

**MÉTODO PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER UTILIZANDO CÉLULA
ADYUVANTE ARTIFICIAL (aAVC)**

Campo Técnico

[0001] La presente invención se refiere a un método efectivo y seguro para el tratamiento o prevención de un cáncer utilizando una célula adyuvante artificial (aAVC).

Arte Anterior

[0002] Las células T asesinas naturales (NKT) son células inmunes que tienen las características de las células T y de las células asesinas naturales (NK) y son activadas por un ligando CD1d constituido por glicolípido cargado en un complejo con histocompatibilidad mayor (MHC) similar a la molécula CD1d en células que presentan antígeno (APC). Se sabe que las células NKT activadas inducen aumento en la citotoxicidad directa mediada por perforina/granzima B, etc., así como también para producir citosinas tales como interferona gamma (IFN- γ) o interleucina-4 (IL-4), induciendo así la diferenciación y proliferación de las células NKT propiamente dichas y la activación de las células T, células NK y células B.

[0003] Los ligandos CD1d capaces de activar a las células NKT incluyen, por ejemplo, una α -galactosil ceramida (α -GalCer), α -C-galactosil ceramida (α -C-GalCer), 7DW8-5

e isoglobotrihexosil ceramida (iGb3). Las células conocidas que presentan antígeno y expresan CD1d incluyen, por ejemplo, macrófagos, células dendríticas (DC), células B y células B de la leucemia linfocítica (B-CLL).

[0004] Las células NKT activadas por células dendríticas impulsadas con α -GalCer, presentan citotoxicidad para varias células cancerosas. Se ha informado que las células dendríticas impulsadas con α -GalCer, inducen con mayor intensidad células NKT productoras de IFN- γ y presentan un alto efecto antitumoral, en comparación con la administración de α -GalCer libre (Literaturas No Patente 1 y 2). Se han realizado también pruebas clínicas teniendo como objetivo pacientes con cáncer pulmonar (Literaturas No Patente 3 y 4).

[0005] Se ha informado que en modelos de ratón, la administración de α -GalCer induce un efecto antitumoral mediante la activación de inmunidad innata a través de la activación de células NKT, mientras que se manifiestan efectos adversos tal como necrosis de hepatocitos debido a la producción de citosinas inflamatorias, asociada con la activación de células NKT, etc. (Literatura No Patente 5). Además, en pruebas clínicas de α -GalCer, la administración de α -GalCer ha inducido respuesta inmune que da lugar a un efecto antitumoral y, por otra parte, se ha

averiguado que causa eventos adversos que muestran el deterioro de las condiciones generales, tales como dolor de cabeza, vómito, resfriado y una sensación de malestar, indicando la posibilidad de la inducción de varias reacciones adversas (Literatura No Patente 6).

[0006] Fujii et al. han preparado aAVC causando que células de origen humano expresen exógenamente CD1d y un antígeno de cáncer, impulsando además a las células con α -GalCer (Literaturas de Patente 1 a 3). Esta células adyuvante artificial activa a las células NKT a través de su complejo CD1d/ α -GalCer y las células NKT activadas producen citosinas tal como IFN- γ , las cuales activan a las células NK o similares. En modelos de ratón, se ha demostrado que la administración de aAVC tiene un efecto antitumoral dependiente de la célula NK (Literaturas de Patente 1 a 3 y Literaturas No Patente 7 y 8). La célula adyuvante artificial administrada a ratones es inmediatamente destruida por células NKT activadas *in vivo* y los fragmentos de la célula adyuvante artificial son absorbidos en las células dendríticas. Las células dendríticas con el fragmento de aAVC así absorbido, presentan el antígeno de cáncer incorporado en MHC sobre la superficie de la célula e inducen células T específicas al antígeno de cáncer. En modelos de ratón, se ha demostrado también que la administración de aAVC tiene un efecto antitumoral mediante la

inducción de células T específicas al antígeno de cáncer (Literaturas de Patente 1 a 2 y Literaturas No Patente 7 y 8). Así, se ha demostrado que aAVC tiene la capacidad de inducir fuertemente dos mecanismos inmunes, o sea, activación de la inmunidad innata presentada por las activación de célula NK mediada por la activación de células NKT e inducción de inmunidad adaptativa mostrada por la inducción de células T específicas al antígeno. Sin embargo, todavía no se ha realizado ningún estudio para determinar una dosis clínica adecuada de aAVC que ejerza un efecto antitumoral mediante la activación de inmunidad innata y pueda ser utilizada con seguridad.

[Lista de Referencias]

[Literatura de Patentes]

[0007]

[Literatura de Patentes 1] Publicación Internacional No. WO 2007/097370

[Literatura de Patentes 2] Publicación Internacional No. WO 2010/061930

[Literatura de Patentes 3] Publicación Internacional No. WO 2013/018778

[Literatura No Patente]

[0008]

[Literatura No Patente 1] "The Journal of Immunology", (USA), 1999; 163 (5): 2387-2391

[Literatura No Patente 2] "Nature Immunology", (USA), 2002; 3 (9): 867-874

[Literatura No Patente 3] "The Journal of Immunology", (USA), 2009; 182 (4): 2492-2501

[Literatura No Patente 4] "Clinical Cancer Research", (USA), 2005; 11 (5): 1910-1017

[Literatura No Patente 5] "Anticancer Research", 2016; 36 (7): 3667-3672

[Literatura No Patente 6] "Clinical Cancer Research", (USA), 2002; 83 (12): 3702-3709

[Literatura No Patente 7] "Cancer Research", (USA), 2013; 73 (1): 62-73

[Literatura No Patente 8] "Cancer Research", (USA), 2016; 76 (13): 3756-3766

[Resumen de la Invención]

[Problema Técnico]

[0009]

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un método seguro y efectivo para el tratamiento o prevención de un cáncer mediante el uso de una Célula Adyuvante Artificial (aAVC).

[Solución al Problema]

[0010]

Los presentes inventores han realizado estudios detallados sobre la aplicación clínica de Célula Adyuvante

Artificial (aAVC). Los presentes inventores han averiguado que la cantidad de α -GalCer cargada en la célula adyuvante artificial en el curso de sus procesos de fabricación, varía dependiendo del tipo de células y de las condiciones para impulsar células con α -GalCer, etc. Por lo tanto, se ha encontrado la necesidad de normalizar la cantidad de α -GalCer cargada en las células adyuvantes artificiales para producirlas como medicamentos. Por lo tanto, los presentes inventores han establecido un método para medir la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie celular a fin de cuantificar la cantidad de α -GalCer cargada en la célula adyuvante artificial. Los presentes inventores han confirmado además que la adición de varias concentraciones de α -GalCer en el medio cuando se impulsa a la célula adyuvante artificial con un α -GalCer, da como resultado variaciones en la cantidad de α -GalCer cargado en la célula (Ejemplo 2). Los presentes inventores han averiguado además que la dosis de un α -GalCer cargado en aAVC está relacionada con la inducción de un efecto antitumoral y reacciones adversas atribuibles a la activación de inmunidad innata mediada por las células NKT (Ejemplos 3 a 5). En esta forma, los presentes inventores han encontrado satisfactoriamente la dosis de α -GalCer cargada en aAVC y la cantidad de α -GalCer cargada en aAVC en una composición farmacéutica que la

contiene, las cuales son preferidas en términos de efectividad y seguridad en el tratamiento y prevención de un cáncer utilizando aAVC. Específicamente, la presente invención proporciona un método seguro y efectivo para tratar o prevenir un cáncer, utilizando una célula adyuvante artificial; una célula adyuvante artificial para el tratamiento efectivo y seguro de un cáncer y una composición farmacéutica que contiene a la misma, etc.

[0011]

Específicamente, la presente invención puede incluir los siguientes aspectos como una sustancia o método médica o industrialmente útil.

[0012]

[1] Un método para tratar o prevenir un cáncer, comprendiendo la etapa de administrar una célula de origen humano a una persona, en el cual la célula expresa CD1d exógeno y tiene una α -GalCer cargada en la superficie celular; y en el cual se administra la célula a la persona, de modo que una sola dosis de α -GalCer cargada en la superficie celular varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona.

[2] El método, de acuerdo con [1], en el cual la célula de origen humano expresa un antígeno de cáncer exógeno.

[3] El método, de acuerdo con [1] o [2], en el cual CD1d es CD1d humano.

[4] El método, de acuerdo con cualesquiera de [1] a [3], en el cual la célula de origen humano es una célula derivada de célula renal embriónica humana 293 (HEK293).

[5] El método, de acuerdo con cualesquiera [1] a [4], en el cual la cantidad de α -GalCer cargada en la superficie celular está en la escala de 3,9 a 275 ng por 1×10^6 células.

[6] Una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención es un cáncer, comprendiendo una célula de origen humano, en la cual la célula expresa CD1d exógeno y tiene α -GalCer cargado en la superficie celular; y en la cual se administra la composición a una persona de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado en la superficie celular varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona.

[7] La composición farmacéutica de acuerdo con [6], en la cual la célula de origen humano expresa un antígeno de cáncer exógeno.

[8] La composición farmacéutica, de acuerdo con [6] o [7], en la cual el CD1d es CD1d humano.

[9] La composición farmacéutica, de acuerdo con cualesquiera [6] a [8], en la cual la célula de origen humano es una célula derivada de célula renal embriónica humana 293.

[10] La composición farmacéutica, de acuerdo con cualesquiera [6] a [9], en la cual la cantidad de α -GalCer cargada en la superficie celular está en la escala de 3,9 a 275 ng por 1×10^6 células.

[11] El uso de una célula de origen humano para producir una composición farmacéutica destinada a tratar o prevenir un cáncer, donde la célula expresa CD1d exógeno y tiene un α -GalCer cargado en la superficie celular y donde se administra la composición a una persona, de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado en la superficie celular varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona.

[12] El uso de acuerdo con [11], en el cual la célula de origen humano expresa un antígeno de cáncer exógeno.

[13] El uso de acuerdo con [11] o [12], en el cual el CD1d es CD1d humano.

[14] El uso, de acuerdo con cualesquiera de [11] a [13], en el cual la célula de origen humano es una célula derivada de célula renal embriónica humana 293 (HEK293).

[15] El uso, de acuerdo con cualesquiera de [11] a [14], en el cual la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie celular está en la escala de 3,9 a 275 ng por 1×10^6 células.

[16] Una célula de origen humano para uso en el tratamiento o prevención de un cáncer, donde la célula expresa CD1d

exógeno y tiene un α -GalCer cargado en la superficie celular y donde se administra la célula a una persona, de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado en la superficie celular varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona.

[17] La célula de origen humano, de acuerdo con [16], la cual expresa un antígeno de cáncer exógeno.

[18] La célula de origen humano, de acuerdo con [16] o [17], en la cual CD1d es CD1d humano.

[19] La célula de origen humano, de acuerdo con cualquiera [16] a [18], la cual es célula derivada de célula renal embriónica humana 293 (HEK293).

[20] La célula de origen humano, de acuerdo con cualquiera [16] a [19], en la cual la cantidad de α -GalCer cargada en la superficie celular está en la escala de 3,9 a 275 ng por 1×10^6 células.

[21] Un método para producir una célula de origen humano que expresa CD1d exógeno y tiene un α -GalCer cargado en la superficie celular, en el cual se administra la célula a una persona de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado en la superficie celular varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona y dicho método comprende la etapa de cultivar células de origen humano que expresan CD1d exógeno, en un medio de cultivo que contiene 56 ng/mL hasta 3000 ng/mL de α -GalCer.

[22] El método de acuerdo con [21], comprendiendo además la etapa de medir la cantidad de α -GalCer cargada en las células obtenidas mediante la etapa de cultivo; y la selección de una célula en la cual la cantidad de α -GalCer cargada en la superficie celular está en la escala de 3,9 a 275 ng por 1×10^6 células.

[Efectos Ventajosos de la Invención]

[0013]

El método de la presente invención puede ser utilizado para la prevención y tratamiento efectivos y seguros de un cáncer mediante el uso de una célula adyuvante artificial (aAVC).

[Breve Descripción de los Dibujos]

[0014]

[Figura 1] La Figura 1 ilustra un cambio en el índice de supervivencia después de la administración de aAVC(3T3)-WT1 en un modelo de metástasis de pulmón de ratón, en el cual se inyectaron por vía intravenosa células de melanoma B16. Se administró las células B16-F10 a la vena caudal de cada uno de ratones hembra C57BL/6J de siete semanas de edad y, 3 horas después de la administración, se administró BICANATE o cada dosis de aAVC(3T3)-WT1 a la vena caudal de los ratones ($n = 16$ en cada grupo). Se examinó la supervivencia de los ratones durante 61 días después de la administración. Se comparó el tiempo de supervivencia del

grupo que recibió aAVC(3T3)-WT1 con el tiempo de supervivencia del grupo que recibió BICANATE, mediante el uso de la prueba de rango logarítmico para determinar un valor P de probabilidad de significancia. En el dibujo, * y ** indican que el valor P es menor que los niveles de significancia 0,05/3 y 0,01/3 respectivamente, corregidos por el método de Bonferroni.

[Figura 2] La Figura 2 ilustra la proporción (%) de las células NKT en las células del bazo después de la administración de aAVC(3T3)-WT1 o cada aAVC-WT1 descritos en la Tabla 2. Se administró BICANATE o cada dosis de aAVC(3T3)-WT1 o aAVC-WT1 a la vena caudal de cada uno de ratones hembras C57GBL/6J de 5 semanas de edad (n = 3 en cada grupo). Tres días después de la administración, se extirpó el bazo y se detectó a las células NKT mediante citometría de flujo. Se definió la proporción de las células NKT como la proporción de CD1d/Gal-dímero-positivo y células CD19-negativas en las células de la fracción linfocito de un citograma de dispersión frontal y dispersión lateral e indicadas por medio de $\pm$ error normal en el gráfico. Los valores numéricos en el eje X indican la cantidad de α -GalCer cargado en aAVC (ng/10⁶ células).

[Figura 3] La Figura 3 ilustra los resultados de la medición de los pesos corporales de ratones machos o ratones

hembras en un estudio de toxicidad después de la administración intravenosa de una sola dosis de aAVC-WT1 en ratones. Se administró BICANATE o cada dosis de aAVC-WT1 a la vena caudal de cada uno de ratones hembras o machos C57BL/6J de 8 semanas de edad (n = 5 en cada grupo). Se midió los pesos corporales en el día antes de la administración (día 1), el día de la administración (día 0), el día después de la administración (día 1), 3 días después de la administración (día 3) y 7 días después de la administración (día 7) y se ilustra en el gráfico.

[Figura 4] La Figura 4 ilustra los resultados de la medición de los consumos de alimento de ratones machos y ratones hembras en un estudio de toxicidad para la administración intravenosa en ratones. Se administró BICANATE o cada dosis de aAVC-WT1 una sola vez a la vena caudal de cada uno de ratones hembras o machos C57BL/6J de ocho semanas de edad (n = 5 en cada grupo). Se midieron los consumos de alimento por día (g/día) desde 3 días antes de la administración hasta el día antes de la administración (días -3 a -1), desde el día de la administración hasta el día siguiente a la administración (días 0 a 1), desde el día siguiente a la administración hasta 3 días después de la administración (días 1 a 3) y desde 3 días después de la administración hasta 7 días después de la administración (días 3 a 7) y esto se ilustra en un gráfico.

[Descripción de las Formas

[0015]

Más adelante se describirá a la presente invención detalladamente. Sin embargo, la presente invención no está limitada a las formas descritas más adelante. Los términos científicos y términos técnicos utilizados en relación a la presente invención tienen significados generalmente comprendidos por los expertos en el arte, a menos que se especifique aquí de otro modo.

[0016]

<Método para el tratamiento o prevención del cáncer de acuerdo con la presente invención>

La presente invención ofrece el siguiente método para el tratamiento o prevención de un cáncer:

un método para tratar o prevenir un cáncer, comprendiendo la etapa de administrar una célula de origen humano a una persona, en el cual la célula expresa CD1d exógeno o endógeno y tiene un α -GalCer cargado sobre la superficie celular y en el cual se administra la célula a una persona, de tal manera que una sola dosis de α -GalCer cargado sobre la superficie celular varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona.

[0017]

1. aAVC

El método de la presente invención puede emplear una célula de origen humano que expresa CD1d exógeno o endógeno y tiene un α -GalCer cargado sobre la superficie celular (referido también como aAVC en la presente Memoria). aAVC puede expresar además uno o más antígeno(s) de cáncer exógenos o endógenos. A pesar de que aAVC, sin expresar antígeno(s) de cáncer puede activar a las células NKT y presenta cierto grado de efecto antitumoral, aAVC que expresa un antígeno de cáncer tiene más ventaja para inducir inmunidad adaptativa contra un cáncer. La célula adyuvante artificial (aAVC) puede ser fácilmente preparada por los expertos en el arte, utilizando un método conocido en este último (por ejemplo, Literaturas No Patente 7 y 8 y Literaturas de Patente 1 a 3).

[0018]

La célula de origen humano utilizada en la presente invención puede ser una célula derivada a partir de un tejido humano arbitrario, por ejemplo, del estómago, intestino delgado, intestino grande, pulmón, páncreas, riñón, glándula timo, bazo, próstata, ovario, útero, médula ósea, piel, músculo o sangre periférica. La célula de origen humano utilizada en la presente invención puede tener la capacidad de proliferar. En una forma, célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula no

hemocito. La célula de origen humano utilizada en la presente invención puede ser una célula derivada de un tipo particular de célula existente en un tejido humano (por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, células epidérmicas, células estromales, fibroblastos, adipocitos, células de la glándula mamaria, células mesangiales, células β pancreáticas, células nerviosas, células gliales, células epiteliales exocrinas, células epiteliales endocrinas, células del músculo del esqueleto, células del músculo liso, células del miocardio, osteoblastos, células embriónicas y células inmunes). La célula de origen humano utilizada en la presente invención puede ser una célula normal o una célula cancerosa. En una forma, la célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula normal. En una forma, la célula de origen humano utilizada en la presente invención puede ser una célula renal 293 (HEK293) embrionica humana (J. Gen. Virol., 1977; 36: 59-74), una célula WI-38, una célula SC-01MFP una célula MRC-5; o una célula derivada de cualquiera de estas células. En una forma, la célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula derivada de HEK293. En una forma, la célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula FreeStyle™ 293-F.

[0019]

En una forma, la célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula inmortalizada o una línea celular derivada de un tejido humano. La célula inmortalizada y la línea celular pueden ser preparadas mediante el uso de métodos conocidos por los expertos en el arte.

[0020] En una forma, la célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula madre pluripotente inducida de origen humano (célula iPS) o una célula madre embrionica (célula ES). La célula iPS y la célula ES pueden ser preparadas mediante el uso de métodos conocidos por los expertos en el arte. En una forma, la célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula derivada de una célula madre pluripotente inducida de origen humano (célula iPS) o una célula madre embrionica (célula ES).

[0021]

La CD1d utilizada en la presente invención puede ser CD1d de origen natural o una forma modificada que tiene sus funciones. La CD1d puede ser CD1d que es endógenamente expresada en la célula de origen humano utilizada o puede ser CD1d que es expresada exógenamente en la célula de origen humano utilizada. En una forma, la expresión significa expresión en cualquier sitio de una célula. En una forma, la expresión significa expresión en la superficie

celular. En una forma, aAVC expresa CD1d exógeno. En una forma, el CD1d utilizado en la presente invención es CD1d derivado de un mamífero (por ejemplo, humanos, monos, ratones, ratas, perros y chimpancés). En una forma, el CD1d utilizado en la presente invención es CD1d humano.

[0022]

En la presente Memoria, los términos "exógeno" o "exógenamente" se utilizan en forma intercambiable para hacer referencia a la transferencia artificial de un gen o un ácido nucleico a una célula de interés mediante una operación tal como ingeniería genética o transferencia de genes; y el gen o ácido nucleico introducido artificialmente en la célula de interés o una proteína expresada a partir de la misma. El gen exógeno puede ser enlazado operativamente a una secuencia promotora que impulsa la expresión del gen.

[0023]

En la presente Memoria, el término "endógeno" o "endógenamente" significa que una célula posee originalmente un material, por ejemplo gen, un ácido nucleico o una proteína.

[0024]

En la presente Memoria, se emplea el término "derivado" para indicar una especie animal a partir de la cual se ha obtenido una célula. Por ejemplo, célula de origen

humano significa que la misma es una célula obtenida a partir de una persona o una línea celular obtenida mediante el sub-cultivo de la célula. Por ejemplo, célula de origen humano significa que la misma es una célula humana.

[0025]

En la presente Memoria, el término "identidad" significa un valor de Identidad obtenido a partir de los parámetros ofrecidos como valores predeterminados utilizando EMBOSS Needle (Ácidos Nucleicos Res.; 2015; 43: W580-W584). Los parámetros descritos anteriormente son como sigue:

Penalización de Brecha Abierto = 10

Penalización por Espacio Extendido = 0,5

Matriz = EBLOSUM62

Penalización al Final de la Brecha = falso

[0026]

En una forma, la CD1d humana es una proteína que consiste en la secuencia de ácido amino representada por ID SEC NO: 4. En una forma, la CD1d humana es una proteína que consiste en secuencia de ácido amino derivada de la secuencia de ácido amino representada por ID SEC NO: 4 con la adición, sustitución, inserción y/o adición de 1 o varios ácidos amino o, en cierta forma, 1 a 10, 1 a 7, 1 a 5, 1 a 3 o 1 o 2 ácidos amino y tiene una función de CD1d. En una forma, el CD1d humano es una proteína que consiste

en una secuencia de ácido amino que tiene por lo menos 90% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más o 99% o más de identidad con la secuencia de ácido amino representada por ID SEC NO: 4 y tiene una función de CD1d. En una forma, el CD1d humano es una proteína que consiste en una secuencia de ácido amino codificada por una secuencia nucleótido representada por ID SEC NO: 3.

[0027]

Ejemplos de la función de CD1d incluyen la capacidad de fijarse a un ligando CD1d (por ejemplo, α -GalCer). La capacidad de CD1d para fijarse a un ligando CD1d puede ser fácilmente evaluada por los expertos en el arte mediante el uso de un método conocido. De otro modo, la función de CD1d puede ser evaluada mediante el uso de la capacidad de aAVC para activar células NKT humanas como un índice. Esta capacidad para activar células NKT humanas puede ser evaluada mediante un método descrito en la Literatura de Patentes 1 o el Ejemplo 4 de la presente solicitud.

[0028]

En una forma, la aAVC utilizada en la presente invención expresa un antígeno del cáncer. Se puede utilizar una proteína arbitraria cuya expresión se encuentra en células cancerosas, como el antígeno de cáncer utilizado en la presente invención. Ejemplos de antígenos de cáncer in-

cluyen Wilms tumor 1 (WT-1), antígeno de carbohidrato humano 125 (CA-125), antígeno carcino embriónico (CEA), telomerasa transcriptasa inversa humana (Htert), mucin-1 (Muc-1), mucin-2 (Muc-2), antígeno 1B de cáncer/testículo (CTAG1B/NY-ESO-1), fosfatasa ácida prostática (PAP), antígeno específico para la próstata (PSA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), survivin b, ras mutante y p53 mutante. En una forma, el antígeno de cáncer utilizado en la presente invención es Wilms tumor 1 (WT-1). En una forma, WT-1 es WT-1 humano. En una forma, WT-1 humano es una proteína que consiste en la secuencia de ácido amino representada por ID SEC NO: 2. En una forma, WT-1 humano es una proteína que consiste en una secuencia de ácido amino derivada a partir de la secuencia de ácido amino representada por ID SEC NO: 2, con la anulación, sustitución, inserción y/o adición de 1 o varios ácidos amino o, en cierta forma, 1 a 10, 1 a 7, 1 a 5, 1 a 3 o 1 o 2 ácidos amino. En una forma, WT-1 humano es una proteína que consiste en una secuencia de ácido amino que tiene por lo menos 90% o más, 95% o más, 967% o más, 97% o más, 98% o más o 99% o más de identidad con la secuencia de ácido amino representada por ID SEC NO: 2. En una forma, aAVC expresa un antígeno de cáncer. En una forma, aAVC expresa varios antígenos de cáncer. El antígeno de cáncer puede ser un antígeno de cáncer de origen natural o una forma

modificada del mismo, siempre y cuando aAVC que expresa al antígeno de cáncer presente un efecto antitumoral a través de un efecto inmunológico contra el antígeno de cáncer. Este antígeno de cáncer puede ser un antígeno expresado en forma endógena en la célula de origen natural utilizada o puede ser un antígeno expresado en forma exógena en la célula utilizada de origen humano. En una forma, aAVC expresa un antígeno de cáncer exógeno. En una forma, aAVC expresa varios antígenos de cáncer exógenos.

[0029] α -GalCer es uno de los ligandos sCD1d y una sustancia representada por CAS RN: 158021-47-7 y una fórmula molecular: $C_{50}H_{99}N_9$ (peso molecular: 858,34). α -GalCer puede ser sintetizado de acuerdo con una técnica conocida en el arte o se puede utilizar un producto comercialmente disponible (por ejemplo, α -Galactosylceramide (Funakoshi Co., Ltd., Cat. KRN7000)). Se puede realizar la carga de α -GalCer en las células mediante el cultivo de células que expresan CD1d en un medio que contiene α -GalCer, tal como se describe en la sección "2. Método para la preparación de aAVC".

[0030]

2. Método para la preparación de aAVC

La presente invención puede comprender la preparación de células en una etapa anterior a la carga de α -GalCer (referidas también como células precursoras de aAVC en la

presente Memoria); y la carga de α -GalCer en las células precursoras de aAVC. La presente invención proporciona también un método para la preparación de una célula que expresa CD1d exógeno y tiene α -GalCer cargado en la superficie celular; en el cual la célula es administrada a una persona de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado en la superficie celular varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona; y en el cual el método comprende la etapa de cultivar células de origen humano que expresan CD1d exógeno, en un medio de cultivo que contiene 56 ng/mL a 3000 ng/mL de α -GalCer. La presente invención proporciona también un método para la preparación de una célula que expresa CD1d exógeno y tiene un α -GalCer cargado en la superficie celular; en el cual la célula es administrada a la persona de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado en la superficie celular varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona; y en el cual el método comprende la etapa de cultivar células de origen humano que expresan CD1d exógeno en un medio de cultivo que contiene 56 ng/mL hasta 3000 ng/mL de α -GalCer y la etapa de seleccionar una célula en la cual la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie celular está en la escala de 3,9 a 275 ng por 1×10^6 células.

[0031]

2-1. Preparación de la célula precursora de aAVC

Las células precursoras de aAVC pueden ser preparadas mediante la introducción ya sea el gen CD1d o un gen que codifica un antígeno de cáncer o el gen CD1d y un gen que codifica un antígeno de cáncer, en células de origen humano. El gen CD1d y el gen que codifica un antígeno de cáncer pueden ser diseñados y preparados mediante el uso de un método biológico y/o químico molecular normal, mediante la obtención de secuencias nucleótido que codifican secuencias de ácido amino a partir de NCBI RefSeq ID o números de GenBank Accession. Estos genes pueden ser sintetizados, por ejemplo, mediante el uso de un método fosforamidita basado en sus secuencia nucleótido o pueden ser preparados mediante la combinación de fragmentos ADN obtenidos mediante la reacción de la cadena polimerasa (PCR) a partir de bibliotecas de cDNA. Se puede realizar la transferencia de los genes de interés a las células de origen humano, mediante el uso de un vector de expresión que contiene al gen a ser introducido en una forma de cDNA, mRNA o similares. De otro modo, los genes de interés pueden ser introducidos directamente en las células de origen humano mediante un método tal como electroporación, lipofección, etc. Además, después de la introducción del gen de interés en las células de origen humano para preparar

células progenitoras de aAVC, las células pueden ser cultivadas y proliferadas.

[0032]

El vector de expresión utilizado en la presente invención no está particularmente limitado siempre y cuando el vector de expresión permita expresar CD1d o el antígeno de cáncer de interés o CD1d y el antígeno de cáncer de interés en células de origen humano. El vector de expresión puede ser, por ejemplo, un vector plásmido (por ejemplo, serie pcDNA (Thermo Fisher Scientific Inc.), pALTER®-MAX (Promega Corp.) y pHEK293 Ultra Expression Vector (Takara Bio Inc.)) o un vector viral (por ejemplo, lentivirus, adenovirus, retrovirus y virus adeno-asociado). Por ejemplo, vector pLVSIN-CMV/EF1 α (Takara Bio Inc.) o vector pLenti (Thermo Fisher Scientific Inc.) para uso en la preparación de lentivurs, pueden ser empleados en la producción de un vector viral. Cuando se expresan exógenamente CD1d y un antígeno de cáncer en células de origen humano, CD1d y el antígeno de cáncer pueden ser expresados mediante el uso ya sea de un vector o vectores separados.

[0033]

El vector de expresión puede contener un promotor enlazado operativamente al gen que codifica CD1d o un antígeno de cáncer. Como un promotor se puede utilizar cua-

lesquiera de un promotor que promueve de manera constitutiva la expresión y un promotor que es impulsado por un fármaco (por ejemplo, tetraciclina o doxiciclina), etc. Ejemplos del promotor que promueve de manera constitutiva a la expresión, incluyen promotores derivados de virus tales como CMV (citomegalovirus), RSV (virus sincitial respiratorio) y SV40 (virus 40 de simio), promotor actin y promotor EF (factor de alargamiento) 1 α . Ejemplos del promotor inducible incluyen factor de respuesta de tetraciclina (promotor TRE3G), secuencia de operador cumato, secuencia de operador λ (12 x λ Op) y promotor de choque térmico.

[0034]

El vector de expresión puede contener un codón de inicio y un codón de parada. En este caso, el vector de expresión puede contener una secuencia potenciadora, una región no traducida, un nudo de empalme, un sitio de poliadenilación o una unidad replicable, etc. El vector de expresión puede contener también un gen capaz de servir como un marcador para confirmar la expresión del gen de interés (por ejemplo, un gen con resistencia al fármaco, un gen que codifica una enzima reportera o un gen que codifica una proteína fluorescente).

[0035]

En una forma, se preparan las células precursoras de aAVC mediante la introducción del gen CD1d en células de origen humano, utilizando un vector viral. En una forma, las células precursoras de aAVC utilizadas en la presente invención son una célula obligada a expresar CD1d de manera exógena con un vector viral. En esta forma, las células precursoras de aAVC pueden contener un gen que codifica CD1d, el cual está enlazado operativamente a un promotor. En una forma, se preparan las células precursoras de aAVC mediante la introducción del gen CD1d y un gen que codifica a un antígeno de cáncer a células de origen humano, utilizando un vector viral. En una forma, las células precursoras de aAVC utilizadas en la presente invención son una célula en la cual CD1d y un antígeno de cáncer han sido expresados de manera exógena utilizando un vector viral. En esta forma, las células precursoras de aAVC pueden contener al gen CD1d y un gen que codifica un antígeno de cáncer; cada uno de dichos genes está enlazado operativamente a un promotor.

[0036]

En una forma, se preparan las células precursoras de aAVC mediante la introducción del gen CD1d a células de origen humano, utilizando un vector lentivirus. En una forma, las células precursoras de aAVC utilizadas en la presente invención son una célula en la cual CD1d ha sido

expresado de manera exógena utilizando un vector lentivirus. En una forma, se preparan las células precursoras de aAVC mediante la introducción del gen CD1d y un gen que codifica un antígeno de cáncer, a células de origen humano mediante el uso de un vector lentivirus. En una forma, las células precursoras de aAVC utilizadas en la presente invención son una célula en la cual CD1d y un antígeno de cáncer han sido expresados de manera exógena utilizando un vector lentivirus.

[0037]

Se cultivan las células precursoras de aAVC mediante un método conocido en el arte. Como un medio basal se pueden utilizar medio MEM (Science; 1952; 122: 501), medio DMEM (Virology; 1959; 8: 396-397), RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc.; 1967; 199: 519-524), medio 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 1950; 73: 1-8), FreeStyle™ 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 12338022), CD 293 Medium (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 11913019) o Expi293™ Expression Medium (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. A1435101). El medio de cultivo puede contener, por ejemplo, un reemplazo de suero (por ejemplo, KnockOut Serum Replacement: KSR), un ácido graso o un lípido, un ácido amino, vitamina, un factor de crecimiento, una citosina, un antioxidante, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, un amortiguador, una sal inorgánica o un antibiótico. Los

expertos en el arte pueden seleccionar apropiadamente las condiciones de cultivo tales como tiempo de cultivo, temperatura, pH del medio y concentración de CO₂). El pH del medio es aproximadamente 6 a 8. La temperatura de cultivo no está limitada de manera particular y es, por ejemplo, de aproximadamente 30 a 40°C preferiblemente de manera aproximada 37°C. La concentración de CO₂ es de aproximadamente 1 a 10%, preferiblemente 5% de manera aproximada. El tiempo de cultivo no está limitado de manera particular y se realiza el cultivo durante aproximadamente 15 a 336 horas. En caso necesario se puede realizar la aireación o agitación. En el caso de utilizar un promotor que es impulsado por un fármaco, tal como tetraciclina o doxiciclina, el método puede comprender la etapa de cultivar a las células precursoras de aAVC en un medio suplementado con el fármaco para inducir la expresión de CD1d y el antígeno de cáncer. Se puede realizar esta etapa de acuerdo con un método de inducción de gen utilizando un sistema general de inducción de gen.

[0038]

2-2. Carga de α -GalCer en la célula

Se prepara aAVC que tiene α -GalCer cargado en la superficie celular, mediante el impulso de las células precursoras de aAVC con α -GalCer. En la presente Memoria, la frase "que tiene α -GalCer cargado en la superficie celular"

se refiere a un estado en el cual α -GalCer está fijado a la superficie de una célula aAVC. Se puede medir la cantidad de α -GalCer fijado, mediante el uso de un método descrito en la sección "2-3. Medición de la cantidad de α -GalCer cargado en aAVC". En la presente Memoria, el término "impulsado" con α -GalCer se refiere al contacto de las células precursoras de aAVC con α -GalCer para fijarlo a la superficie celular de las células precursoras de aAVC que expresan CD1d. El impulso puede ser aplicado en un medio de cultivo celular.

[0039]

Los expertos en el arte, tomando en cuenta a las células precursoras de aAVC utilizadas y las condiciones de cultivo, pueden ajustar convenientemente las condiciones para el impulso de las células precursoras de aAVC (por ejemplo, el tiempo de adición de α -GalCer a un medio de cultivo celular, la concentración de α -GalCer en el medio de cultivo y el tiempo de cultivo. La concentración de α -GalCer a ser agregado al medio de cultivo para las células precursoras de aAVC no está particularmente limitada y puede ser seleccionada convenientemente dentro de la escala de, por ejemplo, 56 ng/mL a 3000 ng/mL.

[0040]

Se puede realizar simultáneamente la preparación de las células precursoras de aAVC y el impulso de las células

con α -GalCer, mediante la introducción del gen de CD1d o un antígeno de cáncer o CD1d y un antígeno de cáncer a células de origen humano en presencia de α -GalCer.

[0041]

Después de la carga de α -GalCer en la superficie celular, se puede retirar a α -GalCer que no ha sido cargado en esta última (un exceso de α -GalCer en el medio de cultivo).

[0042]

Después del impulso de las células precursoras de aAVC con α -GalCer, se puede interrumpir la proliferación de aAVC mediante el uso de un método artificial. No está particularmente limitado el método para interrumpir la proliferación de aAVC. Por ejemplo, se puede utilizar un método para interrumpir la proliferación celular mediante exposición a radiación de partículas tales como rayos radiactivos (por ejemplo, rayos X o rayos γ) o un método que consiste en agregar un fármaco tal como mitomicina C.

[0043]

2-3. Medición de la cantidad de α -GalCer cargado en aAVC

Los presentes inventores han establecido un método para medir la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie de células aAVC. Se puede realizar la medición de la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie de las células aAVC, mediante la preparación de extractos celulares de

aAVC y cuantificando α -GalCer contenido en los extractos, mediante un método que utiliza espectrometría de masa (MS) (por ejemplo, cromatografía líquida-espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS)).

[0044]

En un análisis cuantitativo general utilizando LC-MS/MS, se lleva a cabo el análisis cuantitativo de α -GalCer contenido en una muestra, mediante las siguientes etapas:

Etapa 1: Se analizan sustancias normales de α -GalCer preparadas a varias concentraciones.

Etapa 2: Se obtiene el cambio temporal en la resistencia iónica (cromatograma de masa) para m/z (relación masa/carga) de iones derivados de las sustancias corrientes y se calcula las áreas de cresta del cromatograma de masa.

Etapa 3: Se elabora una curva de calibración a partir de la relación entre el área de cresta de cada sustancia determinada en la etapa 2 y la concentración de la sustancia.

Etapa 4: Se analiza una muestra a ser cuantificada, para calcular el área de cresta del cromatograma de masa de α -GalCer contenido en la muestra.

Etapa 5: Se calcula la concentración de α -GalCer contenido en la muestra, que corresponde al área de cresta en

el cromatograma de masa de la etapa 4, sobre la base de la curva de calibración preparada en la etapa 3.

[0045]

Se puede realizar la medición de α -GalCer mediante LC-MS/MS mediante, por ejemplo, un método de ionización de α -GalCer en iones precursores e iones de producto, mediante un método de ionización por electrorociado. La columna y la composición de la fase móvil para uso en la cromatografía líquida en LC-MS/MS, puede ser cualquier combinación de una columna y una fase móvil, siempre y cuando la combinación utilizada permita la separación de α -GalCer a partir de los componentes derivados de la célula y permita la discriminación de α -GalCer a partir de los componentes derivados de la célula, mediante MS/MS.

[0046]

En una forma, la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie celular de aAVC está en la escala de 3,9 ng hasta 275 ng por 1×10^6 células. En una forma, la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie celular aAVC puede estar en la escala de 10 a 275 ng, 10 a 140 ng o 10 a 100 ng por 1×10^6 células.

[0047]

3. Tratamiento o prevención del cáncer con aAVC

El método de tratamiento o prevención de la presente invención puede implicar la administración a un sujeto de

tal manera que la dosis única de α -GalCer cargado en la superficie celular de aAVC a ser administrada a una persona, sea una dosis predeterminada.

[0048]

En una forma, el método de tratamiento o prevención de la presente invención se caracteriza en que se administra una aAVC a un sujeto, de tal manera que la dosis única de α -GalCer cargado en la superficie celular de aAVC a ser administrada a una persona, varíe desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona.

[0049]

En una forma, la dosis única de α -GalCer cargado en la superficie celular de aAVC a ser administrada a una persona, puede estar en una escala numérica particular. La escala numérica particular puede ser una escala numérica incluida en la escala de 1,7 ng a 275 ng (o sea, una escala numérica desde un valor límite superior de 275 ng o menos hasta un valor límite inferior de 1,7 ng o más) por kg de peso del cuerpo de la persona. La escala numérica tiene, por ejemplo, un valor numérico de 275 ng o menos, 270 ng o menos, 260 ng o menos, 250 ng o menos, 240 ng o menos, 238 ng o menos, 230 ng o menos, 220 ng o menos, 210 ng o menos, 200 ng o menos, 190 ng o menos, 180 ng o menos, 170 ng o menos, 160 ng o menos, 150 ng o menos, 140 ng o menos, 130 ng o menos, 120 ng o menos, 110 ng o menos, 100 ng o

menos, 90 ng o menos, 80 ng o menos, 70 ng o menos, 66 ng o menos, 60 ng o menos, 50 ng o menos, 47 ng o menos, 40 ng o menos, 36 ng o menos, 30 ng o menos, 24 ng o menos, 20 ng o menos, 19 ng o menos, 18 ng o menos, 17 ng o menos, 16 ng o menos, 15 ng o menos, 14 ng o menos, 13 ng o menos, 12 ng o menos, 11 ng o menos, 10 ng o menos, 9 ng o menos, 8 ng o menos, 7 ng o menos, 6,6 ng o menos, 5 ng o menos, 4,7 ng o menos, 4 ng o menos, 3,6 ng o menos, 3 ng o menos o 2 ng o menos, como su valor límite superior y un valor numérico de 270 ng o más, 260 ng o más, 250 ng o más, 240 ng o más, 238 ng o más, 230 ng o más, 220 ng o más, 210 ng o más, 200 ng o más, 190 ng o más, 180 ng o más, 170 ng o más, 160 ng o más, 150 ng o más, 140 ng o más, 130 ng o más, 120 ng o más, 110 ng o más, 100 ng o más, 90 ng o más, 80 ng o más, 70 ng o más, 66 ng o más, 60 ng o más, 50 ng o más, 47 ng o más, 40 ng o más, 36 ng o más, 30 ng o más, 24 ng o más, 20 ng o más, 19 ng o más, 18 ng o más, 17 ng o más, 16 ng o más, 15 ng o más, 14 ng o más, 13 ng o más, 12 ng o más, 11 ng o más, 10 ng o más, 9 ng o más, 8 ng o más, 7 ng o más, 6,6 ng o más, 6 ng o más, 5 ng o más, 4,7 ng o más, 4 ng o más, 3,6 ng o más, 3 ng o más, 2,4 ng o más, 2 ng o más o 1,7 ng o más como un valor límite inferior. La escala numérica particular puede ser una escala numérica incluida en una o más escalas seleccionadas a partir del grupo que consiste en, por ejemplo,

la escala de 1,7 ng a 50 ng, la escala de 50 ng a 100 ng, la escala de 100 ng a 150 ng, la escala de 150 ng a 200 ng, la escala de 200 ng a 275 ng, la escala de 1,7 ng a 238 ng, la escala de 1,7 ng a 170 ng, la escala de 6,6 ng a 238 ng o la escala de 6,6 ng a 170 ng.

[0050]

Se puede determinar la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie celular de aAVC a ser administrada a una persona, mediante utilizando como un índice la proporción de células NKT en las células del bazo de un sujeto después de la administración. Se considera que una proporción elevada de células NKT en las células del bazo mejora el efecto de la administración.

[0051]

En una forma, la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie celular de aAVC a ser administrada a una persona, se encuentra en la escala de 3,9 ng a 275 ng por 1×10^6 células. En una forma, la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie celular de aAVC a ser administrada a una persona puede estar en la escala de 10 a 275 ng, 10 a 140 ng o 10 a 100 ng por 1×10^6 células.

[0052]

aAVC puede ser administrada un sujeto que requiere el tratamiento o prevención de un cáncer, mediante el uso de un método conocidos por los expertos en el arte. En el

caso de la administración de aAVC a un sujeto, la misma puede ser administrada en la forma de una composición farmacéutica que contiene aAVC y un excipiente aceptable en el campo farmacéutico. Se puede preparar la composición farmacéutica que contiene aAVC mediante un método comúnmente empleado que utiliza un excipiente usado de manera común en el arte, o sea, un excipiente farmacéutico, un vehículo farmacéutico, etc. Para la preparación de la composición farmacéutica se puede utilizar un excipiente, un vehículo, un aditivo, etc., apropiados para su forma de dosificación y dentro de una escala aceptable en el campo farmacéutico. Ejemplos de la forma de dosificación de la composición farmacéutica incluyen agentes parenterales tales como inyecciones e instilaciones.

[0053]

Ejemplos del cáncer que es el objetivo del tratamiento o prevención de la presente invención incluyen pero no están particularmente limitados a: cánceres hematológicos tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda (AML), linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, mieloma múltiple y linfoma de la célula T; cánceres sólidos tales como síndrome mielodisplásico, adenocarcinoma, carcinoma de las células escamosas, carcinoma adenoescamoso, cáncer anaplásico, cáncer de las células grandes, cáncer pulmonar de las células no pequeñas, cáncer

pulmonar de las células pequeñas, mesotelioma, cáncer de la piel, cáncer de seno, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer vaginal, cáncer de cuello, cáncer de cabeza y cuello, cáncer uterino, cáncer cervical uterino, cáncer de hígado, cáncer de la vesícula biliar, cáncer del ducto biliar, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer pulmonar, cáncer de colon, cáncer colorectal, cáncer de recto, cáncer del intestino delgado, cáncer del estómago, cáncer esofágico, cáncer de los testículos, cáncer de ovario, cáncer de vejiga y tumor cerebral; cánceres de los tejidos óseos, tejidos de cartílago, tejidos adiposos, tejidos musculares, tejidos vasculares y tejidos hematopoyéticos; sarcomas tales como condrosarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma y sarcoma del tejido blando; y blastomas tales como hepatoblastoma, meduloblastoma, nefroblastoma, neuroblastoma, pancreatoblastoma, blastoma pleuropulmonar y retinoblastoma.

[0054]

Se pueden ajustar adecuadamente la dosis de una aAVC para una persona y el número de dosis de la misma, de acuerdo con el tipo, posición y severidad del cáncer, la edad, peso del cuerpo y condición del sujeto a ser tratado, etc. Se puede ajustar la dosis a una cantidad arbitraria dentro de la escala de por ejemplo 1×10^3 células/kg hasta

1×10^8 células/kg por dosis para un sujeto. En una forma, la dosis de aAVC es $1,7 \times 10^3$ células/kg, $1,7 \times 10^4$ células/kg, $1,7 \times 10^5$ células/kg o $1,7 \times 10^6$ células/kg. En una forma, se puede ajustar la dosis de aAVC a una cantidad arbitraria dentro de la escala de $6,2 \times 10^3$ células/kg hasta $7,0 \times 10^7$ células/kg. En este contexto, el valor límite inferior es el número de células por kg de peso del cuerpo de la persona, cuando se administran células que tienen α -GalCer cargado en una cantidad de 275 ng/ 10^6 células, de modo que la dosis única de α -GalCer cargado en la superficie celular es de 1,7 ng/kg. El valor límite superior es el número de células por kg de peso del cuerpo de la persona, cuando se administran células que tienen α -GalCer cargado en una cantidad de 3,9 ng/ 10^6 células, de tal manera que la dosis única de α -GalCer cargado en la superficie celular es de 275 ng/kg. En una forma, la dosis de aAVC puede ser una escala numérica particular. La escala numérica particular puede ser una escala numérica incluida en la escala de $6,2 \times 10^3$ células/kg hasta $7,0 \times 10^7$ células/kg (o sea, una escala numérica desde un valor límite superior de $7,0 \times 10^7$ células/kg o menos hasta valor límite inferior de $6,2 \times 10^3$ células/kg o más). La escala numérica tiene, por ejemplo, un valor numérico de $7,0 \times 10^7$ células/kg o menos, $6,0 \times 10^7$ células/kg o menos, $5,0 \times 10^7$ células/kg o menos, $4,0 \times 10^7$ células/kg o menos, $3,0 \times 10^7$

células/kg o menos, $2,0 \times 10^7$ células/kg o menos, $1,7 \times 10^7$
 células/kg o menos, $1,3 \times 10^7$ células/kg o menos, $1,0 \times 10^7$
 células/kg o menos, $9,0 \times 10^6$ células/kg o menos, $8,0 \times 10^6$
 células/kg o menos, $7,0 \times 10^6$ células/kg o menos, $6,0 \times 10^6$
 células/kg o menos, $5,0 \times 10^6$ células/kg o menos, $4,3 \times 10^6$
 células/kg o menos, $4,0 \times 10^6$ células/kg o menos, $3,0 \times 10^6$
 células/kg o menos, $2,7 \times 10^6$ células/kg o menos, $2,0 \times 10^6$
 células/kg o menos, $1,7 \times 10^6$ células/kg o menos o $1,0 \times 10^6$ células/kg o menos como su valor límite superior; y un
 valor numérico de $1,0 \times 10^4$ células/kg o más, $1,7 \times 10^4$
 células/kg o más, $2,0 \times 10^4$ células/kg o más, $3,0 \times 10^4$
 células/kg o más, $4,0 \times 10^4$ células/kg o más, $4,4 \times 10^4$
 células/kg o más, $5,0 \times 10^4$ células/kg o más, $6,0 \times 10^4$
 células/kg o más, $6,6 \times 10^4$ células/kg o más, $7,0 \times 10^4$
 células/kg o más, $8,1 \times 10^4$ células/kg o más, $9,0 \times 10^4$
 células/kg o más, $1,0 \times 10^5$ células/kg o más, $1,7 \times 10^5$
 células/kg o más, $2,0 \times 10^5$ células/kg o más, $3,0 \times 10^5$
 células/kg o más, $3,2 \times 10^5$ células/kg o más, $4,0 \times 10^5$
 células/kg o más, $5,0 \times 10^5$ células/kg o más, $6,0 \times 10^5$
 células/kg o más, $6,6 \times 10^5$ células/kg o más, $7,0 \times 10^5$
 células/kg o más, $8,0 \times 10^5$ células/kg o más o $9,0 \times 10^5$
 células/kg o más como un valor límite inferior. La escala
 numérica particular puede ser una escala numérica incluida
 en una o más escalas seleccionadas a partir del grupo que

consiste en, por ejemplo, las escalas de $1,7 \times 10^3$ células/kg hasta $1,7 \times 10^6$ células/kg, $1,7 \times 10^3$ células/kg hasta $1,7 \times 10^5$ células/kg, $1,7 \times 10^3$ células/kg hasta $1,7 \times 10^4$ células/kg, $1,7 \times 10^4$ células/kg hasta $1,7 \times 10^6$ células/kg, $1,7 \times 10^4$ células/kg hasta $1,7 \times 10^5$ células/kg, $1,7 \times 10^5$ células/kg hasta $1,7 \times 10^6$ células/kg, $6,6 \times 10^4$ células/kg hasta $1,7 \times 10^7$ células/kg, $1,7 \times 10^5$ células/kg hasta $2,7 \times 10^7$ células/kg, $6,6 \times 10^5$ células/kg hasta $1,7 \times 10^7$ células/kg, $8,1 \times 10^4$ células/kg hasta $1,3 \times 10^7$ células/kg, $3,2 \times 10^5$ células/kg hasta $8,8 \times 10^6$ células/kg, $4,4 \times 10^4$ células/kg hasta $7,0 \times 10^6$ células/kg, $2,6 \times 10^5$ células/kg hasta $4,3 \times 10^6$ células/kg, $1,7 \times 10^4$ células/kg hasta $2,7 \times 10^6$ células/kg y $6,6 \times 10^4$ células/kg hasta $1,7 \times 10^6$ células/kg.

[0055]

Como un método para administrar aAVC a una persona, la aAVC puede ser administrada por ejemplo mediante inyección o instilación intravenosa, intratumoral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intraarterial.

[0056]

Se puede utilizar el método de tratamiento o prevención de la presente invención en combinación con un método adicional para el tratamiento del cáncer. Ejemplos de método adicional para el tratamiento del cáncer incluyen

cirugía, radioterapia, trasplante de células madre hematopoyéticas y tratamiento con otros agentes anticancerosos.

[0057]

<Composición farmacéutica, etc. de la presente invención>

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un cáncer, la cual comprende una célula de origen humano. La composición farmacéutica comprende una célula de origen humano que expresa CD1d exógeno o endógeno y tiene un α -GalCer cargado en la superficie celular y se la administra a una persona, de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado en la superficie de la célula a ser administrada a la persona, varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la misma. La célula de origen humano puede expresar además uno o más antígenos de cáncer exógenos o endógenos. La presente invención contempla además el uso de una célula de origen humano para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento o prevención de un cáncer, en la cual la célula expresa CD1d exógeno o endógeno y tiene un α -GalCer cargado sobre la superficie celular; se administra la composición a una persona de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado sobre la superficie de la célula a ser administrada a la persona, varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso

del cuerpo de la misma. La célula de origen humano puede expresar además uno o más antígenos de cáncer exógenos o endógenos. La presente invención proporciona también una célula de origen humano para el tratamiento o prevención de un cáncer, en la cual la célula expresa CD1d exógeno o endógeno y tiene un α -GalCer cargado sobre la superficie celular; se administra la célula a una persona de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado sobre la superficie de la célula a ser administrada a dicha persona varía desde 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la misma. La célula de origen humano puede expresar además uno o más antígenos de cáncer exógenos o endógenos.

[0058]

En la sección "Método para tratar o prevenir el cáncer de acuerdo con la presente invención" se describen formas referentes a la célula utilizada (aAVC) y un método para producir, así como su uso en el tratamiento o prevención de un cáncer, etc., así como la composición farmacéutica, el uso y la célula de la presente invención que se mencionan más arriba.

[0059]

"Método para tratar o prevenir el cáncer de acuerdo con la presente invención"

La presente invención proporciona también un método para producir una composición farmacéutica destinada al

tratamiento o prevención de un cáncer, la cual comprende una célula de origen humano. El método para producir una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede ser un método que comprende: proporcionar una célula de origen humano que expresa CD1d exógeno o endógeno y tiene un α -GalCer cargado sobre la superficie de la célula; y el envasado de la célula como una composición farmacéutica que se administra a una persona, de modo que una sola dosis de α -GalCer cargado sobre la superficie de la célula se encuentra en la escala de 1,7 ng hasta 275 ng por kg de peso del cuerpo de la persona. El método puede comprender además la etapa de interrumpir el crecimiento de la célula de origen humano, mediante un método tal como exposición a la radiación. En una forma, el método para producir una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede ser aquel que comprende: proporcionar una célula de origen humano que expresa CD1d exógeno o endógeno y tiene un α -GalCer cargado sobre la superficie de la célula; seleccionar una célula o determinar un número de células a ser envasadas como una composición farmacéutica, mediante el uso de α -GalCer cargado sobre la superficie celular, como un índice; y envasar a la célula seleccionada o determinada a fin de obtener una composición farmacéutica. En esta forma, la cantidad total de α -GalCer cargado sobre la superficie de las células contenidas en

la composición farmacéutica, puede ser una escala numérica definida mediante la multiplicación de un valor numérico arbitrario desde 1,7 ng hasta 275 ng por un peso corporal promedio. El método para producir una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede implicar además un método para medir la cantidad de α -GalCer cargado en la superficie de la célula, descrito en la sección <Método para medir la cantidad de α -GalCer cargado sobre la célula>. El método para producir una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender además: seleccionar una población celular en la cual la cantidad de α -GalCer cargado por célula se encuentra en una escala numérica definida; y el envasado de la población celular seleccionada, como una composición farmacéutica. La cantidad de α -GalCer cargado por célula puede estar en la escala de, por ejemplo, 3,9 ng hasta 275 ng, 10 hasta 275 ng, 10 hasta 140 ng o 10 hasta 100 ng por 1×10^6 células. Se administra la composición farmacéutica producida, a la dosis descrita anteriormente, a una persona.

[0060]

<Método para medir la cantidad de α -GalCer cargado en la célula>

La presente invención proporciona también el siguiente método para medir la cantidad de α -GalCer cargado sobre las células:

un método para medir la cantidad de α -GalCer cargado sobre las células, en el cual estas últimas expresan CD1d y tienen α -GalCer cargado sobre la superficie celular, el cual comprende las etapas de:

preparar los extractos celulares; y

someter los extractos celulares a espectrometría de masa (MS) para medir la cantidad de α -GalCer en dichos extractos.

[0061]

En una forma, la espectrometría de masa (MS) es cromatografía líquida-espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS).

[0062]

En una forma, las células utilizadas en este método son células de origen humano que expresan CD1d exógeno o endógeno y tienen α -GalCer cargado sobre la superficie celular (aAVC). En una forma, las células utilizadas en este método son células de origen humano que expresan CD1d exógeno o endógeno y uno o más antígenos de cáncer exógenos o endógenos y tienen α -GalCer cargado sobre la superficie celular (aAVC). En una forma, las células utilizadas en este método son células de origen humano que expresan CD1d

exógeno y uno o más antígenos de cáncer exógenos y tienen α -GalCer cargado sobre la superficie celular (aAVC).

[0063]

Se ofrecen aquí Ejemplos particulares para referencia a fin de comprender mejor a la presente invención. Sin embargo, se ofrece esos ejemplos para propósitos ilustrativos y no para limitar a la presente invención.

[Ejemplos]

[0064]

[Ejemplo 1-1: Preparación de aAVC-WT1]

Se preparó lentivirus utilizando plásmidos que llevan WT1, CD1d y genes Tet3G (transactivador regulador de tetraciclina inversa), respectivamente. Mediante la introducción de esos genes en células FreeStyle™ 293-F (Thermo Fisher Scientific, Cat. R79007), se construyó aAVC que expresa CD1d y WT1 y α -GalCer cargado sobre la superficie celular.

[0065]

(1) Construcción de plásmidos para la preparación de lentivirus

Se insertó un gen que tiene una secuencia de reconocimiento XhoI agregada en el terminal 5' y una secuencia de reconocimiento NotI agregada en el terminal 3' en el gen WT1 (ID SEC NO:1) en el sitio XhoI-NotI del plásmido pLVSIN-CMV (Takara Bio Inc., Cat. 6183) para construir el

plásmido pLVSIN-CMV-WT1. Se preparó el gen con ID SEC NO: 1 mediante la optimización de codones humanos a través del servicio de síntesis de gen artificial de Thermo Fisher Scientific Inc., basado en la secuencia de ácido amino de isoform D de proteína tumoral de Wilms (Secuencia de Referencia NCBI: NP_077744.3). Se separó el plásmido pLVSIN-CMV-WT1 con las enzimas de restricción ClaI y EcoRI para remover al promotor CMV. Luego, se volvió romos a los extremos cortados con T4 DNA Polymerase (Toyobo Co., Ltd., Cat. TPL-101). Se realizó la reacción de ligación utilizando el DNA Ligation Kit (Takara Bio Inc., Cat. 6023) para construir el plásmido pLVSIN-ΔWT1. El promotor TRE3G extirpado a partir de pTRE3G (Takara Bio Inc., Cat. 631173) con las enzimas de restricción EcoRI y SalI, fue insertado en el sitio EcoRI-XhoI del plásmido pLVSIN-ΔWT1 para construir el plásmido pLVSIN-TREG-WT1. Este plásmido pLVSIN-TREG-WT1 fue separado con las enzimas de restricción BamHI y MluI para remover al promotor PGK y al gen de resistencia puromicina. Luego, se volvió romos a los extremos cortados del plásmido, con T4 DNA Polymerase. Se realizó la reacción de ligación utilizando el DNA Ligation Kit para construir al plásmido pLVSIN-TRE3G-WT1Δpur.

[0066]

Se separó al plásmido pLVSIN-CMV Pur con las enzimas de restricción XhoI y MluI para remover al promotor PGK y

al gen de resistencia puromicina. Se amplificó al gen CD1d (ID SEC NO:3) mediante PCR utilizando imprimadores con secuencias complementarias a 15 nucleótidos en ambos lados del sitio XhoI-MluI del plásmido respectivamente. Se insertó al gen CD1d amplificado en el plásmido separado descrito anteriormente, utilizando In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio Inc., Cat. 639648) para construir el plásmido pLVSIN-CMV-CD1d Δ pur. Se preparó el gen de ID SEC NO:3 mediante la optimización de codones humanos a través del servicio de síntesis de gen artificial de Thermo Fisher Scientific Inc., basado en la secuencia de ácido amino (ID SEC NO: 4) precursor glicoproteína CD1d isoform 1 que presenta antígeno (Secuencia de Referencia NCBI: NP_0011757.1).

[0067]

Se amplificó el gen Tet3G a partir del plásmido pCMV-Tet-On 3G (Takara Bio Inc., Cat. 631335) mediante el uso de PCR. Se insertó al gen amplificado en el sitio XhoI-MluI del plásmido pLVSIN-CMV Pur, utilizando In-Fusion® HD Cloning Kit para construir el plásmido pLVSIN-CMV-Tet3G Δ pur.

[0068]

(2) Preparación de lentivirus

Se prepararon lentivirus cargado con WT1, lentivirus cargado con CD1d y lentivirus cargado con Tet3G, utilizando

el plásmido pLVSIN-CMV-Tet3GΔpur, el plásmido pLVSIN-CMV-CD1dΔpur y el plásmido pLVSIN-CMV-Tet3GΔpur preparados en (1).

[0069]

Se mezclaron 30 μg del plásmido pLVSIN-TRE3G-WT1Δpur y 30 μg de ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. K497500). Se agregó Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 31985-070) para ajustar hasta 1 mL y se mezcló; luego, se dejó reposar a la mezcla durante 5 minutos (A). Se mezclaron 60 μL del reactivo de transfección de ADN in vitro PEIpro® (Polypus-transfection SE, Cat. 115-010) y 940 μL de Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium y se dejó reposar durante 5 minutos (B). Se mezcló (A) y (B) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, se realizó la introducción del gen mediante la adición de la cantidad total a células 293T (ATCC Cat. CRL-3216) inoculadas, a un Matraz Falcon® del Tipo con Tapón de Ventilación con capacidad de 800 mL, Cuello Inclinado (Corning Inc., Cat. 353138). Se realizó la inoculación de las células 293T en el día antes de la introducción del gen. Se cultivó a las células a 37°C bajo condiciones de 5% de CO₂ en medio DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 10569-010) conteniendo suero de feto bovino al 10% (SAFC Biosciences, Cat. 12007 (producto irradiado con rayos γ) y

0,1% de gentamicina (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 15750-060). Después de la introducción del gen, se cultivó a las células durante 2 días. Se recuperó un líquido sobrenadante del cultivo, conteniendo el lentivirus cargado en el gen WT1) mediante la centrifugación del mismo a 230 x g a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se filtró al líquido sobrenadante a través de un filtro de 0,22 µm (Merck KGaA, Cat. SLGV033RS). Se agregó una solución 4 x PEG (32% Polietileno glicol) BioUltra, 6000 (Merck KGaA, Cat. 81253-250G), NaCl 0,4 M (Kanto Chemical Co., Inc., Cat. 37144-02) y HEPES 0,04 M (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 15630-080) en una cantidad de 1/3 de la cantidad del líquido sobrenadante, se mezcló y se dejó reposar durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó a la mezcla a 2500 x g a 4°C durante 30 minutos y se extrajo al líquido sobrenadante. Este último fue completamente extraído después de una centrifugación adicional a 2500 x g a 4°C durante 30 minutos. Se suspendió a los precipitados en una cantidad apropiada de Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium. Se concentró hasta 30 veces al líquido sobrenadante recuperado del cultivo.

[0070]

Se preparó al lentivirus cargado con Tet3G empleando casi el mismo procedimiento anterior y utilizando al plás-

mido pLVSIN-CMV-Tet3G Δ pur. Se ajustó el período de cultivo, después de la introducción del gen, a 2 días o 3 días. Se realizó el reposo después de la mezcla con la solución 4 x PEG a 4°C durante toda la noche o durante 4 días. Se utilizó FreeStyle 293 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 12338018) como el medio de suspensión final.

[0071]

Se mezcló 12 μ g del plásmido pLVSIN-CMV-CD1d Δ pur y 36 μ L de ViraPower Lentiviral Packaging Mix. Se agregó OptiPro™ SFM ((Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 123209-019) para completar hasta 6 mL y se mezcló; se dejó reposar a la mezcla durante 5 minutos (A-2). Se mezcló 144 μ L de Lipofectamine 2000 CD Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 12566-014) y 6 mL de OptiPro™ SFM y se dejó reposar durante 5 minutos (B-2). Se mezcló A-2 y B-2 y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego, se realizó la introducción del gen agregando la cantidad total a células 293FT (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. RT0007) inoculadas al Matraz Falcon® con Tapa de Ventilación con Capacidad de 800 mL, Cuello Inclinado. Se preparó el medio utilizando para el cultivo de las células 293FT, mediante la adición de G418 (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 10131-027) y Solución de Áci-

dos Amino No Esenciales MEM (100X) (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 11140050) a concentraciones finales de 500 µg/mL y 0,1 mM respectivamente, a medio DMEM conteniendo suero de feto de bovino al 10% (SAFC Biosciences, Ct. 12007C) (producto irradiado con rayos γ) y gentamicina al 0,1%. Después de la introducción del gen, se cultivó a las células durante 2 días. Se recuperó un líquido sobrenadante del cultivo conteniendo lentivirus cargado con el gen CD1D, mediante centrifugación del medio de cultivo a 540 x g a 4°C durante 10 minutos. Se filtró al líquido sobrenadante a través de un filtro de 0,44 µm (Merck KGaA, Cat. SLHV033RS). Se agregó Solución de Precipitación de Virus PEG-it™ (5x) (System Biosciences, LLC, Cat. LV825A-1) en una cantidad de 1/5 de la cantidad del líquido sobrenadante, se mezcló y se dejó reposar durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó a la mezcla a 1500 x g a 4°C durante 30 minutos para la remoción de un líquido sobrenadante; se centrifugó nuevamente a 1500 x g a 4°C durante 5 minutos para retirar completamente a dicho líquido. Se suspendió a los gránulos en una cantidad apropiada de FreeStyle 293 Expression Medium. Se concentró 75 veces al líquido sobrenadante recuperado del cultivo a fin de obtener lentivirus cargado con CDd1.

[0072]

(3) Preparación de la célula FreeStyle 293F_WT1-CD1d_Tet3G

Se infectó en secuencia células FreeStyle™ 293-F con los 3 tipos de lentivirus preparados en (2), para obtener células FreeStyle 293F_WT1-CD1d_Tet3G. Se cultivó a las células FreeStyle™ 293-F en FreeStyle 293 Expression Medium conteniendo 0,1% de gentamicina. Se preparó a las células FreeStyle™ 293-F a una concentración de 1×10^6 células/mL y fueron inoculadas a un volumen de 1 mL/foso en una Placa de Cultivo Celular, Multi-Foso, Fondo Plano, 12 Fosos, Con Tapa, Falcon® (Corning Inc., Cat. 353043; referida más adelante como una placa de 12 fosos). Se agregó en cada foso 50 µL del lentivirus cargado con WT1 y 100 µL del lentivirus cargado con Tet3G preparados en (2). Después de la centrifugación a $540 \times g$ a temperatura ambiente durante 30 minutos, se suspendió suavemente a las células mediante el uso de pipeta y se agitó al cultivo. Al cabo 3 días, se hizo pasar a las células desde la placa de 12 fosos a un Matraz Erlenmeyer de Policarbonato, 125 mL, Corning®, provisto con Tapón de Ventilación (Corning Inc., Cat. 431143, referido en adelante como matraz Erlenmeyer de 125 mL), se realizó el paso a intervalos de 3 o 4 días y se cultivó durante 11 días. Se inoculó nuevamente estas células a una placa de 12 fosos. Se agregó a cada foso 100 µL del lentivirus cargado con CD1d preparado en

(2). Se realizó la segunda infección con lentivirus mediante los mismos procedimientos anteriores. Después del día 1, se pasó a las células desde la placa de 12 fosos a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, a intervalos de 3 o 4 días, y se cultivó durante 10 días. Se utilizó a las células obtenidas como células FreeStyle 293F_WT1-CD1d_Tet3G.

[0073]

(4) Clonación

Se realizó la clonación unicelular mediante el método de dilución limitada de las células FreeStyle 293F_WT1-CD1d_Tet3G preparadas en (3). Se seleccionó a aquellos clones que expresan a la totalidad de los genes. Se incubó a las células a razón de 1 célula/foso para una placa de 96 fosos y pasaban al ir proliferando. Se midieron los niveles de la proteína WT1 y de la proteína CD1d en las células proliferadas, mediante ELISA para WT1 y mediante citometría de flujo para CD1d a fin de seleccionar clones que expresan de manera estable a las proteínas WT1 y CD1d. Se indujo la expresión de WT1 mediante Tet-On System agregando al medio doxiciclina (Takara Bio Inc., Cat. 631311) con una concentración final de 100 ng/mL y se realizó la respectiva evaluación. Se realizó la adición mediante ELISA de acuerdo con un procedimiento general de emparejado ELISA utilizando el Anticuerpo de Tumor de Anti-Wilms,

clon NT 6F-H2 (Merck KGaA, Cat. MAB4234-C) como un anticuerpo para inmovilización, anticuerpo Anti WT1 (Wuxi AppTec Co., Ltd., Cat. AP11964c) como un anticuerpo primario y Anticuerpo IgG de Conejo Conjugado con Peroxidasa de Rábano Picante (R&D Systems, Inc., Cat. HAF008) como un anticuerpo secundario. Se realizó la citometría por flujo utilizando anticuerpo APOC Mouse Anti-Human CD1d (BD Biosciences, Cat. 563505) y FACSVerse™ (BD Biosciences). Los clones seleccionados fueron utilizados como células precursoras de aAVC-WT1.

[0074]

(5) Preparación de aAVC-WT1 que difiere en la cantidad de α -GalCer cargado

Mediante la adición de varias concentraciones de α -GalCer (de cuya síntesis estuvo encargada Juzen Chemical Corp. bajo un convenio de fabricación) a células precursoras de aAVC-WT1 y el cultivo de las mismas, se preparó aAVCs que difieren en la cantidad de α -GalCer cargado (referidas también como aAVC-WT1).

[0075]

Se cultivó células precursoras de aAVC-WT1 y se agregó al medio doxiciclina a una concentración final de 100 ng/mL y una solución de α -GalCer a una concentración final de 56 ng/mL, 167 ng/mL, 500ng/mL, 1500 ng/mL o 3000 ng/mL, para impulsar a las células con α -GalCer. Se realizó de manera

independiente el cultivo de las células precursoras de aAVC/WT1 suplementadas con la solución de 1500 ng/mL de α -GalCer, utilizando tres volúmenes diferentes de cultivo. Se preparó la solución de α -GalCer mediante un método de acuerdo con el Ejemplo (2)1 descrito anteriormente. Dos días después de la adición de α -GalCer, se recuperó a las células mediante el método de centrifugación, se lavaron, se concentraron y se irradiaron con rayos X a una dosis de 30, 40 o 100 Gy utilizando el aparato de irradiación por rayos X MBR-1520R-3 o MBR-1520R-4 (Hitachi Power Solutions Co., Ltd.) para preparar aAVC-WT1.

{0076]

[Ejemplo 1-2: Preparación de aAVC(3T3)-WT1 tipo ratón]

Se preparó aAVC tipo ratón (referido también como aAVC(3T3)-WT1) mediante la introducción de mRNAs del gen WT1 y del gen CD1d en células NIH/3T3 de ratón (ATCC, Cat. CRL-1658) y la adición de α -GalCer (sintetizado por Juzen Chemical Corp. bajo convenio de fabricación).

[0077]

Se insertó al gen WT1 extirpado a partir de pcDNA3-ATG-WT1 descrito en WO2013/018778 con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI, en el sitio HindIII-EcoRI del plásmido pGEM-4Z (Promega Corp., Cat. P2161) para preparar

pGEM-4Z-WT1. Se insertó al gen CD1d de ratón consistente en la secuencia nucleótido ilustrada en ID SEC NO:

5 (sintetizado mediante la optimización de codones de ratón a través del servicio de síntesis de genes artificiales de Thermo Fisher Scientific Inc., basado en la secuencia de ácido amino (ID SEC NO: 6) de glicoproteína CD1d1 que presenta antígeno, UniProt: P11609-1, en el sitio HindIII-BamHI del plásmido pGEM-4Z para construir el plásmido pGEM-4Z-mCD1d. El plásmido PGEM-4Z-WT1 y el plásmido pPGEM-4Z-mCD1d fueron separados y puestos en línea con EcoRI y BamHII respectivamente. Se prepararon WT1 mRNA y CD1d mRNA utilizando a los plásmidos como plantillas mediante el empleo del Kit de Transcripción mMMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. AMB13455). Se recuperaron células NIH/3T3 cultivadas durante 2 días en medio Dulbecco's Modified Eagle (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 10569) conteniendo suero de feto de bovino al 10% suplementado con 500 ng/mL de α -GalCer (sintetizado por Juzen Chemical Corp. bajo convenio de fabricación). Se agregó WT1 mRNA y CD1d mRNA a la suspensión celular y se realizó la electroporación (impulso del proceso: voltaje: 150 V, ancho del impulso: 8 ms, intervalo del impulso: 50 ms, número de veces: 2; índice de decadencia: 40%; polaridad: +, impulso de transferencia: voltaje: 20 V, ancho del impulso: 50 ms, intervalo del impulso: 50 ms, número de veces: ± 5 , índice de decadencia: 10%, polaridad: +/-) utilizando el electroporador NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd.).

Las células electroporadas fueron recuperadas e irradiadas con rayos X a una dosis de 30 Gy, utilizando el sistema de irradiación por rayos X MBR-1520R-3 (Hitachi Power Solutions Co., Ltd.) o MBR-1520R-4 para preparar aAVC(3T3)-WT1.

[0078]

[Ejemplo 2: Medición de la concentración de α -GalCer cargado en aAVC-WT1 y aAVC(3T3)-WT1]

(1) Preparación de solución normal de α -GalCer

Se agregó 28 gramos de sucrosa (Merck KGaA, Cat. S7903) y 3,75 gramos de L-histidina (Merck KGaA, Cat. H8000) a 400 mL de agua para inyección (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. A12873-02) y se disolvió mediante calentamiento en un baño de agua a temperatura constante de 80°C. Se agregó a la solución 100 mg de α -GalCer y 25 gramos de polisorbato 20 al 10% (MP Biomedicals, LLC, Cat. 194724), después de lo cual se calentó a la mezcla durante 1 hora en un baño de temperatura constante a 80°C. Una vez confirmada la disolución del material sólido en la solución, se ajustó la cantidad hasta 500 mg mediante la adición de agua para inyección. Se utilizó esta solución como una solución de 200 μ g/mL de α -GalCer. Esta solución de 200 μ g/mL de α -GalCer fue diluida con una solución diluyente (10% agua y 90% fase móvil B (70% de etanol, 29,5%

de metanol y 0,5% de ácido fórmico) para preparar soluciones de α -GalCer que tienen una concentración de 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL o 2,5 ng/mL, las cuales se utilizan como soluciones normales de α -GalCer.

[0079]

(2) Preparación del extracto celular

Se agregó 1 mL o 0,25 mL de agua Milli-Q a 1×10^6 células de las aAVC preparadas mediante el impulso con varias concentraciones de α -GalCer en el Ejemplo 1. Se homogeneizó a las células durante 20 segundos mediante el uso de un homogeneizador ultrasónico (STM Co., Ltd., Cat. UH-50). Se agregó 900 μ L de la fase móvil B a 100 μ L del material homogeneizado celular y se agitó a la mezcla durante más de 10 minutos. Después de centrifugación a 10000 x g durante 5 minutos, se recogió 250 μ L del líquido sobrenadante en un frasco de polipropileno con rosca (GL Sciences Inc., Cat. 1030-61024) para preparar los extractos celulares.

[0080]

Medición LC-MS/MS

Se midieron las soluciones normales de α -GalCer preparadas en (1) y los extractos celulares preparados en (2), mediante vigilancia de reacción múltiple de LC-MS/MS. Se realizó la medición con el número de mediciones fijadas

en 1 para las soluciones normales de α -GalCer y en 6, 3 o 1 para los extractos celulares tal como se ilustra en la Tabla 1 de (5). LC empleó la serie 1200 (Agilent Technologies, Inc.) como LC y se utilizó 6410 Triple Quad LC-MS (Agilent Technologies, Inc., Cat. G6410B) como MS. Se separaron las muestras mediante LC. 10 μ L de cada solución normal de α -GalCer y extractos celulares se colocaron en la columna Accucore-150-C4 (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 16526-103030) y se separaron las muestras utilizando a la fase móvil A (0,1% de ácido fórmico) y la fase móvil B (70% de etanol, 29,5% de metanol y 0,5% de ácido fórmico) en una gradiente desde 60% hasta 100% de la fase móvil B. El caudal de flujo para la columna fue de 0,4 ml/minuto y la temperatura de la columna fue de 40°C. Se introdujo en secuencia a las fases separadas en MS y los compuestos contenidos en las soluciones fueron ionizados mediante el método de ionización mediante electrorociado. Se seleccionó 858,7 [m/z] como un ion precursor de α -GalCer a partir de los iones generados. Este ion precursor fue descompuesto adicionalmente para detectar 696,7 [m/z] como un ion producido de α -GalCer. Los valores determinados anticipadamente mediante el análisis de las soluciones normales de α -GalCer a través de LC-MS/MS fueron utilizados como el ion precursor y el ion producido.

[0081]

(4) Análisis

Se cuantificaron las concentraciones de α -GalCer utilizando un software de análisis (Agilent Technologies, Inc., Agilent MassHunter Quantitative Analysis). Se determinó el tiempo de retención de α -GalCer a partir de los resultados de la medición de las soluciones normales de α -GalCer y se confirmó que las muestras de medición presentaban un tiempo de retención similar; se analizó la cantidad de α -GalCer en cada una de las muestras de medición, utilizando el método de área de cresta. Se elaboró una curva de calibración a partir de los resultados del análisis de las soluciones normales de α -GalCer preparadas en (1) y se cuantificaron las muestras de interés. Para la elaboración de la curva de calibración, se utilizaron los resultados de la medición obtenidos a partir de 6 puntos de 1000 ng/mL, 500 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL y 5 ng/mL o a partir de 4 o 5 puntos entre 6 puntos de 500 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL y 2,5 ng/mL.

(5) Resultados de la medición del contenido de α -GalCer

La tabla presentada más adelante contiene los resultados de la medición de la cantidad de α -GalCer cargado en aAVC(3T3)-WT1 o aAVC-WT1 mediante LC-MS/MS.

En la Tabla 1, los tres valores indicados a la concentración por adición de α -GalCer de 1500 ng/mL ilustran la cantidad de α -GalCer cargado en las células obtenidas

en tres experimentos independientes, con diferentes esca-
las de cultivo.

[Tabla 1]

Tipo	Concentración de la adición de α -GalCer	Cantidad cargada (ng/10 ⁶ células)	Número de me- diciones
aAVC (3T3) - WT1	500	2,4*	1
aAVC-WT1	56	3,9*	3
	167	10	3
	500	21	3
	1500	39	3
	1500	140	6
	1500	275	6
	3000	100	3

*representa "menor que el valor del límite inferior de cuantificación" cuando el número de células medidas es de 10^6 .

[0083]

[Ejemplo 3: Determinación de la dosis de células aAVC(3T3)-WT1 que presentan eficacia farmacológica]

Se evaluó el efecto antitumoral mediante la activación de células NKT mediadas por α -GalCer de aAVC(3T3)-WT1, en un modelo de metástasis pulmonar de ratón, en el cual se inyectó por vía intravenosa células de melanoma B16. Se administró células de melanoma B16-F10 (ATCC, Cat. CRL-6475) suspendidas en PSB a 2×10^4 células, a la vena caudal de cada uno de ratones hembras C57BL/6J de siete semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (n = 16 en cada grupo) a fin de preparar un modelo de metástasis pulmonar de ratón, en el cual se inyectaron por vía intravenosa células de melanoma B16. Tres horas después de la administración, se administró aAVC(3T3)-WT1 suspendido en Inyección BICANATE (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), donde la cantidad cargada de α -GalCer es de 2,4 ng/ 10^6 células (la parte más alta de la Tabla 1 en el Ejemplo 2) a $1,7 \times 10^4$ células/kg, $1,7 \times 10^5$ células/kg o $1,7 \times 10^6$ células/kg, a las venas caudales de los ratones. Se administró 200 μ L de la Inyección BICANATE a un grupo de control. Los resultados del examen de supervivencia

durante 61 días a partir de la administración de B16-F10 demostraron que el tiempo promedio de supervivencia del grupo de control fue de 29,5 días, mientras que el tiempo de supervivencia del grupo que recibió aAVC(3T3)-WT1 fue de 31,5 días para el grupo que recibió $1,7 \times 10^4$ células/kg, 42,0 días para el grupo que recibió $1,7 \times 10^5$ células/kg y 37,0 días para el grupo que recibió $1,7 \times 10^6$ células/kg. Cuando se compararon los tiempos de supervivencia mediante la prueba de rango logarítmico, el tiempo de supervivencia de los grupos que recibieron aAVC(3T3)-WT1 a $1,7 \times 10^5$ células/kg o $1,7 \times 10^6$ células/kg fue significativamente prolongado en comparación con el grupo de control (Figura 1). Por lo tanto, se encontró que aAVC(3T3)-WT1 fue efectivo a $1,7 \times 10^5$ células/kg para este modelo. Se ha informado que el efecto antitumoral de células que tienen α -GalCer cargado en ellas, en este modelo, queda atenuado debido a una deficiencia de células NKT en ratones o agotamiento de células NK (J. Immunol.; 2007; 178: 2853-2861). Así, se cree que el efecto antitumoral de aAVC(3T3)-WT1 indicado en este modelo es mediado por la activación de células NKT mediante α -GalCer cargado en ellas.

[0084]

[Ejemplo 4: Cantidad de α -GalCer cargado y activación de la célula NKT]

Para estimar la dosis farmacológica efectiva de aAVC-WT1 del tipo humano, utilizando aAVC(3T3)-WT1 del tipo de ratón, se midió la capacidad de activar las células NKT en ratones para aAVC(3T3)-WT1 y cada aAVC-WT1 descrito en la Tabla 1 del Ejemplo 2 y se realizó la debida comparación. Se determinó la dosis de α -GalCer necesaria para ejercer un efecto farmacológico mediado por la activación de la célula NKT, mediante la administración de aAVC-WT1 a una persona, utilizando los resultados obtenidos anteriormente. Se midió la proporción de las células NKT en las células del bazo después de la administración de aAVC(3T3)-WT1, como un índice para la capacidad de activar las células NKT.

[0085]

Se administró aAVC(3T3)-WT1 o cada aAVC-WT1 cargado con la cantidad de α -GalCer dado en la Tabla 1 del Ejemplo 2 y suspendido en Inyección BICANATE a $1,7 \times 10^4$ células/kg, $1,7 \times 10^5$ células/kg o $1,7 \times 10^6$ células/kg, en la vena caudal de cada uno de ratones hembras C57BL/6J de 5 semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (n = 3 en cada grupo). Se administró 200 μ L de Inyección BICANATE a un grupo de control. Tres días después de la administración, el ratón fue sacrificado y se extirpó el bazo. Se preparó a las células a partir del bazo extirpado de acuerdo con un método general. Las células NKT incluidas

en las células del bazo fueron teñidas con fusión de CD1d de ratón, dimérico y recombinante fijado con α -GalCer:Ig (CD1d/Gal-dímero, Becton, Dickinson and Company, Cat. 557599), APC-IgG1 anti-ratón conjugado (Becton, Dickinson and Company, Cat. 560089) y CD19 anti-ratón FITC-conjugado (BioLegend, Inc., Cat. 115506) y se midió mediante citometría por flujo. Se calculó la proporción de células NKT mediante el análisis de la proporción de células CD1d(Gal-dímero y células CD19-negativo, en las células de la fracción linfocito de un citograma por dispersión frontal y por dispersión lateral utilizando el software FlowJo ver. 10.2 (FlowJo, LLC). Como resultado, se demostró la tendencia de que fue aumentada la proporción de células NKT en las células del bazo de acuerdo con el aumento de la cantidad de α -GalCer cargado en aAVC-WT1 y el aumento del número células administradas (Figura 2). Estos resultados sugieren que la cantidad de α -GalCer administrado está altamente correlacionada con la activación de las células NKT, más bien que el número de células administradas.

[0086]

La proporción de células NKT en las células del bazo fue de 1,1% (barra sombreada de aAVC(3T3)-WT1 en la Figura 2) cuando se administró aAVC(3T3)-WT1 a $1,7 \times 10^5$ células/kg (dosis que prolongó significativamente el tiempo de supervivencia, en comparación con un grupo de control en

el Ejemplo 3). En el ratón que recibió aAVC-WT1, la dosis mínima de α -GalCer que presenta una proporción de células NKT de 1,1% o más fue 1,7 ng/kg (Figura 2, barra sombreada de aAVC-WT1 con α -GalCer 10 ng/ 10^6 células; y Tabla 2, cuando se administró 10 ng/ 10^6 células de α -GalCer a $1,7 \times 10^5$ células/kg, se administró 1,7 ng/kg en el término de una dosis de α -GalCer). Esto sugiere que una dosis de α -GalCer de 1,7 ng/kg o más puede elevar significativamente la proporción de células NKT en las células del bazo.

Incluso la cantidad mínima de α -GalCer cargado en la superficie de la célula aAVC, correspondiente a una concentración de 3,9 ng/ 10^6 células, demostró una proporción de células NKT de 1,1% o más, siempre y cuando la dosis de α -GalCer fue aquella que excede de 1,7 ng/kg (Figura 2, gráfico de barra llena de aAVC-WT1 donde la cantidad de α -GalCer cargado fue de 3,9 ng/ 10^6 células). Esto sugiere que es deseable utilizar células cargadas con α -GalCer a una concentración de 3,9 ng/ 10^6 células o más.

[0087]

La Tabla 2 resume los tipos de células, la cantidad de α -GalCer cargado, los números de células administradas y las dosis de α -GalCer en la administración de dichos números de células a ratones, utilizados en los Ejemplos 3 y 4.

[Tabla 2]

Tipo	Cantidad de α-GalCer cargado (ng/10 ⁶ células)	Número de células administradas (células/kg)	Dosis de α-Gal-Cer (ng/kg)
aAVC (3T3) - WT1	2,4*	1,7 x 10 ⁴	0,041
		1,7 x 10 ⁵	0,41
		1,7 x 10 ⁶	4,1
aAVC-WT1	3,9*	1,7 x 10 ⁴	0,066
		1,7 x 10 ⁵	0,66
		1,7 x 10 ⁶	6,6
	10	1,7 x 10 ⁴	0,17
		1,7 x 10 ⁵	1,7
		1,7 x 10 ⁶	17
	21	1,7 x 10 ⁴	0,36
		1,7 x 10 ⁵	3,6
		1,7 x 10 ⁶	36
	39	1,7 x 10 ⁴	0,66
		1,7 x 10 ⁵	6,6
		1,7 x 10 ⁶	66
	100	1,7 x 10 ⁴	1,7
		1,7 x 10 ⁵	17
		1,7 x 10 ⁶	170
	140	1,7 x 10 ⁴	2,4
		1,7 x 10 ⁵	24
		1,7 x 10 ⁶	238

	275	$1,7 \times 10^4$	4,7
		$1,7 \times 10^5$	47
		$1,7 \times 10^6$	468

*representa "menos que el valor límite inferior de cuantificación" cuando el número de las células medidas es 10⁶ células

[0088]

[Ejemplo 5: Estudio de toxicidad después de la administración intravenosa de una dosis única a ratones]

Se evaluó la toxicidad de aAVC-WT1 (cantidad de α-GalCer cargado: 275 ng/10⁶ células) para después de la administración intravenosa a ratones. Se utilizó ratones hembras o machos C57BL/6J de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories Japan, Inc.) en cada grupo consistente de cinco ratones. Como el grupo de administración se utilizó cuatro grupos: un grupo de control de vehículo, un grupo de dosis baja (1 x 10⁶ células/kg), un grupo de dosis media (1 x 10⁷ células/kg) y un grupo de dosis alta (1 x 10⁸ células/kg). Se utilizó Inyección BICANATE (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) como el vehículo para preparar la solución de administración celular. Se suspendió aAVC-WT1 en Inyección de BICANATE para preparar solución de administración 1 x 10⁵ células/mL para el grupo de dosis baja, solución de administración de 1 x 10⁶ células/mL para

el grupo de dosis media y solución de administración de $(1 \times 10^7$ células/mL para el grupo de dosis alta respectivamente. La dosis para los ratones fue establecida en 10 mL/kg. Se calculó la cantidad de la solución de dosificación para cada ratón, tomando como base el peso del cuerpo medido en el día de la administración y el vehículo o cada solución de dosis de células fue administrado una sola vez en la vena caudal de cada ratón. Los ratones después de la administración fueron sometidos a un examen de las condiciones generales y se midió el peso del cuerpo durante 7 días después de la administración. Luego, se sacrificó a los ratones a los 7 días después de la administración y fueron sometidos a necropsia. No se observaron efectos (muerte, agonía, otra disminución de la actividad locomotriz, etc.) debido a la administración del vehículo o de cada solución de dosificación celular, durante el período de observación de las condiciones generales (observado 3 veces en total antes de la administración, 1 hora después de la administración y 4 horas después de la administración en el día de esta última y una vez al día a partir del día después de la administración, hasta el momento de la necropsia). Se realizó la medición del peso del cuerpo en el día antes de la administración, en el día de la administración, en el día después de la administración, 3 días y

7 días después de la administración. Se encontró disminución en el peso del cuerpo 3 días después de la administración en hembras y machos en el grupo de dosis alta (Figura 3). En la medición del consumo de alimento (se midieron los consumos de alimento por día desde 3 días antes de la administración hasta el día antes de la administración, desde el día de administración hasta el día después de la administración, desde el día después de la administración hasta 3 días después de la administración y desde 3 días después de la administración hasta 7 días después de la administración), se encontró disminución en el consumo de alimento desde el día de la administración hasta el día después de la administración y desde el día después de la administración hasta 3 días después de la administración en hembras del grupo de dosis media y machos en el grupo de dosis alta (Figura 4). A partir de los resultados de este estudio, no se encontraron efectos sobre el peso del cuerpo y consumo de alimento en el grupo de dosis baja y, por lo tanto, se consideró que la dosis de 1×10^6 células/kg es el límite superior de la dosis que no afecta al peso del cuerpo y al consumo de alimento (equivalente a 275 ng/kg de la dosis de α -GalCer calculada a partir de la cantidad de α -GalCer cargado).

[Aplicabilidad Industrial]

[0089]

Se espera que la presente invención sea útil en el tratamiento o prevención seguro y efectivo de un cáncer, utilizando aAVC.

[Texto Libre de Listado de Secuencia]

[0090]

La "Secuencia Artificial" será en el título numérico <223> del listado de secuencia dado más abajo.

La secuencia nucleótido que establece la fuerza en ID SEC NO: 1 del listado de secuencia es una secuencia nucleótido que codifica a la proteína WT1 humana y la secuencia de ácido amino que establece la fuerza en ID SEC NO: 2 del listado de secuencia es una secuencia de ácido amino codificada por la secuencia de ID SEC NO: 1. La secuencia nucleótido que establece la fuerza en ID SEC NO: 3 del listado de secuencia es una secuencia nucleótido que codifica a la proteína CD1d humana y la secuencia de ácido amino que establece la fuerza en la ID SEC NO: 4 del listado de secuencia, es una secuencia de ácido amino codificada por la secuencia de ID SEC NO: 3. La secuencia nucleótido que establece la fuerza en la ID SEC NO: 5 del listado de secuencia, es una secuencia nucleótido que codifica a la proteína CD1d de ratón y la secuencia de ácido amino que establece la fuerza en ID SEC NO: 6 del listado de secuencia es una secuencia de ácido amino codificada por la secuencia de ID SEC NO: 5.