

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 021**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02758474 .7**
96 Fecha de presentación: **19.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1419240**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2004**

54 Título: **PRODUCCIÓN Y USO DE LÍNEAS DE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS CD124 Y CD116 POSITIVAS EN LA PRODUCCIÓN DE AGENTES DE INMUNOTERAPIA ALOGÉNICOS O SEMIALOGENICOS.**

30 Prioridad:
17.08.2001 DE 10139428

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.12.2011

73 Titular/es:
**GLYCOTOPE GMBH
ROBERT-RÖSSLE-STRASSE 10
13125 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:
**GOLETZ, Steffen;
SCHEPER, Rik, J.;
MASTERSON, Alan y
PINEDO, Herbert, M.**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 371 021 T3

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

DESCRIPCIÓN

Producción y uso de líneas de células tumorales humanas CD124 y CD116 positivas en la producción de agentes de inmunoterapia alogénicos o semialogénicos.

5 La invención describe la producción de células o líneas celulares dendríticas (CD) eficaces a partir de la línea celular MUTZ-3 CD124+ y CD116+ con ayuda de las moléculas estimuladoras GM-CSF, TNF-alfa, LPS, PGE2, ligando de CD40, poliIC, calcio, PMA, TGF-beta 1, IL-7, IL-13 y/o IL-14 y además las células dendríticas humanas eficaces MUTZ-3 o una línea celular MUTZ-3 obtenibles.

10 Las células dendríticas (CD) desempeñan un papel importante como células presentadoras de antígeno (CPA). Transmiten señales coestimuladoras que son necesarias para la activación de células T e inducen respuestas inmunes primarias mediante la presentación de antígenos a las células T CD4⁺ y CD8⁺ (Banchereau et al. 1998, Nature 392 (6673): 245-252). Las CD se desarrollan a partir de células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea y atraviesan secuencialmente diferentes fases de diferenciación (células precursoras intermedias en la sangre y CD inmaduras en los tejidos y órganos periféricos) (Banchereau et al. 2000, Ann Rev Immunol 18: 767-811). Una vez que han llegado a los tejidos las CD inmaduras (CDi) desempeñan una importante función sensora, que se caracteriza por una captación muy activa de antígenos del medio circundante. Después de su estimulación por señales externas ("señales de peligro") como por ejemplo, infecciones bacterianas o víricas o procesos inflamatorios las CD migran a los órganos linfáticos periféricos, donde se diferencian a CD maduras y activan células T a través de la presentación de antígenos.

20 Geissmann et al. (1998), J. Exp. Med. 187: 961-966, describe que TGF-beta 1 e IL-4 inducen la diferenciación de monocitos de sangre periférica humana a células dendríticas de Langerhans.

25 Igualmente Jaksits et al. (1999), J. Immunology 163:4869-4877 describe la diferenciación de células precursoras CD14+ derivadas de células CD34+ a células de Langerhans en presencia de GM-CSF/TNF-alfa y TGF-beta 1.

30 También Caux et al. (1999), J. Leukoc. Biol. 66:781-791 divulgan que las células precursoras CD34+ en presencia de TGF-beta e IL-4 se pueden desarrollar a células dendríticas de Langerhans y no Langerhans.

El documento US 5.811.297 describe el cultivo de células troncales hematopoyéticas CD34+ inmortalizadas en presencia de GM-CSF, TNF-alfa e IL-4, en donde estas células maduran a células dendríticas.

35 El documento US 5.648.219 describe la línea de células dendríticas de ratón JAWS II que se puede inducir, por ejemplo, con TNF-alfa, GM-CSF o IL-4.

40 Fairchild et al. (2000), Current Biology 10:1515-1518 describe que se pueden obtener células dendríticas a partir de células troncales embrionarias de ratón, por ejemplo, en presencia de IL-3 o GM-CSF.

Paglia et al. (1993), J. Exp. Med. 178:1893-1901 divulga que una línea de células dendríticas inmortalizadas que presenta antígenos, puede ocasionar una actividad primaria de células T in vivo.

45 Hu et al. (1996), Leukemia 10: 1025-1040 describe las líneas celulares MUTZ-2 y MUTZ-3 y observa que estas líneas celulares se pueden usar para estudios de diferenciación. Esta observación es de carácter general y no hace ninguna referencia a células dendríticas.

50 Según métodos anteriores para la producción de CD in vitro, se obtienen dos poblaciones principales de células precursoras de CD: células CD1a⁺/CD14⁻ que se desarrollan a células de Langerhans (CL), y células CD1a⁻/CD14⁺ que se diferencian a CD intersticiales. Después del cultivo con GM-CSF e IL-4 los monocitos pueden desarrollar un fenotipo que se parece al de las CD inmaduras (CDi). Una diferenciación y maduración adicional se conseguirá mediante diferentes estímulos, como lipopolisacárido bacteriano (LPS), TNF-alfa, PGE2, ligando de CD40 o poliIC. Se han usado sistemas de cultivo definidos disponibles hasta la fecha para investigar la biología de las CD. Sin embargo, su uso para experimentos a gran escala está limitado por la dependencia de material de donantes disponible y su variabilidad. En un sistema de ratón las líneas de células dendríticas dependientes de citoquinas (GM-CSF) se han mostrado muy valiosas para el estudio de la diferenciación y desarrollo de CD en modelos de enfermedades *in vitro* e *in vivo*. Tales líneas celulares se obtuvieron mediante la inmortalización de tejido linfático o cutáneo murino. Representan un fenotipo de CD inmadura que es invariable y por tanto no permiten el análisis de los diferentes factores que participan en la diferenciación de CD. Además, debido a la heterogeneidad de las CD en los sistemas murino y humano, solo son posibles afirmaciones muy limitadas, si acaso, respecto a la biología de las CD humanas.

60 Se pudo observar que los tumores de origen linfoide o mieloides muestran características comunes con las CPA en la ontogénesis. Estudios con PBMC de pacientes con leucemia mieloides crónica (LMC) y leucemia mieloides aguda (LMA) han mostrado que en subpoblaciones de hemoblastos de LMC y LMA se puede obtener una diferenciación en parte similar a DC a través de citoquinas, que en parte muestran una función de CPA reforzada. Por consiguiente, se

han intentado usar líneas celulares leucémicas establecidas como sistema modelo *in vitro* para la investigación sobre la biología de CD. Sin embargo, esto no funcionó, ya que todas las líneas celulares investigadas solo pueden alcanzar fases determinadas del desarrollo de CD, más allá de la cuales no se pueden diferenciar más y por tanto no pueden reflejar la biología de las CD como se deseaba. Esto es debido a que la capacidad de tales células malignas a responder a estímulos de citoquinas depende de la expresión de receptores específicos y funcionales. Sin embargo, muchas líneas celulares de leucemia no reaccionan a tratamiento con citoquinas. Otras líneas celulares de leucemia investigadas hasta ahora solo responden al tratamiento con citoquinas particulares y no se pueden desarrollar a CD efectivas a través de una diferenciación secuencial de CD. Aunque se pueden utilizar agentes farmacológicos que movilizan calcio y que por tanto evitan las rutas de señales de receptores defectuosos para inducir un fenotipo similar a CD en células mieloides, la activación de proteína quinasa C mediante PMA induce un fenotipo de CD en la línea celular de mieloblastos humanos KG-1, la manipulación de rutas de señalización intracelulares con tales agentes produce CPA que no pueden cubrir la función completa de las CD. En el caso de KG-1 estimuladas con citoquinas, por ejemplo, no se observó diferenciación sin maduración inmediata.

Por tanto, las líneas celulares examinadas hasta ahora solo son adecuadas con limitación para la investigación de la biología de las CD. Estas no son adecuadas para usos inmunoterapéuticos y en sistemas de prueba para ensayar sustancias que tienen influencia en el sistema inmune. Por tanto, el estado de la técnica era que las líneas celulares leucémicas u otras líneas de células tumorales no serían capaces de diferenciarse mediante la estimulación correspondiente a CD inmaduras que, dependiendo de la estimulación, son similares a CD intersticiales o CD de Langerhans, y posteriormente a CD maduras potentes, específicamente CD de tipo 1 o CD de tipo 2.

Actualmente se usan las CD en diferentes procedimientos y planteamientos para tratar diferentes enfermedades, entre ellas por ejemplo, enfermedades tumorales, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes. Los resultados han tenido éxito y son prometedores. Sin embargo, para todos estos tratamientos se deben usar actualmente CD que se obtienen de células primarias, ya que hasta ahora, a pesar de los grandes esfuerzos, no se han podido generar e identificar líneas celulares de las que producir CD que estimulen una respuesta inmune eficaz. Las desventajas de las CD de células primarias son, por ejemplo, que las CD o sus células precursoras solo se pueden obtener en cantidades muy pequeñas de pacientes o donantes, lo que limita mucho el uso de estas células, su obtención requiere una gran inversión de tiempo y trabajo técnico, la cantidad de CD obtenidas es tan pequeña que en seres humanos no se pueden usar, por mucho, cantidades proporcionales a las que en modelos en ratón pueden alcanzar los mejores resultados de tratamiento. Por tanto, las CD se deben obtener de células precursoras, como por ejemplo, células troncales CD34 positivas o monocitos, madurarlas *in vitro* a CD mediante una estimulación adecuada con moléculas estimuladoras, en donde las células precursoras son extremadamente raras tanto en sangre como en tejidos. Se estima que representan aproximadamente el 1% de las PBMC. Además su cultivo es complicado y está muy limitado por la cantidad de monocitos obtenidos de las PBMC y con frecuencia alterado por las impurezas en las células progenitoras. La gran variabilidad resultante en la eficacia de purificación, estimulación y efectividad de las células progenitoras de CD autólogas dificultan mucho la estandarización de procesos para tratamientos inmunoterapéuticos. Además de la variación dentro de un paciente también está la variación entre pacientes individuales.

Para el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos basados en CD efectivas es ventajoso generar líneas celulares bien caracterizadas, que o bien representan CD efectivas o bien se pueden transformar en las mismas *in vitro* mediante la estimulación adecuada con moléculas señales adecuadas, que después solas en combinación con otras sustancias proporcionan agentes inmunoterapéuticos eficaces.

Por tanto, el objeto de la invención es proporcionar un método para la producción de líneas celulares o células, a partir de las cuales se pueden generar células dendríticas (CD) efectivas, que se pueden usar en particular como agentes inmunoterapéuticos o como parte de agentes inmunoterapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunes.

La invención resuelve este problema técnico proporcionando un método para la producción de células o líneas celulares dendríticas efectivas, en donde la línea celular MUTZ-3 positiva para CD124 y CD116 se pone en contacto con al menos una molécula estimuladora al mismo tiempo o de forma secuencial desplazada en el tiempo y se pueden obtener las células o líneas celulares dendríticas efectivas, en donde las moléculas estimuladoras son GM-CSF, TNF-alfa, LPS, PGE2, ligando de CD40, poliIC, calcio, PMA, TGF-beta 1, IL-7, IL-13 y/o IL-4.

Respecto a la invención, los siguientes términos se deben usar como sigue:

En **líneas celulares** de las que se pueden obtener células dendríticas efectivas (CD efectivas) se incluyen todas las líneas de células tumorales, preferiblemente líneas celulares de leucemia, como por ejemplo, mieloides, linfoides y plasmacitoides, y aquellas líneas celulares, que no son de origen leucémico, pero que tienen CD124 y CD116, preferiblemente también CD34, incluyendo aquellas líneas celulares que no son líneas celulares tumorales en sentido estricto. También se puede referir a líneas celulares, que carecen de CD124 y/o CD116, pero que expresan CD124 y CD116 recombinantes funcionales a través de la incorporación de genes lo que permite la producción de CD efectivas. Preferiblemente las líneas celulares de las que se pueden producir CD también son positivas para CD34, en donde CD34 también se puede incorporar por medio de genes. Tales líneas celulares, de las que se

pueden producir CD efectivas se pueden obtener de células tumorales o células primarias. Esto se produce mediante métodos convencionales por sí, como por ejemplo, transformación, inmortalización, fusión celular con células tumorales y/o mediante cultivo *in vitro* y/o *in vivo* con o sin clonación de células de líneas celulares preferiblemente homogéneas. Se prefieren métodos en los que las células CD124 y CD116 positivas se enriquecen y clonan mediante técnicas de bolas magnéticas o métodos de separación celular por FACS conocidos por sí. Como donantes de células tumorales que, según la invención, se pueden transformar en líneas celulares mediante moléculas estimuladoras, de las que se pueden obtener CD efectivas, se prefieren pacientes con leucemia mieloide crónica o leucemia mieloide aguda; sin embargo, la invención no se restringe a los mismos. Las células primarias de las que pueden obtener líneas celulares adecuadas son preferiblemente de origen mieloide, linfoide, plasmacitoide o monocítico. Para obtener CD efectivas a partir de líneas celulares y/o para aumentar la eficacia de las CD obtenidas, se pueden incorporar uno o más genes en las líneas celulares, células tumorales o células primarias según métodos conocidos por sí, genes que, por ejemplo, codifican y/o expresan receptores o inhibidores para moléculas estimuladoras. También se pueden introducir uno o más agentes inmunoterapéuticos como genes. La introducción de genes de agentes inmunoterapéuticos en esta fase de la línea celular tiene la ventaja de que los genes se pueden caracterizar como línea celular y no se tienen que introducir después de la maduración a células dendríticas para un uso posterior como agente inmunoterapéutico. Una posibilidad más de introducir genes es la fusión de líneas celulares con otras células o líneas celulares según métodos en sí conocidos.

La línea celular que se usa en el método según la invención para la producción de células o líneas celulares dendríticas efectivas, es la línea celular MUTZ-3 CD124 y CD116 positiva.

Según la invención por **CD efectivas** se entienden aquellas células o líneas celulares que mediante estimulación de líneas celulares con moléculas estimuladoras se diferencian a células que actúan como células dendríticas y activan, inhiben o modulan partes humorales y/o celulares del sistema inmune. Las CD efectivas se usan como agentes inmunoterapéuticos. Para este fin, las CD efectivas, sus células precursoras en las fases de diferenciación apropiadas o las células de las líneas celulares se cargan al menos con un antígeno. La carga se realiza según métodos conocidos en sí, por ejemplo, mediante carga con antígenos tumorales o antígenos de infección sintéticos o purificados o parcialmente purificados de material biológico, con lisados celulares de células tumorales, líneas de células tumorales, células o líneas celulares infectadas, mediante fusión con otras células o líneas celulares, mediante introducción de al menos un gen inmunoterapéutico, mediante infección con partículas infecciosas o partes respectivas de las mismas. Opcionalmente, las células o líneas celulares cargadas se diferencian adicionalmente mediante moléculas estimuladoras. Las CD efectivas en general procesan los antígenos y los presentan a las células inmunes correspondientes del sistema inmune a través moléculas determinadas, por ejemplo a través de moléculas del MHC I o MHC II, y activan mediante las mismas la correspondiente respuesta inmune humoral y/o celular, que combate la enfermedad o construye una memoria inmunológica, que evita las enfermedades de forma profiláctica. Para este fin, las CD efectivas se usan en al menos una fase de actividad y/o efectora adecuada como agente inmunoterapéutico en el paciente.

Las células dendríticas efectivas de la invención se obtienen de la línea celular MUTZ-3.

Por **moléculas estimuladoras** se entienden tales moléculas químicas y biológicas que tienen influencia en la diferenciación de células, como por ejemplo, citoquinas (IL-4, TNF-alfa), factores de crecimiento (por ejemplo, GM-CSF), moléculas sustitutas de citoquinas o factores de crecimiento, que inducen un efecto biológico comparable al de las moléculas estimuladoras mismas, por ejemplos anticuerpos, otras moléculas biológicas (por ejemplo, LPS, poliIC) y agentes químicos. Las moléculas se pueden utilizar juntas al mismo tiempo o de forma secuencial diferida en el tiempo para lograr la correspondiente fase deseada de diferenciación de las células y por tanto fases variables de actividad y efectora, por ejemplo, células de fenotipo CD de tipo 1 o CD de tipo 2, que se pueden utilizar para los diferentes usos según la idoneidad de las mismas. Por ejemplo, a partir de la misma línea de células tumorales de partida se pueden producir diferentes CD efectivas mediante diferentes moléculas estimuladoras, por ejemplo que tienen efecto inhibidor o estimulador sobre diferentes componentes del sistema inmune y de esta manera se pueden usar, por ejemplo, en la inmunoterapia de enfermedades infecciosas y enfermedades tumorales o enfermedades autoinmunes. Además entre las moléculas estimuladoras están según la invención todas las señales de peligro incluyendo tales, que en sentido estricto no son moléculas, como por ejemplo, tensión mecánica. Las moléculas estimuladoras que se usan en los métodos según la invención son GM-CSF, TNF-alfa, LPS, PGE2, ligando de CD40, poliIC, calcio, PMA, TGF-beta 1, IL-7, IL-13 y/o IL-4.

Según la invención, por **agentes inmunoterapéuticos**, se entiende:

- tales agentes terapéuticos que se pueden usar contra enfermedades de forma profiláctica o curativa, en los cuales se pueden usar células dendríticas efectivas para el tratamiento, en donde las células dendríticas efectivas adecuadas pueden estar en diferentes fases de desarrollo y activación. Además, el éxito del tratamiento puede ser completo o parcial. Además, por ejemplo, se puede tratar de vacunas.

CD semialogénicas para agentes inmunoterapéuticos son, según la invención, tales CD efectivas que coinciden en una o más moléculas HLA con el receptor del agente inmunoterapéutico y las células no proceden de la misma

persona. Por tanto, también se incluyen tales CD que muestran una coincidencia completa en las moléculas HLA y no provienen de la misma persona.

5 Según la invención, **CD allogénicas** para agentes inmunoterapéuticos son tales CD efectivas que no coinciden en ninguna molécula HLA con las del receptor del agente inmunoterapéutico.

Por **líneas celulares o células CD124 positivas** se entiende según la invención tales células que son sensibles frente a un tratamiento con IL-4.

10 Por **líneas celulares o células CD116 positivas** se entiende según la invención tales células que son sensibles frente a un tratamiento con GM-CSF.

Por **enfermedades inmunes** se entiende según la invención todas las enfermedades en las que se pueden usar células dendríticas para el tratamiento, por ejemplo:

- 15
- enfermedades infecciosas
 - enfermedades tumorales
 - enfermedades autoinmunes.

20 Por **introducción de genes** se entiende según la invención, una transfección o infección vírica o transformación de células o líneas celulares en donde se introduce material genético en las células o líneas celulares según métodos conocidos por sí. El material genético puede ser ADN o ARN. El material genético codifica la expresión de al menos una proteína o péptido y/o el ARN mismo puede tener efecto inhibitorio o estimulador, por ejemplo, como ARN antisentido. Las proteínas expresadas se pueden procesar y modificar adicionalmente, por ejemplo, mediante glicosilación. Los genes también se pueden introducir mediante fusión de las células o las líneas celulares con otras células o líneas celulares.

25

Genes de agentes inmunoterapéuticos son según la invención genes que codifican proteínas o péptidos que desempeñan un papel en el uso de células dendríticas efectivas como agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo, antígenos tumorales, antígenos víricos o antígenos de parásitos, bacterias u otros microorganismos. Las células o líneas celulares en las que se introducen los genes expresan las proteínas o péptidos de estos genes. Posteriormente las células dendríticas las presentan al sistema inmune, mediante lo cual las células dendríticas efectivas activan, inhiben o modulan las respuestas inmunes correspondientes que dependen de las fases de actividad y efectora de las células dendríticas efectivas. Para la presentación de los productos génicos, las proteínas o péptidos expresados se procesan o se usan directamente; además, las proteínas o péptidos expresados se pueden modificar, por ejemplo, mediante glicosilación.

30

35

Moléculas sustitutas son aquellas moléculas que pueden sustituir a las moléculas estimuladoras en cuanto a su efecto, por ejemplo, se pueden usar en lugar de citoquinas anticuerpos o peptidomiméticos que tienen influencia en las células de la misma manera que las moléculas estimuladoras.

40

Para producir **apoptosis o necrosis** celular según la invención, se usan diferentes métodos según se requiera, por ejemplo, se pueden usar irradiación, choque térmico, esfuerzo mecánico, agresión oxidativa, ultrasonido, inducción de genes suicidas, inducción mediante moléculas químicas y biológicas, glicerol, zinc, ácido butilínico, butirato de sodio, leptomicina B con STI571 y/o ligando de Fas. Además, las células pueden formar poblaciones mixtas de las que una parte experimenta apoptosis o necrosis. Se pueden usar estos métodos para asegurarse que las células dendríticas efectivas no son viables en el organismo.

45

Antígenos tumorales son según la invención, péptidos, proteínas, lípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, hidratos de carbono, glicolípidos, glicopéptidos, glicoproteínas, proteínas fosforiladas, péptidos fosforilados, proteínas o péptidos modificados postraduccionalmente de otra manera, que comparadas con el tejido normal, en las células del tumor se sobreexpresan, se subexpresan, se expresan de nuevo, están mutadas, se modifican postraduccionalmente de forma diferencial, se procesan de forma diferencial, se localizan de forma diferencial, se pliegan de forma diferencial o se modifican de otra manera.

50

55

Antígenos de infección son según la invención, péptidos, proteínas, lípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, hidratos de carbono, glicolípidos, glicopéptidos, glicoproteínas, proteínas fosforiladas, péptidos fosforilados, proteínas o péptidos modificados postraduccionalmente de otra manera, que proceden de partículas infecciosas o que derivan de las mismas.

60

Partículas infecciosas son según la invención, entidades infecciosas que causan enfermedades, o partes derivadas de las mismas. Pertenecen a las mismas, por ejemplo, virus, bacterias, parásitos y priones. Las partículas infecciosas que según la invención que sirven para la producción de células dendríticas efectivas y su uso no se pueden propagar in vivo en el paciente.

65

Además, en el presente documento se describe el uso y producción de líneas de células tumorales CD124+ y CD116+, que preferiblemente también son CD34+, como sistemas modelo y de prueba para el ensayo de la biología de CD y para el ensayo de sustancias que tienen influencia en el sistema inmune y su condicionamiento.

5 Por un **sistema modelo y de prueba para el ensayo de la biología de las CD** se entiende sistemas de prueba que tienen como componente una línea de células tumorales CD124+ y CD116+, que preferiblemente también es CD34+, y con cuya ayuda se pueden esclarecer procesos durante la diferenciación de las células dendríticas y de las células que maduran a células dendríticas y/o con cuya ayuda se esclarecen procesos que puede estar influenciados por las CD o sus células precursoras mediante la activación, inhibición o modulación del sistema inmune y su respuesta. Al esclarecimiento de estos procesos también pertenece el esclarecimiento de otras influencias como por ejemplo, la influencia de moléculas estimuladoras y/o su efecto en el tiempo, por ejemplo, durante la diferenciación de las CD y la modulación de la actividad del sistema inmune. Estos sistemas modelo y de prueba se pueden usar, por ejemplo, en forma de kits y/o sistemas de alto rendimiento. El experto en la materia conoce las formas de ensayo individuales y su ejecución.

15 Por un **sistema modelo y de prueba para el ensayo de sustancias que tienen un efecto sobre el sistema inmune** se entiende sistemas de prueba que tienen como componente una línea de células tumorales CD124+ y CD116+, que preferiblemente también es CD34+, y con cuya ayuda se puede ensayar si una sustancia tiene influencia sobre el sistema inmune y/o su condicionamiento. Entre otros se incluyen también sistemas de prueba que sirven para el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo el ensayo de vacunas tumorales adecuadas y su formulación y tales sistemas de prueba que permiten ensayar la influencia de sustancias que no son agentes inmunoterapéuticos, como por ejemplo, sustancias químicas, agentes farmacológicos, cosméticos o sus precursores, o productos alimenticios o sus componentes, en el sistema inmune. Además, tales sistemas de prueba pueden servir para el desarrollo de productos de, por ejemplo, agentes inmunoterapéuticos y otros productos, que pueden ejercer influencia sobre el sistema inmune. Estos sistemas modelo y de prueba se pueden usar, por ejemplo, en forma de kits y/o sistemas de alto rendimiento. El experto en la materia conoce las formas de ensayo individuales y su ejecución.

30 Las células que son positivas para CD124 tienen el receptor para IL4, las CD116+ el receptor para GM-CSF, y las CD34+ el marcador para células troncales y progenitoras hematopoyéticas.

A continuación se describe un método para la identificación de péptidos que presentan las células dendríticas efectivas según la invención, que comprende los pasos de

- 35 (a) propagar las células dendríticas según la invención según métodos conocidos por sí, en donde las células dendríticas son inmaduras;
- (b) añadir antígenos o inmunógenos o partes de los mismos o lisados celulares, en donde las células dendríticas inmaduras (CDi) maduran a células dendríticas maduras (CDm), y procesan los antígenos o inmunógenos o partes de los mismos o lisados celulares y presentan péptidos adecuados en el contexto de moléculas de MHC de clase I o MHC de clase II;
- 40 (c) obtener los péptidos presentados de las células dendríticas según métodos conocidos por sí; y
- (d) identificar/determinar los péptidos desprendidos según métodos conocidos por sí.

45 Preferiblemente, los péptidos obtenidos se separan mediante métodos conocidos por sí, como por ejemplo, por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). En particular preferiblemente, los péptidos separados se identifican mediante espectrometría de masas y lo más preferiblemente los péptidos se secuencian.

50 Preferiblemente, el método permite la validación de los péptidos identificados/determinados. Más preferiblemente, los péptidos identificados/determinados que se obtienen según el método, se producen de forma sintética según métodos en sí conocidos. Lo más preferiblemente, los péptidos producidos sintéticamente se añaden a células dendríticas inmaduras y/o maduras según la invención, en donde las células dendríticas se cargan ("pulsan") según métodos en sí conocidos. En una variante en lugar del paso (b) se lleva a cabo el siguiente paso: cargar las células maduras CDm con péptidos de MHC I y/o MHC II. Este paso puede estar precedido por un paso para la separación de péptidos existentes de MHC I y/o MHC II según métodos conocidos por sí. Preferiblemente, se presentan librerías de péptidos de MHC I y/o MHC II a las CDm.

60 Sorprendentemente, con la invención se pudieron encontrar líneas de célula leucémicas con una propiedad determinada, que se comportan en todos los aspectos como un equivalente inmortalizado de células precursoras de CD CD34+ y que son adecuadas para investigar la biología de las CD, el ensayo de sustancias que tienen influencia en el sistema inmune y para agentes inmunoterapéuticos. Las propiedades determinadas de las líneas de células tumorales son una positividad para CD124 (IL-4R)

65 La línea celular mielóide MUTZ-3 es la línea celular que se usa en el método según la invención para la producción de células o líneas celulares dendríticas efectivas. Recientemente se ha sabido que MUTZ-3 tras la estimulación con IL-4 y GM-CSF disminuye la expresión de CD14. Las investigaciones de la invención muestran que, en comparación con otras líneas celulares leucémicas conocidas y probadas y otras líneas de células tumorales, las células MUTZ-3

son únicas en su capacidad de alcanzar un estado de CD inmadura. Además, después de estimulación adicional expresan el marcador de maduración CD83, y ensayos funcionales demuestran su capacidad para el procesamiento y presentación de antígenos. De este modo, es apropiada para fines inmunoterapéuticos. MUTZ-3 es la primera línea de células leucémicas humana que se puede estimular de modo que experimente diferenciación y formación de un fenotipo de CD inmadura y es adecuada como modelo *in vitro* para investigar las vías moleculares y fisiológicas que producen la diferenciación y maduración de CD y para investigar la biología de las CD y para el ensayo de sustancias que tienen influencia en el sistema inmune.

En el contexto de la invención se muestra de forma sorprendente que es posible generar CD efectivas a partir de la línea celular MUTZ-3, que en particular se pueden usar como agentes inmunoterapéuticos o como parte de agentes inmunoterapéuticos para el tratamiento de enfermedades inmunes. Características clave de la línea celular es su positividad para CD124 y CD116 y la sensibilidad a moléculas estimuladoras, como por ejemplo, citoquinas, mientras que otras líneas de células leucémicas estudiadas que no muestran estas características, no producen CD efectivas en el sentido de la invención. Preferiblemente, a partir de la línea celular se obtienen CD con fases de activación y efectora variables mediante una estimulación secuencial con moléculas estimuladoras. Las fases de activación y efectora individuales se pueden usar como CD efectivas para la activación de distintas partes del sistema inmune, y o bien activar células T CD8+ a través de la presentación en MHC I, activar células T CD4+ a través de la presentación por MHC II o activar células NKT a través de CD1. Las CD activadas se emplean principalmente para agentes inmunoterapéuticos, que se usan en el tratamiento de enfermedades infecciosas y enfermedades tumorales. Además, las fases de activación de CD adecuadas pueden dar lugar a la inducción de anergia y tolerancia, y por tanto son adecuadas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

La invención se describirá posteriormente con más detalle, por medio de la línea de células mieloides humanas MUTZ-3.

La línea de células de leucemia mieloide aguda humana MUTZ-3 es sensible a tales citoquinas que son responsables de que se generen CD a partir de monocitos y células troncales CD34 positivas en modelos *in vivo* e *in vitro*. Las células MUTZ-3 se comportan en todas las propiedades como equivalentes inmortalizados de células precursoras de CD CD34 positivas. Mediante estimulación con las correspondientes mezclas de citoquinas específicas adecuadas se desarrollan a células con fenotipo que corresponde al fenotipo de, por ejemplo, CD intersticiales o células de Langerhans. Como resultado de una maduración las células expresan CD83. MUTZ-3 posee el espectro completo de procesos de procesamiento y presentación de antígenos para la presentación y activación dependiente de MHC y dependiente de CD1. En condiciones adecuadas, por ejemplo, administración de interferón gamma o dexametasona, pueden adoptar específicamente un fenotipo CD1 o fenotipo CD2 mediante el cual se puede controlar una respuesta inmune. Esto muestra que las células MUTZ-3 representan una fuente ilimitada para células precursoras (progenitoras) de CD CD34 positivas, que se pueden usar eficazmente en la estimulación (dirigida) de las diferentes células inmunes y por tanto, como CD efectivas para el tratamiento de enfermedades inmunes.

El componente importante, en el sentido de la invención, para agentes inmunoterapéuticos es la línea celular, que ella misma representa CD efectivas o que a través de un tratamiento con las moléculas estimuladoras adecuadas forma CD efectivas. En el sentido de invención las CD efectivas se pueden combinar con componentes adicionales para dar agentes inmunoterapéuticos alogénicos o semialogénicos, en donde, si se requiere, se puede producir una maduración adicional de las células, opcionalmente, a través de moléculas estimuladoras adecuadas. En el ejemplo 1, se describe esto para MUTZ-3 para la activación mediada por MHCI, MHCII y CD1, respectivamente. Sin embargo, la invención no se restringe a la misma, sino que además abarca todos los campos de usos terapéuticos o profilácticos, donde se pueden usar las células CD.

Por ejemplo, esto también incluye agentes terapéuticos tumorales. Estos se pueden producir, por ejemplo, de tal manera que las CD alogénicas o semialogénicas, por ejemplo, se pulsan con antígenos tumorales según métodos conocidos por sí y se administran al paciente. Los antígenos tumorales pueden ser una o varias moléculas definidas, como por ejemplo, péptidos, glicopéptidos, proteínas, glicoproteínas, glicolípidos, que se sintetizan, purifican o se usan en forma de lisado celular; un ejemplo adicional es la transfección de las CD efectivas con ARN, ADN o vectores víricos, que codifican antígenos tumorales o partes de los mismos; un ejemplo adicional es cargar CD efectivas con antígenos mediante la incubación con células tumorales apoptóticas y/o necróticas, o con células sometidas a choque térmico; un ejemplo adicional es la fusión con células tumorales. Un uso clínico de tales CD producidas en el ámbito de la invención se realiza en forma de CD alogénicas o semialogénicas de forma profiláctica o como terapia curativa, por ejemplo, en la terapia de tumores o después de la resección de tales tumores, por ejemplo mediante cirugía, como terapia adyuvante para el tratamiento de enfermedades residuales mínimas incluyendo para combatir metástasis o para impedir la formación de metástasis o micrometástasis.

Son posibles una serie de estrategias de inmunización, entre otras la aplicación intranodal, intratumoral, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o mucosa de las CD con o sin inmunoestimuladores adicionales como, por ejemplo, citoquinas, quimioquinas u otras sustancias inmunoestimuladoras o inmunomoduladoras. Las CD producidas según la invención también pueden ser parte de esquemas de

inmunización más complejos en los que, por ejemplo, los componentes adicionales se administran al mismo tiempo o de manera desplazada en el tiempo.

Aunque las CD obtenidas a partir de MUTZ-3 no se dividen más después de la diferenciación, no se puede excluir que las CD que se pueden producir de otras células o líneas leucémicas se dividan adicionalmente. Por consiguiente, una variante preferida es la irradiación de las CD cargadas con antígeno, su tratamiento con mitomicina C u otras medidas que impidan la división de las células *in vivo*. Una alternativa sería, por ejemplo, la incorporación de un denominado gen suicida, como por ejemplo, el gen de la timidina quinasa (TK) de HSV, que permite la aniquilación selectiva de tales células que tienen la TK de HSV mediante ganciclovir.

En el presente documento también se describe la producción de líneas celulares, que pueden madurar a CD efectivas. El método según la invención comprende el aislamiento de células CD34+, CD124+ y CD116+ según métodos conocidos por sí a partir de material humano, preferiblemente de pacientes de leucemia. Las células se pueden aislar secuencialmente, por ejemplo, de sangre periférica o médula ósea de pacientes de leucemia mediante enriquecimiento de células que son CD34+, CD124+ y CD116+, con ayuda de bolas magnéticas que tienen anticuerpos para CD34+, CD124+ y CD116+. De forma alternativa, las células CD34+, CD124+ y CD116+ se pueden aislar mediante separación celular por medio de citometría de flujo y anticuerpos específicos para CD34-, CD124- y CD116-.

Además, se describe un método para la producción de un medicamento que comprende los pasos del método según la invención y además comprende el paso de formular el medicamento en una forma farmacéuticamente aceptable, en donde el medicamento opcionalmente se combina adicionalmente con un adyuvante como un potenciador del principio activo.

Mediante el término "medicamento" se definen según la invención sustancias y preparaciones de sustancias que son adecuadas para curar, aliviar o prevenir enfermedades, dolencias, daños en el cuerpo o afecciones patológicas mediante su aplicación sobre o en el cuerpo humano. Durante el proceso de producción según la invención, se pueden añadir adyuvantes médicos y/o farmacéuticos técnicos a los compuestos identificados con el método según la invención. Los adyuvantes médicos son, según la invención, tales sustancias que se usan para la producción (como ingredientes activos) de medicamentos en un proceso según la invención. Los adyuvantes farmacéutico-técnicos sirven solamente en la formulación adecuada de los medicamentos y se pueden incluso eliminar posteriormente, siempre que solo se necesiten durante el proceso, o pueden ser parte del medicamento como soporte farmacéuticamente aceptable. Posteriormente se dan ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables.

La formulación de los medicamentos se realiza opcionalmente en combinación con un soporte y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

El experto en la materia conoce ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables adecuados y estos incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como, por ejemplo, emulsiones de aceite en agua, distintos tipos de detergentes, soluciones estériles, etc.

Los medicamentos que incluyen tales soportes se pueden formular por medio de métodos convencionales conocidos. Se prefieren vías de aplicación en donde se introducen las células dendríticas efectivas de la invención en una formulación farmacéutica en un sitio del cuerpo, donde pueden realizar mejor su función. Tales sitios y formas de aplicación los conoce el experto en la materia, por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, local o intradérmica, preferiblemente, por ejemplo, intranodal, intradérmica, subcutánea, intrarrectal, intravenosa o local. Una vía de aplicación adecuada puede ser diferentemente adecuada, dependiendo de la enfermedad.

Por ejemplo, una aplicación de células dendríticas para la terapia de enfermedades autoinmunes se dirige a una tolerancia del sistema inmune, mientras que una vía de aplicación adecuada para el tratamiento o profilaxis de enfermedades tumorales o infecciosas debe apoyar la activación del sistema inmune. El experto en la materia puede determinar una vía de administración adecuada con métodos conocidos. Los medicamentos se pueden administrar a un individuo a una dosis adecuada, una dosis comprende de 100 hasta 10^{12} células dendríticas efectivas, preferiblemente de 10^5 hasta 10^{10} . Las células dendríticas efectivas se cargan con una forma y cantidad adecuadas de antígeno, que también puede variar dependiendo del tipo de uso. Una dosis se administra preferiblemente una vez a la semana, hasta intervalos mayores, como por ejemplo un mes, 3 meses, un año e incluso intervalos más largos. También pueden ser adecuados intervalos más cortos, como por ejemplo, a diario. El experto en la materia puede determinar el intervalo de tiempo y dosis adecuados. Para ello se pueden usar métodos preferidos de inmunoseguimiento y ajustar equivalentemente las dosis correspondientes. El experto en la materia conoce los métodos correspondientes y se describen en parte en los ejemplos.

El tipo de dosis la determinará el médico según los factores clínicos. El experto en la materia sabe que el tipo de dosis depende de diversos factores, como por ejemplo, el tamaño, superficie corporal, edad, sexo o estado general de salud del paciente, pero también del agente particular que se administra, la duración y tipo de administración y de otros medicamentos que posiblemente se administran en paralelo.

En una forma de realización preferida, las células dendríticas efectivas de la invención se pueden cargar con una serie de antígenos.

5 En otra forma de realización preferida, se combinan dosis de células dendríticas efectivas cargadas con los antígenos adecuados con dosis que comprenden los antígenos o antígenos individuales o parte de los mismos directamente en formulaciones adecuadas sin carga *ex vivo* de las células dendríticas. Esto tiene la ventaja de que las células dendríticas semialogénicas cargadas *ex vivo* según la invención inducen fuertemente la respuesta inmune, que está apoyada por la respuesta alogénica como un tipo de señal de peligro y asociada con una
10 inmunización parcial específica mediante la presentación de moléculas de MHC solapantes, combinada con una respuesta inmune que se dirige a las células dendríticas autólogas *in vivo*. Tal combinación es particularmente adecuada para romper tolerancias y anergias.

15 En una forma de realización preferida, las células dendríticas efectivas inmaduras (forma CDi) según la invención cargadas con el antígeno correspondiente se usan para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. En una forma de realización preferida adicional, las células se detienen en la forma CDi de forma transitoria o estable, en donde se usan métodos que conoce el experto en la materia por sí, por ejemplo una detención mediante modificación genética. En una forma de realización preferida adicional, después de cargar las células en la forma inmadura (CDi) o en la forma madura (CDm), opcionalmente, se maduran adicionalmente y se usan como células dendríticas
20 efectivas cargadas (CDm) para el tratamiento o profilaxis de enfermedades tumorales o infecciosas.

25 Un medicamento según la invención comprende una sustancia farmacológica, que contiene las células dendríticas en una solución o forma de administración adecuada. Estas se pueden administrar solas o en combinación con uno o más adyuvantes u otra sustancia adecuada para reforzar el efecto del medicamento. Como adyuvantes preferidos se usan QS-21, GPI-0100 u otras saponinas, emulsiones de agua en aceite como por ejemplo adyuvantes Montanide, polilisina, compuestos de poliarginina, compuestos de ADN como por ejemplo, CpG, Detox, vacunas bacterianas, como por ejemplo vacuna contra el tifus o vacunas BCG y se mezclan con las células dendríticas según la invención de una manera correspondiente adecuada según métodos conocidos por sí.

30 Una forma preferida de los adyuvantes son factores coestimuladores, citoquinas y/o factores de crecimiento, como por ejemplo, GM-CSF o IL-2 o IL-12. Estos también se pueden introducir en una forma genética en las células de las líneas celulares según la invención, preferiblemente de forma estable.

35 El uso del medicamento es adecuado para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades cancerosas, tumores, infecciones y/o enfermedades autoinmunes.

40 Se prefiere la enfermedad cancerosa o el tumor que se va a tratar o prevenir elegida del grupo de enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales de la cabeza y la nuca, pulmones, mediastino, aparato digestivo, sistema genital/aparato urinario, sistema ginecológico, mama, sistema endocrino, piel, enfermedades cancerosas o enfermedades tumorales de la niñez, tumores primarios, cáncer metastásico, sarcoma de tejidos blandos o de huesos, un melanoma, neoplasia del sistema nervioso central, linfomas, leucemias, síndrome paraneoplásico, carcinomatosis y/o tumor maligno peritoneal, relacionado con tumor maligno inmunosuprimido.

45 La infección que se va a tratar o impedir con el medicamento según la invención, se elige de infecciones bacterianas, infecciones víricas, infecciones fúngicas, infecciones con protozoos y/o infecciones con helmintos. Se prefiere la infección bacteriana, vírica, fúngica, infección con protozoos y/o infección con helmintos, que se va a tratar o impedir, elegida de infecciones como septicemia o choque séptico, fiebre de origen desconocido, endocarditis infecciosa, infecciones y abscesos intraabdominales, infecciones agudas, enfermedades diarreicas, intoxicación alimentaria bacteriana, infecciones de transmisión sexual, infecciones inflamatorias de la pelvis, infecciones del
50 aparato urinario, pielonefritis, osteomielitis, infecciones de la piel, músculo o tejidos blandos, infecciones por inyección de drogas, infecciones por mordeduras, arañazos o quemaduras, infecciones en el receptor de un trasplante, infecciones hospitalarias y/o infecciones intravasculares por dispositivos. En una forma de realización más preferida la infección que se va a impedir o tratar se elige de infecciones bacterianas como infecciones por neumococos, infecciones por estafilococos, infecciones por estreptococos, infecciones por enterococos, difteria, otras infecciones por corinebacterias, carbunco, infecciones por *Listeria monocytogenes*, tétanos, botulismo, gangrena gaseosa, colitis asociada a antibióticos, otras infecciones por clostridios, infecciones por meningococos, infecciones por gonococos, infecciones por *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*, infecciones por otras especies de *Moraxella*, infecciones por *Klingella*, infecciones por *Haemophilus influenzae*, infecciones por otras especies de *Haemophilus*, infecciones por el grupo HACEK, infecciones por otros bacilos Gram negativos, infecciones por *Legionella*, tos ferina, infecciones por enterobacilos Gram negativos, infecciones por *Helicobacter*, infecciones por *Pseudomonas* y otros organismos relacionados, salmonelosis, shigelosis, infecciones por *Campylobacter* y especies relacionadas, cólera, vibrio, brucelosis, tularemia, peste, otras infecciones por yersinias, infecciones por *Bartonella*, incluyendo infecciones por arañazos de gato, donovania (granuloma inguinal), nocardiosis, actinomycosis, infecciones por organismos anaerobios mezclados, tuberculosis, lepra, infecciones por bacterias no tuberculosas, sífilis, treponematosis endémica, leptospirosis, fiebre recidivante, borreliosis de Lyme, infecciones por rickettsias, micoplasmas o clamidias, infecciones víricas como infecciones por virus del herpes simple, infecciones por varicela
65

zoster, infecciones por el virus de Epstein Barr, incluyendo mononucleosis, infecciones por citomegalovirus, infecciones por herpesvirus humanos de tipo 6, 7 u 8, infecciones por virus de la viruela, infecciones por vaccinia, infecciones por otros poxvirus, infecciones por parvovirus, infecciones por virus del papiloma humano, infecciones víricas del aparato respiratorio, gripe, gastroenteritis vírica, infecciones por enterovirus, infecciones por reovirus, sarampión, rubeola, paperas, infecciones por el virus de la rabia, otras infecciones por rhabdovirus, infecciones producidas por virus de roedores y/o artrópodos, infecciones con virus de Marburg y/o Ébola, infecciones fúngicas como histoplasmosis, coccidioomicosis, blastomicosis, criptococosis, candidiasis, aspergilosis, mucormicosis, diferentes micosis, infecciones por Prototheca, infecciones por Pneumocistis carinii, infecciones con protozoos, como infestación con amebas, infecciones con amebas de vida libre, malaria, infecciones por parásitos de los glóbulos rojos, leishmaniosis, tripanosomiasis, infecciones por toxoplasma, infecciones intestinales por protozoos, colpitis por tricomonas, infecciones con helmintos, como triquinosis, infecciones con otros nematodos tisulares, infecciones con nematodos intestinales, filariosis, infecciones como loiasis, oncocercosis o dracontiasis, esquistosomiasis, infecciones con trematodos o infecciones con cestodos.

La enfermedad autoinmune que se va a tratar o impedir con el medicamento según la invención se elige de enfermedades autoinmunes como encefalomiелitis alérgica, anemia hemolítica autoinmune, tiroiditis autoinmune (síndrome de Hashimoto), esterilidad masculina autoinmune, pénfigo, enfermedad de la cavidad abdominal, enfermedad de Basedow, síndrome de Goodpasture, púrpura trombocitopénica idiopática, diabetes mellitus resistente a insulina, miastenia grave, anemia perniciosa, pénfigo vulgar, poliarteritis nodosa, cirrosis biliar primaria, síndrome de Reiter, fiebre reumática, sarcoidosis, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, oftalmia simpática, esclerosis múltiple y/o miocarditis vírica por respuesta al virus Cocksakie B.

Además, se describe un método para la producción de un medicamento que comprende los procedimientos según la invención, en donde el medicamento contiene las células dendríticas que se cargan con antígenos según métodos conocidos por sí o se fusionan con las células correspondientes. Las células dendríticas del medicamento se formulan con un soporte farmacéutico adecuado según los métodos conocidos por sí para la terapia de células dendríticas autólogas. El medicamento obtenido de esta manera se puede administrar según métodos conocidos por sí. Las células dendríticas del medicamento absorben antígenos, los procesan y presentan fragmentos de los mismos en su superficie en el contexto de moléculas de MHC y moléculas coestimuladoras. Después de una maduración adicional según métodos conocidos por sí, se emplean las células en una formulación adecuada en seres humanos. Un ejemplo adicional es la carga de células dendríticas maduras según los métodos conocidos por sí de "pulsar". Respecto a las células dendríticas se refiere a células dendríticas autólogas, alogénicas o semialogénicas, o células precursoras de las mismas o células de líneas celulares que tienen las características funcionales de células dendríticas, que mediante el correspondiente tratamiento adecuado *ex vivo* según métodos conocidos por sí se desarrollan y maduran.

Si es necesario, las células precursoras se maduran preferiblemente mediante la adición de factores adecuados, por ejemplo, factores coestimuladores, citoquinas y/o factores de crecimiento, como por ejemplo, IL-4 y GM-CSF a células que funcional y fenotípicamente son similares a las CDi. Estas células cargadas con los antígenos adecuados se maduran adicionalmente si se necesita. Las células dendríticas efectivas (CDm) cargadas resultantes son células que fenotípica y funcionalmente son similares a células dendríticas cargadas maduras, y se usan preferiblemente para la profilaxis o terapia de enfermedades tumorales o infecciosas. De forma alternativa, las células dendríticas efectivas se pueden cargar después como CDm, como por ejemplo, para péptidos clase de MHC definidos como antígenos. De forma alternativa, las células en las distintas fases de precursor, diferenciación y/o maduración se transfectan con ADN o ARN de antígenos, moléculas coestimuladoras y/o inmunógenos según métodos de tecnología genética conocidos por sí. Se prefieren las transformaciones estables de las células que experimentan división de la mejor manera posible, preferiblemente antes de la fase de precursor antes de la fase de diferenciación. De forma alternativa, las células dendríticas según la invención, en las fases adecuadas, como células precursoras, como células inmaduras o como células maduras, se fusionan con otras células según métodos conocidos por sí y opcionalmente además se diferencian y/o maduran. Para el tratamiento o profilaxis de enfermedades autoinmunes preferiblemente se usan células cargadas en la fase inmadura, como se ha descrito con más detalle anteriormente.

La invención se ilustra con más detalle mediante el siguiente ejemplo, sin que se limite a este ejemplo:

Ejemplo 1:

MUTZ-3, una línea celular humana CD34+, CD124+, CD116+ para la producción de CD efectivas mediante una diferenciación inducida con citoquinas de células dendríticas a partir de células precursoras CD34+ y el uso de las CD efectivas para la inducción de subseries de células T funcionales para la producción de agentes inmunoterapéuticos.

Materiales y métodos

Anticuerpos y reactivos

Para las investigaciones se utilizaron:

Anticuerpos monoclonales (Acm) marcados con PE contra CD40, CD34 y TCR Valfa 24 de Coulter Immunotec (Marsella, Francia), contra CD1a, CD54, CD83 y CD86 de Pharmingen (San Diego, CA) y contra CD80 de Becton-Dickinson (San Jose, CA)

Acm marcados con FITC contra HLA-DR, TCR V β 11 y CD14 de Becton-Dickinson, contra CD116 (receptor de GM-CSF) de Pharmingen.

La expresión de CD1d se determinó por medio de un Acm murino contra Cd1d (Acm CD1d27) (Spada et al. 1998, J Exp Med 188(8): 1529-1534) seguido por un Acm anti-IgG1 de ratón marcado con FITC (Pharmingen). La IgG1 de control de isotipo de ratón es de Organon Technika-Cappel (Malvern, PA), los controles de isotipo Simultest marcados con FITC y PE de Becton-Dickinson. La expresión de langerina se detectó mediante tinción con el Acm DDCM4 seguido por un Acm anti-ratón marcado con FITC. El bloqueo de la presentación de antígeno a través de CD1d se realizó con el Ac CD1d51 (Spada et al. 1998, J Exp Med 188(8): 1529-1534).

Cultivo de células

La línea de células de leucemia mielomonocítica humana, dependiente de citoquinas MUTZ-3 se cultivó en MEM-alfa con ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos (Gibco, Paisley, UK), SFT inactivado por calor, penicilina/estreptomocina y medio condicionado de la línea celular de carcinoma de vejiga humano 5637 al 10% (Quentmeier 1996, Leuk Res (4): 343-350). Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos (Costar, Cambridge, MA) a 37°C y CO₂ al 5% y se pasaron dos veces por semana. La línea celular THP-1 derivada de una leucemia monocítica aguda, la línea celular KG-1 derivada de una leucemia mielógena aguda, la línea de leucemia mieloide crónica K562, la línea celular HL-60 derivada de una leucemia promielocítica y la línea de linfoma histiocítica U937 similar a macrófagos se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Rockville, MD). Estas líneas celulares se cultivaron en IMDM o RPMI-1640 con SFT inactivado por calor, penicilina/estreptomocina, L-glutamina 2 M y beta-mercaptoetanol y se pasaron dos veces por semana en botellas de cultivo celular de 80 cm² (Costar).

Generación de células similares a CD inmaduras (CDi) y maduras (CDm) a partir de líneas celulares de leucemia

La inducción de un fenotipo similar a CD en líneas celulares de leucemia se realizó como sigue:

Las células se lavaron y se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 1x10⁵/ml (en un volumen de 3 ml) y se incubaron durante 7 días con GM-CSF (100 ng/ml, Novartis/Schering-Plough, Arnhem, NL), IL-4 (1000 U/ml, CLB) y TNF-alfa a dosis bajas (2,5 ng/ml, CLB, Ámsterdam, NL). El día 7 se indujo la maduración mediante la adición de TNF-alfa (75 ng/ml) o LPS (100 ng/ml, Sigma). Para la producción de células similares a CL se cultivaron las células MUTZ-3 durante 9 días en GM-CSF y TNF α a dosis bajas. Las células se incubaron después con o sin TGF β 1 (1 ng/ml, R&D Systems, Abingdon, Oxon UK) y TNF α a dosis bajas durante 7 días adicionales, en donde el medio de cultivo se renovó el día 2. Se investigó la expresión de CD1a y langerina en las CD inmaduras (CDi) obtenidas de estas manera.

Citometría de flujo

Las células cultivadas se lavaron y se resuspendieron en un número de células de 5x10⁴ a 1x10⁵ en 25 μ l de tampón de FACS helado (PBS, pH 7,5, BSA al 0,1%, azida sódica al 0,2%). Se añadieron los Acm específicos y marcados con fluorescencia o los controles de isotipo correspondientes y se incubaron las células durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron una vez y se resuspendieron en 250 μ l de tampón de FACS. Las células marcadas se analizaron en un FACStar (Becton Dickinson) mediante el uso del software CellQuest.

Reacción de linfocitos mezcla alogénicos (mixed lymphocyte reaction, MLR)

Se aislaron PBL alogénicos no adherentes por medio de centrifugación en gradiente sobre Hypaque Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Suecia) a partir de sangre periférica de donantes sanos. Las células se sembraron en placas de microtitulación de fondo redondeado a una concentración de 5x10⁴ células/pocillo y se incubaron con una serie de diluciones de CD MUTZ-3 en 200 μ l de medio de cultivo durante 5 días. Se determinó la proliferación de células T después de un pulso de 5 horas con ³H-timidina (0,4 μ Ci/pocillo, Amersham, Aylesbury, UK) (métodos estándar).

Inducción de la secreción de IL-12/p70 e IL-10 por CD maduras MUTZ-3 (CDm MUTZ-3)

Las CDi MUTZ-3 se lavaron y se sembraron en placas de 48 pocillos con un número de células de 1x10⁵ en MEM alfa (para los aditivos véase anteriormente). Las CD inmaduras MUTZ-3 (CDi MUTZ-3) se hicieron madurar mediante el tratamiento con TNF α en combinación con IFN-gamma (1000 U/ml, Biosource, Camarillo, CA) o dexametasona (1 μ mol/l, Sigma) (tiempo de incubación de 48 horas) y posterior estimulación con células irradiadas

de una línea celular J558 transfectada con el ligando de CD40 (J-558-CD40L, 1×10^5 células/pocillo). Las concentraciones de las citoquinas secretadas IL-10 e IL-12 (subunidad p70) se determinaron por medio de ELISA.

Inducción de células T CD8⁺ con una especificidad para la proteína de matriz del virus de la gripe

Las CD MUTZ-3 se infectaron con 100 pfu/célula de un adenovirus recombinante. Este adenovirus codifica el gen de la proteína de matriz M1 del virus Haemifluenza (RAd128). Para la infección de RAd128 las CD se lavaron con medio sin suero y se incubaron con lipofectamina (100 pfu/célula, $1,7 \mu\text{g/l} \times 10^8$ pfu). Después de 2 horas las células se lavaron con medio completo y después se incubaron durante la noche a 37°C y CO₂ al 5%. Otras CD MUTZ-3 se cargaron con el péptido M1₅₈₋₆₆ (50 $\mu\text{g/ml}$) derivado de M1 que se une a HLA-A2.1 junto con beta-microglobulina (2,5 $\mu\text{g/ml}$) en medio sin suero durante la noche a 37°C. Las células T CD8⁺ (respondedoras) se aislaron de PBMC HLA-A2+ por medio de un kit de aislamiento de células T CD8 MACS (Miltenyi Biotec). Se usaron las CD MUTZ-3 cargadas con antígeno (virus o péptido) (estimuladoras) a una relación respondedoras:estimuladoras de 5:1 en medio IMDM completo con suero humano (CLB) juntado al 10% e IL-7 5 ng/ml (R&D Systems). Después de una semana, se examinó la especificidad de las células T en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma. Para ello, se usaron células T2 irradiadas, que se habían cargado con el péptido M1₅₈₋₆₆ derivado de M1 que se une a HLA-A2.1 o como control con el péptido (E7₁₁₋₂₀) derivado de HPV16-E7 que se une a HLA-A2.1. Las células se cargaron durante la noche a 37°C con el péptido (50 $\mu\text{g/ml}$) y con beta-microglobulina (2,5 $\mu\text{g/ml}$) en medio sin suero.

Inducción de células T CD8⁺ con una especificidad para el antígeno asociado a melanoma, MART-1

Las CD MUTZ-3 se cargaron con el péptido derivado de MART-1 (ELAGIGILTV) (10 $\mu\text{g/ml}$) que se une a HLA-A2.1 durante 4 horas a 37°C en medio AIM-V (Gibco) sin suero. Las células T CD8⁺ (respondedoras) se aislaron de PBMC HLA-A2+ por medio de un kit de aislamiento de células T CD8 MACS (Miltenyi Biotec). Se usaron células CD MUTZ-3 cargadas con el péptido de MART-1 (estimuladoras) a una relación respondedoras:estimuladoras de 10:1 en medio AIM-V (Gibco) sin suero. Después de una semana, se examinó la especificidad de las células T en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma. Para ello, se usaron células T2 irradiadas, que se habían cargado con el péptido de MART-1 (ELAGIGILTV) que se une a HLA-A2.1 o como control con el péptido CEA.78 (IMIGVLVGV) derivado de CEA, que se une a HLA-A2.1. Las células se cargaron durante 4 horas a 37°C con el péptido (1 $\mu\text{g/ml}$) en medio AIM-V (Gibco) sin suero.

Inducción de células T CD8⁺ con especificidades para el antígeno tumoral MUC-1 y asialoglicoforina mediante estimulación con lisados de células tumorales

Los lisados de células tumorales se produjeron de líneas de células tumorales o de material primario: a) el lisado celular de líneas de células tumorales se preparó con ayuda de 4 rondas alternativas de congelación en nitrógeno líquido y posterior descongelación según métodos conocidos por sí.

b) Los lisados celulares de material primario de tumor sólido se produjeron como sigue: los tumores sólidos se trataron con ayuda del método de la triple enzima y de esta manera se produjeron suspensiones de células individuales. El experto en la materia conoce este método y se usa con frecuencia en diferentes variantes en la mayoría de los laboratorios de patología tumoral/inmunología. Después de la resección quirúrgica del tumor todos los pasos adicionales se realizan en condiciones asépticas. El tumor se cortó en trozos de aproximadamente 5 milímetros cúbicos de tamaño y se colocó en un recipiente con medio de triple enzima estéril (colagenasa al 0,1%, desoxirribonucleasa al 0,002%, hialuronidasa al 0,01% en el tampón "solución salina tamponada de Hank", HBSS). Esto se agitó durante la noche a temperatura ambiente con un agitador magnético hasta que los trozos de tejido sólidos se disolvieron. Posteriormente los trozos de tejido no digeridos se separaron mediante un filtro de tela metálica gruesa y las células restantes, tras un lavado cuidadoso en HBSS, se centrifugaron en un gradiente de Ficoll para separar los monocitos y linfocitos de la suspensión de células tumorales. Las células tumorales se lisaron posteriormente con ayuda de 4 rondas alternativas de congelación en nitrógeno líquido y posterior descongelación.

Las CD MUTZ-3 se cargaron con un lisado de células tumorales durante la noche a 37°C en medio AIM-V (Gibco) sin suero. Las células T CD8⁺ (respondedoras) se aislaron de PBMC HLA-A2+ por medio de un kit de aislamiento de células T CD8 MACS (Miltenyi Biotec). Se usaron células CD MUTZ-3 cargadas con lisado de células tumorales (estimuladoras) a una relación respondedoras:estimuladoras de 10:1 en medio AIM-V (Gibco) sin suero. Después de una semana, se examinó la especificidad de las células T en un ensayo ELISPOT de IFN-gamma. Para ello, se usaron células CD MUTZ-3 cargadas con el antígeno o células T2 cargadas con péptido. Las CD MUTZ-3 se cargaron durante la noche a 37°C en medio AIM-V (Gibco) sin suero con un lisado de células tumorales o con asialoglicoforina (proteína). Las células T2 se cargaron durante 4 horas a 37°C con el péptido de MUC-1 MUC-1.2 (LLLLTVLTV) (1 $\mu\text{g/ml}$) en medio AIM-V (Gibco) sin suero.

Ensayo ELISPOT de IFN-gamma

Se recubrieron placas de filtración de 96 pocillos Multiscreen (Millipore, Molsheim, Francia) durante 3 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C con el Acm 1-D1K (50 μl , 15 $\mu\text{g/ml}$) en PBS filtrado (Mabtech, Nacka, Suecia). Las placas se lavaron 6 veces con medio sin suero y posteriormente se bloquearon con medio completo filtrado con SFT al 10% durante 0,5-1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron de

7,5x10³ a 1x10⁵ células efectoras/pocillo con 1x10⁴ células diana durante la noche a 37°C y CO₂ al 5%. Las células se desecharon y las placas se lavaron 6 veces con PBS/Tween 20 al 0,05% filtrado. A cada pocillo se añadieron después 50 µl de Acm 7-B6-1 (1 µg/ml en PBS filtrado) y las placas se dejaron reposar durante 2-4 horas a temperatura ambiente. Después de 6 pasos de lavado con PBS/Tween 20 al 0,05% filtrado, se añadieron 50 µl/pocillo de fosfatasa alcalina conjugada a estreptavidina (diluida 1:1000 en PBS) y las placas se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Después de 6 pasos adicionales de lavado con PBS/Tween 20 al 0,05% filtrado, se añadieron 50 µl de reactivo de fosfatasa alcalina (kit de sustrato conjugado de AP, Biorad, Herkules, CA) y se dejaron reposar de 15 minutos a 1 hora, hasta que se desarrollaron los puntos de color. La reacción se paró con agua corriente los puntos de color los contaron dos personas independientes.

Activación de células T específicas de toxoide tetánico (TT)

Se seleccionaron PBMC de donantes con concordancia parcial de HLA (que expresan HLA-DR11, HLA-DQ7, HLA-B44 y HLA-A2) y se aislaron los PBL CD4⁺ por medio de columnas de separación MiniMACS (Miltenyi Biotec). Después de 1,5 horas de adherencia a la superficie de plástico, para eliminar las CPA contaminantes, las células se incubaron con una serie de diluciones de CD inmaduras MUTZ-3 pulsadas con TT (50 mg/ml, Bilthoven, NL, 12 horas en medio sin suero) en 200 µl de medio durante 7 días a 37°C y CO₂ al 5%. Se determinó la proliferación de células T después de un pulso de 5 horas con ³H-timidina (0,4 µCi/pocillo, Amersham, Aylesbury, UK) (métodos estándar).

Presentación de α-galactosilceramida a células NKT Valpha24⁺/Vbeta11⁺

Se obtuvieron células T Valpha24⁺, incluyendo células NKT Valpha24⁺/Vbeta11⁺, mediante selección positiva de PBL por medio de autoMACS (Miltenyi Biotec). Las células NKT purificadas se cocultivaron después durante 7 días con CD MUTZ-3 inmaduras o maduras, que se habían pulsado con DMSO (control de vehículo) o con 100 ng/ml de alfa-galactosilceramida (alfa-Gal-Cer, Pharmaceutical, Research Laboratory, Kirin Brewery, Japón), con la adición de 10 ng/ml de IL-7 humana recombinante (R&D Systems) y 10 ng/ml de IL-15 humana recombinante (R&D Systems) así como con o sin anticuerpo bloqueante anti-CD1d (CD1d51, 10 µg/ml). El número absoluto de células NKT y el factor de expansión se determinaron por medio de análisis por FACS.

Resultados

Diferenciación de las células MUTZ-3 a CD efectivas de diferentes fases de diferenciación y fases efectoras

Las células MUTZ-3 adquieren el fenotipo de CD inmaduras tras la adición de citoquinas

En primer lugar se determinó el potencial de líneas de células leucémicas para diferenciarse en presencia de citoquinas que se emplean de forma rutinaria para la inducción de células CD. En particular se examinó en las líneas celulares tratadas con citoquinas si se inducía la expresión de CD1a, una característica principal para células dendríticas inmaduras (CDi), en la superficie de las células. Tres de las seis líneas celulares ensayadas (MUTZ-3, KG-1, THP-1) respondieron a la mezcla de citoquinas GM-CSF, IL-4 y TNFα a dosis bajas. La proporción de células CD1a positivas después de 7 días en cultivo fue máxima en la línea celular MUTZ-3 (20%), mientras que las líneas celulares KG-1 y THP-1 mostraron el 10% y el 5% de células positivas para CD1a, respectivamente (Tabla 1). En estas dos últimas líneas celulares la diferenciación iba acompañada de una clara expresión del marcador de maduración de CD CD83, lo que confirma resultados anteriores (Hulette et al. 2001, Arch Dermatol Res 293(3):147-158; St Louis et al. 1999, J Immunol 162(6):3237-3248).

KG-1 y THP-1 no respondieron a otros estímulos con citoquinas, tampoco se pudo observar modificación adicional del fenotipo CD1a/CD83. En las 3 líneas celulares examinadas restantes no se detectó ni Cd1a ni CD83. Todas las líneas celulares ensayadas expresaban el receptor de GM-CSF (CD116), pero solo la línea celular MUTZ-3 también el receptor de IL-4 (CD124). Esto muestra la capacidad singular de las células MUTZ-3 de convertirse en CD1a positivas sin expresar al mismo tiempo también CD83, es decir, adquirir el fenotipo de CDi.

MUTZ-3 es un modelo de diferenciación de CD CD34 positivas que derivan de células precursoras

Además de la nueva expresión de CD1a se observaron modificaciones morfológicas y fenotípicas adicionales después de la estimulación con citoquinas en las células MUTZ-3. Típicamente, las células MUTZ-3 eran células no adherentes, redondeadas o un poco lobuladas. Después de la diferenciación las células CDi MUTZ-3 eran solo ligeramente adherentes, formaban masas de células grandes y desarrollaban proyecciones citoplásmicas piliformes, una característica morfológica de células CD (figura 1a, b). Los análisis de los marcadores de la superficie celular mostraron que las células MUTZ-3 sin estimular expresaban débilmente CD14, CD86, CD54 y CD40 y fuertemente CD334 y HLA-DR (figuras 2 y 3). Después de la inducción de la expresión de Cd1a en la superficie celular se observó una disminución en la expresión de CD14 (marcador de monocitos) y CD34 (marcador de células precursoras hematopoyéticas). La expresión de las moléculas coestimuladoras y de adhesión CD80, CD86, CD40, CD54 y HLA-DR aumentó mucho en las células CDi MUTZ-3 comparada con la población de células sin estimular (figura 3). La estimulación de las células CDi MUTZ-3 con TNFα indujo la expresión del marcador de maduración de

CD CD83 con un aumento adicional de la expresión de CD1a y todas las moléculas coestimuladoras. Se hicieron observaciones similares cuando las células CDi MUTZ-3 se maduraron con LPS, células J558 transfectadas con ligando de CD40 o poliIC (resultados no mostrados). No se observó proliferación adicional cuando se añadieron citoquinas a las células CDi MUTZ-3 o CD maduras (CDm).

5 Por tanto, las células MUTZ-3 se pueden diferenciar bajo influencia de GM-CSF, IL-4 y TNF α a dosis bajas a células CD (CD MUTZ-3), en donde atraviesan dos fases de diferenciación diferentes –un fenotipo inmaduro (CDi MUTZ-3) y uno maduro (CDm MUTZ-3).

10 La disminución de CD34 y CD14 indica por tanto, que las células MUTZ-3 representan una población de células precursoras en la diferenciación de células troncales CD34 positivas. En la diferenciación de células troncales CD34 positivas surgen al menos dos tipos de células precursoras, que por último maduran a células intersticiales y de Langerhans (CL). Para determinar si las células MUTZ-3 se pueden desarrollar a células similares a CL, se han cultivado células MUTZ-3 en presencia o ausencia de TGF-beta1. Se sabe que el TGF-beta1 induce un fenotipo de CL en células CD que provienen de células CD34 positivas (Caux et al. 1997, Blood 90 (4): 1458-1470). Se observó que bajo la influencia de TGF-beta1 no solo aumentó la proporción de células MUTZ-3 CD1a positivas del 20% al 80%, sino que también apareció una doble tinción fuerte langerina/CD1a (figura 4). Esto último indica que estas células muestran determinadas características de células CL.

20 *Las células CD MUTZ-3 inducen la proliferación de linfocitos alogénicos*

Las células CDm MUTZ-3 eran capaces de estimular la proliferación de células T alogénicas en reacciones de linfocitos mixtos, y por cierto, a un grado mayor que las CDi MUTZ-3 o las células MUTZ-3 sin estimular. Se midió una incorporación de [³H]-timidina (proliferación de linfocitos) de 6-10 veces mayor comparada con células MUTZ-3 sin estimular y una incorporación de [³H]-timidina de 2-3 veces mayor en comparación con células CDi MUTZ-3 a una relación MUTZ-3/PBL de 40:1 (figura 5). Probablemente esta propiedad estimuladora aumentada de células CDm MUTZ-3 comparada con CDi MUTZ-3 refleje el aumento de expresión observado en los marcadores de coestimulación y adhesión CD80, CD86, CD40 y CD54 (como se muestra en la figura 3).

30 *Las células CD MUTZ-3 responden a estímulos polarizadores de Th y adquieren un fenotipo CD1 o CD2 durante la maduración*

Las células CD pueden secretar IL-12, una potente citoquina inductora de células T de tipo 1 (Kalinski et al 1998, J Immunol 161 (6): 2804-2809). Además, se pudo mostrar que bajo la influencia de ciertos estímulos la células CDi no preprogramadas adquieren la capacidad de secretar principalmente IL-12 (fenotipo CD1) o la citoquina inductora de tipo 2 IL-10 (fenotipo CD2) (Vieira et al. 2000, J Immunol 164 (9): 4507-4512; Langenkamp et al. 2000, Nat Immunol 1 (4): 311-316). Para investigar si las células CDi MUTZ-3 pueden desarrollar el fenotipo CD1 o CD2 se indujo la maduración de las células CDi MUTZ-3 en presencia de IFN-gamma o dexametasona. Cuando se estimularon las células CDm MUTZ-3 (después de maduración en presencia de TNF-alfa) con o sin células J558 transfectadas con ligandos de CD40, se produjeron cantidades pequeñas de IL-10 e IL-12 (figura 6). Por otro lado, la maduración de células CDi MUTZ-3 en presencia de IFN-gamma dio lugar a una producción de IL-12, que además aumentó masivamente cuando las células se estimularon adicionalmente con células J558 transfectadas (posmaduración). En marcado contraste, no se produjo absolutamente nada de IL-12 de células CDm MUTZ-3 cuando estas se hicieron madurar en presencia de dexametasona. Sin embargo, en estos cultivos celulares se pudo detectar una producción aumentada de IL-10. Estos resultados muestran que en las condiciones adecuadas las células CD MUTZ-3 no preprogramadas pueden cambiar a un fenotipo CD1 o CD2.

50 *Las células MUTZ-3 como CD efectivas que tienen la capacidad de procesar y presentar antígenos y de inducir una respuesta inmune*

Una función central de las células CD como células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales es su capacidad de estimular células T CD4 y CD8 positivas, así como (como se ha mostrado recientemente) de presentar lípidos y antígenos hidrofóbicos a células NKT. Por tanto, se ha investigado si las células CD MUTZ-3 también son capaces de procesar y presentar de esta manera antígenos específicos.

55 *Las células CD MUTZ-3 activan linfocitos T citotóxicos específicos de gripe a través de MHC de clase I*

La tipificación molecular reveló que las células MUTZ-3 eran positivas para los antígenos de HLA HLA-A2, HLA-A3, HLA-B44, HLA-DR10, HLA-DR11, HLA-DR52, HLA-DQ5 y HLA-DQ7. La expresión de HLA-A2 se confirmó mediante un análisis por FACS usando los anticuerpos monoclonales MA2.1 y BB 7.1 (resultados no mostrados). Se investigó después si las células CD MUTZ-3 serían capaces de procesar y presentar antígenos a través de la molécula de clase I HLA-A2. Las células CD MUTZ-3 se cargaron con el péptido inmunodominante de Haemifluenza (gripe) M1 que se une a A2 o las células se infectaron con adenovirus que codifican toda la secuencia de M1 (para probar la capacidad de procesamiento de HLA de clase I). En ambos casos se usaron células T2, que se cargaron con el péptido de gripe M1 o como control con el péptido E7 derivado de HPV, como células estimuladoras en el ensayo ELISPOT de IFN-gamma para linfocitos T citotóxicos (CTL), que podrían haber originado durante el cocultivo de CD

MUTZ-3 y células T. Se añadieron células T sin estimular para determinar la línea basal de la reacción de CTL específica de gripe. No se observó ninguna respuesta CTL específica en estas condiciones (resultados no mostrados). Se pudo detectar una expansión de CTL específicos de gripe restringidos a HLA-A2 después de cocultivar los CTL con células CD MUTZ-3 que se habían cargado con el péptido de la gripe o que se habían infectado con el adenovirus que codifica M1 (figura 7a 1, 2). Estos resultados muestran que las células CD MUTZ-3 pueden procesar y presentar péptidos de la gripe, lo que produce una estimulación de CTL específicos de gripe restringidos a MHC de clase I.

Las células CD MUTZ-3 inducen linfocitos T citotóxicos específicos de MART-1 a través de MHC de clase I

Se pudo detectar una expansión y activación (secreción de IFN-gamma) de CTL específicos de MART-1 dependiente de HLA-A2 después de cocultivar los CTL con CD MUTZ-3 que se habían cargado con el péptido modificado de MART-1 ELAGIGILTV (figura 9). Estos resultados muestran que las CD MUTZ-3 pueden sensibilizar CTL indiferenciados a través de MHC de clase I.

Las CD MUTZ-3 cargadas con lisados de células tumorales inducen linfocitos T citotóxicos que son específicos para diferentes antígenos tumorales

Se pudo detectar una expansión y activación (secreción de IFN-gamma) de CTL específicos de lisados de células tumorales dependiente de HLA-A2 después de cocultivar los CTL con CD MUTZ-3 que se habían cargado con lisado de células tumorales (figura 10). Estos CTL también se pudieron activar mediante la reestimulación con el péptido de MUC-1 LLLLVLTV y mediante la reestimulación con la proteína asialoglicoforina. Estos resultados muestran que las CD MUTZ-3 pueden inducir una respuesta inmune antitumoral celular poliespecífica.

Generación de MUTZ-3 inmaduras (CDi) a partir de células precursoras con GM-CSF, TNF-alfa y distintas concentraciones de IL-4 o IL-13

Las células MUTZ-3 de los cultivos corrientes se lavaron 2 veces con PBS y se sembraron con una densidad celular de 1×10^5 células/ml en un volumen de 5 ml de medio de cultivo en una placa de 6 pocillos y se incubaron durante 7 días con GM-CSF (1000 U/ml, Leukomax/Novartis) y TNF-alfa a dosis bajas (2,5 ng/ml, Peprotech) y diferentes concentraciones de IL-4 (entre 0,1 U/ml y 1000 U/ml, Peprotech). En un ensayo adicional se sustituyó IL-4 por IL-13 (100 ng/ml). Esta concentración corresponde a aproximadamente 40 veces la concentración de IL-4 utilizada (100 U/ml). Se añadieron citoquinas cada dos o tres días. Después de 7 días de incubación se produjo una caracterización de las células mediante citometría de flujo (véanse las figuras 11 y 12).

Estimulación de célula T CD4 positivas específicas de TT mediante células CDi MUTZ-3 pulsadas con TT

Se investigó la capacidad de procesamiento de péptidos a través de la vía de MHC de clase II mediante carga por pulso de células CDi MUTZ-3 con péptidos derivados del antígeno TT "de memoria común", y posteriormente se cultivaron con células T CD4 positivas alogénicas parcialmente coincidentes en el tipo de HLA. Se observó una fuerte estimulación de las células T CD4 positivas específicas de TT, cuando las células CDi MUTZ-3 se cargaron por pulso con el péptido TT comparadas con las cargadas con vehículo como control, en donde los valores control fueron similarmente bajos a los de las células T CD4 positivas solas (figura 7 b). Estos resultados muestran que las células MUTZ-3 son capaces de procesar y presentar antígenos a través de la vía de MHC de clase II.

Presentación de glicolípidos a por células CD MUTZ-3 a células NKT Valpha24-positivas/Vbeta11-positivas

Las moléculas CD1 representan una clase especializada de moléculas presentadoras de antígenos, que son capaces de presentar lípidos, glicolípidos y péptidos hidrofóbicos. Se pudo demostrar que el glicolípido α -GalCer se puede presentar a células NKT CD1d Valpha24-positivas/Vbeta11-positivas (Brossay et al. 1998, J. Exp. Med. 188 (8): 1521-1528). Para investigar si las células CD MUTZ-3 son capaces de presentar α -GalCer, se demostró en primer lugar que las células CD MUTZ-3 expresan la molécula CD1d (resultados no mostrados). Las células CDi y CDm MUTZ-3 se cargaron después con α -GalCer o vehículo y se cocultivaron con células NKT purificadas durante 7 días en presencia de 10 ng/ml de IL-7 e IL-15 (van der Vliet et al. 2001, J. Immunol. Methods 247 (1-2): 61-72). Las células CDm MUTZ-3 cargadas con α -GalCer pudieron inducir mejor células NKT que las células CDi MUTZ-3 (cargadas tanto con α -GalCer como con vehículo) y células CDm MUTZ-3 cargadas con vehículo. La neutralización de la presentación de antígeno mediante bloqueo de CD1d confirmó la conclusión de que las células CDm MUTZ-3 son capaces de presentar antígenos glicolípidos a través de las moléculas presentadoras de antígenos no clásicas CD1d (figura 8).

Leyendas

Tabla 1. Análisis por FACS de la expresión de CD1a y CD83 en líneas de células de leucemia. La expresión de CD1a y CD83 se investigó mediante citometría de flujo después de 7 días de incubación con las citoquinas. En las células MUTZ-3 se observa expresión nueva de CD1a pero no de CD83. Se midió una inducción pequeña de la expresión de CD1a con expresión asociada de CD83 para KG-1 y una medida aún más pequeña también para

células THP-1. ^a El % de células positivas representa el número total de células que se tiñeron positivamente para un marcador CD determinado en una población celular restringida ("gated"). ^b Las células que se tiñeron con los anticuerpos monoclonales anti-CD1a conjugado con PE y anti-CD83 conjugado con FITC representan las células doblemente positivas. ^c Las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD116 conjugados con FITC. ^d Publicado en Drexler, H.G. 2001, The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, Academic Press.

Figura 1. Imágenes microscópicas de células MUTZ-3 diferenciadas después de la adición de citoquinas. a) células MUTZ-3 sin estimular, b) CDi MUTZ-3 después de 7 días de cultivo en presencia de GM-CSF, IL-4 y concentraciones bajas de TNF-alfa. Las células solo son ligeramente adherentes y muestran una morfología dendrítica (aumento de 40 veces).

Figura 2. Las CD MUTZ-3 muestran características de CD inmaduras y maduras en presencia de citoquinas. La representación del diagrama de dispersión ilustra el fenotipo a) de células MUTZ-3 sin estimular, b) CDi MUTZ-3 inmaduras y c) de CDm MUTZ-3 maduras inducidas con TNF-alfa. Los números se refieren al porcentaje de células que son positivas para el marcador CD respectivo. Todas las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales específicos de antígeno conjugados a PE o FITC. Los datos provienen de un experimento que es representativo de cinco experimentos.

Figura 3. La diferenciación de las células MUTZ-3 se asocia con la inducción de la expresión de moléculas coestimuladoras. El análisis por FACS demuestra una inducción de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD40, la molécula de adhesión CD54 y la molécula de HLA de clase II HLA-DR durante la diferenciación de MUTZ-3, MUTZ-3 sin estimular (línea de puntos), CDi MUTZ-3 inmaduras (línea continua) y CDm MUTZ-3 maduras (línea continua gruesa). Los datos provienen de un experimento que es representativo de cinco experimentos.

Figura 4. TGF-beta1 induce la expresión de la molécula de superficie asociada a CL langerina en células MUTZ-3. Las células MUTZ-3 CD34-positivas primero se cultivaron en presencia de GM-CSF/TNF-alfa y posteriormente en presencia o ausencia de TGF-beta1. Los números en la esquina superior izquierda se refieren al porcentaje de células doblemente positivas CD1a/langerina en una población celular restringida ("gated") o al porcentaje de células que se tiñeron con un anticuerpo isotópico como control. Los datos provienen de un experimento que es representativo de tres experimentos.

Figura 5. La capacidad de células MUTZ-3 de estimular linfocitos. Se colcultivaron MUTZ-3 sin estimular, CDi MUTZ-3 inmaduras y CDm MUTZ-3 maduras con linfocitos sin concordancia en MHC, en una reacción de linfocitos mezclados alogénicos. Las CDm MUTZ-3 mostraron una fuerte capacidad estimuladora comparadas con las células MUTZ-3 sin estimular (diferencia de 6,3 veces en la incorporación de [3H]-timidina comparado con células sin estimular) y una diferencia de 2,3 veces comparadas con CDi MUTZ-3. Los datos provienen de un experimento que es representativo de cuatro experimentos.

Figura 6. Las células CDi MUTZ-3 sin preprogramar se pueden modificar a fenotipo CD1 o CD2 durante la maduración bajo la influencia de IFN-gamma o dexametasona. Las CDi MUTZ-3 que se cultivaron en presencia de IFN-gamma secretan IL-12. No se puede observar producción de IL-12 cuando las células se cultivaron con dexametasona. De manera similar, las células no secretan IL-10 cuando se trataron con IFN-gamma. Las concentraciones de IL-12 e IL-10 se determinaron mediante ELISA. Las concentraciones de citoquinas se muestran en pg/ml por 10^5 células. Los datos son representativos de cuatro experimentos individuales.

Figura 7. Las células MUTZ-3 tienen capacidad de procesamiento y presentación de antígenos. (a) Presentación de MHC de clase I, las CDi MUTZ-3 estimulan una reacción de CTL específica de gripe mediante la presentación del péptido de la gripe restringido a HLA-A2.1. (1) Las CD MUTZ-3 se cargaron con la proteína de matriz M1₅₈₋₆₆ derivado de gripe que se une a HLA-A2.1 y se cocultivaron con células T CD8-positivas. Para detectar proliferación de CTL se midió la producción de IFN γ por los CTL que se cocultivaron con células T2 como células diana. Las células T2 se cargaron con el péptido de M1 de gripe (cuadrados negros) o como control con el péptido E7 derivado de HPV16 (cuadrados blancos). (2) Las CD MUTZ-3 se infectaron con adenovirus recombinantes, que contenían en gen de la proteína de matriz M1 y posteriormente se cocultivaron como se ha descrito anteriormente. Después, los CTL se estimularon de nuevo con células T2 que se habían cargado con el péptido de M1 de gripe (círculos negros) o con el péptido E7 (círculos blancos). Los datos provienen de un experimento que es representativo de tres experimentos. (b) Presentación de antígenos de MHC de clase II. Las CDm MUTZ-3 procesan y presentan péptidos que derivan de antígeno de "memoria común" de TT, y estimulan células T CD4-positivas específicas de TT. Los datos provienen de un experimento que es representativo de tres experimentos.

Figura 8. Presentación de α -GalCer a través de CD1d. Las CDi MUTZ-3 se cargaron con α -GalCer o con vehículo (DMSO) como control y posteriormente se cultivaron durante 48 horas en presencia o ausencia de TNF α a altas dosis. Después las CDm se cocultivaron durante 9 días en presencia de IL-7 e IL-15 con o sin anticuerpo bloqueante de CD1d con células NKT que se habían aislado de donantes sanos. Los resultados muestran el rendimiento relativo de células NKT después de cocultivarlas con CDi y CDm MUTZ-3, que se habían cargado antes con vehículo y α -GalCer, con o sin bloqueo de la presentación de α -GalCer por el anticuerpo bloqueante de CD1d. Los datos provienen de un experimento que es representativo de tres experimentos.

Figura 9. Las CD MUTZ-3 pueden sensibilizar CTL indiferenciados.

Los CTL se estimularon con CD MUTZ-3 cargadas con el péptido de MART-1 ELAGIGILTV (cebar) y después de una semana se reestimularon durante la noche con células T2 cargadas con el péptido de MART-1 ELAGIGILTV o el péptido de CEA IMIGVLVGV. El ELISPOT de IFN-gamma mostró una fuerte activación específica de antígeno (MART-1) de los CTL, mediante la reestimulación con un antígeno irrelevante (CEA) se produjo solo una activación muy débil de las células.

Figura 10. Las CD MUTZ-3 pueden inducir una respuesta de CTL antitumoral poliespecífica

Los CTL se estimularon con CD MUTZ-3 cargadas con lisado de células tumorales (cebar) y después de una semana se reestimularon durante la noche con CD MUTZ-3 cargadas con lisado de células tumorales, CD MUTZ-3 cargadas con asialoglicoforina o con células T2 cargadas con el péptido de MUC-1 LLLLTVLTV. El ELISPOT de IFN-gamma mostró una fuerte activación de los CTL mediante la reestimulación de las células con lisados de células tumorales, con el péptido de MUC-1 y con la asialoglicoforina.

Figura 11: Se incubaron células MUTZ-3 de cultivo corriente durante 7 días con GM-CSF (1000 U/ml), TNF-alfa en dosis bajas (2,5 ng/ml) y diferentes concentraciones de IL-4 (entre 0,1 U/ml y 1000 U/ml). Los resultados muestran que se puede observar una reducción en la expresión de CD124 con concentraciones crecientes de IL-4.

Figura 12: Se incubaron células MUTZ-3 de cultivo corriente durante 7 días con GM-CSF (1000 U/ml), TNF-alfa en dosis bajas (2,5 ng/ml) y de forma comparativa con IL-4 (100 U/ml) o IL-13 (100 ng/ml). La concentración de IL-13 corresponde a aproximadamente 40 veces la concentración de IL-4 usada. La caracterización por medio de citometría de flujo de diferentes moléculas de superficie muestra que mediante una incubación de 7 días con IL-13 en lugar de IL-4, además de GM-CSF y TNF-alfa a dosis bajas, se puede observar una expresión de las moléculas de superficie comparable.

En el contexto de la invención el término “sensibilizar” significa poner linfocitos T en un estado en el que son susceptibles a un estímulo específico de antígeno.

Línea celular	% de células positivas ^a		Expresión de receptores de citoquinas	
	CD1a ^b	CD83 ^b	CD116 (Receptor de GM-CSF) ^c	CD124 (Receptor de IL-4) ^d
MUTZ-3	38	0	+	+
KG-1	10	10	+	-
THP-1	5	5	+	-
HL-60	0	0	+	-
U937	0	0	+	-
K562	0	0	+	-

Tabla 1. Análisis por FACS de la expresión de CD1a y CD83 en líneas de células de leucemia. La expresión de CD1a y CD83 se investigó por medio de citometría de flujo 7 días después de la adición de las citoquinas. En las células MUTZ-3 se puede inducir expresión de CD1a pero no de CD83. KG-1, y en un grado aún menor TH-1, dan expresión (baja) de CD1a junto con CD83.

^a % de células positivas representa el número total de células que se tiñeron positivamente para un marcador CD determinado en un población celular restringida.

^b Las células se tiñeron con los anticuerpos monoclonales anti-CD1a marcado con PE y anti-CD83 marcado con FITC, este resultado representa las células doblemente positivas.

^c Teñidas con anticuerpos monoclonales anti-CD116 conjugados con FITC.

^d De Drexler, H.G. 2001, The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book, Academic Press.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de células o líneas celulares dendríticas efectivas **caracterizado en que** la línea celular MUTZ-3 CD124 y CD116 positiva se pone en contacto con al menos una molécula estimuladora, al mismo tiempo o de forma secuencial diferida en el tiempo, y se obtienen las células o líneas celulares dendríticas efectivas, en donde como moléculas estimuladoras se usan GM-CSF, TNF-alfa, LPS, PGE2, ligando de CD40, ácido poliinosínico-policitidílico (poliIC), calcio, PMA, TGF-beta1, IL-7, IL-13 y/o IL-4.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado en que** como células o líneas celulares dendríticas efectivas se producen células o líneas celulares que tienen un fenotipo de células dendríticas intersticiales, células dendríticas de Langerhans, células CD83 positivas, células dendríticas inmaduras y/o células dendríticas maduras.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado en que** la línea celular o células CD124 y CD116 positiva/s es/son CD34 positiva/s.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores **caracterizado en que** en la línea celular o células CD116 y CD124 positiva/s se introduce el gen de CD34.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado en que** en la línea celular o células se introducen genes adicionales que, por ejemplo, codifican y/o expresan receptores o inhibidores para moléculas estimuladoras.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado en que** en la línea celular o células se introduce al menos un gen de un agente inmunoterapéutico, en donde el gen del agente inmunoterapéutico es un gen que codifica un antígeno tumoral, un antígeno vírico, un antígeno de parásitos, bacterias o microorganismos.
- 35 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado en que** la línea celular o células se fusiona(n) con otras células o líneas celulares.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado en que** se pueden obtener diferentes fases de activación y/o capacidad efectora de las líneas celulares o células dendríticas efectivas mediante diferentes moléculas estimuladoras, su dosificación y/o mediante el orden en que se ponen en contacto.
- 45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado en que** la línea celular CD124 y CD116 positiva y/o las células o líneas celulares dendríticas efectivas se puede(n) llevar a apoptosis o necrosis, por ejemplo mediante irradiación de las células.
- 50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado en que** se puede introducir al menos un gen suicida en la línea celular o células CD124 y CD116 positivas y/o células o líneas celulares dendríticas efectivas.
- 55 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado en que** se producen líneas celulares o células dendríticas efectivas que son CD de tipo 1 o CD de tipo 2 mediante diferentes moléculas estimuladoras, su dosificación y/o el orden en que se ponen en contacto.
- 60 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado en que** las líneas celulares o células dendríticas efectivas se ponen en contacto con moléculas estimuladoras y se obtienen líneas celulares o células dendríticas maduras efectivas.
- 65 13. Células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o línea celular MUTZ-3 obtenible(s) mediante un método de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o línea celular MUTZ-3 según la reivindicación 13, que se carga(n) con al menos un antígeno.
15. Células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o línea celular MUTZ-3 según la reivindicación 14, en donde el antígeno es un antígeno tumoral o antígeno de infección o una parte de los mismos.
16. Células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o línea celular MUTZ-3 según la reivindicación 15, en donde el antígeno tumoral o el antígeno de infección es un péptido, proteína, lípido, lipopéptido, lipoproteína, hidrato de carbono, glicolípido, glicopéptido, glicoproteína, proteína fosforilada, péptido fosforilado, proteína o péptido modificados postraduccionalmente o donde el antígeno tumoral está codificado por ADN o ARN con el que se transfectan las células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3.

17. Medicamento que comprende las células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o la línea celular MUTZ-3 según cualquiera de las reivindicaciones 13, 14, 15 o 16.
- 5 18. Células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o línea celular MUTZ-3 según cualquiera de las reivindicaciones 13, 14, 15 o 16 para su uso como agente inmunoterapéutico.
- 10 19. Células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o línea celular MUTZ-3 según cualquiera de las reivindicaciones 13, 14, 15 o 16 para su uso en la profilaxis o tratamiento de enfermedades infecciosas, tumorales y/o autoinmunes.
- 15 20. Células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o línea celular MUTZ-3 según la reivindicación 13 para su uso para el procesamiento y/o presentación de antígenos.
- 20 21. Células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o línea celular MUTZ-3 según la reivindicación 20, en donde los antígenos son péptidos, proteínas, lípidos, lipopéptidos, lipoproteína, hidratos de carbono, glicolípidos, glicopéptidos, glicoproteínas, proteínas fosforiladas y/o péptidos fosforilados.
- 25 22. Sistema de prueba que comprende las células dendríticas efectivas humanas MUTZ-3 o la línea celular MUTZ-3 según la reivindicación 13.
23. Sistema de prueba según la reivindicación 22, en donde el sistema de prueba se usa para el ensayo de sustancias inmunoactivadoras, inhibidoras o moduladoras.
24. Sistema de prueba según la reivindicación 22, en donde el sistema de prueba se usa para el ensayo de vacunas tumorales o la influencia de sustancias químicas, agentes farmacológicos, cosméticos o productos alimenticios en el sistema inmune.

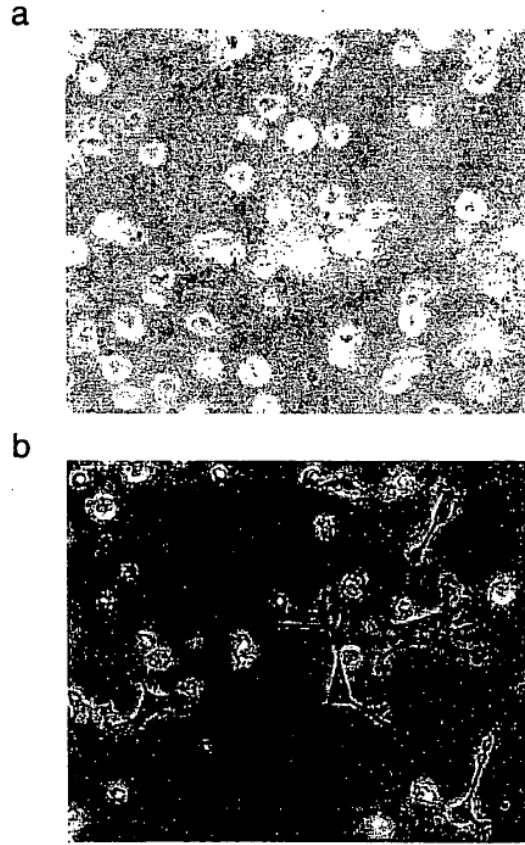


Figura 1

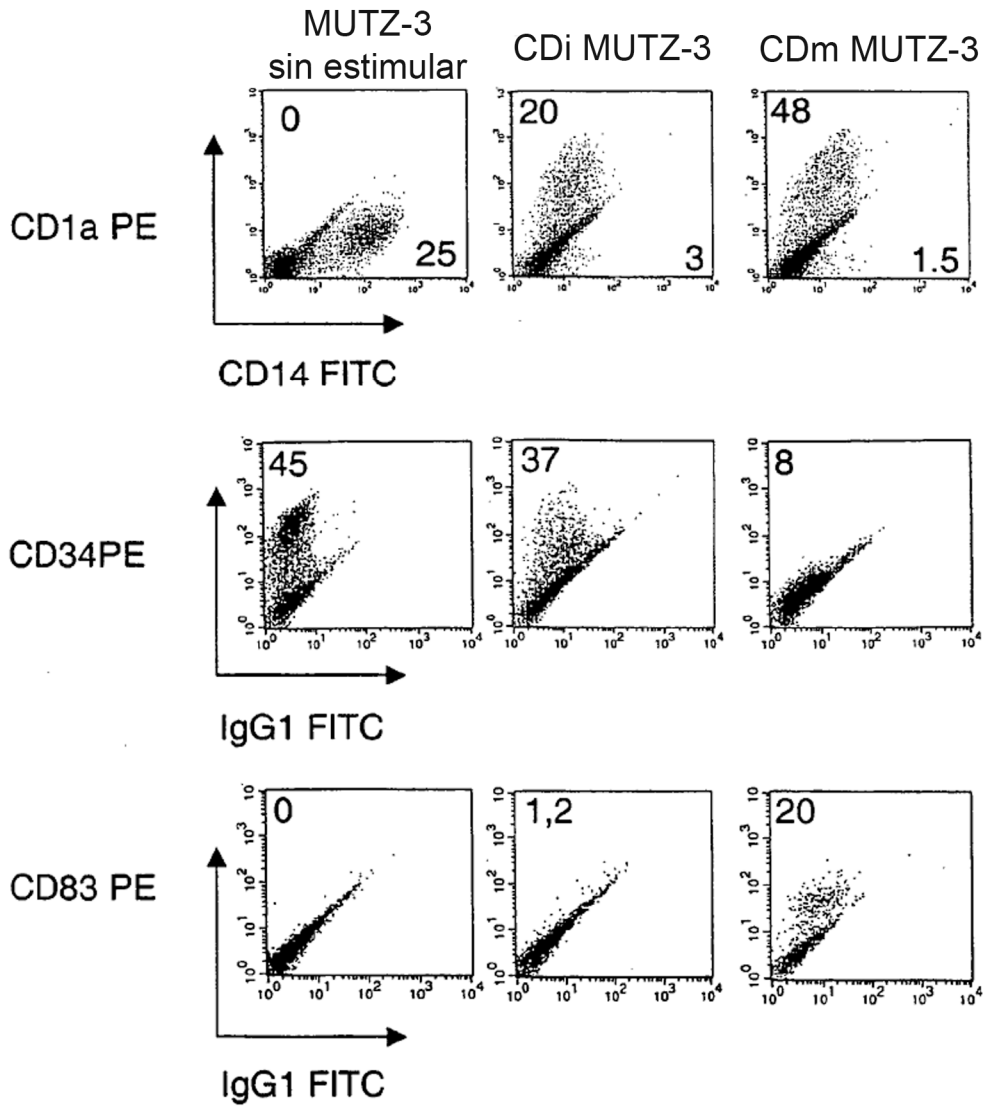


Figura 2

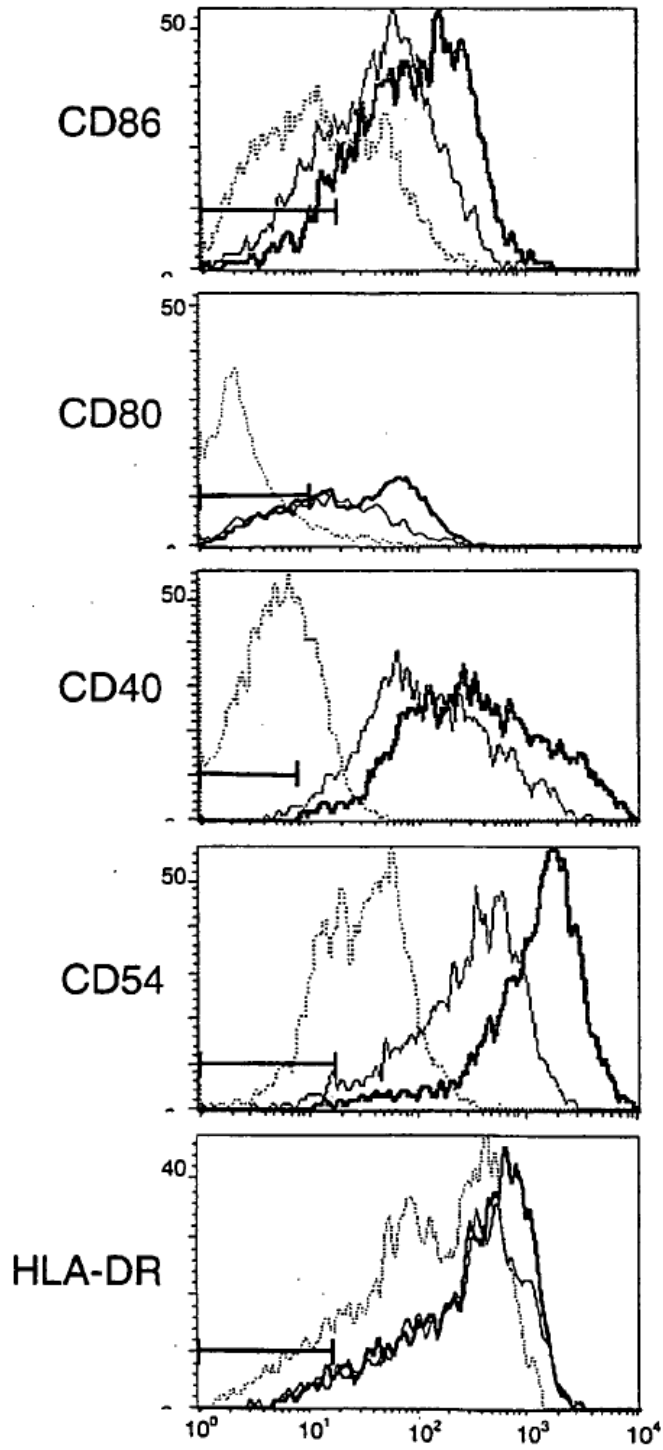


Figura 3

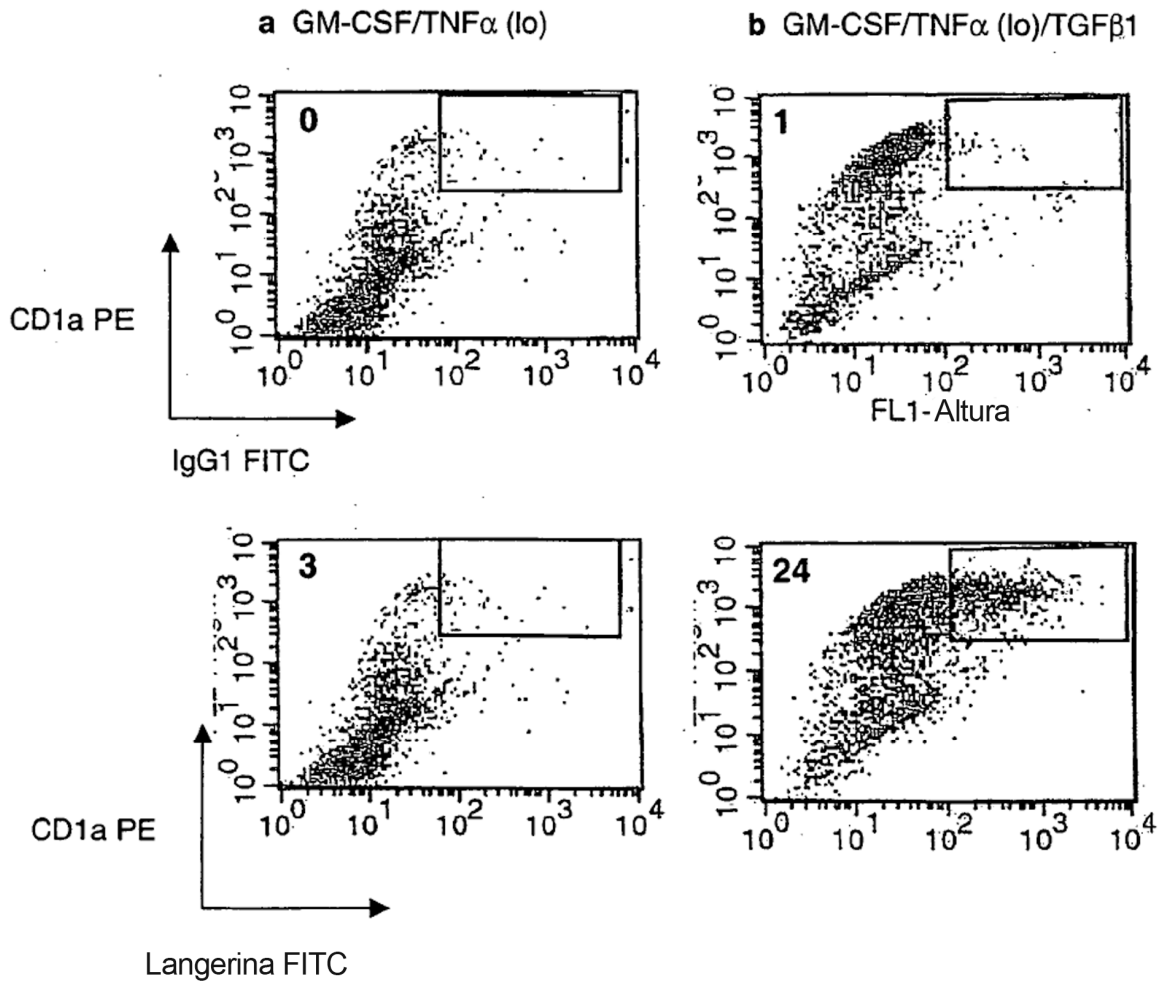


Figura 4

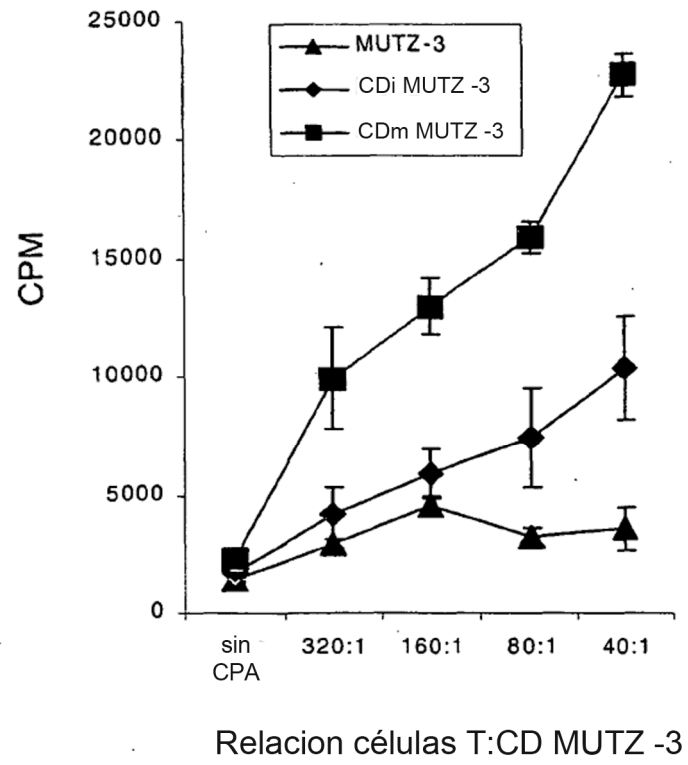


Figura 5

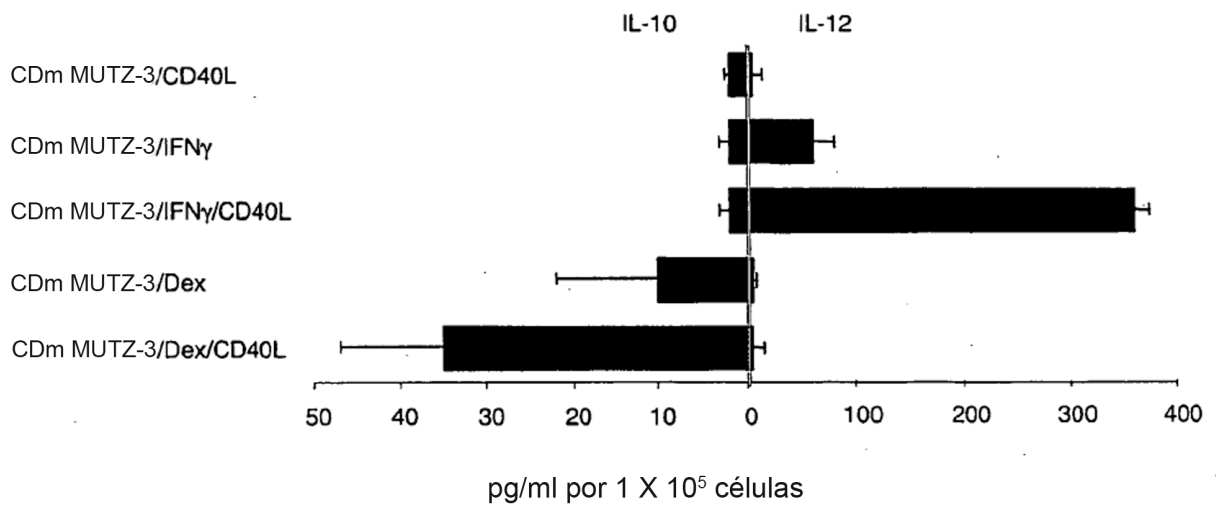


Figura 6

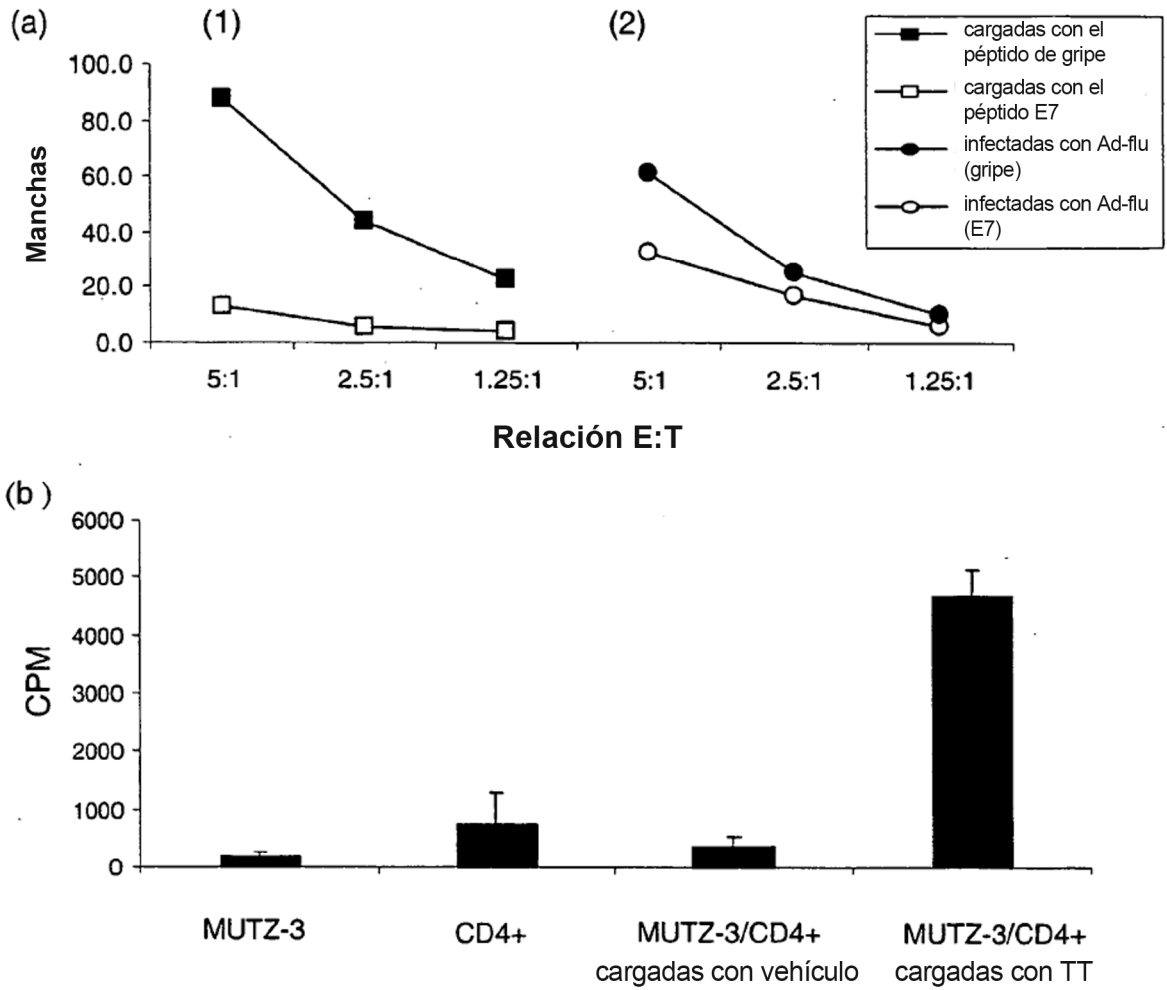


Figura 7

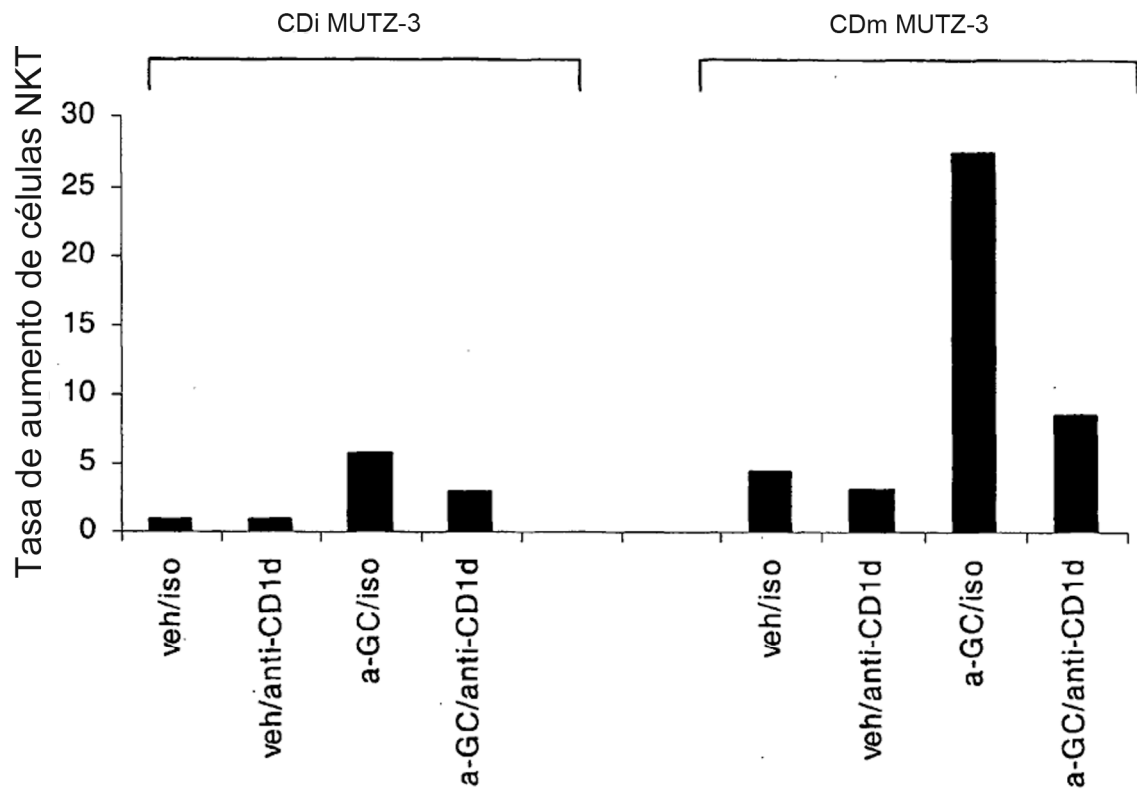


Figura 8

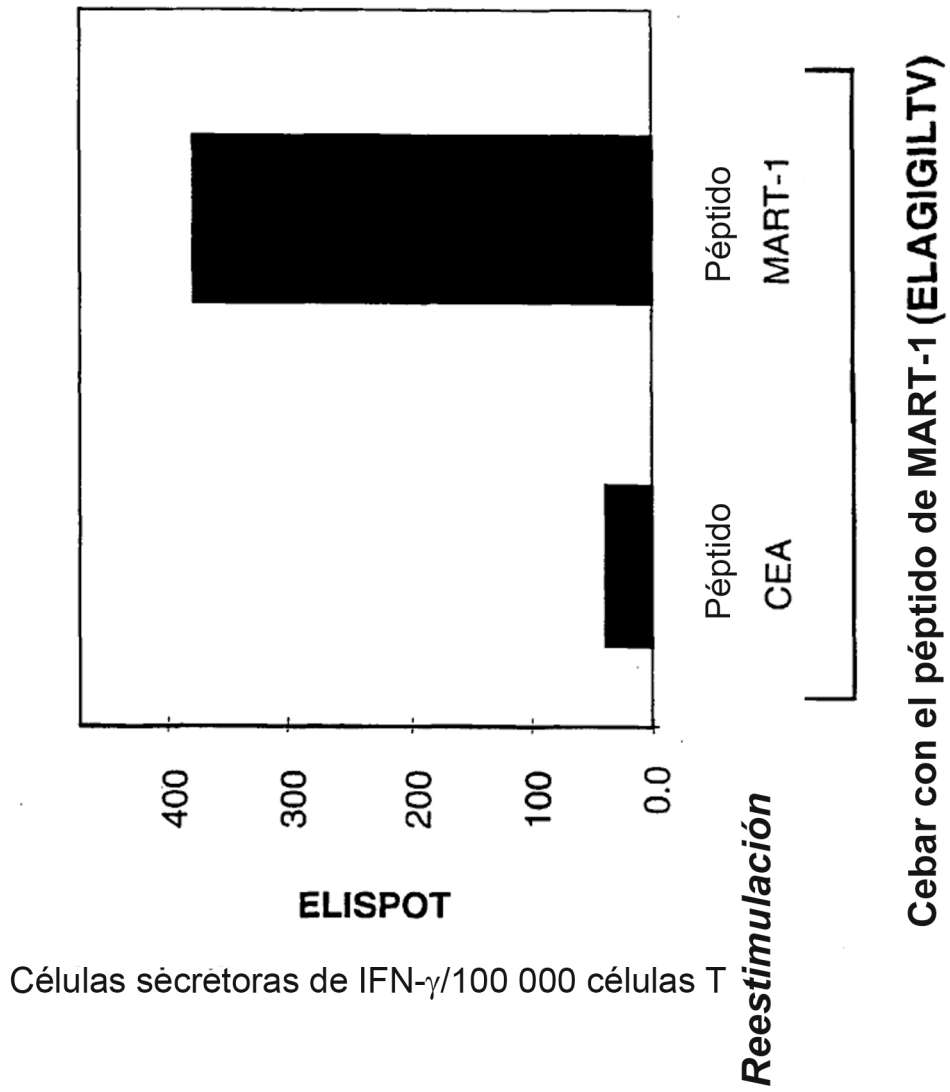


Figura 9

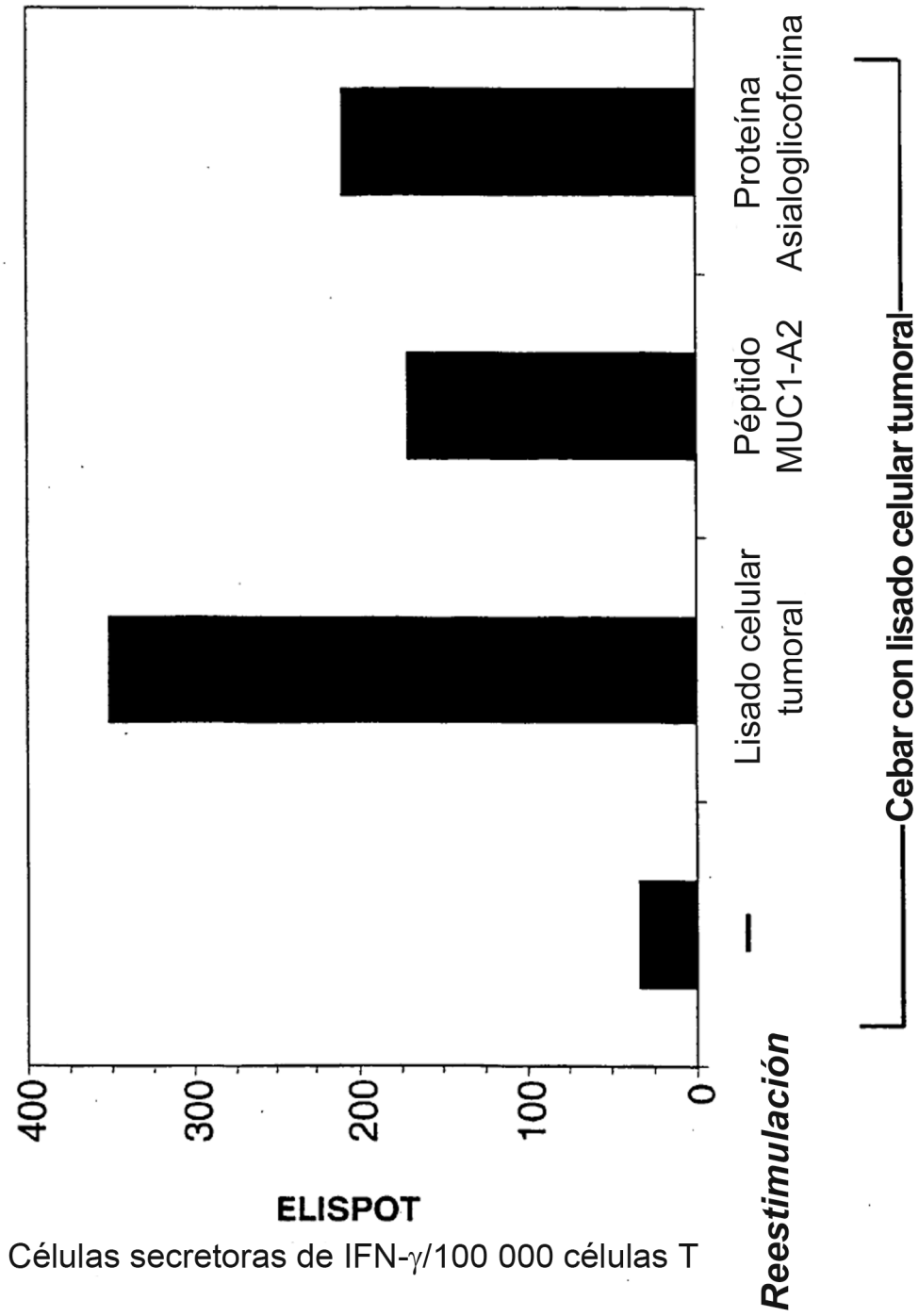


Figura 10

Figura 11: Expresión de CD124 (IL-4R α) dependiente de IL-4

Diferenciación de Mutz-3 con GM-CSF (1000 U/ml), TNF α (2,5 ng/ml) y concentraciones crecientes de IL-4

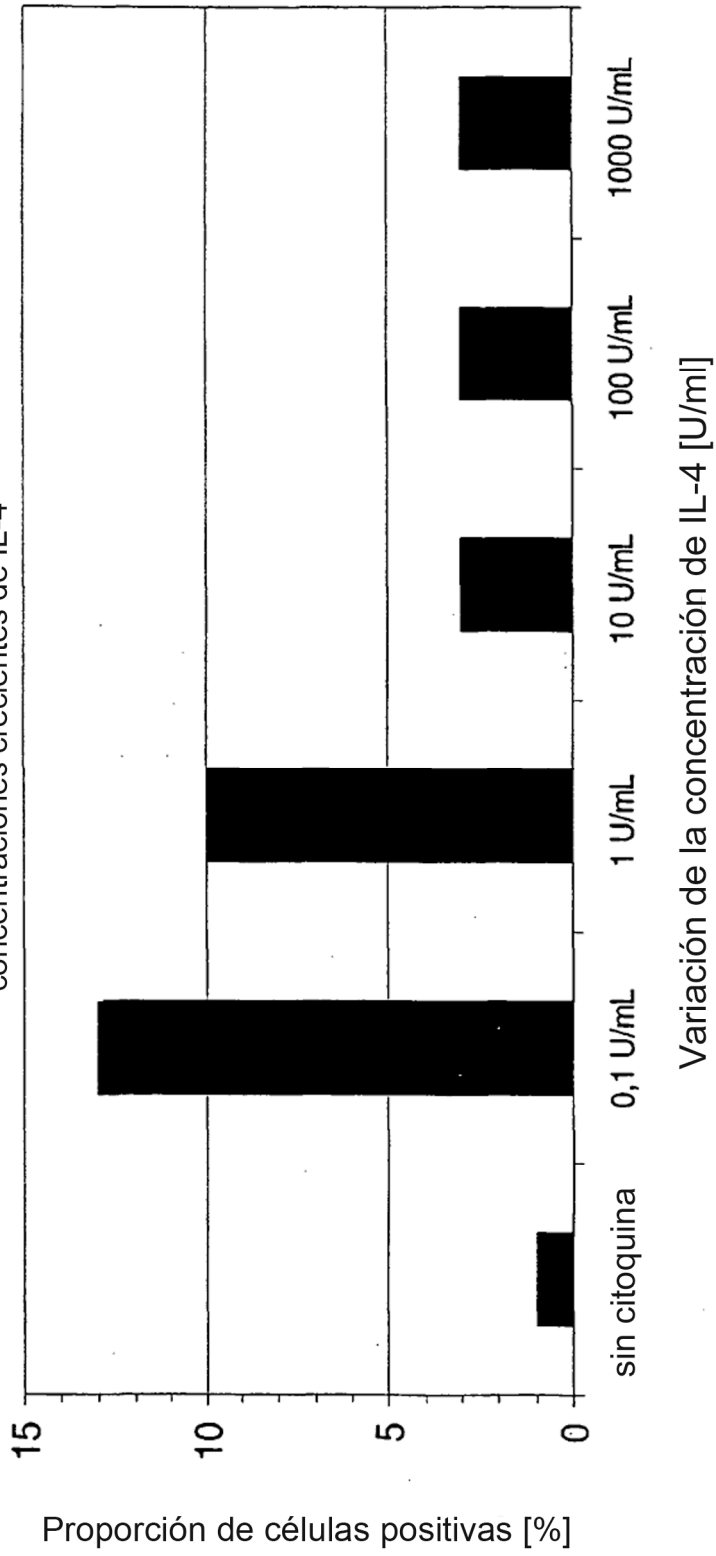


Figura 12: Diferenciación de Mutz-3 con GM-CSF (1000 U/ml), TNF- α (2,5 ng/ml) e IL-4 (100 U/ml) o IL-13 (100 U/ml)

