

**CÉLULA VECTORIAL ADYUVANTE ARTIFICIAL QUE CONTIENE NY-
ESO-1 PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER**

[Campo Técnico]

[0001]

La presente invención se relaciona con una célula vector adyuvante artificial con contenido de NY-ESO-1 (célula aAVC-NY-ESO-1) para usar en el tratamiento de un cáncer.

[Técnica Anterior]

[0002]

Se encuentra que el carcinoma de células escamosas esofágicas de New York 1 (NY-ESO-1), uno de los antígenos del cáncer/testículo, se expresa en una amplia gama de tumores tales como el cáncer de próstata y el cáncer de vejiga. Por otro lado, no se observa su expresión en las células normales de adultos humanos, excepto en los testículos. Por lo tanto, se considera que este antígeno es una molécula objetivo adecuada para la terapia contra el cáncer, y hay fármacos, incluyendo vacunas, que se encuentran en desarrollo (Literatura no patente 1 a 3).

[0003]

Una vacuna G305, que es una mezcla de la proteína NY-ESO-1 y un adyuvante lipídico de glucopiranosilo (GLA), está siendo objeto de ensayos clínicos dirigidos a pacientes con cánceres que expresan la NY-ESO-1, y se ha

confirmado la inducción de células T específicas para NY-ESO-1 después de la vacunación (Literatura no patente 4).
[0004]

Fujii et al. han preparado una célula vector adyuvante artificial (aAVC) mediante la modificación de células de origen humano para que expresen de manera exógena CD1d y un antígeno del cáncer, y además que apliquen a las células pulsos de α -galactosilceramida (α -GalCer) (Literatura de patentes 1 a 3). Esta aAVC activa las células T asesinas naturales (NKT) por medio de su complejo CD1d/ α -GalCer, y las células NKT activadas producen citoquinas tales como interferón γ (IFN- γ), que a su vez activa las células asesinas naturales (NK) o similares. En modelos de ratón, se ha demostrado que la administración de aAVC tiene efecto antitumoral dependiente de las células NK (Literatura de patentes 1 a 3). La aAVC administrada a un ratón es asesinada de inmediato por las células NKT activadas *in vivo*, y los fragmentos de la aAVC son captadas por las células dendríticas. Las células dendríticas que captan los fragmentos de aAVC presentan un fragmento del antígeno del cáncer con el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) en la superficie de la célula, e induce las células T específicas para el antígeno de cáncer. En modelos de ratón, se ha demostrado que la administración de aAVC ha tiene efecto antitumoral mediante la inducción de las células T específicas para el antígeno de cáncer (Literatura de patente 1 a 3 y Literatura no patente 5 y

6). Por consiguiente, aAVC ha demostrado su capacidad para inducir poderosamente dos mecanismos inmunológicos, es decir, la activación de inmunidad innata exhibida por la activación de células NK mediada por la activación de las células NKT y la inducción de inmunidad adaptativa demostrada por la inducción de células T específicas para el antígeno de cáncer.

[Lista de Menciones]

[Literatura de patente]

[0005]

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

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

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

[Literatura no patente]

[0006]

[Literatura no patente 1] Thomas R. et al., "Frontiers in Immunology", (Suiza), 2018; 9: 947

[Literatura no patente 2] Gasser O. et al., "Cancer Immunology, Immunotherapy", (Alemania), 2018; 67 (2): 285-298

[Literatura no patente 3] Robbins P.F. et al., "Clinical Cancer Research", (E.E.U.U.), 2015; 21 (5): 1019-1027

[Literatura no patente 4] Mahipal A. et al., "Cancer Immunology, Immunotherapy", (Alemania), 2019; 68 (7): 1211-1222

[Literatura no patente 5] Shimizu K. et al., "Cancer Research", (E.E.U.U.), 2013; 73 (1): 62-73

[Literatura no patente 6] Shimizu K. et al., "Cancer Research", (E.E.U.U.), 2016; 76 (13): 3756-3766

[Síntesis de la invención]

[Problema Técnico]

[0007]

Un objetivo de la presente invención es dar a conocer aAVC que expresan de manera estable NY-ESO-1 o un fragmento de ésta.

[Solución al Problema]

[0008]

Los inventores de la presente han llevado a cabo considerables y meticulosos estudios sobre la preparación de aAVC que expresan NY-ESO-1 como antígeno de cáncer y, como resultado de éstos, obtuvieron exitosamente aAVC que expresan NY-ESO-1 de manera estable. Específicamente, los inventores de la presente han descubierto un problema de la NY-ESO-1 expresada constitutivamente, que es la reducción del nivel de expresión y la tasa positiva al aumentar el número de días de cultivo, y solucionaron el problema mediante estudios concienzudos. Específicamente, los inventores de la presente han descubierto que las

células que expresan NY-ESO-1 de manera inducible con un promotor inducible (especialmente, un promotor inducible mediante fármacos) exhiben un nivel de expresión de NY-ESO-1 más elevado que en el caso de la NY-ESO-1 que se expresa de manera constitutiva, y han obtenido con éxito aAVC que expresan de manera estable y elevada NY-ESO-1 bajo el control de un promotor inducible (Ejemplo 2-2). Específicamente, la presente invención da a conocer una aAVC que se puede utilizar para el tratamiento de un cáncer, un método para la producción de la aAVC, una composición farmacéutica que comprende la aAVC, un método para tratar un cáncer con la aAVC, etc.

[0009]

Específicamente, la presente invención puede incluir los siguientes aspectos como sustancia o método de utilidad medicinal o industrial.

[0010]

[1] Una célula de origen humano, que comprende un polinucleótido que codifica CD1d y un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible.

[2] La célula de acuerdo con [1], donde la NY-ESO-1 es NY-ESO-1 humana.

[3] La célula de acuerdo con [1] o [2], donde la CD1d es CD1d humana.

[4] La célula de acuerdo con cualquiera de los puntos [1] a [3], en la cual el promotor inducible es un promotor inducible por fármacos.

[5] La célula de acuerdo con [4], en la cual el promotor inducible por fármacos es un promotor inducible por tetraciclinas.

[6] La célula de acuerdo con [5], en la cual el promotor inducible por tetraciclinas es el promotor TRE3G.

[7] La célula de acuerdo con cualquiera de los puntos [1] a [6], donde la célula de origen humano es una célula normal.

[8] La célula de acuerdo con [7], donde la célula de origen humano es una célula derivada de una célula de riñón embrionario humana 293 (célula HEK293).

[9] La célula de acuerdo con cualquiera de los puntos [1] a [8], que expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta.

[10] La célula de acuerdo con [9], en la cual el nivel de expresión de NY-ESO-1 o un fragmento de ésta es de 245 ng a 45000 ng por 10^6 células.

[11] La célula de acuerdo con [9] o [10], en la cual hay un ligando de CD1d cargado en la superficie celular.

[12] La célula de acuerdo con [11], en la cual el ligando de CD1d es un α -GalCer.

[13] Una composición farmacéutica que comprende una célula de acuerdo con [11] o [12].

[14] La composición farmacéutica de acuerdo con [13] para usar en el tratamiento de un cáncer.

[15] Un método para tratar un cáncer, que comprende el paso de administrar una célula de acuerdo con [11] o [12] a un sujeto.

[16] La célula de acuerdo con [11] o [12] para el tratamiento de un cáncer.

[17] El uso de una célula de acuerdo con [11] o [12] para la producción de una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un cáncer.

[18] Un método para la producción de una célula para usar en el tratamiento de un cáncer, que comprende el paso de cultivar una célula de acuerdo con cualquiera de los puntos [1] a [8] en presencia de un inductor del promotor inducible, para inducir de esa manera la expresión de NY-ESO-1 o un fragmento de ésta.

[19] El método de acuerdo con [18], que comprende además el paso de carga de α -GalCer sobre la superficie de la célula.

[20] Un método para la producción de una célula para utilizar en el tratamiento de un cáncer, que comprende el paso de:

introducir un polinucleótido que codifica CD1d y un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en una célula de origen humano, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible;
o

introducir un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en una célula de origen humano que expresa CD1d en forma endógena, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible.

[21] El método de acuerdo con [20], que comprende además el paso de cultivar la célula obtenida en el paso en presencia de un inductor del promotor inducible, para inducir de esa manera la expresión de NY-ESO-1 o un fragmento de ésta.

[22] El método de acuerdo con [21], que comprende además el paso de carga de α -GalCer sobre la superficie de la célula.

[23] Un método para tratar un cáncer, que comprende el paso de administrar una célula de acuerdo con [11] o [12] y un inhibidor de los puntos de control inmunitario a un sujeto.

[24] El método de acuerdo con [23], en el cual el inhibidor de los puntos de control inmunitario es un inhibidor de los puntos de control inmunitario PD-1 o un inhibidor de los puntos de control inmunitario CTLA-4.

[25] Un método para producir una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un cáncer, que comprende los siguientes pasos:

descongelar un producto congelado que comprende una célula de origen humano clonada que comprende un polinucleótido que codifica CD1d y un polinucleótido que

codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible;

propagar la célula humana contenida en el producto congelado para inducir la expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta y

cargar α -GalCer en la superficie de la célula.

[0011]

La célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención y la composición farmacéutica de la presente invención pueden ser utilizadas en el tratamiento de un cáncer.

[BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS]

[0012]

[Figura 1-1] La Figura 1-1 ilustra el efecto inductor de células T específicas para el antígeno de las células aAVC83T3)-NY-ESO1 en términos del número de células T específicas para NY-ESO-1 en ratones a los que se administran las células aAVC83T3)-NY-ESO1. La ordenada ilustra el número de puntos presentes en 4×10^5 células de bazo contadas con un Lector ELISPOT. En la abscisa, Vehículo indica un grupo control al que se administra BINACATE y aAVC-NY representa un grupo al que se administra aAVC(3T3)-NY-ESO-1. PAP y NY representan el péptido PAP y el péptido NY-ESO-1, respectivamente, utilizados en la estimulación. "-" indica la no adición del péptido. Se

indica el número de puntos por individuo y la media $\pm$ error standard de la media del número de puntos.

[Figura 1-2] La Figura 1-2 ilustra el efecto antitumoral de las células aAVC83T3)-NY-ESO1 en ratones con cáncer B16 con expresión de NY-ESO-1 y en ratones con cáncer B16-F10. La ordenada indica el volumen de un tumor y la abscisa indica el número de días después de la inoculación de las células cancerosas. Las rayas verticales ilustran la media $\pm$ error standard de la media, y el número de ratones en el momento de la medición está indicado entre paréntesis. Se calculó un valor P de probabilidad de significancia (**: $P < 0,01$) comparando el volumen del tumor el día 20 entre un grupo al que se administró vehículo and un grupo al que se administraron células aAVC(3T3)-NY-ESO-1 mediante un test t de Student;

[Figura 1-3] La Figura 1-3 ilustra el efecto antitumoral de las células aAVC83T3)-NY-ESO1 en ratones con cáncer con expresión de NY-ESO-1. La ordenada indica el volumen de un tumor y la abscisa indica el número de días después de la inoculación con células aAVC(3T3)-NY-ESO-1. Las rayas verticales ilustran la media $\pm$ error standard de la media . Se calculó un valor P de probabilidad de significancia (**: $P < 0,01$) comparando el volumen del tumor el día 10 entre un grupo al que se administró vehículo y un grupo al que se administraron células aAVC(3T3)-NY-ESO-1 mediante el test de comparaciones múltiples de Dunnett;

[Figuras 2-1] Las Figuras 2-1 a 2-4 ilustran el cambio dependiente del tiempo de diversos índices de un acervo celular CD1d FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_ (CMV en el dibujo) un acervo celular CD1d FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d (Tet-on en el dibujo). La Figura 2-1 ilustra los niveles de expresión de NY-ESO-1 por 1×10^6 células de CMV y Tet-on. La ordenada indica el nivel de expresión de NY-ESO-1 y la abscisa indica el número de días de cultivo después de la infección;

[Figura 2-2] La Figura 2-2 ilustra las tasas de NY-ESO-1 positiva de CMV y Tet-on. La ordenada indica la tasa positiva de NY-ESO-1 y la abscisa indica el número de días de cultivo después de la infección;

[Figura 2-3] La Figura 2-3 ilustra las tasas de sobrevida de CMV y Tet-on. La ordenada indica la tasa de sobrevida de la célula de cada grupo, y la abscisa indica el número de días de cultivo después de la infección;

[Figura 2-4] La Figura 2-4 ilustra los tiempos de duplicación de las células de CMV y Tet-on. La ordenada indica el tiempo de duplicación, y la abscisa indica el número de días de cultivo después de la infección;

[Figura 3] La Figura 3 ilustra Los niveles de expresión de NY-ESO-1 en diversos clones aislados de un acervo celular CD1d FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1 (CMV en el dibujo) y un acervo celular CD1d FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1 (Tet-on en el dibujo). No. representa los números

de clones, y los valores numéricos ilustran Los niveles de expresión de NY-ESO-1 por 1×10^6 células;

[Figura 4-1] La Figura 4-1 ilustra los efectos antitumorales de las células aAVC83T3)-NY-ESO1, un anticuerpo anti-PD-1 y el uso combinado de éstos en ratones con cáncer con expresión de NY-ESO-1. La ordenada indica el volumen de un tumor, y la abscisa indica el número de días después de la administración de las células aAVC(3T3)-NY-ESO-1. Las rayas verticales ilustran la media $\pm$ error standard de la media, y el número de ratones en el momento de la medición está indicado entre paréntesis;

[Figura 4-2] La Figura 4-2 ilustra los efectos antitumorales de las células aAVC83T3)-NY-ESO1, un anticuerpo anti-PD-1 y el uso combinado de los mismos en ratones CT26 con cáncer que expresa NY-ESO-1. La ordenada indica el volumen de un tumor, y la abscisa indica el número de días después de la administración de las células aAVC(3T3)-NY-ESO-1. Las rayas verticales ilustran la media $\pm$ el error standard y

[Figura 5] La Figura 5 ilustra los efectos antitumorales de las células aAVC83T3)-NY-ESO1, un anticuerpo anti-CTLA-4 y el uso combinado de los mismos en ratones CT26 con cáncer que expresa NY-ESO-1. La ordenada indica el volumen de un tumor, y la abscisa indica el número de días después de la inoculación de las células cancerosas. Las rayas verticales ilustran la media $\pm$ el error standard. $n = 9$ en el caso del uso combinado de las

células aAVC83T3)-NY-ESO1 y los anticuerpos anti-CTLA-4 el día 18 o más tarde.

[DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS]

[0013]

En Adelante se describe la presente invención en forma detallada. Sin embargo, la presente invención no se limita a la descripción detallada expuesta a continuación. Los términos científicos y los términos técnicos empleados en relación con la presente invención tienen los significados conocidos en general por las personas con capacitación en la técnica, a menos que se específicamente se indique lo contrario en la presente.

[0014]

<Célula vector adyuvante artificial>

En la presente memoria descriptiva, los términos "célula vector adyuvante artificial" y "aAVC" tienen el mismo significado se los utiliza de modo intercambiable. Los términos se refieren a una célula que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido CD1d (al que en adelante, se hace referencia asimismo como "CD1d") y uno o más polinucleótidos que codifican uno o dos o más antígenos de cáncer arbitrarios o fragmentos de los mismos.

En la presente memoria descriptiva, la frase "que comprende un polinucleótido" se refiere a un estado en el cual se ha introducido una célula tiene el polipéptido de

manera endógena, o el polinucleótido en una célula mediante un método exógeno. En este contexto, el término "endógeno" o "de manera endógena" se pueden utilizar con el significado que normalmente le atribuyen las personas con capacitación en la técnica, en el sentido de que una célula aislada comprende un gen o polinucleótido determinado o expresa una proteína. Los términos "exógeno" o "de manera exógena" se utilizan en forma intercambiable para referirse a la introducción de un gen o polinucleótido preparado de manera artificial en una célula de interés mediante una operación tal como manipulación génica o introducción de genes, y a la expresión artificial de una proteína codificada por el gen o el polinucleótido introducido artificialmente en la célula de interés.

[0015]

<Célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención>

La presente invención da a conocer
una célula de origen humano que comprende
un polinucleótido que codifica CD1d, y
un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible
(en la presente memoria descriptiva, también se la denomina "célula aAVC-NY-ESO-1").

[0016]

1. Célula de origen humano

La célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula normal o una célula obtenida de un tejido canceroso, y puede expresar CD1d de manera endógena.

Se puede emplear una célula obtenida de un humano, tal como una célula aislada y/o purificada extraída de un tejido humano arbitrario, una célula obtenida de una especie específica de células, una línea celular establecida obtenida de un tejido humano, o una célula diferenciada de una célula madre como célula normal. La célula normal puede tener capacidad para proliferar. Se puede emplear una célula aislada y/o purificada extraída de un tejido canceroso de un paciente, o una línea celular establecida derivada de un tejido canceroso humano como célula derivada de un tejido canceroso. En este contexto, el término "aislamiento" se refiere a la separación de un tejido vivo. El término "purificación" se refiere a la separación de una célula derivada de una célula derivada de un humano de uno o más componentes adicionales contenidos en un tejido del cual se obtiene la célula. El aislamiento y purificación de las células se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos en la técnica. En una forma de realización, la célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula normal.

[0017]

La célula aislada y/o purificada a partir de un tejido humano arbitrario puede ser una célula derivada de un tejido humano arbitrario del estómago, intestino delgado,

intestino grueso, pulmón, páncreas, riñón, hígado, timo, bazo, próstata, ovario, útero, médula ósea, piel, músculo, sangre periférica o similar. La célula aislada y/o purificada a partir de un tejido humano arbitrario puede tener la capacidad de proliferar. En una forma de realización, la célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula no hemocito.

[0018]

La célula obtenida de una especie específica de células es una célula derivada de una especie específica de células de un tejido humano (por ej., células epiteliales, células endoteliales, células epidérmicas, células estromales, fibroblastos, tejidos adiposos, células de glándula mamaria, células mesangiales, células β pancreáticas, células nerviosas, células de la glía, células epiteliales exocrinas, células endócrinas, células musculoesqueléticas, células de la musculatura lisa, células de miocardio, osteoblastos, células embrionarias o células inmunes (por ej., células dendríticas, macrófagos y células B)).

[0019]

Ese tipo de línea celular establecida derivada de un tejido humano se puede preparar mediante el uso de un método conocido por las personas con capacitación en la técnica, o se las puede obtener en el mercado. Los ejemplos de líneas celulares incluyen las células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) (J. Gen. Virol.; 1977; 36:

59-74), células WI-38, células SC-01MFP y células MRC-5, así como células derivadas de estas células. En una forma de realización, la célula de origen humano utilizada en la presente invención es una célula derivada de una célula HEK293. En una forma de realización, la célula obtenida de una célula HEK293 es una célula FreeStyle™ 293-F.

[0020]

La célula diferenciada de una célula madre es una célula diferenciada de una célula madre pluripotente inducida de origen humano (célula iPS) o una célula madre embrionaria (célula ES). Las células iPS o las células ES y las células derivadas de estas se pueden preparar utilizando métodos conocidos por las personas con capacitación en la técnica.

[0021]

La célula obtenida de un tejido canceroso se puede obtener mediante aislamiento y/o purificación a partir de un tejido canceroso de un paciente por un método conocido por las personas con capacitación en la técnica. Por otra parte, las personas con capacitación en la técnica pueden utilizar generalmente una línea celular establecida derivada de un tejido canceroso humano que se puede obtener en un instituto tal como la American Type Culture Collection (ATCC(R)).

[0022]

2. NY-ESO-1

La célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención comprende un polinucleótido que codifica el carcinoma de células escamosas de esófago de New York 1 (NY-ESO-1) o un fragmento de éste como antígeno de cáncer. Se observa que NY-ESO-1, una proteína también llamada antígeno de cáncer/testículo 1 (CTAG1), se expresa en diversos cánceres, aunque se conoce por su expresión únicamente en el tejido testicular entre los tejidos adultos normales.

[0023]

La NY-ESO-1 utilizada en la presente invención puede ser NY-ESO-1 de origen natural o puede ser una forma modificada de la misma, siempre que la forma modificada induzca células T específicas para NY-ESO-1 al administrársela como aAVC. En una forma de realización, la NY-ESO-1 empleada en la presente invención es NY-ESO-1 derivada de un mamífero (por ej., humanos, monos, ratones, ratas, perros y chimpancés). En una forma de realización, la NY-ESO-1 es NY-ESO-1 humana. En una forma de realización, la NY-ESO-1 humana es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. En una forma de realización, la NY-ESO-1 humana es un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos 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 un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. En una forma de realización, la NY-ESO-1 humana es un polipéptido que consiste en una

secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 mediante la delección, sustitución y/o adición de 1 o varios, preferentemente de 1 a 10, más preferentemente de 1 a 7, aun más preferentemente de 1 a 5, 1 a 3, o 1 o 2 aminoácidos. La NY-ESO-1 empleada en la presente invención puede ser un fragmento de NY-ESO-1 siempre que el fragmento induzca células T específicas para NY-ESO-1 cuando se lo administra como aAVC. En una forma de realización, el fragmento de NY-ESO-1 es un fragmento de NY-ESO-1 humana. En una forma de realización, el fragmento de NY-ESO-1 humana es un polipéptido que posee 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 55% o más, 60% o más, 65% o más, 70% o más, 75% o más, 80% o más, 85% o más, 90% o más, o 95% o más de la longitud de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2. La inducción de células T específicas para NY-ESO-1 mediante la administración como aAVC puede ser evaluada mediante un método descripto, por ejemplo, en el Ejemplo 1-2 que se cita más adelante. El polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta utilizado en la presente invención se puede preparar diseñando una secuencia de nucleótidos a partir de la secuencia de aminoácidos de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta utilizado mediante el uso de un método conocido en la técnica. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 es un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

[0024]

En la presente memoria descriptiva, el término "identidad" se refiere a un valor de Identidad obtenido a partir de los parámetros provistos por defecto utilizando EMBOSS Needle (Nucleic Acids Res.; 2015; 43: W580-W584).

Los parámetros antes descriptos son los siguientes:

Penalidad por Brecha Abierta ("Gap Open") = 10

Penalidad por Extensión de Brecha ("Gap Extend") = 0,5

Matriz = EBLOSUM62

Penalidad por Cierre de Brecha ("End Gap") = falsa

[0025]

3. CD1d

La célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención comprende un polinucleótido que codifica CD1d. CD1d es una glucoproteína MHC del tipo de clase I que se expresa en la superficie celular. La CD1d utilizada en la presente invención puede ser una CD1d de origen natural o una forma modificada de ésta, siempre que la CD1d cumpla la función de CD1d al ser expresada por la célula de origen humano. Los ejemplos de función de la CD1d incluyen la capacidad para unirse a un ligando de CD1d (por ej., α -GalCer). La capacidad de CD1d para unirse a un ligando de CD1d puede ser fácilmente evaluada por las personas con capacitación en la técnica utilizando un método conocido en la técnica. Por otro lado, se puede evaluar la función de CD1d empleando la capacidad de la aAVC para activar las células

NKT humanas como índice. Esta capacidad para activar las células NKT humanas puede ser evaluada mediante un sistema de evaluación *in vitro* descrito, por ejemplo, en la Fig. 1 de la Literatura no patente 5. En pocas palabras, la activación de las células NKT puede ser evaluada mediante el cocultivo de células que expresan CD1d en presencia de α -GalCer con células NKT, y midiendo la cantidad de IFN- γ en la solución de cultivo.

[0026]

En una forma de realización, la CD1d utilizada en la presente invención es CD1d derivada de un mamífero (por ej., humanos, monos, ratones, ratas, perros y chimpancés). En una forma de realización, la CD1d es CD1d humana. En una forma de realización, la CD1d humana es un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4. En una forma de realización, la CD1d humana es un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 con la delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 10, 1 a 7, 1 a 5, 1 a 3, o 1 o 2 aminoácidos, y tiene función de CD1d. En una forma de realización, la CD1d humana es un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos 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 un polipéptido expuesto en SEQ ID NO: 4, y tiene función de CD1d.

[0027]

El polinucleótido que codifica CD1d, utilizado en la presente invención puede ser un polinucleótido endógeno de la célula de origen humano usada, o un polinucleótido introducido de manera exógena. En el caso de la introducción exógena del polinucleótido que codifica CD1d en la célula de origen humano, el polinucleótido se puede preparar diseñando una secuencia de nucleótidos de la secuencia de aminoácidos de la CD1d usada mediante el uso de un método conocido en la técnica. En una forma de realización, el polinucleótido que codifica CD1d es un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

[0028]

4. Promotor

En la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención, el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible. En la presente memoria descriptiva, la frase "operativamente ligado" se refiere a un estado en el cual un promotor está ligado a un polinucleótido con el fin de controlar la expresión del polipéptido en las células huésped mediante el promotor. En la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención, en el caso de la introducción exógena del polinucleótido que codifica CD1d en la célula de origen humano, el polinucleótido puede estar operativamente ligado a un promotor. En este caso, se puede utilizar ya sea un promotor que promueve

constitutivamente la expresión o un promotor inducible como promotor para la expresión de CD1d.

[0029]

El término "promotor inducible" es un promotor que promueve la expresión de manera inducible, y se refiere a un promotor que puede inducir la expresión de un polinucleótido operativamente ligado al promotor en presencia de un inductor que drives el promotor (al que también se hace referencia, en la presente memoria descriptiva, como "inductor del promotor inducible" o simplemente "inductor"). Los ejemplos del promotor inducible incluyen promotores inducibles por calor (por ej., promotor de choque térmico) y promotores inducibles por fármacos. En una forma de realización, el promotor inducible es un promotor inducible por fármacos. En la presente memoria descriptiva, el término " promotor inducible por fármacos " se refiere a un promotor que regula la expresión de un polinucleótido operativamente ligado al promotor por medio de una fármaco inductora. Entre los ejemplos de promotores inducibles por fármacos se cuentan la secuencia de operador de cumato, la secuencia de operador λ (por ej., $12 \times \lambda Op$), y un promotor inducible de un sistema de inducción de la expresión génica de tetraciclina (al que en adelante se hace referencia como "promotor inducible por tetraciclina"). La secuencia de operador de cumato se inactiva en presencia del represor CymR, pero se disocia del represor CymR en presencia de un

inductor de cumato para inducir la expresión de un polinucleótido operativamente ligado al promotor. La secuencia de operador λ induce la expresión de un polinucleótido operativamente ligado al promotor en presencia de un inductor, tal como cumermicina, que dimeriza un activador (λ Rep-GyrB-AD) que tiene capacidad para activar la transcripción mediante la dimerización. El promotor inducible por tetraciclinas induce la expresión de un polinucleótido operativamente ligado al promotor en presencia de un inductor tetraciclina o un derivado de ésta (por ej., doxiciclina) y un transactivador inverso controlado por tetraciclina (rtTA) (por ej., Tet-On 3G). Los ejemplos de promotores inducibles por tetraciclinas incluyen el promotor TRE3G. En una forma de realización, el promotor inducible por fármacos es un promotor inducible por tetraciclinas. En una forma de realización, el promotor inducible por tetraciclinas es el promotor TRE3G.

[0030]

Los ejemplos de promotores que promueven constitutivamente la expresión incluyen promotores derivados de virus tales como el CMV (citomegalovirus), RSV (virus sincicial respiratorio) y SV40 (virus del simio 40), el promotor de actina y el promotor 1 α del EF (factor de elongación).

[0031]

En la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención, se puede inducir la expresión de NY-ESO-1 o un fragmento de ésta mediante el cultivo de la célula en presencia del inductor del promotor inducible. En una forma de realización, la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención expresa NY-ESO-1 o un fragmento de ésta. En una forma de realización, la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta. En una forma de realización, el límite inferior del nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención puede ser superior a 88 ng, 90 ng o más, 100 ng o más, 150 ng o más, 200 ng o más, 245 ng o más, 250 ng o más, 300 ng o más, 400 ng o más, 500 ng o más, 600 ng o más, 700 ng o más, 800 ng o más, 900 ng o más, 1000 ng o más, 1500 ng o más, 2000 ng o más, 2500 ng o más, 3000 ng o más, 4000 ng o más, 5000 ng o más, 6000 ng o más, 7000 ng o más, 8000 ng o más, 9000 ng o más, o 10000 ng o más, y el límite superior del mismo puede ser de 30000 ng o menos, 35000 ng o menos, 40000 ng o menos, 43890 ng o menos, 45000 ng o menos, 50000 ng o menos, 55000 ng o menos, o 60000 ng o menos, por cada 10^6 células. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 89 ng a 50000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de

89 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 89 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 89 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 89 ng a 35000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 106 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 106 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 106 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 106 ng a 35000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 245 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 245 ng

a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 245 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 245 ng a 35000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 1000 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 1000 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 1000 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es de 1000 ng a 35000 ng.

[0032]

5. Ligando de CD1d

En una forma de realización, en la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención, se puede cargar un ligando de CD1d en la superficie de la célula. En la presente memoria descriptiva, la frase "se ha cargado un ligando de CD1d en la superficie de la célula" se refiere a un estado en el cual el ligando de CD1d está unido a la superficie

de la célula aAVC. La carga del ligando de CD1d sobre la superficie de la célula se puede realizar pulsando células que expresan CD1d con el ligando de CD1d (por ej., α -GalCer), de acuerdo con lo descrito en la sección <Método para la preparación de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención>. En la presente memoria descriptiva, la frase "pulsos con el ligando de CD1d" se refiere al contacto de las células con el ligando de CD1d en un medio de cultivo. En la aAVC pulsada con el ligando de CD1d, se carga el ligando de CD1d en la totalidad o, por lo menos una parte de las moléculas de CD1d.

[0033]

Los ejemplos del ligando de CD1d utilizado en la presente invención incluyen la α -galactosilceramida (α -GalCer), α -C-galactosilceramida (α -C-GalCer), 7DW8-5 e isoglobotrihexosilceramida (iGb3). En una forma de realización, el ligando de CD1d es α -GalCer. α -GalCer, cuya denominación química es (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactosil)-N-hexacosanoil-2-amino-1,3,4-octadecantriol, es una sustancia registrada bajo la designación CAS RN: 158021-47-7 y representada por la fórmula molecular: $C_{50}H_{99}NO_9$ (peso molecular: 858,34). La α -GalCer puede ser sintetizada de acuerdo con una técnica conocida en el medio, o puede ser un producto existente en el mercado (por ej., se puede utilizar α -Galactosilceramida (Funakoshi Co., Ltd., Cat. KRN7000)).

[0034]

<Método para la preparación de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención>

La célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención se puede preparar mediante la introducción de un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, y, en caso de ser necesario, de un polinucleótido que codifica CD1d, en una célula de origen humano, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible. El método para la preparación de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención puede comprender además los siguientes pasos: cultivar la célula aAVC-NY-ESO-1; clonar la célula y cargar un ligando de CD1d sobre la superficie de la célula.

[0035]

1. Introducción del polinucleótido en la célula de origen humano

La célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención se puede preparar mediante la introducción de un polinucleótido que codifica CD1d y un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de éste en una célula de origen humano, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de éste está operativamente ligado a un promotor inducible (en adelante, también se hace referencia a los polinucleótidos que se han de introducir como "polinucleótidos de interés"). Por otro lado, en caso de utilizar una célula que expresa CD1d en forma

endógena como célula de origen humano, la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención se puede preparar mediante la introducción de un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de éste en una célula de origen humano que expresa CD1d en forma endógena, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de éste está operativamente ligado a un promotor inducible.

[0036]

El polinucleótido que codifica CD1d y el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de éste pueden ser diseñados y preparados mediante el uso de un método de biología molecular y/o química, por ejemplo, obteniendo secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos del NCBI RefSeq ID o números de Acceso de GenBank. Por ejemplo, estos polinucleótidos pueden ser sintetizados mediante el uso de un método de fosforamidita basado en sus secuencias nucleotídicas o se pueden preparar combinando fragmentos de ADN obtenidos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genotecas de ADNc.

[0037]

La introducción de los polinucleótidos de interés en la célula de origen humano se puede llevar a cabo mediante el uso de cualquier método con un sistema sin vector viral o un sistema de vector viral, como por ej. electroporación, lipofección o microinyección. En caso de utilizar un método con un sistema sin vector viral, los polinucleótidos

de interés pueden estar en una forma tal como un vector plasmídico o ADNc o en forma de ARNm.

[0038]

Se puede usar el vector plasmídico o el vector viral como vector de expresión para la expresión exógena de CD1d o NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula de origen humano. No hay restricciones específicas en cuanto al vector de expresión siempre que el vector de expresión permita la expresión del polipéptido de interés. El vector de expresión se puede preparar mediante el uso de un método conocido por las personas con capacitación en la técnica. Como vector de expresión se puede emplear, por ejemplo, el vector de expresión de la serie pCDNA (Thermo Fisher Scientific Inc.), pALTER(R)-MAX (Promega Corp.), o bien se puede utilizar pHEK293 Ultra (Takara Bio Inc.) como vector plasmídico, y, por ejemplo, lentivirus, adenovirus, retrovirus o virus adenoasociado como vector viral. Por ejemplo, en caso de utilizar lentivirus en la introducción del polinucleótidos de interés en la célula de origen humano, el lentivirus se puede preparar usando el vector pLV SIN-CMV/EF1 α (Takara Bio Inc.) o el vector pLenti (Thermo Fisher Scientific Inc.). Cuando se hace que la célula de origen humano exprese de manera exógena CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, se puede introducir el polinucleótido que codifica CD1d y el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula de origen humano utilizando un solo vector de expresión, o se

lo puede introducir en la misma utilizando vectores de expresión separados. El vector de expresión puede contener además un gen con capacidad para cumplir la función de marcador (por ej., un gen de resistencia a las fármacos, un gen que codifica una enzima reportera o un gen que codifica una proteína fluorescente) para confirmar la expresión del gen o del polinucleótido de interés. El vector de expresión puede contener además un codón de inicio y un codón de terminación, una secuencia intensificadora, una región no traducida, una unión de empalme, un sitio de poliadenilación o una unidad replicable, etc.

[0039]

En una forma de realización, el método para la preparación de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención comprende el paso de introducir un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica CD1d y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en una célula de origen humano, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible. En una forma de realización, el método para la preparación de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención comprende el paso de introducir un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica CD1d y un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de

ésta en una célula de origen humano, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible. En una forma de realización, el método para la preparación de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención comprende el paso de introducir un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en una célula de origen humano que expresa CD1d en forma endógena, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible. En una forma de realización con referencia a estos métodos, el vector de expresión es un vector plasmídico o un vector viral. En una forma de realización, el vector de expresión es un vector viral. En una forma de realización, el vector viral es un vector lentiviral.

[0040]

En una forma de realización, la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es una célula preparada mediante la introducción de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica CD1d y un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en una célula de origen humano, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible. En una forma de realización, la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es una célula preparada mediante la

introducción de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica CD1d y un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en una célula de origen humano, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible. En una forma de realización, la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es una célula preparada mediante la introducción de un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en una célula de origen humano que expresa CD1d en forma endógena, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible. En una forma de realización, en lo que respecta a estas células, el vector de expresión es un vector plasmídico o un vector viral. En una forma de realización, el vector de expresión es un vector viral. En una forma de realización, el vector viral es un vector lentiviral. En una forma de realización, la célula aAVC-NY-ESO-1 preparada contiene el polinucleótido que codifica CD1d y el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en forma extracromosómica o en un ADN genómico del núcleo de la célula, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible. En una forma de realización, la célula preparada tiene el polinucleótido que codifica CD1d y el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de

ésta en el ADN genómico del núcleo de la célula, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible.

[0041]

2. Cultivo de la célula aAVC-NY-ESO-1

También se puede hacer proliferar la célula aAVC-NY-ESO-1 preparada mediante el método precedentemente descrito mediante cultivo. El cultivo celular para el mantenimiento o proliferación de la célula aAVC-NY-ESO-1 se lleva a cabo usando un método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar el medio MEM (Science; 1952; 122: 501), el medio DMEM (Virology; 1959; 8: 396-397), el medio RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc.; 1967; 199: 519-524), el medio 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 1950; 73: 1-8), el medio de Expresión FreeStyle™ 293 (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 12338022), el medio CD 293 (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 11913019) o el medio de Expresión Expi293™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. A1435101) como medio basal. El medio de cultivo puede contener, por ejemplo, suero (por ej., suero fetal bovino), un reemplazo del suero (por ej., Reemplazo de Suero KnockOut: KSR), un ácido graso o un lípido, un aminoácido, una vitamina, un factor de crecimiento, una citoquina, un antioxidante, 2-mercaptoetanol, ácido pirúvico, un búfer, una sal inorgánica o un antibiótico. En una forma de realización, el medio para usar en el cultivo es un medio sin suero o un medio definido químicamente.

[0042]

Las personas con capacitación en la técnica pueden elegir las condiciones de cultivo (por ej., condiciones de cultivo tales como tiempo de cultivo, temperatura, pH del medio y concentración de CO₂) que consideren apropiadas. El pH del medio es preferentemente aproximadamente 6 a 8. La temperatura de cultivo no está sujeta a restricciones específicas y es, por ejemplo, de aproximadamente 30 a 40°C, preferentemente aproximadamente 37°C. La concentración de CO₂ es de aproximadamente 1 a 10%, preferentemente aproximadamente 5%. El tiempo de cultivo no está sujeto a restricciones específicas, y el cultivo se lleva a cabo durante aproximadamente 15 a 336 horas. En caso de ser necesario, se puede realizar el aireado o agitación.

[0043]

En el momento de cultivo de la célula aAVC-NY-ESO-1, se puede inducir la expresión de NY-ESO-1 o un fragmento de ésta poniendo en contacto a las células aAVC-NY-ESO-1 con un inductor del promotor inducible. En una forma de realización, el método para la preparación de la célula aAVC-NY-ESO-1 comprende el paso de cultivar la célula aAVC-NY-ESO-1 en presencia de un inductor del promotor inducible, para inducir de esa manera la expresión de NY-ESO-1 o un fragmento de ésta. En una forma de realización, el promotor inducible es un promotor inducible por fármacos, y el método de preparación comprende el paso de

cultivar la célula aAVC-NY-ESO-1 en presencia de un inductor del promotor inducible por fármacos. En caso de utilizar un promotor inducible por fármacos, se puede inducir la expresión de un gen o un polinucleótido operativamente ligado al promotor inducible por fármacos mediante el cultivo de la célula en un medio suplementado con una fármaco inductora tal como tetraciclina, doxiciclina, cumato o cumermicina. Este paso se puede realizar de conformidad con un método de inducción génica utilizando un sistema general de inducción génica. En una forma de realización, el promotor inducible por fármacos es un promotor inducible por tetraciclinas, y el método de preparación comprende el paso de cultivar la célula aAVC-NY-ESO-1 en presencia de a tetraciclina o un derivado de ésta y rtTA. En una forma de realización, el promotor inducible por tetraciclinas es el promotor TRE3G y el método de preparación comprende el paso de cultivar la célula aAVC-NY-ESO-1 en presencia de tetraciclina o un derivado de ésta y Tet-On 3G. Los niveles de expresión de la CD1d y la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida se pueden medir mediante un método conocido por las personas con capacitación en la técnica, tal como transferencia Western, ELISA o citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD1d o un anticuerpo anti-NY-ESO-1.

[0044]

3. Clonación de la célula aAVC-NY-ESO-1

En caso de introducir un polinucleótido en las células, coexisten células en las cuales se ha introducido el polinucleótido de interés y células en las cuales no se ha introducido el polinucleótido de interés. Además, en el caso de integrar un polinucleótido de interés al ADN genómico de un núcleo celular, la ubicación de esa integración también difiere según las células. Por consiguiente, esas células pueden constituir una población heterogénea. En la presente memoria descriptiva, se hace referencia a la población heterogénea de células como "acervo celular". Las células individuales en las cuales se ha introducido el polinucleótido que codifica CD1d y el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible (al que, en adelante, se hace referencia como "células clonadas") se pueden obtener mediante un método para obtener células que presentan un único genotipo del acervo celular (a lo que en la presente memoria descriptiva se hace referencia como "clonación" y se las hace proliferar, para obtener así una población celular con un único genotipo (al que en adelante se hace referencia como "población de células clonadas"). La clonación de la célula aAVC-NY-ESO-1 se puede llevar a cabo mediante el uso de un método muy conocido por las personas con capacitación en la técnica. Por ejemplo, se puede emplear un método por dilución limitante, un método de

clasificación de células individuales, o un método de recolección de colonias. En una forma de realización, el método para clonar la célula aAVC-NY-ESO-1 puede emplear un método o una combinación de dos o más métodos seleccionados entre un método por dilución limitante, un método de clasificación de células individuales o un método de recolección de colonias. En una forma de realización, el método para clonar la célula aAVC-NY-ESO-1 es un método por dilución limitante.

[0045]

Por cada clon de células aAVC-NY-ESO-1 obtenidas por el método antes descrito, poniendo en contacto una parte de las células del clon con un inductor de un promotor inducible y midiendo el nivel de expresión de CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en cada clon, se puede seleccionar una población de células aAVC-NY-ESO-1 clonadas que exhiben los niveles de expresión deseados de CD1d y NY-ESO-1 o fragmentos de ésta en presencia del inductor. La población de células clonadas seleccionada puede ser conservada en estado congelado (a lo que también se hace referencia como "producto congelado") y utilizada como banco de células para investigación (RCB). Las células del RCB se pueden cultivar para la proliferación, luego congelar y utilizar como banco maestro de células (MCB). Las células del MCB pueden ser cultivadas para la proliferación celular, luego congeladas y utilizadas con banco de células de trabajo (WCB). Las células del WCB

pueden ser cultivadas y utilizadas como materia prima farmacéutica. Cada banco de células puede contener un agente crioconservador. Cada banco de células puede ser distribuido en una pluralidad de recipientes (por ej., de 2 a 10000 recipientes, por ejemplo, de 10 a 1000 recipientes, por ejemplo, de 100 a 500 recipientes) y almacenado en estado congelado. El descongelamiento, cultivo y contacto con el inductor de las células aAVC-NY-ESO-1 clonadas, y la medición de los niveles de expresión de la CD1d y la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta se pueden realizar, en cada caso, mediante un método conocido por las personas con capacitación en la técnica. El cultivo, el contacto con el inductor y la medición de los niveles de expresión se pueden llevar a cabo recurriendo, por ejemplo, a un método descrito en "2. Cultivo de la célula aAVC-NY-ESO-1". En una forma de realización, el cultivo, el contacto con el inductor de las células aAVC-NY-ESO-1 clonadas, así como la medición de los niveles de expresión de la CD1d y la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta se pueden llevar a cabo después del descongelamiento del RCB y WCB.

[0046]

En una forma de realización, el límite inferior del nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de más de 88 ng, 90 ng o más, 100 ng o más, 150 ng o más, 200 ng o más, 245 ng o más, 250 ng o más, 300 ng o más, 400 ng o más, 500 ng o más, 600 ng o más, 700 ng o más, 800 ng o más, 900 ng o

más, 1000 ng o más, 1500 ng o más, 2000 ng o más, 2500 ng o más, 3000 ng o más, 4000 ng o más, 5000 ng o más, 6000 ng o más, 7000 ng o más, 8000 ng o más, 9000 ng o más, o 10000 ng o más, y el límite superior del mismo es de 30000 ng o menos, 35000 ng o menos, 40000 ng o menos, 43890 ng o menos, 45000 ng o menos, 50000 ng o menos, 55000 ng o menos, o 60000 ng o menos as el valor límite superior, por 10^6 células. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 89 ng a 50000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 89 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 89 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 89 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 89 ng a 35000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 106 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 106 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de

la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 106 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 106 ng a 35000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 245 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 245 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 245 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 245 ng a 35000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 1000 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 1000 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 1000 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 obtenida es de 1000 ng a 35000 ng.

[0047]

4. Carga del ligando de CD1d sobre la célula aAVC-NY-ESO-1

Se puede preparar una célula aAVC-NY-ESO-1 con un ligando de CD1d cargado sobre la misma enviando a la célula aAVC-NY-ESO-1 pulsos con el ligando de CD1d. Las condiciones para la pulsación del ligando de CD1d (por ej., el momento de la adición del ligando de CD1d a un medio de cultivo celular, la concentración del ligando de CD1d en el medio de cultivo y el tiempo de cultivo) pueden ser ajustadas de manera apropiada por las personas con capacitación en la técnica teniendo en cuenta la célula utilizada y las condiciones de cultivo. La concentración del ligando de CD1d que se ha de agregar al medio de cultivo para la célula aAVC-NY-ESO-1 no está sujeta a restricciones específicas y puede ser seleccionada de manera apropiada dentro del rango, por ejemplo, de 1 ng/mL a 10000 ng/mL. En una forma de realización, el ligando de CD1d es α -GalCer. En una forma de realización, la carga del ligando de CD1d sobre la célula aAVC-NY-ESO-1 se puede realizar antes del contacto de la célula con el inductor. En una forma de realización, la carga del ligando de CD1d sobre la célula aAVC-NY-ESO-1 se puede realizar después del contacto de la célula con el inductor. En una forma de realización, la carga del ligando de CD1d sobre la célula aAVC-NY-ESO-1 se puede realizar al mismo tiempo que el contacto de la célula con el inductor. En estas formas

de realización, la célula aAVC-NY-ESO-1 es preferentemente una célula clonada.

[0048]

Con la célula aAVC-NY-ESO-1 que expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta así preparada y con el ligando de CD1d cargado en ella, se puede detener la proliferación celular mediante un método artificial. El método para detener la proliferación de la célula no está sujeto a restricciones específicas. Por ejemplo, se puede usar un método para detener la proliferación celular mediante exposición a la radiación de un rayo radioactivo (por ej., rayos X), o un método que consiste en agregar una fármaco tal como mitomicina C. En una forma de realización, la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención puede ser una célula que expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta cuya proliferación se ha detenido. En una forma de realización, la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención puede ser una célula que expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta con un ligando de CD1d cargado en la misma y con proliferación detenida.

[0049]

<Composición farmacéutica, etc. de la presente invención>

La presente invención da a conocer asimismo una composición farmacéutica que comprende la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención. En la composición farmacéutica, la célula aAVC-NY-ESO-1 expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, y tiene un ligando de CD1d

cargado en su superficie. En una forma de realización, la composición farmacéutica es una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un cáncer. En una forma de realización, el ligando de CD1d es α -GalCer. La composición farmacéutica se puede preparar mediante un método utilizado habitualmente utilizando un excipiente conocido en la técnica, es decir, un excipiente para una fármaco, un vehículo para una fármaco o similar. Para la formulación de la composición farmacéutica, se puede emplear un excipiente, un vehículo, un aditivo o similar, apropiado para su forma de dosificación dentro de un rango farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de formas de dosificación de la composición farmacéutica incluyen agentes parenterales tales como inyecciones y agentes para infusiones por goteo. En una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un producto congelado de la célula aAVC-NY-ESO-1. En una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un producto congelado de la célula aAVC-NY-ESO-1 y un agente de crioconservación. En una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender una suspensión de la célula aAVC-NY-ESO-1. En una forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender una suspensión de la célula aAVC-NY-ESO-1 y un agente de crioconservación. La presente invención da a conocer asimismo el uso de la

célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención para la elaboración de una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un cáncer, donde la célula expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, y tiene un ligando de CD1d cargado en la superficie celular. En una forma de realización, el ligando de CD1d es α -GalCer. La presente invención da a conocer asimismo la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención para el tratamiento de un cáncer, donde la célula expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, y tiene un ligando de CD1d cargado en la superficie celular. En una forma de realización, el ligando de CD1d es α -GalCer.

[0050]

La presente invención da a conocer asimismo un método para tratar un cáncer, que comprende el paso de administrar la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención a un sujeto. En este método, la célula aAVC-NY-ESO-1 expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, y tiene un ligando de CD1d cargado en la superficie celular. En una forma de realización, el ligando de CD1d es α -GalCer. En la presente memoria descriptiva, el término "sujeto" se refiere a un mamífero (por ej., humanos, monos, ratones, ratas, perros y chimpancés). En una forma de realización, el sujeto es un humano. En la presente memoria descriptiva, el término "tratamiento" se utiliza en un sentido que incluye el tratamiento terapéutico y el tratamiento profiláctico. En el caso de

la administración de la célula aAVC-NY-ESO-1 a un sujeto, la célula aAVC-NY-ESO-1 puede ser administrada en forma de una composición farmacéutica que comprende esta célula y un excipiente farmacéuticamente aceptable al sujeto. La dosis de la célula aAVC-NY-ESO-1 administrada al sujeto y el número de dosis de ésta pueden ser ajustadas según corresponda de acuerdo con el tipo, posición y severidad del cáncer, la edad, peso corporal y condición del sujeto a tratar, etc. Por ejemplo, se puede utilizar una dosis para el sujeto de 1×10^3 células/kg a 1×10^9 células/kg por dosis como dosis de la célula aAVC-NY-ESO-1. En cuanto al método para administrar la célula aAVC-NY-ESO-1 al sujeto, la célula puede ser administrada, por ejemplo, por inyección o infusión por goteo endovenosa, intratumoral, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intra-arterial. El método de tratamiento de la presente invención se puede utilizar en combinación con un método adicional de terapia del cáncer. Los ejemplos de métodos adicionales de terapia del cáncer incluyen cirugía, radioterapia, trasplante de células madre hematopoyéticas y terapia con otros agentes anticancerosos.

[0051]

Los ejemplos de cánceres que pueden ser objetivo para el tratamiento de la presente invención incluyen, aunque no a modo de limitación específica: cánceres sanguíneos tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia

mieloide aguda (AML), linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células B, mieloma múltiple y linfoma de células T; cánceres sólidos tales como síndrome mielodisplásico, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, cáncer anaplásico, cáncer de células grandes, cáncer de pulmón de células no grandes, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma, cáncer de piel, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer vaginal, cáncer de cuello, cáncer de cabeza y cuello, cáncer uterino, cáncer cervical, cáncer de hígado, cáncer de vesícula, cáncer de los conductos biliares, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de intestino grueso, cáncer de recto, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer testicular, cáncer de ovario y tumor cerebral; cánceres de tejidos óseos, tejidos cartilaginosos, tejidos adiposos, tejidos musculares, tejidos vasculares y tejidos hematopoyéticos; sarcomas tales como condrosarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma y sarcoma de tejidos blandos; también blastomas tales como hepatoblastoma, meduloblastoma, nefroblastoma, neuroblastoma, pancreatoblastoma, blastoma pleuropulmonar y retinoblastoma. En una forma de realización, el cáncer al que se ha de dirigir el tratamiento de la presente invención es un cáncer NY-ESO-1 positivo.

[0052]

En la composición farmacéutica, el uso, la célula método de tratamiento del cáncer de la presente invención, el límite inferior del nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 puede ser, por ejemplo, superior a 88 ng, 90 ng o más, 100 ng o más, 150 ng o más, 200 ng o más, 245 ng o más, 250 ng o más, 300 ng o más, 400 ng o más, 500 ng o más, 600 ng o más, 700 ng o más, 800 ng o más, 900 ng o más, 1000 ng o más, 1500 ng o más, 2000 ng o más, 2500 ng o más, 3000 ng o más, 4000 ng o más, 5000 ng o más, 6000 ng o más, 7000 ng o más, 8000 ng o más, 9000 ng o más, o 10000 ng o más, y el límite superior del mismo puede ser de 30000 ng o menos, 35000 ng o menos, 40000 ng o menos, 43890 ng o menos, 45000 ng o menos, 50000 ng o menos, 55000 ng o menos, o 60000 ng o menos as el valor límite superior, por 10^6 células. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es superior a 88 ng, 90 ng o más, 100 ng o más, 150 ng o más, 200 ng o más, 245 ng o más, 250 ng o más, 300 ng o más, 400 ng o más, 500 ng o más, 600 ng o más, 700 ng o más, 800 ng o más, 900 ng o más, 1000 ng o más, 1500 ng o más, 2000 ng o más, 2500 ng o más, 3000 ng o más, 4000 ng o más, 5000 ng o más, 6000 ng o más, 7000 ng o más, 8000 ng o más, 9000 ng o más, o 10000 ng o más como valor límite inferior, y 30000 ng o menos, 35000 ng o menos, 40000 ng o menos, 43890 ng o menos, 45000 ng o

menos, 50000 ng o menos, 55000 ng o menos, o 60000 ng o menos como valor límite superior, por 10^6 células. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 89 ng a 50000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 89 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 89 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 89 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 89 ng a 35000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 106 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 106 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 106 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 106 ng a 35000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 245 ng a 45000 ng. En una forma

de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 245 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 245 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 245 ng a 35000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 1000 ng a 45000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 1000 ng a 43890 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 1000 ng a 40000 ng. En una forma de realización, el nivel de expresión de la NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en la célula aAVC-NY-ESO-1 es de 1000 ng a 35000 ng.

[0053]

<Método para la producción de la célula o la composición farmacéutica para usar en el tratamiento del cáncer>

La presente invención da a conocer asimismo un método para la producción de una célula o una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un cáncer, que comprende el paso de poner en contacto a la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención con un inductor del promotor inducible para inducir la expresión de NY-ESO-1

o un fragmento de ésta. En una forma de realización, el método de producción comprende el paso de cultivar la célula aAVC-NY-ESO-1 en presencia de un inductor del promotor inducible, para inducir de esa manera la expresión de NY-ESO-1 o un fragmento de ésta. En una forma de realización, el método de producción comprende además el paso de carga de α -GalCer sobre la superficie de la célula. La carga del ligando de CD1d sobre la superficie de la célula se puede realizar antes, después o en el mismo momento del contacto de la célula aAVC-NY-ESO-1 con el inductor. La presente invención da a conocer asimismo use de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención en la elaboración de una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un cáncer.

[0054]

La presente invención da a conocer asimismo un método para la producción de una célula o una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un cáncer, que comprende el paso de:

introducir un polinucleótido que codifica CD1d y un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en una célula de origen humano, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible;

o

introducir un polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta en una célula de origen humano que

expresa CD1d en forma endógena, donde el polinucleótido que codifica NY-ESO-1 o un fragmento de ésta está operativamente ligado a un promotor inducible.

[0055]

En una forma de realización, el método de producción comprende además el paso de contacto de la célula obtenida en el paso (célula aAVC-NY-ESO-1) con un inductor del promotor inducible para inducir la expresión de NY-ESO-1 o un fragmento de ésta. En una forma de realización, el método de producción comprende el paso de cultivo de la célula aAVC-NY-ESO-1 en presencia de un inductor del promotor inducible, para inducir de esa manera la expresión de NY-ESO-1 o un fragmento de ésta. En una forma de realización, el método de producción comprende además el paso de carga de α -GalCer sobre la superficie de la célula. La carga del ligando de CD1d sobre la superficie de la célula se puede realizar antes, después o al mismo tiempo que el contacto de la célula aAVC-NY-ESO-1 con el inductor.

[0056]

Las formas de realización específicas con respecto a la célula y los pasos, etc. para usar en el método de producción descrito en esta sección son los descritos en las secciones anteriores <célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención> y <Método para la preparación de célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención>.

[0057]

<Uso combinado de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención y el inhibidor de los puntos de control inmunitario >

La presente invención da a conocer asimismo un método para tratar un cáncer, que comprende el paso de administrar la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención y un inhibidor de los puntos de control inmunitario a un sujeto. La presente invención da a conocer asimismo una composición farmacéutica para el tratamiento de un cáncer, que comprende la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención, donde la composición farmacéutica se utiliza en combinación con un inhibidor de los puntos de control inmunitario. La presente invención da a conocer asimismo la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención para el tratamiento de un cáncer, donde la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención se utiliza en combinación con un inhibidor de los puntos de control inmunitario. La presente invención da a conocer asimismo use de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención para la producción de una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de un cáncer, donde la composición farmacéutica se utiliza en combinación con un inhibidor de los puntos de control inmunitario. En el método, la composición farmacéutica, la célula o el uso, la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención expresa CD1d y NY-ESO-1 o un fragmento de ésta, y se ha cargado un ligando de CD1d en la superficie celular.

En la presente memoria descriptiva, el "inhibidor de los puntos de control inmunitario " se refiere a un medicamento que estimula la inmunidad cancelando la supresión de las células inmunes causada por una molécula de puntos de control inmunitario. Los ejemplos de moléculas de puntos de control inmunitario incluyen la muerte celular programada 1 (PD-1), la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 (TIM-3), el gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3), y el supresor de la activación de células T que contiene el dominio de inmunoglobulina de tipo V (VISTA). Los puntos de control inmunitario que se han de formar merced a esa molécula se denominan puntos de control inmunitario PD-1, puntos de control inmunitario CTLA-4, puntos de control inmunitario TIM-3, puntos de control inmunitario LAG-3 y puntos de control inmunitario VISTA. El inhibidor de los puntos de control inmunitario tiene capacidad para inhibir las funciones de los puntos de control inmunitario, por ejemplo, mediante el enlace de una molécula de puntos de control inmunitario o un ligando de ésta. Por ejemplo, el inhibidor de los puntos de control inmunitario PD-1 puede inhibir los puntos de control inmunitario PD-1 inhibiendo la unión de PD-1 a PD-L1 o PD-L2. El inhibidor de los puntos de control inmunitario CTLA-4 puede inhibir los puntos de control inmunitario CTLA-4 inhibiendo la unión de CTLA-4 a CD80 o CD86. El inhibidor de los puntos de

control inmunitario TIM-3 puede inhibir los puntos de control inmunitario TIM-3 inhibiendo la unión de TIM-3 a galectina-9. El inhibidor de los puntos de control inmunitario LAG-3 puede inhibir los puntos de control inmunitario LAG-3 inhibiendo la unión de LAG-3 a una molécula de MHC de clase II. El inhibidor de los puntos de control inmunitario VISTA puede inhibir los puntos de control inmunitario VISTA inhibiendo la unión de VISTA a VSIG-3/IGSF11. El inhibidor de los puntos de control inmunitario se refiere a una sustancia que puede inhibir uno o más de los puntos de control inmunitario tales como los puntos de control inmunitario PD-1, los puntos de control inmunitario CTLA-4, los puntos de control inmunitario TIM-3, los puntos de control inmunitario LAG3 y los puntos de control inmunitario VISTA. Entre los ejemplos de estos se cuentan los anticuerpos, proteínas de unión al antígeno y compuestos de bajo peso molecular. Algunos anticuerpos se unen a un receptor o a un ligando. Los ejemplos de anticuerpos que inhiben los puntos de control inmunitario PD-1 incluyen anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 y anticuerpos anti-PD-L2. Por ejemplo, se puede utilizar nivolumab, pembrolizumab, MK-3475, AMP-224, pidilizumab, AMP-514, ANB-011, BGB-A317, REGN-2810, HR301210, PF-06801591, JS-001, IBI-308, CBT-501, avelumab, atezolizumab, BMS-936559, LY-3300054, JNJ-61610588 y durvalumab. Los ejemplos de anticuerpos que inhiben los puntos de control inmunitario CTLA-4 se cuentan

los anticuerpos anti-CTLA-4, anticuerpos anti-CD80 y anticuerpos anti-CD86. Por ejemplo, se puede utilizar ipilimumab y tremelimumab. Los ejemplos de anticuerpos que inhiben los puntos de control inmunitario TIM-3 incluyen anticuerpos anti-TIM-3 y anticuerpos anti-galectina-9. Por ejemplo, se puede emplear MGB453. Los ejemplos de anticuerpos que inhiben los puntos de control inmunitario VISTA incluyen un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos anti-VISTA y anticuerpos anti-VSIG-3/IGSF11. Por ejemplo, se puede utilizar JNJ-61610588. Por otro lado, se puede utilizar AUPM-170 como compuesto de bajo peso molecular.

[0058]

El uso combinado de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención y el inhibidor de los puntos de control inmunitario puede potenciar el efecto antitumoral de la célula aAVC-NY-ESO-1. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se puede usar en combinación con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es un inhibidor de los puntos de control inmunitario PD-1. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario para el uso combinado con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-L2. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario para el uso combinado con la célula aAVC-NY-

ESO-1 de la presente invención es nivolumab, pembrolizumab, avelumab, atezolizumab o durvalumab. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario para el uso combinado con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es nivolumab o pembrolizumab. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario para el uso combinado con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es pembrolizumab. En otra forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se puede usar en combinación con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es un inhibidor de los puntos de control inmunitario CTLA-4. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario para el uso combinado con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-CD80 o un anticuerpo anti-CD86. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario para uso combinado con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es ipilimumab o tremelimumab. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario para el uso combinado con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es nivolumab o pembrolizumab. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario para el uso combinado con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es ipilimumab.

[0059]

Por ejemplo, en el método para el tratamiento de un cáncer que comprende administrar la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención y un inhibidor de los puntos de control inmunitario a un sujeto, en una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se ha de administrar a un sujeto es un inhibidor de los puntos de control inmunitario PD-1 o un inhibidor de los puntos de control inmunitario CTLA-4. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se ha de administrar a un sujeto es un inhibidor de los puntos de control inmunitario PD-1. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se ha de administrar a un sujeto es un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1 o un anticuerpo anti-PD-L2. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se ha de administrar a un sujeto es nivolumab, pembrolizumab, avelumab, atezolizumab o durvalumab. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se ha de administrar a un sujeto es nivolumab o pembrolizumab. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se utiliza en combinación con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es pembrolizumab. En otra forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se puede usar en combinación con la célula

aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención es un inhibidor de los puntos de control inmunitario CTLA-4. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se ha de administrar a un sujeto es un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-CD80 o un anticuerpo anti-CD86. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se ha de administrar a un sujeto es ipilimumab o tremelimumab. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se ha de administrar a un sujeto es nivolumab o pembrolizumab. En una forma de realización, el inhibidor de los puntos de control inmunitario que se ha de administrar a un sujeto es ipilimumab.

[0060]

La célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención y el inhibidor de los puntos de control inmunitario se pueden administrar en forma simultánea, consecutiva, continua o superpuesta. Se puede administrar en primer lugar ya sea la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención o el inhibidor de los puntos de control inmunitario. En una forma de realización, la administración de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención se puede iniciar antes de la administración del inhibidor de los puntos de control inmunitario. En una forma de realización, se puede comenzar la administración del inhibidor de los puntos de control inmunitario con anterioridad a la administración de la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención. Tanto

la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención como el inhibidor de los puntos de control inmunitario pueden ser administrados, de manera individual e independiente uno de otro, una sola vez o una pluralidad de veces. En una forma de realización, se puede utilizar además un agente anticáncer adicional tal como un agente quimioterapéutico en combinación con monoterapia o terapia concomitante con la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención y el inhibidor de los puntos de control inmunitario.

[0061]

En la presente se proporcionan ejemplos como referencia para una comprensión más clara de la presente invención. Sin embargo, estos ejemplos sólo tienen fines ilustrativos y no limitan la presente invención.

[Ejemplos]

[0062]

[Ejemplo 1: Efecto antitumoral la célula aAVC(3T3)-NY-ESO-1] del tipo de ratón

[0063]

[Ejemplo 1-1: Preparación la célula aAVC(3T3)-NY-ESO-1] del tipo de ratón

Para confirmar el efecto como vacuna contra el cáncer de la aAVC cargada con el antígeno de cáncer NY-ESO-1 en un sistema de evaluación *in vivo*, se introdujeron ARNm del gen de NY-ESO-1 y el gen de CD1d en células de ratón NIH/3T3 (ATCC, Cat. CRL-1658) para preparar aAVC del tipo

de ratón (a la que también se hace referencia como aAVC(3T3)-NY-ESO-1).

[0064]

Se preparó el gen NY-ESO-1 gene (SEQ ID NO: 1) mediante síntesis génica artificial basada en la secuencia de aminoácidos de la NY-ESO-1 humana expuesta en SEQ ID NO: 2. Se amplificó el gen NY-ESO-1 por PCR usando cebadores con una secuencia agregada complementaria de 15 nucleótidos que incluyen la secuencia de reconocimiento HindIII o EcoRI del plásmido pGEM(R)-4Z (Promega Corp., Cat. P2161). Se insertó el gen NY-ESO-1 amplificado en el sitio HindIII-EcoRI de pGEM(R)-4Z usando el Kit de Clonación In-Fusion(R) HD (Takara Bio Inc., Cat. 639648). El plásmido obtenido recibió la designación plásmido pGEM-4Z-NY-ESO-1. El gen CD1d (gen sintetizado mediante síntesis artificial basada en la secuencia de aminoácidos de UniProt: P11609-1 (SEQ ID NO: 6)) que consiste en la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 fue insertado en el sitio HindIII-BamHI del plásmido pGEM(R)-4Z. El plásmido obtenido recibió la designación plásmido pGEM-4Z-mCD1d. El plásmido pGEM-4Z-NY-ESO-1 y el plásmido pGEM-4Z-mCD1d fueron escindidos con EcoRI y BamHI, respectivamente, a fin de linealizar estos plásmidos. Se preparó ARNm de NY-ESO-1 mRNA y ARNm de CD1d empleando los plásmidos linealizados así obtenidos como plantillas y empleando el Kit de Transcripción mMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. AMB13455). Se

cosecharon las células NIH/3T3 cultivadas durante 2 días en medio Eagle Modificado de Dulbecco (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 10569) que contenía 10% de suero fetal bovino con 500 ng/mL de α -GalCer. Se agregó el ARNm de NY-ESO-1 y el ARNm de CD1d a la suspensión celular, y luego se procedió a la electroporación (pulso eléctrico: voltaje: 150 V, duración del pulso: 8 ms, intervalo entre pulsos: 50 ms, número de veces: 2, tasa de degradación: 10%, polaridad: +, pulso de transferencia: voltaje: 20 V, duración del pulso: 50 ms, intervalo entre pulsos: 50 ms, número de veces: ± 5 , tasa de degradación: 40%, polaridad: +/-) utilizando el electroporador NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd.). Se cosecharon las células y se las irradió con 30 Gy de rayos X empleando un aparato de irradiación de rayos X MBR-1520R-3 (Hitachi Power Solutions Co., Ltd.). Las células obtenidas por el método recién descrito fueron designadas aAVC(3T3)-NY-ESO-1.

[0065]

[Ejemplo 1-2: Capacidad de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 para inducir células T específicas para NY-ESO-1 en el ratón]

Se administraron 5×10^5 células de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 suspendidas en BICANATE Injection (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) en la vena del rabo de cada uno de los ratones hembra C57BL/6J de 6 semanas de edad (Charles River Laboratories Japón, Inc.) (n =5). Se administraron 200 μ L de BICANATE Injection a un grupo control. 7 días después de la administración, se extrajeron células del bazo de

los ratones y se inoculó a razón de 4×10^5 células/pocillo en una placa del kit de ensayo enzimático de color único con IFN- γ de ratón ELISPOT (Cellular Technology Limited, Cat. mIFNgp-2M/5). Con el fin de estimular las células T específicas para NY-ESO-1, se les agregaron también péptidos NY-ESO-1 (PepTivator NY-ESO-1 - grado premium, humanos (Miltenyi Biotec, Cat. 130-095-381)) como péptidos superpuestos para cubrir toda la longitud de la secuencia de la proteína NY-ESO-1 o el péptido PAP (PepTivator PAP - grado para investigación, humano (Miltenyi Biotec, Cat. 130-096-767)) como péptidos no específicos para el antígeno, y las células fueron cultivadas a 37°C por espacio de 1 día en condiciones de 5% de CO₂. Se midió el número de células productoras de IFN- γ contando el número de puntos en el fondo del pocillo. En los ratones que recibieron aAVC(3T3)-NY-ESO-1, se incrementó el número de células productoras de IFN- γ mediante la estimulación con el péptido NY-ESO-1 (Figura 1-1). La diferencia con respecto al número de puntos atribuible a la estimulación con el péptido PAP no específico para el antígeno representa el número de células T específicas para NY-ESO-1. Estos resultados sugirieron que la administración de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 induce las células T específicas para NY-ESO-1.

[0066]

[Ejemplo 1-3: Efecto antitumoral de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 específico del antígeno en ratón con cáncer que contenía células de melanoma B16 con expresión de NY-ESO-1-]

Se administraron 5×10^5 células de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 suspendidas en BICANATE Injection (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) en la vena del rabo de cada uno de los ratones hembra C57BL/6J de 8 semanas de edad (Charles River Laboratories Japón, Inc.) ($n = 10$ por cada grupo). Se administraron 200 μL de BICANATE Injection a un grupo control. 14 días después de la administración, se inocularon a los ratones, por vía subcutánea, 3×10^5 células de las células de melanoma B16-F10 (ATCC, Cat. CRL-6475) suspendidas en D-PBS(-) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp., Cat. 045-29795), o 3×10^5 células de las células de melanoma B16-F10 que expresaban la proteína NY-ESO-1 (que habían sido preparadas mediante la introducción del gen de NY-ESO-1; a las que en adelante se hace referencia como células B16-NY-ESO-1 o B16-NY-ESO-1) suspendidas en D-PBS(-). Se estableció el día de la inoculación de las células cancerosas como día 0. Se midió el cambio de volumen de los tumores por espacio de 20 días. La administración de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 suprimió significativamente el aumento de tamaño de los tumores B16-NY-ESO-1, en tanto que esta administración no suprimió el aumento de tamaño de los tumores B16-F10 que no expresaban NY-ESO-1 (Figura 1-2). Estos resultados sugirieron que aAVC(3T3)-NY-ESO-1 tiene efecto antitumoral

específico para NY-ESO-1 basado en la inducción de inmunidad específica para NY-ESO-1.

[0067]

[Ejemplo 1-4: Estudio del número de células aAVC83T3)-NY-ESO1 que exhiben efecto antitumoral en ratones con cáncer de células de melanoma B16 con expresión de NY-ESO-1]

Se inocularon por vía subcutánea 3×10^5 de las células B16-NY-ESO-1 suspendidas en D-PBS(-) a cada ratón hembra C57BL/6J de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories Japón, Inc.). 7 días después de la inoculación de las células, se dividió a los ratones en 5 grupos, cada uno de los cuales consistía en 10 ratones, basándose en los volúmenes de sus tumores. Se administraron a los ratones de cada grupo 5×10^2 células/ratón, 5×10^3 células/ratón, 5×10^4 células/ratón, o 5×10^5 células/ratón de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 suspendidas en un vehículo para inyección BICANATE a través de la vena del rabo. Se administraron 200 μ L de BICANATE Injection a un grupo control. El día de la administración de las aAVC(3T3)-NY-ESO-1 fue establecido como día 0. Se midió el cambio de volumen de los tumores por espacio de 10 días. Dado que dos individuos del grupo con administración de 5×10^5 células/ratón murieron después de la administración de aAVC(3T3)-NY-ESO-1, el número de ratones fue de ocho en este grupo desde el día 0 en adelante. La progresión de los tumores B16-NY-ESO-1 fue significativamente suprimida en los grupos con administración de 5×10^3 células/ratón

o más (Figura 1-3). El nivel de expresión de NY-ESO-1 en aAVC(3T3)-NY-ESO-1 utilizadas en este experimento fue de 245 ng/1 × 10⁶ células.

[0068]

De los resultados del Ejemplo 1, se confirmó que las células aAVC83T3 (de ratón)-NY-ESO1 exhibían efecto antitumoral específico para NY-ESO-1 mediante la inducción de células T específicas para NY-ESO-1 en el sistema de evaluación *in vivo* en ratones. En humanos también, se puede esperar que las células aAVC-NY-ESO-1 de tipo humano exhiban efecto antitumoral por inducir la inmunidad natural y también exhiban efecto antitumoral basado en la inmunidad adquirida mediante la inducción de inmunidad adquirida específica para el antígeno. Por lo tanto, se realizaron estudios sobre la preparación de células aAVC-NY-ESO-1 de tipo humano, según lo que se describe a continuación, con el fin de desarrollar un fármaco terapéutico que exhiba un efecto antitumoral específico para NY-ESO-1 sobre el cáncer humano con expresión de NY-ESO-1.

[0069]

[Ejemplo 2: Preparación de la célula aAVC-NY-ESO-1] de tipo humano

Se prepararon células aAVC-NY-ESO-1 de tipo humano mediante el siguiente método: se establecieron células aAVC que expresaban NY-ESO-1, CD1d y Tet3G mediante la

preparación de lentivirus utilizando plásmidos para cargar los genes NY-ESO-1, CD1d y Tet3G, respectivamente, e introduciendo estos genes en células FreeStyle 293-F (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. R79007) usando los lentivirus.

[0070]

[Ejemplo 2-1: Preparación de los lentivirus]

(1) Construcción del plásmido para la preparación de los lentivirus

Se prepare un plásmido lentiviral pLVsyn-CMV (SEQ ID NO: 7). Se preparó un gen NY-ESO-1 al que se había agregado una secuencia de reconocimiento EcoRI en el extremo 5' y una secuencia de reconocimiento BamHI extremo 3' del gen NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 1) mediante síntesis génica artificial. Se insertó el gen NY-ESO-1 escindido con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI en el sitio EcoRI-BamHI del plásmido pLVsyn-CMV. El plásmido obtenido fue designado plásmido pLVsyn-CMV-NY-ESO-1. Se insertó el promotor TRE3G escindido con las enzimas de restricción ClaI y EcoRI del plásmido TRE3G preparado con el servicio de síntesis génica artificial basado en la secuencia de pTRE3G (Takara Bio Inc., Cat. 631173) en el plásmido pLVsyn-CMV-NY-ESO-1 del cual se había eliminado el promotor CMV con las enzimas de restricción ClaI y EcoRI. El plásmido así obtenido fue designado plásmido pLVsyn-TRE3G-NY-ESO-1.

[0071]

El gen CD1d (SEQ ID NO: 3) fue designado sobre la base de la secuencia de aminoácidos de la CD1d humana expuesta en SEQ ID NO: 4, y preparado mediante síntesis génica artificial mediante la adición de una secuencia de reconocimiento XhoI en el extremo 5' y una secuencia de reconocimiento NotI en el extremo 3' del gen. El gen CD1d escindido con las enzimas de restricción XhoI y NotI fue insertado en el sitio XhoI-NotI del plásmido pLVsyn-CMV. El plásmido obtenido fue designado plásmido pLVsyn-CMV-CD1d.

[0072]

Se prepare el gen Tet-On 3G mediante síntesis génica artificial mediante la adición de una secuencia de reconocimiento XhoI en el extremo 5' y una secuencia de reconocimiento NotI en el extremo 3' a la secuencia del gen Tet-On 3G del plásmido pCMV-Tet3G (Takara Bio Inc., Cat. 631335). Se insertó el gen Tet-On 3G escindido con las enzimas de restricción XhoI y NotI en el sitio XhoI-NotI del plásmido pLVsyn-CMV. El plásmido obtenido fue designado plásmido pLVsyn-CMV-Tet3G.

[0073]

(2) Preparación del lentivirus

Se prepararon lentivirus con el gen NY-ESO-1, CD1d o Tet3G cargado en los mismos utilizando el plásmido pLVsyn-CMV-NY-ESO-1, el plásmido pLVsyn-TRE3G-NY-ESO-1, el plásmido pLVsyn-CMV-CD1d y el plásmido pLVsyn-CMV-Tet3G preparados en (1). Los lentivirus obtenidos fueron

designados, respectivamente, lentivirus cargado con CMV-NY-ESO-1, lentivirus cargado con TRE3G-NY-ESO-1, Lentivirus cargado con CD1d y lentivirus cargado con Tet3G. [0074]

Se mezclaron 6 µg del plásmido pLVsyn-CMV-NY-ESO-1, el plásmido pLVsyn-TRE3G-NY-ESO-1, el plásmido pLVsyn-CMV-CD1d o el plásmido pLVsyn-CMV-Tet3G y 18 µL de la mezcla ViraPower Lentiviral Packaging Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. K497500), y se agregaron 3 mL de OptiPRO™ SFM (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 12309019) a la misma y se mezcló (A). Se mezclaron 288 µL del Reactivo de Transfección Lipofectamina 2000 CD (Thermo Fischer Scientific Inc., Cat. 12566-014) y 12 mL de OptiPro™ SFM y se dejó reposar durante 5 minutos (B). Se mezcló la mezcla (A) y 3 mL de la mezcla (B) y se dejó reposar a temperatura ambiente por espacio de 20 minutos. A continuación se realizó la introducción del gen mediante la adición de 3 mL/placa de la solución mezcla de (A) y (B) a células Lenti-X™ 293T (Takara Bio Inc., Cat. 632180) inoculadas a razón de 5×10^6 células/placa en una placa de cultivo celular Falcon(R) de 100 mm tratada con TC (Corning Inc., Cat. 353003) el día anterior. Se cultivaron las células Lenti-X™ 293T a 37°C en condiciones de 5% de CO₂ en medio DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 10569010) que contenía suero fetal bovino al 10% (SAFC Biosciences, Cat. 12007C (producto irradiado por rayos γ)) y gentamicina al 0,1% (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat.

15750060). Después de la introducción del gen, se cultivaron las células por espacio de 2 días en las mismas condiciones que las anteriores. Se recuperó un sobrenadante de cultivo que contenía cada lentivirus cargado con el gen. Se centrifugó el sobrenadante del cultivo a $840 \times g$ a 4°C durante 10 minutos. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ (Merck KGaA, Cat. SLHV033RS), se lo mezcló con Solución de Precipitación de Virus PEG-it™ (5x) (System Biosciences, LLC, Cat. LV810A-1) en una cantidad de 1/4 de la cantidad del sobrenadante, y se dejó reposar de un día para otro a 4°C . Se centrifugó la mezcla a $1500 \times g$ a 4°C durante 30 minutos para la remoción del sobrenadante y se volvió a centrifugar a $1500 \times g$ a 4°C durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante por completo. Se suspendieron los pellets en $500 \mu\text{L}$ de DPBS (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 14190144) para obtener lentivirus cargado con CMV-NY-ESO-1, lentivirus cargado con TRE3G-NY-ESO-1, lentivirus cargado con CD1d y lentivirus cargado con Tet3G.

[0075]

[Ejemplo 2-2: Preparación y clonación de células infectadas con lentivirus]

Se infectaron células FreeStyle 293-F con cada uno de los lentivirus preparados en el Ejemplo 2-1. Una población celular infectada con los lentivirus cargados con CMV-NY-ESO-1 y los lentivirus cargados con CD1d fue designada como reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d.

Una población celular infectada con los lentivirus cargados con TRE3G-NY-ESO-1, los lentivirus cargados con CD1d y los lentivirus cargados con Tet3G fue designada como reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d. Se llevó a cabo la clonación de células de estas reservas de células para obtener una pluralidad de clones derivados de cada reserva celular.

[0076]

(1) Preparación de la reserva celular FreeStyle
293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d

Se infectaron células FreeStyle 293-F con el lentivirus cargado con CD1d y el lentivirus cargado con CMV-NY-ESO-1 para obtener células FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1. Se utilizaron dos métodos diferentes: un método de infección de las células con el lentivirus cargado con CD1d y el lentivirus cargado con CMV-NY-ESO-1 al mismo tiempo (método de preparación de la reserva celular A) o un método de infección de las células con el lentivirus cargado con CD1d y el lentivirus cargado con CMV-NY-ESO-1 en forma sucesiva (método de preparación de la reserva celular C), como métodos de infección. Las células FreeStyle 293-F fueron cultivadas en Medio de Expresión FreeStyle 293 (Thermo Fisher Scientific Inc., Cat. 12338018) que contenía 0,1% de gentamicina.

[0077]

La preparación de la reserva celular A se llevó a cabo mediante el siguiente método: Se ajustaron las células

FreeStyle 293-F a una concentración de 1×10^6 células/mL, y se las inoculó en una cantidad de 1 mL/pocillo en una Placa de Cultivo Celular de fondo plano de 12 pocillos Falcon(R) Flat Bottom Multiwell con Tapa (Corning Inc., Cat. 353043; a la que, en adelante, se hace referencia como placa de 12 pocillos). Se introdujeron 50 μ L o 100 μ L de cada uno de los lentivirus cargados con CD1d y los lentivirus cargados con CMV-NY-ESO-1 obtenidos en el Ejemplo 2-1 en cada pocillo. Después de la centrifugación a $540 \times g$ a temperatura ambiente por espacio de 30 minutos, se suspendieron suavemente las células mediante pipetas y se las cultivó con agitación. Después de varios días de cultivo, las células obtenidas fueron transferidas de la placa de 12 pocillos a un Matraz Erlenmeyer de 125 ml de policarbonato Corning(R) con tapa con ventilación (Corning Inc., Cat. 431143; a la que, en adelante, se hace referencia como matraz Erlenmeyer de 125 mL), y se las transfirió a intervalos apropiados para obtener la reserva celular A.

[0078]

La preparación de la reserva celular C se llevó a cabo mediante el siguiente método: Se ajustaron las células FreeStyle 293-F a una concentración de 1×10^6 células/mL, y se las inoculó en una cantidad de 1 mL/pocillo en una placa de cultivo celular de fondo plano de 12 pocillos Falcon(R) Flat Bottom Multiwell con tapa. Se introdujeron 100 μ L del lentivirus cargado con CD1d obtenido en el

Ejemplo 2-1 en cada pocillo. Después de la centrifugación a $540 \times g$ a temperatura ambiente por espacio de 30 minutos, las células fueron suspendidas suavemente mediante pipetas y cultivadas con agitación. Después de varios días de cultivo, las células así obtenidas fueron transferidas de la placa de 12 pocillos a un matraz de 125 mL y vueltas a transferir a intervalos apropiados para obtener la reserva celular FreeStyle 293F_CD1d (a la que se hace referencia como reserva celular B). Se volvió a transferir la reserva celular B a una placa de 12 pocillos. Se agregaron 50 μL o 200 μL del lentivirus cargado con CMV-NY-ESO-1 a cada pocillo. La segunda infección por lentivirus se realizó mediante los mismos procedimientos que la primera. Después de varios días de cultivo, las células fueron transferidas de la placa de 12 pocillos a un matraz Erlenmeyer de 125 mL y vueltas a transferir a intervalos apropiados para obtener la reserva celular C. Se utilizó la reserva celular A y la reserva celular C en la reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d.

[0079]

(2) Preparación de la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d

Se inoculó nuevamente la reserva celular B obtenida durante el curso del método de preparación de la reserva celular C de (1) en una placa de 12 pocillos. Se agregaron a cada pocillo 40 μL de cada uno o 200 μL de cada uno del lentivirus cargado con TRE3G-NY-ESO-1 y el lentivirus

cargado con Tet3G obtenidos en el Ejemplo 2-1 . Se llevó a cabo la infección con lentivirus de acuerdo con los procedimientos descritos en (1). Un día después, las células fueron transferidas de la placa de 12 pocillos a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, y vueltas a transferir a intervalos apropiados para obtener la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d.

[0080]

(3) Estabilidad de la expresión de NY-ESO-1 y características de cultivo de la reserva celular

Se obtuvieron los cursos temporales de los niveles de expresión de NY-ESO-1 después de la infección con lentivirus (Figura 2-1) y las tasas de NY-ESO-1 positivo (Figura 2-2) como en el caso de la reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d y la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d obtenidas en (1) y (2). Se analizó la expresión de NY-ESO-1 los días 3, 7, 10 y 14 después de la infección como en el caso de la reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d. La reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d fue analizada los días 7 y 14 después de la infección. 2 días antes del análisis; se agregó al medio doxiciclina (Takara Bio Inc., Cat. 631311) con una concentración final de 100 ng/mL para inducir la expresión por medio del Sistema Tet-On. Se midió la expresión de NY-ESO-1 mediante ELISA y citometría de flujo. La medición por ELISA se llevó á cabo de acuerdo con el método general de medición de Elisa

sándwich utilizando el anticuerpo anti-NY-ESO-1 (Millipore Corp., Cat. MABC1151) como anticuerpo para la inmovilización, anticuerpo Anti-CTAG1B (Abcam plc, Cat. ab183740) como anticuerpo primario y anticuerpo IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano (R&D Systems, Inc., Cat. HAF008) como anticuerpo secundario. La medición por citometría de flujo se llevó a cabo de acuerdo con un método general de medición utilizando el anticuerpo Anti-NY-ESO-1 como anticuerpo primario, IgG APC de cabra anti ratón (Life Technologies Corp., Cat. A10539) como anticuerpo secundario y FACSVerse™ (BD Biosciences). En ocasión de las transferencias posteriores a la infección, se realizó la medición de las tasas de sobrevivencia (Figura 2-3) y el cálculo de los tiempos de duplicación (Figura 2-4) como características del cultivo.

[0081]

Como se ilustra con respecto al nivel de expresión en la Figura 2-1 con respecto a la tasa de positividad en la Figura 2-2, la reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d exhibió valores mucho más elevados tanto del nivel de expresión de NY-ESO-1 como de la tasa de positividad en comparación con la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d inmediatamente después de la infección con lentivirus, en tanto que se encontró un descenso del nivel de expresión y tasa positiva a medida que pasaba el número de días de cultivo. Por otro lado, no se observó

ese descenso del nivel de expresión y de tasa positiva en la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d.

[0082]

Como se ilustra con respecto a la tasa de sobrevida en la Figura 2-3 y en cuanto el tiempo de duplicación en la Figura 2-4, la reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d exhibió una tasa de sobrevida y un tiempo de duplicación prolongado más de 7 días después de la infección con lentivirus. El nivel de expresión total de NY-ESO-1 y la tasa positiva de la reserva celular se redujeron presumiblemente a medida que transcurría el número de días de cultivo, debido al tiempo de duplicación prolongado asociado a la tasa de sobrevida reducida de las células con un alto nivel de expresión de NY-ESO-1 en la reserva celular. Por el contrario, no se observaron esas variaciones en las características del cultivo en la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d.

[0083]

(4) Clonación

Se realizó la clonación de células individuales mediante el método por dilución limitante de la reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d y la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d preparadas en (1) y (2). Se seleccionaron los clones que expresaban de manera estable todos los genes. Se inocularon las células a razón de 1 célula/pocillo en una placa de 96 pocillos y se las transfirió de acuerdo con la proliferación celular

para lograr la proliferación de las células. Se midieron los niveles de expresión de la proteína NY-ESO-1 y la proteína CD1d en las células que proliferaron mediante ELISA en el caso de NY-ESO-1 y citometría de flujo en el caso de CD1d para seleccionar los clones que expresaban de manera estable las proteínas NY-ESO-1 y CD1d. Se indujo la expresión de NY-ESO-1 en los clones derivados de la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d por medio del Sistema Tet-On mediante la adición al medio de doxiciclina en una concentración final de 100 ng/mL, y se la evaluó. La medición por ELISA se llevó a cabo de conformidad con método de medición general de ELISA sándwich usando el anticuerpo anti-NY-ESO-1 como anticuerpo para la inmovilización, el anticuerpo Anti-CTAG1B como anticuerpo primario y anticuerpo IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano como anticuerpo secundario. La medición por citometría de flujo se llevó a cabo de conformidad con un método de medición general usando el anticuerpo anti-CD1d humano de Ratón APC (BD Biosciences, Cat. 563505) y FACSVerse™ (BD Biosciences).

[0084]

(5) Nivel de expresión de NY-ESO-1 del clon obtenido

Se midió el nivel de expresión de NY-ESO-1 con respecto a los clones derivados de la reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d o derivados de la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d en (4). La

medición se llevó a cabo mediante el uso del método ELISA descrito en (4) (Figura 3).

[0085]

Como se ilustra en La Figura 3, el nivel de expresión de NY-ESO-1 en los clones aislados de la reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d fue de tan sólo 88 ng/10⁶ células como máximo. Por otro lado, el nivel de expresión de los clones derivados de la reserva celular FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d diferían considerablemente entre sí, dando lugar a la elección de un clon con el nivel de expresión deseado. Además, hubo más clones que los derivados de la reserva celular FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d que exhibieron un nivel de expresión más elevado.

[0086]

[Ejemplo 3: Efecto del uso combinado de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 y el anticuerpo anti-PD-1]

(1) Efecto del uso combinado en ratones con cáncer de células de melanoma que expresan NY-ESO-1

Se inocularon 3×10^5 células de B16-NY-ESO-1 suspendidas en D-PBS(-) por vía subcutánea a cada uno de los ratones hembra C57BL/6J de 9 semanas de edad (Charles River Laboratories Japón, Inc.). 7 días después de la inoculación de las células, los ratones fueron divididos en 4 grupos, cada uno de los cuales consistía en 10 ratones sobre la base del volumen de sus tumores. Se administró a los ratones, por vía intraperitoneal, 0,1 mg de un anticuerpo anti-PD-1 (InVivoMAb PD-1 anti-ratón (CD279),

Bio X Cell, Cat. BE0146) o un isotipo de anticuerpo (InVivoMAb isotipo control IgG2a de rata, anti-trinitrofenol, Bio X Cell, Cat. BE0089). El anticuerpo fue administrado un total de 5 veces dos veces por semana con intervalos de 3 a 4 días. 3 días después del comienzo de la administración del anticuerpo, se administraron 5×10^4 células de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 suspendidas en un vehículo BICANATE Injection en la vena del rabo del ratón. Se administraron 200 μ L de BICANATE Injection a un grupo control. El día de la administración de las aAVC(3T3)-NY-ESO-1 fue establecido como día 0. Se midió el cambio de volumen de los tumores hasta el día 11. La administración de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 + isotipo de anticuerpo y la administración del anticuerpo anti-PD-1 suprimieron la progresión del tumor B16-NY-ESO-1. La administración combinada de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 y el anticuerpo anti-PD-1 suprimió de manera más acentuada la progresión de tumores B16-NY-ESO-1 que la administración de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 + isotipo de anticuerpo y la administración del anticuerpo anti-PD-1 (Figura 4-1). Estos resultados sugirieron que el uso combinado con un anticuerpo anti-PD-1 potencia el efecto antitumoral de aAVC(3T3)-NY-ESO-1.

[0087]

(2) Efecto del uso combinado en ratones con cáncer de células colorrectales CT26 con expresión de NY-ESO-1

Se inocularon 7×10^5 células de células de cáncer colorrectal CT26 con expresión de NY-ESO-1 (ATCC, Cat.

CRL-2638) (alas que, en adelante, se hace referencia como células CT26-NY-ESO-1) preparadas mediante la introducción del gen de NY-ESO-1, suspendidas en D-PBS(-) por vía subcutánea a cada uno de los ratones hembra BALB/c de 7 semanas de edad (Charles River Laboratories Japón, Inc.). 14 días después de la inoculación de las células, los ratones fueron divididos en 4 grupos, cada uno de los cuales consistía en 8 ratones, basándose en el volumen de sus tumores. Se administró al ratón por vía intraperitoneal un anticuerpo anti-PD-1. No se administró ningún anticuerpo al grupo sin administración de anticuerpo. El anticuerpo fue administrado un total de 4 veces por semana a intervalos de 3 a 4 días. El día del comienzo de la administración del anticuerpo, se administraron 5×10^5 células de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 suspendidas en un vehículo BICANATE Injection en la vena del rabo del ratón. Se administraron 200 μ L de BICANATE Injection a un grupo control. Se estableció el día de la administración de la aAVC(3T3)-NY-ESO-1 como día 0. Se midió el cambio de volumen de los tumores hasta el día 14. La administración de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 sola y la administración del anticuerpo anti-PD-1 solamente suprimieron la progresión de los tumores CT26-NY-ESO-1, en tanto que el uso combinado de la administración de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 y el anticuerpo anti-PD-1 suprimió de manera más acentuada la progresión de CT26-NY-ESO-1 que la administración de cada agente solamente (Figura 4-2).

Estos resultados sugirieron que el uso combinado con un anticuerpo anti-PD-1 potencia el efecto antitumoral de aAVC(3T3)-NY-ESO-1.

[0088]

[Ejemplo 4: Efecto del uso combinado de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 y anticuerpos anti-CTLA-4]

Se inocularon por vía subcutánea 7×10^5 células de CT26-NY-ESO-1 suspendidas en D-PBS(-) a cada uno de los ratones hembra BALB/c de 7 semanas de edad (Charles River Laboratories Japón, Inc.). 7 días después de la inoculación de las células, los ratones fueron divididos en 4 grupos, cada uno de los cuales consistía en 10 ratones sobre la base del volumen de sus tumores. 7 días del agrupamiento, se administró por vía intraperitoneal al ratón 0,15 mg de un anticuerpo anti-CTLA-4 (InVivoMAb CTLA-4 anti-ratón (CD152), Bio X Cell, Cat. BE0164). No se administró ningún anticuerpo al grupo sin administración de anticuerpo. El anticuerpo fue administrado un total de 5 veces dos veces por semana a intervalos de 3 a 4 días. El día del comienzo de la administración del anticuerpo, se administraron 5×10^5 células de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 suspendidas en un vehículo BICANATE Injection en la vena del rabo del ratón. Un individuo del grupo con uso combinado de la célula AVC(3T3)-NY-ESO-1 + anticuerpos anti-CTLA-4 murió después de la administración de aAVC(3T3)-NY-ESO-1. Se administraron 200 μ L de BICANATE Injection a un grupo control. El día de la inoculación de

las células cancerosas se estableció como día 0. Se midió el cambio de volumen de los tumores por espacio de 32 días. La administración de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 sola y la administración del anticuerpo anti-CTLA-4 solo suprimieron la progresión de los tumores CT26-NY-ESO-1, en tanto que el uso combinado de aAVC(3T3)-NY-ESO-1 y el anticuerpo anti-CTLA-4 suprimió de manera más acentuada la progresión de CT26-NY-ESO-1 que la administración de cada agente por separado (Figura 5). Estos resultados sugirieron que el uso combinado con un anticuerpo anti-CTLA-4 potencia el efecto antitumoral de aAVC(3T3)-NY-ESO-1.

Aplicabilidad Industrial

[0089]

Se puede esperar que la célula aAVC-NY-ESO-1 de la presente invención sea útil para el tratamiento de un cáncer.

Texto Libre del Listado de Secuencias

[0090]

La secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias es una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NY-ESO-1 human, y la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2 del listado de secuencias es una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 3 del listado de secuencias es una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína CD1d humana, y la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID

NO: 4 del listado de secuencias es una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 3. La secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5 del listado de secuencias es una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína CD1d de ratón, y la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6 del listado de secuencias es una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de SEQ ID NO: 5. La secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 7 del listado de secuencias es la secuencia nucleotídica de pLVsyn-CMV. Estas secuencias son como se las describe en la descripción de "Secuencia Artificial" en la leyenda numérica <223> del listado de secuencias expuesto a continuación.