede usar un agente de unión que tenga éster de ácido carboxílico y/o que tenga un enlace disulfuro.

Cuando la célula dendrítica madura se trata con el antígeno al que está unido el péptido que penetra en la membrana plasmática, por ejemplo, el péptido de transducción citoplásmica, se podría confirmar que la permeabilidad en las células se mejora notablemente, la eficacia de captación del antígeno se incrementa y la capacidad de migración de la célula dendrítica, la producción de IL-12, la proliferación de células T y la producción de IFN- γ se incrementan notablemente en comparación con un grupo de control al que no está unido el péptido que penetra en la membrana plasmática. Estos resultados son opuestos a resultados convencionales en los que la sensibilización con antígeno de la célula dendrítica se debe realizar antes de la maduración, que fueron demostrados en primer lugar por la presente invención.

Los factores de maduración que se tratan durante el cultivo para la maduración de la célula dendrítica inmadura pueden ser, según una realización de la presente invención, al menos uno seleccionado del grupo que consiste en interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), prostaglandina E2 (PGE2), poli-IC, y una combinación de dos o más de los mismos, pero no se limita a los mismos. El factor de maduración se puede tratar conjuntamente o en momentos diferentes, por ejemplo, a intervalos de 10 minutos a 24 horas, preferiblemente a intervalos de 8 horas a 24 horas, y más preferiblemente a intervalos de 15 a 22 horas. En un ejemplo, el OK-432 se trató en momentos diferentes con diferentes factores de maduración, y la diferencia del momento es para prevenir la sensibilización del OK-432 con el antígeno para inducir una respuesta inmunitaria inespecífica. Además de este propósito, el punto temporal para el tratamiento entre los factores de maduración se puede controlar para inducir una maduración de células dendríticas eficaz.

En algunos casos, un medio usado para inducir la diferenciación de células precursoras de células dendríticas en células dendríticas inmaduras puede ser un medio general usado para cultivar células animales, por ejemplo, un medio libre de suero así como un medio que contiene suero. Por ejemplo, el medio contiene suero (por ejemplo, suero bovino fetal, suero equino y suero humano). El medio utilizable en la presente invención incluye, por ejemplo, la serie RPMI (por ejemplo, RPMI 1640), MEM de Eagle (medio esencial mínimo de Eagle, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM, MEM de Iscove, medio 199, CMRL 1066, RPMI 1640, F12, DMEM (Modificación de Dulbecco del medio de Eagle, Dulbecco), una mezcla de DMEM y F12, MB753/1 de Way-mouth, 5A de McCoy y la serie MCDB, pero no se limita a los mismos. Además, como el medio libre de suero, se puede usar la serie X-VIVO (X-VIVO15, X-VIVO10, etc.) y CellGro, etc.. El medio puede contener otros componentes, por ejemplo, un antioxidante (por ejemplo, β -mercaptoetanol).

En algunos casos, cuando se cultiva la célula dendrítica inmadura en el método de preparación de la presente invención, también se puede tratar un inhibidor de mTOR además de los factores de maduración.

5 Los presentes inventores encontraron que en la célula dendrítica madura preparada mediante el tratamiento adicional del inhibidor de mTOR, se podría incrementar la expresión de las citocinas IL-12 y IFN- γ , se podría incrementar una capacidad de inducción de la inmunidad en modelos de prevención del cáncer y se podría ejercer un excelente efecto anticanceroso en modelos de tratamiento del cáncer.

10 El inhibidor de mTOR puede incluir cualquier tipo de inhibidor que se una directamente a mTORC para la inhibición o actúe para la inhibición competitiva con ATP en un centro de descomposición del mTORC, según una realización de la presente invención, puede ser uno seleccionado del grupo que consiste en rapamicina, sirolimus, everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, NVP-BEZ235, SF-1126, XL-765, PKI-587, PF-04691502, PKI-402, OSI-027, AZD-8055, PP-242, PP-30, torina-1, WYE-125132, WAY-600, WYE-687, WYE-354, KU-0063794 y Palomid-529, pero no se limita a los mismos.

15 Entre ellos, los presentes inventores confirmaron que la célula dendrítica madurada tratada con rapamicina podría incrementar la expresión de IL-12, mejorar la respuesta inmunitaria de Th1 implicada en IFN- γ , incrementar linfocitos T citotóxicos y células destructoras naturales y mejorar sus actividades.

20 El inhibidor de mTOR se puede tratar a una concentración suficiente para obtener la célula dendrítica madura que tiene una capacidad de inducción y una función mejoradas del linfocito T citotóxico deseado, pero, según una realización, una concentración del inhibidor de mTOR puede ser de 1 a 500 ng/ml, y preferiblemente de 1 a 450 ng/ml. Entre los inhibidores de mTOR, la rapamicina se trata preferiblemente a una concentración de 1 a 10 ng/ml. Dentro del intervalo de concentración descrito anteriormente, es posible incrementar la expresión de IL-12 e IFN- γ ,
25 incrementar la proliferación y la actividad de linfocitos T citotóxicos. Sin embargo, cuando la concentración supera 10 ng/ml, la proliferación de células T tiende a decrecer.

30 Según el método de preparación de la presente invención, es posible preparar la célula dendrítica que tiene una permeabilidad celular notablemente mejorada, una capacidad de inducción de linfocitos T citotóxicos mejorada y una capacidad de secreción incrementada de diversas citocinas tales como IFN- γ , IL-12, etc. Por encima de todo, la célula dendrítica preparada según el método de preparación induce fuertemente la muerte de células cancerosas específicas de antígeno (véase la FIG. 2).

35 Basándose en estos resultados, se confirmó que se podría mejorar la capacidad de inducción de inmunidad, y se podría exhibir un excelente efecto anticanceroso basado en esto, y, por lo tanto, la presente invención proporciona la célula dendrítica preparada mediante el método de preparación, y un agente inmunoterapéutico que incluye la misma, y una vacuna antitumoral, o una composición farmacéutica para el uso en un método para tratar tumores.

40 Según la presente invención, una célula dendrítica se prepara mediante el método de preparación descrito anteriormente. La célula dendrítica puede exhibir las siguientes características:

(i) incremento en la capacidad de migración sensible a quimocinas;

(ii) incremento en la capacidad de secreción de IL-12 cuando se reestimula la célula dendrítica;

(iii) incremento en la capacidad de secreción de IFN- γ de la célula T tras la estimulación de la célula T con la célula dendrítica;

45 (iv) incremento en la citotoxicidad de la célula T tras la estimulación de la célula T con la célula dendrítica;

(v) incremento en el linfocito T citotóxico cuando se induce el linfocito T citotóxico con la célula dendrítica; o

(vi) incremento en la célula T funcional específica de antígeno cuando se cocultiva con la célula dendrítica.

50 Basándose en estas características, la presente invención se refiere a un agente inmunoterapéutico que comprende la célula dendrítica. El agente inmunoterapéutico puede incrementar una respuesta inmunitaria o se puede incrementar selectivamente una parte de la respuesta inmunitaria deseable para el tratamiento o la prevención de enfermedades, una infección o trastornos específicos.

55 Basándose en esto, la presente invención se refiere a una vacuna antitumoral, o una composición farmacéutica para el uso en un método para tratar tumores que comprende la célula dendrítica.

5 Basándose en el hecho de que la célula dendrítica tiene inmunogenicidad cuando un tumor tiene antígenos potenciales ricos y los antígenos son presentados por la célula dendrítica, la célula dendrítica según la presente invención es utilizable como las vacunas antitumorales para prevenir tumores o agentes terapéuticos para tumores. La célula dendrítica según la presente invención puede incrementar la inmunogenicidad de un objetivo, previniendo o suprimiendo de ese modo la proliferación y/o la metástasis tumoral en el objetivo.

10 El antígeno utilizable en las vacunas antitumorales puede ser, por ejemplo, antígeno de cáncer hepático o antígeno específico de cáncer de próstata, pero no se limita a los mismos. El antígeno específico de cáncer hepático puede ser, por ejemplo, AFP (alfa-fetoproteína), GPC-3 (glipicano-3), MAGE-1 (antígeno 1 asociado a melanoma) y el antígeno específico de cáncer de próstata puede ser PCA (antígeno de cáncer de próstata), PAP (fosfatasa ácida prostática) o PSA (antígeno específico de la próstata), pero no se limita a los mismos.

15 El antígeno de las vacunas que incluyen la célula dendrítica utilizable en la presente invención es la totalidad de los antígenos capaces de unirse a un péptido que penetra en la membrana plasmática, y pueden incluir células tumorales inactivadas, genes asociados a células tumorales, péptidos o proteínas producidos por un método recombinante génico. Cuando se intenta obtener el antígeno mediante el método recombinante génico, una secuencia nucleotídica que codifica el antígeno puede ser conocida en la técnica, o se puede usar una longitud completa de la secuencia conocida o una parte de la longitud completa de la secuencia conocida. La secuencia nucleotídica que codifica el antígeno se puede clonar en un vector de modo que se exprese el antígeno deseado.

20 La vacuna antitumoral puede incluir tanto un método de inmunización realizado mediante una sola administración como un método de inmunización realizado mediante una administración continua.

25 El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención, que se usa generalmente en la preparación, incluye lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato cálcico, alginato, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato magnésico y aceite mineral, pero la presente invención no se limita a los mismos. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un odorizante, un emulsionante, una suspensión, un conservante, y similares, además de los componentes anteriores. Vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables que son adecuados se describen con detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19^a ed., 1995).

35 Una dosificación apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención se puede prescribir de forma variada dependiendo de factores tales como un método de formulación, un modo de administración, la edad, el peso corporal, el sexo, el momento de administración y la vía de administración del paciente. Sin embargo, no se ha presentado toxicidad grave (Grado: 3 o más) dependiendo de la dosificación y, así, la dosificación se determina en gran parte dependiendo del método de preparación y el rendimiento. Ahora bien, la dosificación subcutánea de la composición farmacéutica de la presente invención es preferiblemente de $0,1 \times 10^7$ a 10×10^7 células.

40 La composición farmacéutica de la presente invención se prepara en una sola forma de dosificación usando un excipiente farmacéuticamente aceptable según un método que pueda ser realizado fácilmente por una persona que tenga una experiencia normal en la técnica de la que trata la presente invención. En la presente, la formulación puede estar en una forma de suspensión en un medio de congelación celular, o una forma de suspensión en una solución tamponadora, y adicionalmente puede contener un estabilizante. La célula dendrítica según un ejemplo se puede congelar después de la sensibilización con antígeno, y descongelar para ser usada si es necesario. La estabilidad de la célula dendrítica se evaluó durante de 3 a 9 meses, y se confirmó que la función y la estabilidad de la célula dendrítica no se cambiaban significativamente por el almacenamiento con congelación.

50 La composición farmacéutica de la presente invención para el uso en un método para tratar tumores se administra parenteralmente, y se puede administrar mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, administración transdérmica, etc.

Posteriormente, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de una célula dendrítica autóloga (Ag-BH4h) (PBMC→imDC)

(1) Diferenciación de una célula dendrítica inmadura (imDC) a partir de una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC) (es decir, PBMC → imDC)

5 Con respecto a las células mononucleares sanguíneas de individuos sanos, se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de las que se retiraban reticulocito, granulocito, plaqueta, plasma, etc. al realizar una centrifugación con gradiente de densidad usando Ficoll-Paque Plus (clase libre de endotoxinas) a temperatura ambiente.

10 Las células mononucleares de sangre periférica se recogieron y se centrifugaron para recolectar las células, y las células se suspendieron en medio RPMI1640 que contenía plasma autólogo en una cierta concentración, y se cultivaron en una incubadora celular. Cuando se usaban PBMCs congeladas, las PBMCs se descongelaban y se lavaban con HBSS o medio libre de suero.

15 Los monocitos se separaron de las células mononucleares de sangre periférica usando la adherencia plástica a un artículo de plástico, que es un material común de una incubadora de células animales. Puesto que los monocitos tienen alta adherencia plástica a un artículo de plástico que es el material del fondo de una incubadora celular, las células mononucleares de sangre periférica suspendidas en un medio se cultivaron a 37°C, y las células no adherentes se retiraron junto con el medio, obteniendo de ese modo células adherentes como una fracción en la que las células mononucleares del paciente se ajustaban selectivamente hasta 80% o más de los números de células sanguíneas totales.

20 Un medio de diferenciación de células dendríticas que inducía la diferenciación de células dendríticas de los monocitos era medio RPMI1640 al que se añadían mezcla de citocinas (interleucina-4: IL-4 que es proteína recombinante humana expresada en *E. coli*, JW CreaGene, concentración final: 300 ng/ml o menos) y GM-CSF (JW CreaGene, concentración final: 100 ng/ml o menos).

(2) Célula dendrítica inmadura

Después de tres días desde el inicio del cultivo, las células que flotaban desde el fondo se recogieron y se contaron, y cada parte alícuota se transfirió a un recipiente de cultivo y se preparó para la maduración. Se recogieron algunas células y el nivel de expresión de diversos marcadores expresados sobre las superficies celulares [HLA-DR (BD, N° Cat. 555812), HLA-ABC (BD, N° Cat. 555552), CD40 (BD, N° Cat. 555588), CD80 (BD, N° Cat. 557227), CD86 (BD, N° Cat. 555657) y CD83 (BD, N° Cat. 556855)] se analizó mediante citometría de flujo (FACS).

(3) Inducción de la maduración de una célula dendrítica inmadura (imDC → mDC)

35 Se indujo la maduración de la célula dendrítica inmadura anterior de (2). Esto es, se añadieron TNF- α (factor de necrosis tumoral- α ; Peprotech n° 300-01A, 10 ng/ml), IL-1 β (interleucina-1 β ; Peprotech n° 200-01B, 10 ng/ml), IL-6 (interleucina-6; Peprotech n° 200-06, 10 ng/ml), PGE₂ (prostaglandina E₂; Sigma n° P0409, 1 μ g/ml) en una concentración predeterminada para la inducción de la maduración de la célula dendrítica. El medio también contenía IFN- γ (LG life science, concentración final: de 30 a 1000 U/ml) y poli IC (Sigma n° P0913, concentración final: 10 μ g/ml) conocido como un material de señalización de TLR (receptor de tipo Toll) como un factor de maduración y activación de células dendríticas, y como un factor inductor de inmunidad mediada celularmente, cada uno a una concentración predeterminada. Además, se añadió al medio rapamicina (Santa Cruz n° SC-3504), que es un inhibidor de mTOR, en una concentración de 5-10 ng/ml.

45 En presencia de los factores de maduración descritos anteriormente, las células dendríticas inmaduras se cultivaron durante de 12 horas a 48 horas, y a continuación se trataron con picibanil (OK-432) (fármaco, Picibanil, JW Pharmaceutical Corporation, concentración final: 1-2 μ g/ml) y un antígeno específico de cáncer (CTP-GPC-333-559; de 5 a 10 μ g/ml, JW CreaGene) para la respuesta inmunitaria específica de cáncer en cada recipiente de cultivo, cada uno en una concentración predeterminada, y se cultivaron durante de 3 a 7 horas. Las células flotantes se recogieron como un agente terapéutico final, se lavaron dos veces y se suspendieron en un estabilizador de congelación celular (albúmina sérica humana o plasma humano que contiene DMSO) para completar una solución madre.

50 Ejemplo Comparativo 1: Preparación de una célula dendrítica autóloga (Ag-O/N)

Se prepararon células dendríticas del mismo modo que en el Ejemplo 1, excepto por tratar simultáneamente las células dendríticas inmaduras con el factor de maduración y antígeno, y el instante en el que se trata el antígeno.

Ejemplo de Prueba 1: Comparación de la actividad biológica y la actividad inmunológica de la célula dendrítica autóloga CreaVax-HCC

Se midieron la capacidad de migración y la cantidad de IL-12 secretada en el medio de cultivo entre células dendríticas respectivas después del procedimiento de maduración cuando se preparan las células dendríticas del Ejemplo 1 (Ag-BH4h; la sensibilización con antígeno se realizó 4 horas antes de la recolección celular que era la última fase del procedimiento de maduración) y el Ejemplo Comparativo 1 (Ag-O/N; la sensibilización con antígeno se realizó junto con el tratamiento del factor de maduración en la fase inmadura), y se muestran en las FIGS. 1a y 1b, respectivamente, y se midieron la proliferación de células T y el IFN- γ cuando se cocultivaban células T aisladas de células de sangre periférica y las células dendríticas del Ejemplo 1 y el Ejemplo Comparativo 1, y se muestran en las FIGS. 1c y 1d, respectivamente. Aquí, el antígeno era GPC-3 (SEQ ID NO: 15).

Según la FIG. 1a, se podía confirmar que la capacidad de migración de la célula dendrítica del Ejemplo 1 era aproximadamente 1,5 veces mayor que la del Ejemplo Comparativo 1.

Específicamente, se preparó MIP-3 β (R&D systems, N^o Cat. 361-MI-025) en medio RPMI 1640 que contenía 10% de FBS a fin de que tuviera una concentración final de 50 ng/ml, y se añadieron 0,6 ml del material de reacción anterior a una cámara inferior de un Transwell (Corning, N^o Cat. 3422) que tenía un tamaño de poro de 8,0 μ m, y se pusieron 5×10^4 células dendríticas maduras en una cámara superior y se hicieron reaccionar a 37°C durante 120 minutos. A continuación, las células dendríticas migradas a la cámara inferior mediante MIP-3 β se contaron y el porcentaje de las células migradas se calculó a partir del número de células cargadas inicialmente. Como un grupo de control negativo, se usó un medio que no se trataba con MIP-3 β , y el método restante se realizó del mismo modo que anteriormente.

Además, a fin de medir las cantidades de IL-12 y IL-10, IL-12 y IL-10 se analizaron mediante ELISA en el medio de cultivo en el que se secretaban las células dendríticas durante el tratamiento con antígeno y la maduración. Se realizó un método experimental según el manual (IL-12; BD, N^o Cat. 555183, IL-10; BD N^o Cat. 555157) del proveedor del estuche de ELISA. Los resultados del experimento se mostraban en la FIG. 1b.

Según la FIG. 1b, se podía confirmar que la cantidad de IL-12 secretada en el medio de cultivo reestimulado de la célula dendrítica según el Ejemplo 1 era aproximadamente 20% superior que la del Ejemplo Comparativo 1. Esto sugiere que la célula dendrítica induce más eficazmente una respuesta inmunitaria de Th1 tras la reacción con células T.

Además, a fin de medir la proliferación de células T, las células T se aislaron de las células mononucleares periféricas congeladas usando un estuche de aislamiento de células T de platillo virgen (MACS, N^o Cat. 130-097-095). Después de descongelar las células dendríticas, las DCs se mezclaron con CFSE (éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína, Molecular Probes, N^o Cat. MOP-C-1157) - células T marcadas en una relación de 1 : 10 y cultivo durante 5 días. Para la tinción con CFSE, las células T se suspendieron a una concentración de 1×10^6 /ml, y el CFSE se añadió hasta una concentración final de 10 μ M, y las células se hicieron reaccionar en tampón de HSA al 0,1%/PBS a 37°C durante 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 y 1×10^5 células T y 1×10^4 células dendríticas maduras sensibilizadas con antígeno se triplicaron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 5 días. Después de cultivar, las células se recogieron y se sometieron a análisis por FACS, y las células proliferadas se analizaron mediante la fracción CFSE^{lo(w)}. Sus resultados experimentales se mostraban en la FIG. 1c.

Según la FIG. 1c, se podría confirmar que la proliferación de células T de la célula dendrítica según el Ejemplo 1 era aproximadamente 24% superior que la de la célula dendrítica preparada en el Ejemplo Comparativo 1.

Las células T autólogas y la célula dendrítica se cultivaron durante 5 días, y el IFN- γ en el sobrenadante de cultivo se analizó mediante ELISA (BD N^o Cat. 555142). Sus resultados se mostraban en la FIG. 1d.

Según la FIG. 1d, se podría confirmar que una cantidad de secreción de IFN- γ en el medio de cultivo en el que la célula dendrítica según el Ejemplo 1 se cultivaba junto con la célula T era aproximadamente 2 veces mayor que el del medio de cultivo en el que la célula dendrítica preparada en el Ejemplo Comparativo 1 se cultivaba junto con la célula T.

Ejemplo de Prueba 2: Prueba de Actividad de Linfocito T citotóxico (CTL) inducido por célula dendrítica autóloga

Los linfocitos T citotóxicos (CTL) fueron inducidos mediante la reacción mixta de una célula T autóloga (aislada de PBMCs) y células dendríticas del Ejemplo 1 (Ag-BH4h) y el Ejemplo Comparativo 1 (Ag-O/N). Aquí, el antígeno era GPC-3. Las células T se aislaron de células de sangre periférica del mismo ser humano usado para la preparación de células dendríticas usando un estuche de aislamiento de células T vírgenes (MACS, N^o Cat. 130-097-095). Las células dendríticas maduras y las células T aisladas se mezclaron en una relación de 1:10 (4×10^5 : 4×10^6) y se cultivaron

durante de 6 a 7 días. Las células T estimuladas primariamente se recogieron y se reestimularon a la misma relación (1 : 10) que las células dendríticas sensibilizadas con antígeno. El medio de cultivo (RPMI1640 + 10% de suero AB) se complementó o intercambió con medio reciente cada 2 a 3 días para proporcionar un ambiente de cultivo adecuado. En la primera estimulación, se añadió IL-7 (PeproTech, N° Cat. 200-07) en una concentración de 5 ng/ml. A partir de la segunda estimulación, la IL-7 se trató a la misma concentración de 2 a 3 días después del cultivo y, a continuación, la IL-2 (Proleukin, Novartis) se trató a una concentración de 50 U/ml. Con respecto a los CTLs inducidos al estimular las células T de dos a tres veces con las células dendríticas sensibilizadas con antígeno, se confirmó el número de células CTL (FIG. 2a) y se analizó la prueba de actividad del CTL (citotoxicidad, FIG. 2b). Esto es, cuando se cocultivaba la célula T y la célula dendrítica durante la inducción de CTL, al día siguiente de la estimulación, se midió la cantidad de secreción de IFN- γ tomando una parte del sobrenadante usando un método de ELISA. Sus resultados se mostraban en la FIG. 2b.

Como célula diana de citotoxicidad, se usa una línea celular Hep G2 que se ajustaba al tipo de HLA y que expresaba antígeno (GPC3). Las células diana y las células efectoras (CTL) se mezclaron a 1 : 0, 1 : 1, 1 : 5, 1 : 10 o 1 : 20, y se cultivaron durante de 20 a 24 horas, y el medio de cultivo se recogió y se congeló para medir IFN- γ , y las placas se fijaron con formalina al 10% durante 1 hora. A continuación, se añadieron a cada pocillo 200 μ l de violeta cristal al 0,4% y se tiñeron durante 30 minutos. A continuación, las placas se lavaron tres veces y se secaron a temperatura ambiente. Después de secar, se añadieron a las mismas 100 μ l de metanol al 80%, seguido por reacción durante 20 minutos. La absorbancia se midió a 570 nm para confirmar la citotoxicidad (FIG. 2c). Además, las células diana y las células efectoras (CTL) se mezclaron a 1 : 0,5, 1 : 1, 1 : 5 y se cultivaron durante de 20 a 24 horas. A continuación, la cantidad de secreción de IFN- γ se midió mediante ELISA usando el sobrenadante de cultivo (FIG. 2d).

Según las FIGS. 2a a 2d, se podría confirmar que el número de linfocitos T citotóxicos inducidos por la célula dendrítica según el Ejemplo 1 era dos veces o más superior que el número de linfocitos T citotóxicos inducidos por la célula dendrítica según el Ejemplo Comparativo 1, y la cantidad de secreción de IFN- γ en el medio de cultivo del Ejemplo 1 era dos veces o superior, y la citotoxicidad era 1,5 veces o superior, y la cantidad de secreción de IFN- γ en el medio de cultivo se incrementaba notablemente en el medio de cultivo en comparación con la del Ejemplo Comparativo 1.

Además, a fin de confirmar la respuesta inmunitaria específica de antígeno del antígeno GPC-3 con respecto a las células T activas inducidas por cada célula dendrítica, la especificidad antigénica del CTL inducido por las células dendríticas del Ejemplo 1 (Ag-BH4h) y el Ejemplo Comparativo 1 (Ag-O/N) se analizó mediante ELISPOT de IFN- γ (BD, N° Cat. 551849). Específicamente, a fin de confirmar la especificidad antigénica, se prepararon dos tipos de células dendríticas tratadas sin o con el antígeno. Aquí, se preparó una célula dendrítica que no está tratada con Picibanil (OK-432) para disminuir la reacción inespecífica. Se cultivaron 1×10^4 de células T activas inducidas y 3×10^3 de células dendríticas en una relación 3 : 1 durante de 18 a 24 horas en una incubadora de cultivo celular, y se realizó análisis de ELISPOT según un método presentado en el estuche. El número de puntos medido en el momento de la reacción con la célula dendrítica no tratada con el antígeno en el análisis se sustrajo, y sus resultados se muestran en la FIG. 2e.

Según la FIG. 2e, se podría confirmar que la especificidad antigénica de las células T activas inducidas por la célula dendrítica según el Ejemplo 1 se incrementaba en 30% o más.

Ejemplo de Prueba 3: Fenotipo de la superficie celular de una célula dendrítica autóloga

A fin de realizar un análisis fenotípico de la célula dendrítica inmadura y las células dendríticas del Ejemplo 1 (Ag-BH4h) y el Ejemplo Comparativo 1 (Ag-O/N), las células dendríticas se suspendieron en tampón de FACS (PBS + azida sódica al 0,1% + FBS al 1%) y se prepararon en de 3 a 5×10^4 células por tubo de FACS. Aquí, el antígeno era GPC-3. A continuación, se añadieron 3 μ l de anticuerpos de FACS con respecto a HLA-DR, HLA-ABC, CD80, CD86, CD40, CD83 [HLA-DR (BD, N° Cat. 555812), HLA-ABC BD, N° Cat.555552], CD40 (BD, N° Cat. 555588), CD80 (BD, N° Cat. 557227), CD86 (BD, N° Cat. 555657), y CD83 (BD, N° Cat. 556855)] y se hicieron reaccionar a 4°C durante 20 minutos. Después de la reacción, las células se lavaron con tampón de FACS, y se realizó el análisis fenotípico celular. Se confirmaba la expresión sobre los HLA-DR, HLA-ABC, CD80, CD86, CD40 y CD83 que son fenotipos de las células dendríticas maduras. Sus resultados se mostraban en la FIG. 3 y la Tabla 1 posteriormente.

En referencia a la FIG. 3, se podría confirmar que la expresión de CD80 y CD83 era baja en la célula dendrítica inmadura. Ahora bien, la expresión de CD80/CD83 se incrementaba significativamente en la célula dendrítica que se maduraba al tratar la célula dendrítica inmadura con el factor de maduración como en el Ejemplo 1 y el Ejemplo Comparativo 1 en comparación con la de la célula dendrítica inmadura, y un nivel de maduración no cambiaba significativamente por la diferencia del tiempo de sensibilización con antígeno.

[Tabla 1]

	Células positivas (%), Media±DE					
	HLA-DR	CD86	HLA-ABC	CD80	CD83	CD40
imDC	81,0±11, 4	85,3±14, 2	98,4±2,8	12,9±6,3	4,6±2,9	83,5±16, 6
BH4h	97,4±2,2	98,9±1,1	99,4±1,0	97,1±2,1	77,8±14, 1	98,1±2,4
mDC	98,3±1,2	98,9±1,0	99,5±0,5	97,4±1,6	89,6±7,2	97,6±1,7

Ejemplo de Prueba 4: Evaluación funcional de una célula dendrítica dependiendo de la presencia o ausencia de CTP

5 Los CTLs fueron inducidos según los métodos del Ejemplo de Prueba 1, el Ejemplo de Prueba 2 y el Ejemplo de Prueba 3, y se realizó una evaluación funcional dependiendo de la presencia o ausencia del CTP. El antígeno con el CTP se indicó con CTP-Ag y el antígeno sin el CTP se indicó con X-Ag. Aquí, el antígeno era GPC-3. Los resultados obtenidos al confirmar el fenotipo de la célula dendrítica se mostraban en la FIG. 4a. Las células T autólogas y las células dendríticas según el Ejemplo 1 o el Ejemplo Comparativo 1 se cocultivaron durante 5 días, y el IFN-γ en el medio de cultivo se analizó mediante ELISA, y sus resultados se mostraban en la FIG. 4b. Los CTLs fueron inducidos y las células CD8 positivas se analizaron y se muestran en la FIG. 4c, y el IFN-γ en el sobrenadante se midió mediante ELISA, y se muestran en la FIG. 4d. La respuesta inmunitaria específica de antígeno con respecto a las células T activas inducidas por cada célula dendrítica sensibilizada con el antígeno GPC-3 se analizó mediante ELISPOT de IFN-γ, y sus resultados se mostraban en la FIG. 4e.

15 Según las FIGS. 4a a 4e, cuando se compara un caso en el que la célula dendrítica se trata con el factor de maduración y, a continuación, se sensibiliza con el antígeno unido al péptido que penetra en la membrana plasmática 4 horas antes de la recolección celular y un caso en el que la célula dendrítica se trata con el factor de maduración y, a continuación, se sensibiliza con el antígeno al que no está unido el péptido que penetra en la membrana plasmática, no había un cambio significativo en el fenotipo de las dos células dendríticas (FIG. 4a). Sin embargo, cuando se cocultivaba con células T, la cantidad de IFN-γ se incrementaba 5 veces o más (FIG. 4b), el número de células T CD8+ se incrementaba 2 veces o más (FIG. 4c), el nivel de IFN-γ que indica la activación de células T CD8+ se incrementaba en 30% o más (FIG. 4d), y el número de ELISPOT se incrementaba en 5 veces o más (FIG. 4e). Por lo tanto, se podría confirmar que incluso cuando las células dendríticas se sensibilizaban con el mismo antígeno bajo las mismas condiciones, la capacidad de inducción de inmunidad de la célula dendrítica sensibilizada con el antígeno unido al péptido que penetra en la membrana plasmática se mejoraba notablemente.

30 Como una parte de la prueba de actividad citotóxica, se realizó una tinción intracelular para confirmar el nivel de expresión de gránulo (Granzyme B) secretado cuando la célula T activa se encuentra con las células diana. Específicamente, después de la estimulación, los CTLs se obtenían, se lavaban y las células diana (HepG2) se añadían en una relación, es decir, célula diana (HepG2) : CTLm de 1 : 20, en donde se añadía GolgiStop (BD, N° Cat.) conjuntamente en una cantidad de 0,14 μl por 200 μl de medio de cultivo celular, y se estimulaban a 37°C durante de 4 a 5 horas. Las células se recogieron y se lavaron, y se añadió PBS que contenía 10% de suero humano para el bloqueo del receptor de Fc. Después de cultivar a 4°C durante 15 minutos, y a continuación los antígenos sobre la superficie celular se tiñeron con CD3 (BD, N° Cat. 555335) y CD4 (BD, N° Cat. 555346), CD8 (BD, N° Cat. 555367) a 4°C durante 20 minutos. Las células se hicieron reaccionar con 250 μl de solución de fijación/permeabilización (BD, N° Cat. 554715) a 4°C durante 20 minutos, y a continuación se lavó dos veces con tampón de permeabilización/lavado, y se tiñó con Granzyme B (BD, N° Cat. 561142) durante de 30 a 50 minutos, se lavó y se analizó mediante citometría de flujo. Sus resultados se mostraban en la FIG. 4f.

40 Según la FIG. 4f, se podría confirmar que la secreción de gránulos (Granzyme B) que muestra que confirma la actividad citotóxica de las células T activas se incrementaba 2 veces o más cuando el antígeno unido al péptido que penetra en la membrana plasmática se sensibilizaba. Se confirmaba que el gránulo (Granzyme B) se expresaba más altamente cuando el antígeno unido al péptido que penetra en la membrana plasmática se trataba después del tratamiento con el factor de maduración en comparación con el caso en el que el antígeno unido al péptido que penetra en la membrana plasmática se trataba con la célula dendrítica inmadura.

Ejemplo de Prueba 5: Capacidad de captación de antígeno de una célula dendrítica dependiendo de la presencia o ausencia de CTP

50 A fin de confirmar una capacidad de captación de antígeno de la célula dendrítica inmadura y la célula dendrítica madura del Ejemplo 1 (Ag-BH4h), se analizó una capacidad de captación de antígeno (antígeno PSA, SEQ ID NO: 16) marcado con rodamina. Además, a fin de confirmar la capacidad de captación de antígeno de la célula dendrítica inmadura o la célula dendrítica madura, se realizó conjuntamente un ensayo de captación de dextrano que es el más

comúnmente usado. El antígeno marcado con rodamina se preparó como sigue. En primer lugar, se disolvió NHS-Rhodamine (Pierce) en DMSO (Sigma) en una concentración de 10 mg/ml, y se mezcló y se hizo reaccionar con 1 mg/ml de proteína durante 1 hora. Un precipitado se retiró mediante centrifugación, y la NHS-Rhodamine que no se hacía reaccionar se retiró mediante cromatografía de filtración en gel (GE, Sephadex G-25, 17-0033-02). La proteína marcada se identificó en Ex/Em = 552/575 nm usando HPLC (Agilent, serie 1200), y se calculó la cuantificación de proteínas al medir la absorbancia a 280/555 nm con un espectrofotómetro (Agilent, serie 8453).

Específicamente, se obtenían la célula dendrítica inmadura (1×10^5 células) al tercer día después del cultivo y la célula dendrítica madura que no se sensibilizaba con el antígeno al cuarto día después del cultivo, en donde las células se cultivaban del mismo modo que en la condición de cultivo de la célula dendrítica inmadura del Ejemplo 1, y se centrifugaban, y se suspendían en medios de cultivo de células dendríticas que tenían cada uno 100 μ l, y se pusieron en tubos de FACS. Entre ellos, una célula usada como un grupo de control negativo se puso en hielo durante 30 minutos antes de ser detenida. Las células se trataron con CTP conjugado fluorescentemente a rodamina-PSA y X-PSA (PSA sin CTP) a una concentración de 20 μ g/ml durante 1 hora, y se lavaron para realizar una citometría de flujo. Los resultados del análisis se mostraban con la mediana de la intensidad fluorescente, y sus resultados se mostraban en la FIG. 5.

Además, a fin de reexaminar la diferencia general en la capacidad de captación de antígeno de la célula dendrítica inmadura y la célula dendrítica madura usadas en la prueba, las células se trataron con 10 μ l de dextrano conjugado fluorescentemente a FITC (Sigma, N^o Cat. FD-40S), cada una a 37°C, y el grupo de control negativo se hizo reaccionar a 4°C durante 1 hora. Las células se lavaron con tampón de FACS (PBS + azida sódica al 0,1% + FBS al 1%), y se realizaron análisis por histograma con el programa FACSDiva (BD) que es un programa de análisis por FACS, para obtener un solo histograma de fluorescencia que especifica FL-1 en un eje X. Aquí, se realizó una segmentación lineal para fijar una región en la que 97% de muestra estándar fluorescente negativa está presente como una región de fluorescencia negativa y, en este estado, se representaron estados de región para cada sección, y se obtuvo y se analizó la única relación de segmentación fluorescente positiva (dextrano-FITC + fenotipo) de cada muestra. Sus resultados se mostraban en la FIG. 5.

Según la FIG. 5, podría reconfirmarse que en el caso de la célula dendrítica inmadura, el antígeno se aportó correctamente a la célula dendrítica, independientemente de si el péptido que penetra en la membrana plasmática estaba unido al antígeno. Sin embargo, en el caso de la célula dendrítica madurada, el antígeno unido al péptido que penetra en la membrana plasmática se aportaba más eficazmente a la célula. Esto es, la presente invención demuestra que el aporte del antígeno a la célula dendrítica se incrementaba notablemente mediante sensibilización con antígeno en la fase de maduración y el péptido que penetra en la membrana plasmática unido al antígeno y, así, las funciones de la célula dendrítica se incrementaban notablemente.

Ejemplo de Prueba 6: Evaluación funcional de una célula dendrítica según el tiempo de tratamiento con CTP-antígeno

El CTP-GPC3 se subdividió desde el instante en el que se trata el factor de maduración hasta el instante en el que se recolectan las células dendríticas maduras incluyendo el Ejemplo 1 (Ag-BH4h; 16 h) y el Ejemplo Comparativo 1 (Ag-O/N; 0 h), y se trata como en la FIG. 6a. El método de prueba descrito en la FIG. 6a es diferente del método para preparar la célula dendrítica del Ejemplo 1 en vista del tiempo de tratamiento con antígeno, y otras condiciones de cultivo se aplicaron del mismo modo. Las células se sensibilizaron con 5 μ g/ml de CTP-GPC3 por momento (0, 2, 4, 8, 12, 16, 18, 19,5 horas) después del punto temporal en el que se trata el factor de maduración, y todas las células se recolectaron a las 20 horas después del instante en el que se trata el factor de maduración. El instante en el que se trata el antígeno es 0 horas, que indica O/N, y el instante en el que se trata el antígeno es 16 horas, que indica BH4h. La célula T autóloga y la célula dendrítica se cultivaron durante 5 días y, a continuación, el IFN- γ en el medio de cultivo se analizó mediante ELISA, y sus resultados se mostraban en la FIG. 6b.

Según la FIG. 6, se considera que los tratamientos con CTP-antígeno cuando el tiempo para el tratamiento con CTP-antígeno es prolongado (tratamiento con antígeno a las 0, 2, 4 y 8 horas después del tratamiento con el factor de maduración) y cuando el tiempo para el tratamiento con CTP-antígeno es muy corto (tratamiento con antígeno a las 19,5 horas después del tratamiento con el factor de maduración) mostraban un nivel relativamente bajo de IFN- γ , y, así, no era eficaz sobre la función inmunológicamente activa de la célula dendrítica. Por otra parte, se podría confirmar que la célula dendrítica sensibilizada con CTP-Ag a de 12 horas a 18 horas después del tratamiento con el factor de maduración, la actividad inmunitaria se incrementaba al secretar una gran cantidad de IFN- γ que es un citocina Th1.

Aplicabilidad Industrial

Según el método para preparar una célula dendrítica de la presente invención, es posible preparar células dendríticas que tienen una permeabilidad celular notablemente mejorada, una capacidad de inducción de linfocitos T citotóxicos mejorada y una capacidad de secreción incrementada de diversas citocinas propensas a Th1 tales como IFN- γ , IL-12,

etc. Las células dendríticas preparadas según el método de la presente invención pueden exhibir un incremento en la capacidad de inducción de inmunidad y un excelente efecto anticanceroso, lo que se puede utilizar eficazmente para vacunas antitumorales, o para composiciones para el uso en métodos para tratar tumores.

5 **Listado de Secuencias**

<110> JW CreaGene Inc.

10 <120> Método para Preparar una Célula Dendrítica, Célula Dendrítica Preparada mediante el Mismo y Uso del Mismo

<130> PP-B1607-1

<150> KR 10-2014-0099281

15 <151> 2014-08-01

<160> 16

20 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> péptido de transducción citoplásmica

<400> 1

35 Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 2

<211> 11

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> péptido de transducción citoplásmica

<400> 2

50 Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Ala Arg Arg
1 5 10

<210> 3

55 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

60 <220>

<223> péptido de transducción citoplásmica

<400> 3

Tyr Gly Arg Arg Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 1 5 10

5 <210> 4

<211> 11

10 <212> **PRT**

<213> **Secuencia Artificial**

<220>

15 <223> péptido de transducción citoplásmica

<400> 4

Tyr Lys Arg Lys Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 1 5 10

20 <210> 5

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> péptido de transducción citoplásmica

<400> 5

35 Tyr Ala Arg Lys Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 1 5 10

<210> 6

40 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> péptido de transducción citoplásmica

50 <400> 6

Tyr Lys Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 1 5 10

55 <210> 7

<211> 11

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de transducción citoplásmica

5 <400> 7

Tyr Glu Arg Glu Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 1 5 10

<210> 8

10 <211> 11

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido de transducción citoplásmica

20 <400> 8

Tyr Ala Arg Glu Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 1 5 10

25 <210> 9

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> péptido de transducción citoplásmica

<400> 9

Tyr Gly Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 1 5 10

40 <210> 10

<211> 11

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> péptido de transducción citoplásmica

<400> 10

Tyr Arg Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Ala
 1 5 10

55 <210> 11

<211> 11

60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> péptido de transducción citoplásmica
 <400> 11
 . . .
 Tyr Pro Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 10 1 5 10
 <210> 12
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> péptido de transducción citoplásmica
 <400> 12
 25 Pro Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 1 5 10
 <210> 13
 30 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> péptido de transducción citoplásmica
 40 <400> 13
 Tyr Gly Arg
 1 5 10
 <210> 14
 45 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido de transducción citoplásmica
 55 <400> 14
 Tyr Arg
 1 5 10
 60 <210> 15

ES 2 796 299 T3

<211> 527

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> GPC-3

10

<400> 15

Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
 20 25 30
 Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
 35 40 45
 Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
 50 55 60
 Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
 65 70 75 80
 Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
 85 90 95
 Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
 100 105 110
 Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
 115 120 125
 Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
 130 135 140
 Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
 145 150 155 160
 Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
 165 170 175

ES 2 796 299 T3

Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
 180 185 190

Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
 195 200 205

Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
 210 215 220

Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
 225 230 235 240

Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
 245 250 255

Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
 260 265 270

Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
 275 280 285

Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
 290 295 300

Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
 305 310 315 320

Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
 325 330 335

Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
 340 345 350

Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
 355 360 365

Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
 370 375 380

Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
 385 390 395 400

Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
 405 410 415

Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
 420 425 430

Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
 435 440 445

Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
 450 455 460

Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly
 465 470 475 480

Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
 485 490 495

Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
 500 505 510

Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His
 515 520 525

5 <210> 16

<211> 244

<212> PRT

10

ES 2 796 299 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> PSA

<400> 16

Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu Lys
 1 5 10 15
 His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala Val
 20 25 30
 Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His
 35 40 45
 Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu Phe
 50 55 60
 His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe Pro
 65 70 75 80
 His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg Pro
 85 90 95
 Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu Pro
 100 105 110
 Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln Glu
 115 120 125
 Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile Glu
 130 135 140
 Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu His
 145 150 155 160
 Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val Thr
 165 170 175
 Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr Cys
 180 185 190
 Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Asn Gly Val Leu Gln Gly
 195 200 205
 Ile Thr Ser Trp Gly Ser Glu Pro Cys Ala Leu Pro Glu Arg Pro Ser
 210 215 220
 Leu Tyr Thr Lys Val Val His Tyr Arg Lys Trp Ile Lys Asp Thr Ile
 225 230 235 240
 Val Ala Asn Pro

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una célula dendrítica que comprende:
- 5 cultivar una célula dendrítica inmadura hasta una célula dendrítica madura en presencia de un factor de maduración, en el que la célula dendrítica se sensibiliza con un antígeno unido a un péptido que tiene permeabilidad celular después de que se complete la maduración, en donde el antígeno se trata entre 6 a 48 horas después de que se trate el factor de maduración, y
- 10 en donde la sensibilización con un antígeno se realiza durante menos de 8 horas.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el péptido que tiene permeabilidad celular comprende un péptido de transducción citoplásmica (CTP).
- 15 3. El método según la reivindicación 1, en el que el factor de maduración es uno seleccionado del grupo que consiste en interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ), prostaglandina E2 (PGE2), poli IC, un inhibidor de mTOR y una combinación de dos o más de los mismos.
- 20 4. El método según la reivindicación 3, en el que el inhibidor de mTOR es uno seleccionado del grupo que consiste en rapamicina, sirolimus, everolimus, temsirolimus, ridaforolimus, NVP-BEZ235, SF-1126, XL-765, PKI-587, PF-04691502, PKI-402, OSI-027, AZD-8055, PP-242, PP-30, torina-1, WYE-125132, WAY-600, WYE-687, WYE-354, KU-0063794 y Palomid-529.
- 25 5. El método según la reivindicación 3, en el que el inhibidor de mTOR es rapamicina.
6. El método según la reivindicación 5, en el que el inhibidor de mTOR se trata con una concentración de 1 a 500 ng/ml.
- 30 7. El método según la reivindicación 6, en el que la rapamicina se trata con una concentración de 1 a 50 ng/ml.
8. El método según la reivindicación 1, en el que la célula dendrítica se sensibiliza con un antígeno, cuando un nivel de expresión de CD80, CD83 o CD40 se incrementa en 60% o más, en comparación con el de la célula dendrítica inmadura.
- 35 9. Una célula dendrítica preparada mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Un agente inmunoterapéutico que comprende la célula dendrítica según la reivindicación 9.
- 40 11. Una vacuna antitumoral que comprende la célula dendrítica según la reivindicación 9.
12. Una composición farmacéutica para el uso en un método para tratar tumores que comprende la célula dendrítica según la reivindicación 9.

FIG. 1a

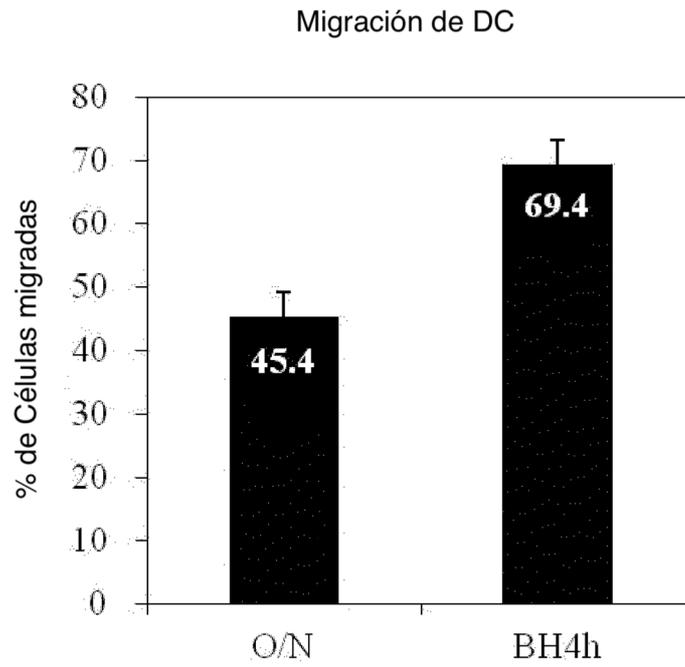


FIG. 1b

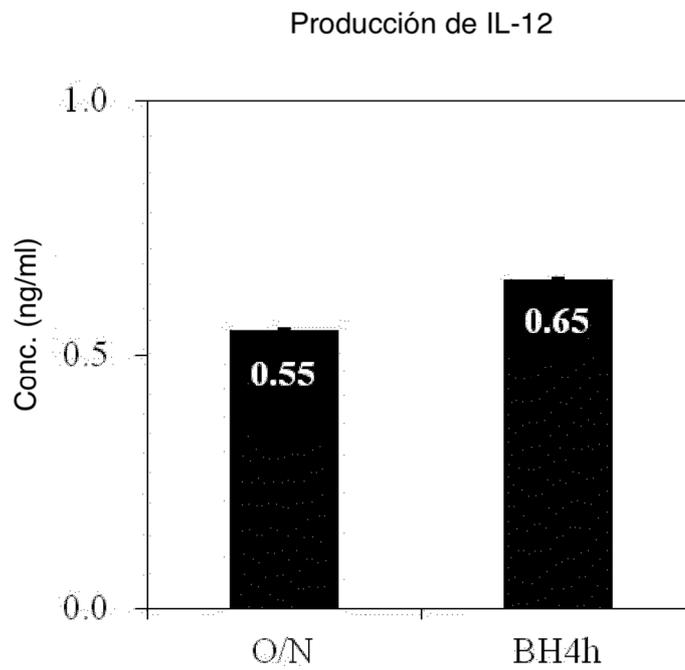


FIG. 1c

Proliferación de células T

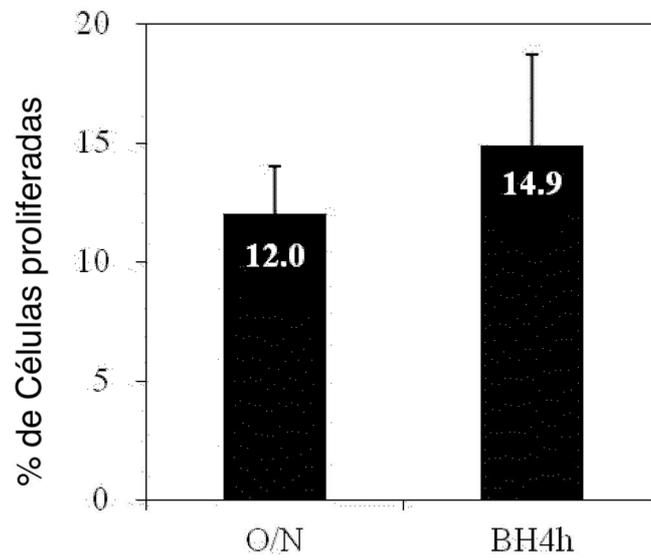


FIG. 1d

Producción de IFN- γ

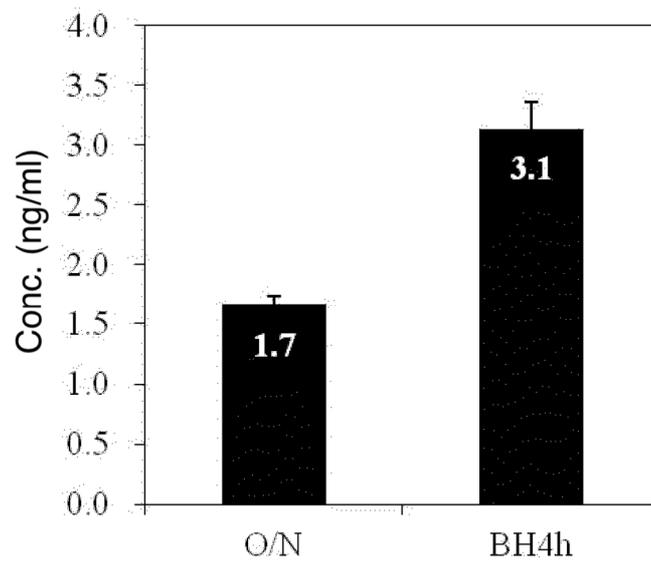


FIG. 2a

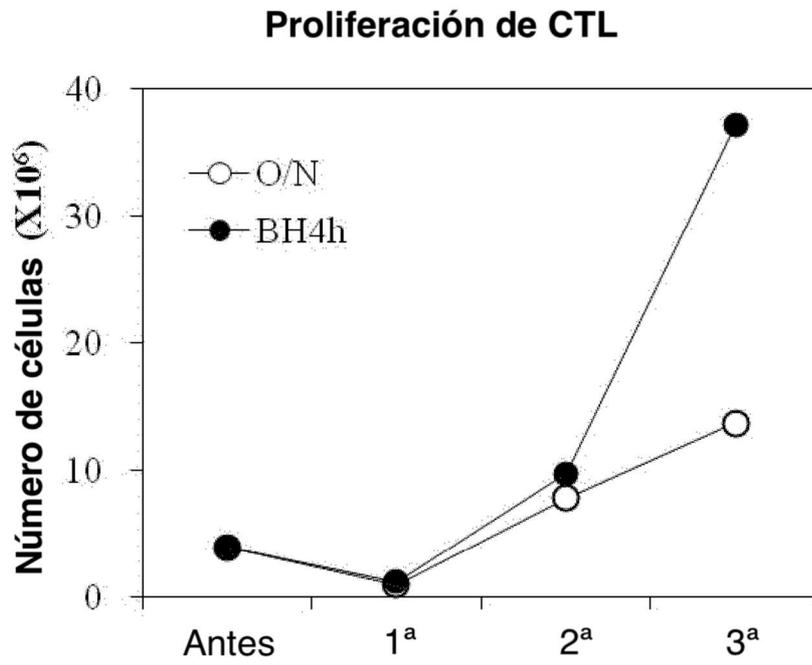


FIG. 2b

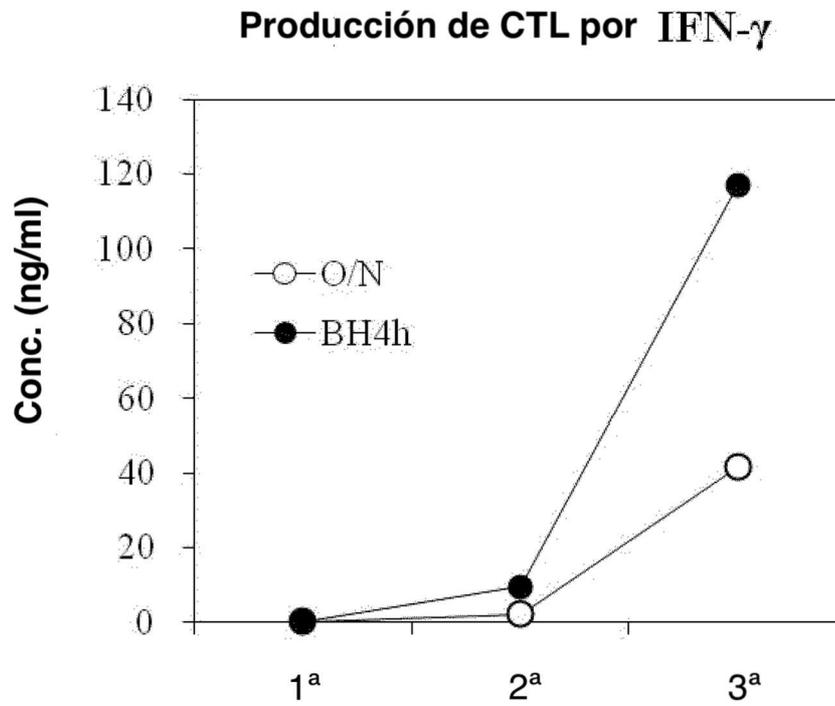
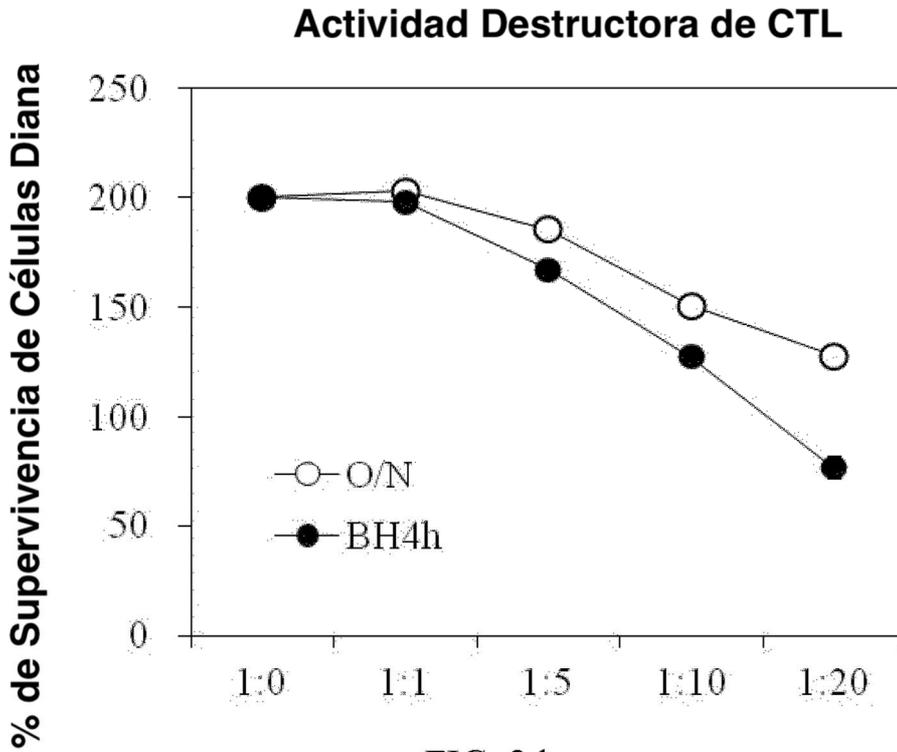


FIG. 2c



Producción de spn. destructores por IFN- γ

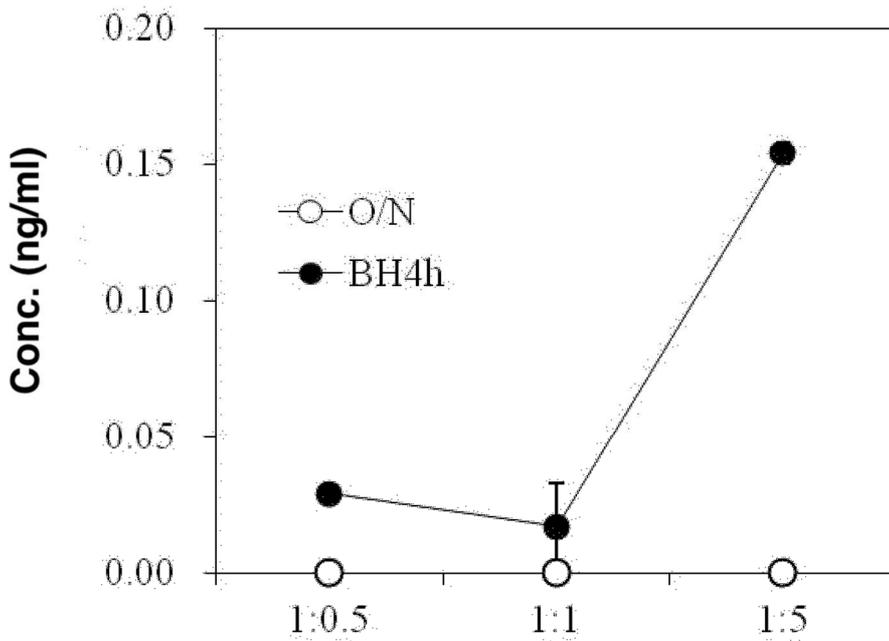


FIG. 2e

Ensayo ELISPOT de IFN- γ

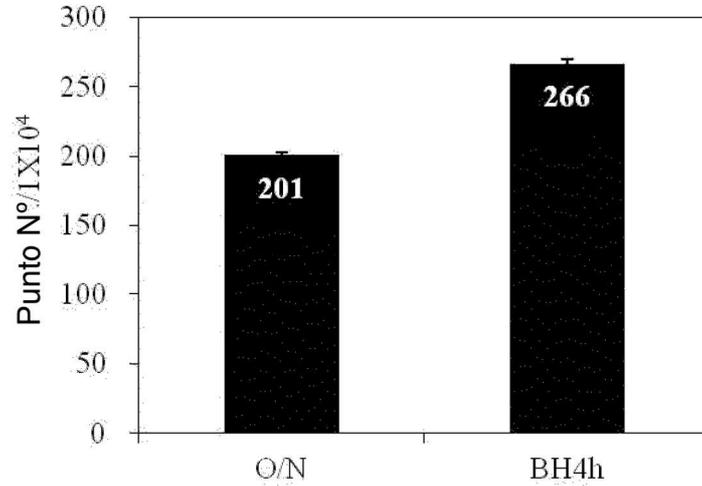
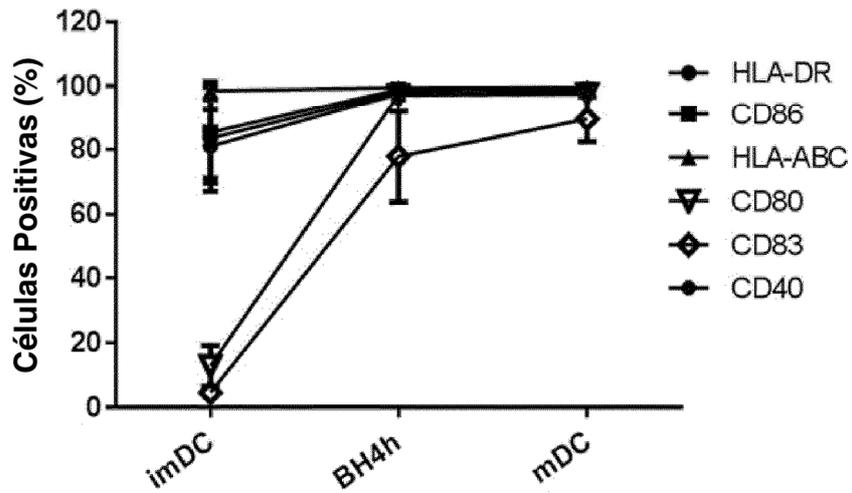


FIG. 3



	Células positivas (%), Media \pm DE					
	HLA-DR	CD86	HLA-ABC	CD80	CD83	CD40
imDC	81,0 \pm 11, 4	85,3 \pm 14, 2	98,4 \pm 2,8	12,9 \pm 6,3	4,6 \pm 2,9	83,5 \pm 16, 6
BH4h	97,4 \pm 2,2	98,9 \pm 1,1	99,4 \pm 1,0	97,1 \pm 2,1	77,8 \pm 14, 1	98,1 \pm 2,4
mDC	98,3 \pm 1,2	98,9 \pm 1,0	99,5 \pm 0,5	97,4 \pm 1,6	89,6 \pm 7,2	97,6 \pm 1,7

FIG. 4a

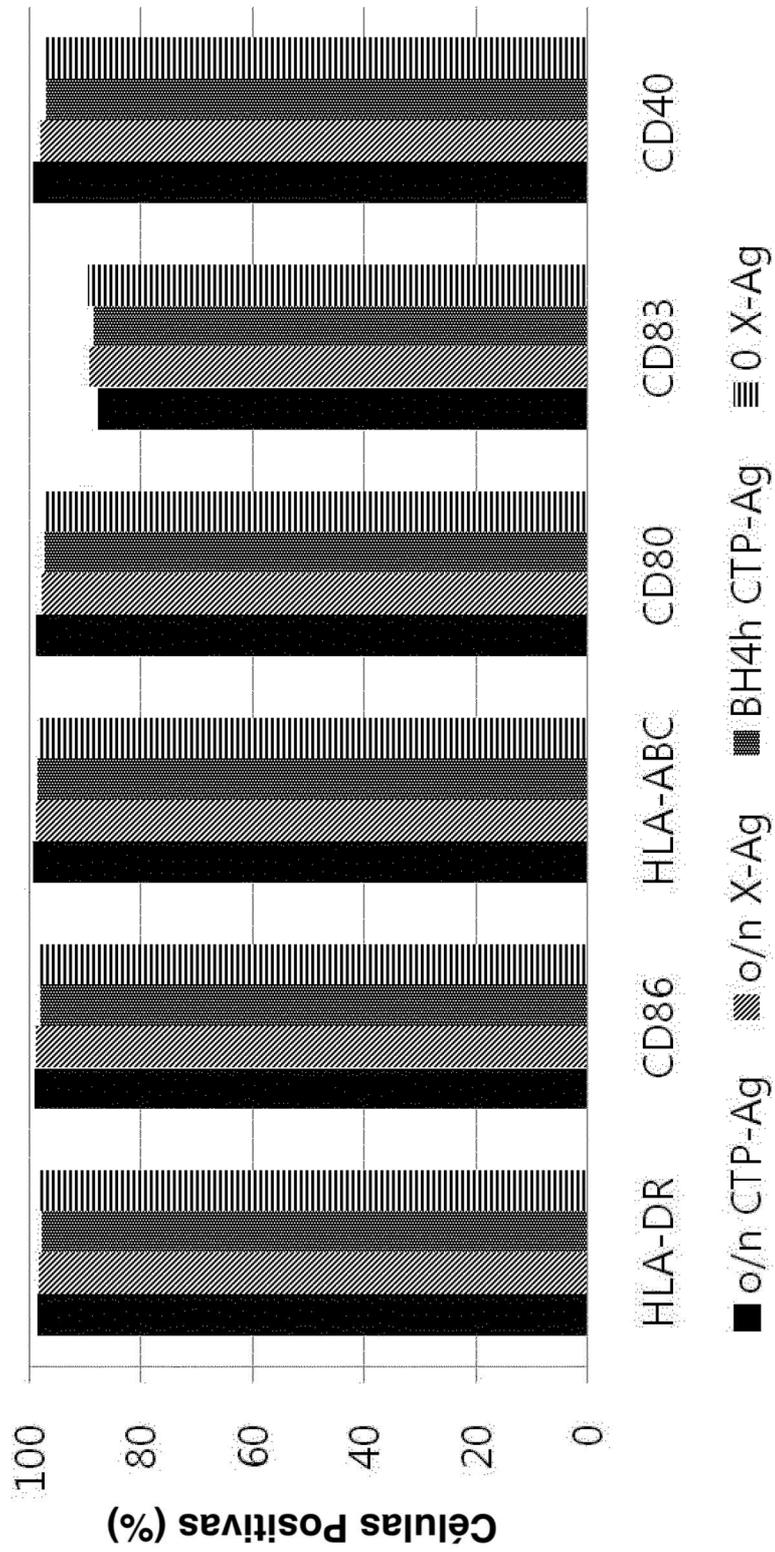


FIG. 4b

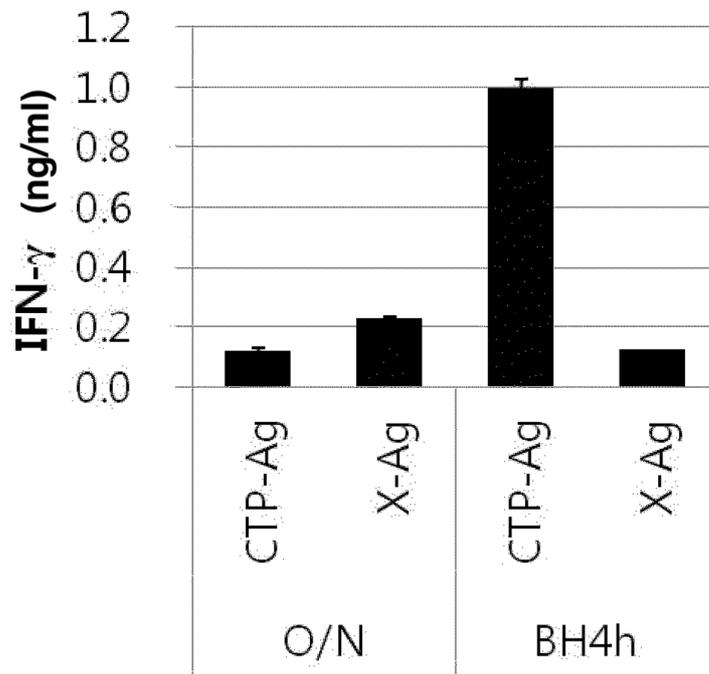


FIG. 4c

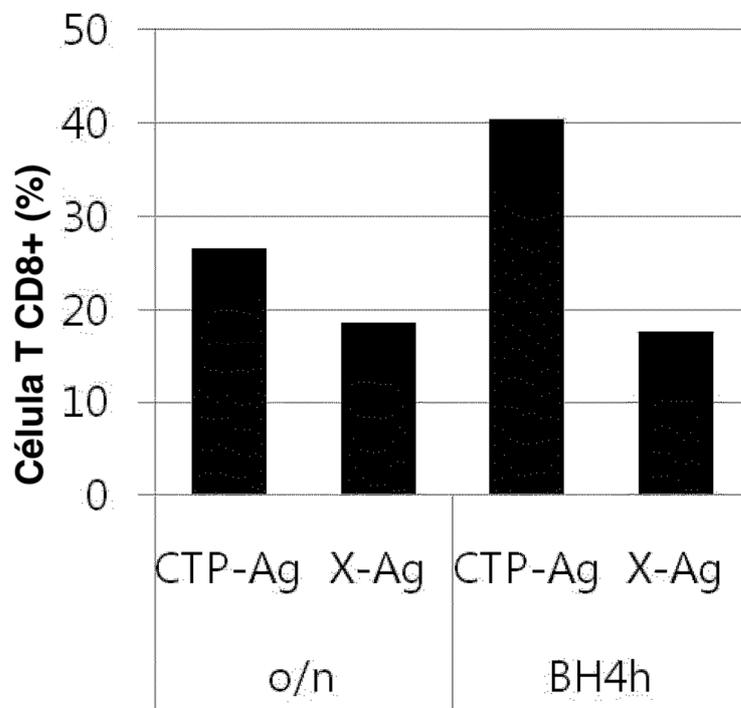


FIG. 4d

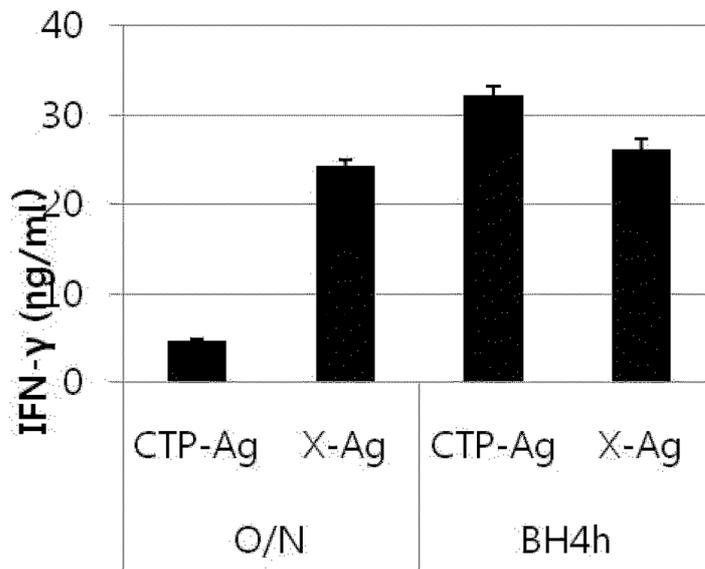


FIG. 4e

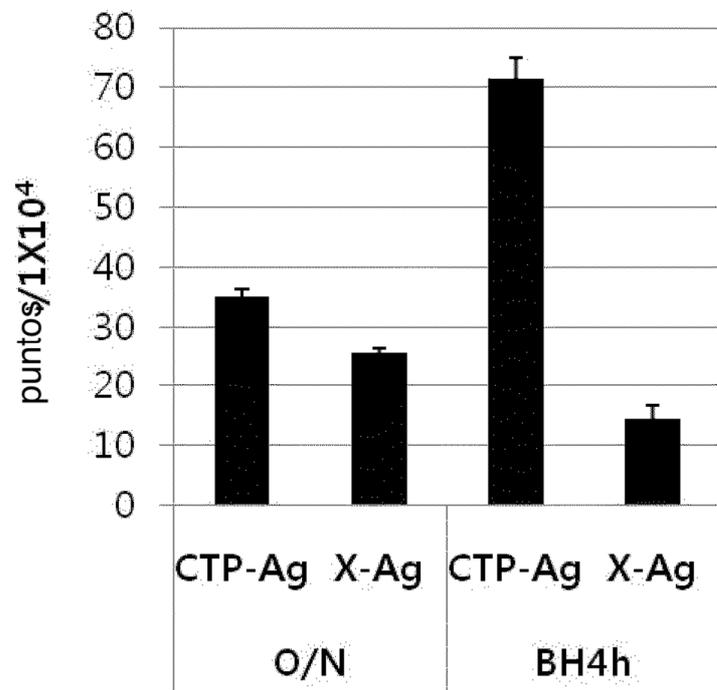


FIG. 4f

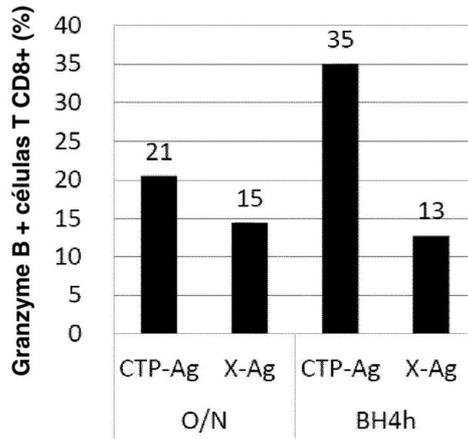


FIG. 5

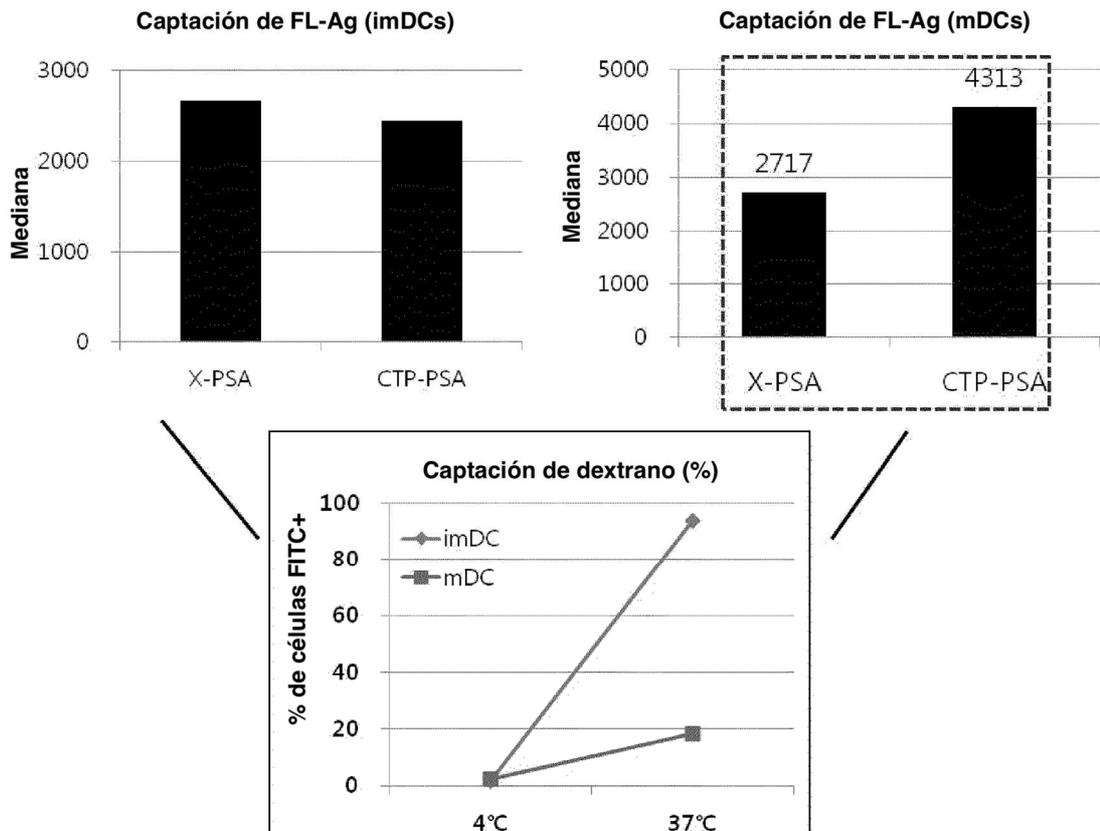


FIG. 6a

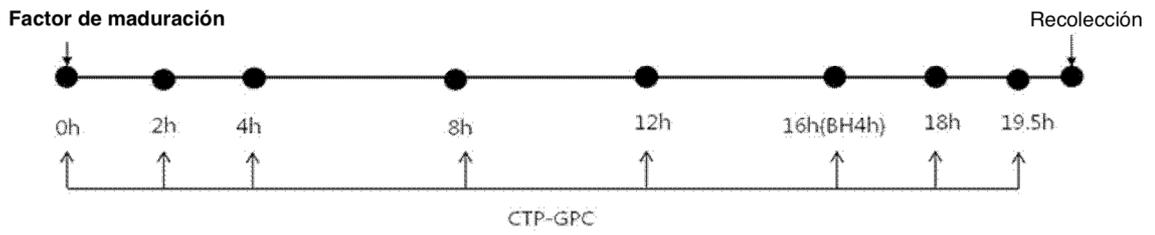


FIG. 6b

