

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 612**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0784 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08787211 .5**
96 Fecha de presentación: **14.08.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2185686**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2010**

54 Título: **Células dendríticas**

30 Prioridad:
16.08.2007 EP 07450139

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2012

73 Titular/es:
**CELL MED RESEARCH GMBH
MAGNESITSTRASSE 1
3502 KREMS-LERCHENFELD, AT**

72 Inventor/es:
RUBIOLLO, Cristina

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 381 612 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

Células dendríticas

La presente invención se refiere a las células dendríticas y su uso.

5 Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno (APC) derivadas de la médula ósea que juegan un papel fundamental en la inducción y regulación de la respuesta inmune. Se ha descrito que la generación y manipulación *in vitro* de las DC humanas puede ser particularmente eficaz para estimular el sistema inmunológico contra el cáncer, siendo una nueva y poderosa herramienta en la lucha contra el tumor. De hecho, se ha demostrado que en pacientes que sufren de diferentes tipos de cáncer, tales como, pero exclusivamente tumor de mama, ovario, cabeza y cuello, colorrectal y renal, carcinoma hepatocelular y melanoma maligno, la incapacidad del sistema inmunitario del huésped para combatir eficazmente el establecimiento cáncer está estrictamente relacionada con una función de DC disminuida. Estos cambios se han detectado principalmente en la sangre, en cánceres de células infiltrantes y en ganglios linfáticos (LNS). Además, se ha documentado que la mayoría de las quimioterapias deterioran profundamente la función de DC, mientras que la capacidad de las células T de los pacientes para producir una respuesta inmune eficaz es comparable con la que se observa en personas sanas. Esta observación implica que la facilidad para el establecimiento del tumor manifestada por el sistema inmune de los pacientes de cáncer se debe principalmente a la presencia de posibles defectos funcionales en las DC como el mantenimiento de un fenotipo inmaduro y/o el equilibrio incorrecto entre la secreción de IL-12 y IL-10. En consecuencia, se ha demostrado que los niveles séricos de IL-10 son significativamente superiores en los pacientes que sufren de cáncer que en los de los controles sanos de edad y sexo similares. Se ha demostrado que IL-10 tiene un efecto inhibidor significativo en varios aspectos de la función de DC, tales como la expresión de moléculas coestimuladoras y la capacidad de sintetizar IL-12. Lo que es mas importante, las DC tratadas con IL-10 se vuelven tolerogénicas. Además, se ha informado de que en los pacientes con tumor de crecimiento progresivo, las DC son inmaduras y están inactivas. Dado que el efecto antitumoral de las DC depende de su nivel de activación y maduración, es probable que el fallo en la inducción de las células T específicas de tumor que producen una respuesta citotóxica dependa del equilibrio incorrecto entre IL-10 e IL-12, así como de la ausencia de los marcadores de maduración, necesarios para obtener la activación esperada de las células T. De hecho, la función inmunosupresora de IL-10 se puede modular mediante una producción simultánea de IL-12. Por ejemplo, se ha demostrado que las DC maduras derivadas de monocitos secretan generalmente tanto IL-12 como IL-10 por estimulación de CD40L. En este caso, la secreción acoplada de IL-10 e IL-12 induce una respuesta inmune más eficaz contra el cáncer que la observada por la secreción única de IL-12. En presencia de niveles de IL-12 moderados-altos, la secreción de IL-10 promueve la activación de las células T colaboradoras (células T CD4⁺) y, por tanto se desencadena el sistema inmunitario adaptativo.

35 Uno de los principales objetivos de las estrategias de inmunoterapia actuales es activar eficazmente el sistema inmune del huésped contra el cáncer. Entre ellos, el uso de DC modificadas y cultivadas *in vitro* y de las células T son los métodos más comunes. Aunque muchos estudios *in vitro* a pequeña escala, modelos animales, así como ensayos clínicos han demostrado un éxito parcial, especialmente en relación con el desencadenamiento de una respuesta citotóxica fuerte mediada por células T CD8⁺, todos ellos fracasan al demostrar el establecimiento de una respuesta adaptativa potente, que sea capaz de luchar contra cualquier recidiva tumoral, incluso años después de concluir la terapia.

40 El enfoque más común en el uso de las DC para vacunas es preparar un gran número de DC mieloides maduras autólogas (MDC) *ex vivo*, cargarlas con un antígeno(s) específico para el cáncer e inyectarlas de nuevo en el sujeto. Dado que la tasa de diferenciación de monocitos a DC maduras es baja, es importante conseguir una cantidad de precursores de DC compatible con la producción a gran escala de DC maduras. Este objetivo se consigue normalmente, alternativamente, por (1) diferenciación de las DC a partir de monocitos derivados por leucoféresis/elutriación con GM-CSF e IL-4 o con GM-CSF e IL-13 ó (2) aislando DC directamente a partir de los productos de leucoféresis por centrifugación en gradiente de densidad o con los sistemas cerrados disponibles comercialmente, basados en el uso de perlas inmunomagnéticas.

50 Una vez diferenciadas a partir de los monocitos, las DC inmaduras (iDC) deben cargarse y madurar *in vitro*. Mientras que la etapa de carga puede realizarse según varios métodos en forma de antígeno de proteína nativa o modificada, ARNm, ADNc, lisado de tumores, etc; la maduración se realiza generalmente por medio de la adición de uno de los combinados siguientes: (a) IL-1 β , IL-6, TNF- α , y PGE2; (b) LPS e IFN- γ ; (c) Ribomunil e IFN- γ . Aunque en la técnica se observa que las DC maduras con un combinado que incluye PGE2 expresan aún CCR7 e inducen Th1 así como respuestas de las células T CD8⁺, fracasan al secretar IL-12p70 bioactiva detectable, a diferencia de las DC maduras con LPS / Ribomunil e IFN- γ .

55 En Zhou Y. et al. (J. Immu. Thera. 25 (2002): 289-303) se describen los métodos para la carga de las células dendríticas con antígenos tumorales. Los autores de esta publicación describen que la carga puede tener lugar con péptidos o proteínas o, alternativamente, con moléculas de ácido nucleico que codifiquen dichos péptidos y proteínas.

- En Onaitis M. et al. (Surg. Oncol. Clin. N. Am. 11 (2002): 645-660) se dan a conocer varios métodos para la carga de células dendríticas con antígenos.
- 5 En la revisión del artículo de Osada T. et al. (Int. Rev. Immunol. 25 (2006): 377-413) se describen inmunoterapias basadas en células dendríticas. Las células dendríticas utilizadas en estos métodos se pueden cargar con antígenos asociados a tumor.
- En Rammensee H-G (Immunol. Cell. Biol. 84 (2006): 290-294) se describen las ventajas de las células dendríticas cargadas ya sea con péptidos o con moléculas de ARN para vacunas.
- En la solicitud de patente internacional WO2006/020889 se describe la carga de células dendríticas con moléculas de RNAm que codifican TERT o fragmentos de la misma.
- 10 En Ciesielski M.J. et al. (Cancer Immunol. Immunother. 55 (2006): 1491-1503) se describe un método para producir células dendríticas cargadas con el ADN que codifica Survivina. Estas células son capaces de expresar Survivina en dichas células dendríticas.
- En Otto K. et al. (Vaccine 23 (2005): 884-889) se investiga la utilidad de las células dendríticas cargadas con epítomos de Survivina para la vacunación de tumores.
- 15 En Hsu A. K. W. et al. (Biol. Blood Marrow Transplat. 12 (2006): 855-867), se describen células dendríticas cargadas con moléculas de RNAm que codifican Survivina.
- En Morse M. A. et al. (Cancer Res. 58 (1998): 2965-2968) se describe la carga de células dendríticas con péptidos que derivan del antígeno CEA asociado un tumor o su ARN codificante.
- 20 También en Nair S. K. et al. (Int. J. Cancer 82 (1999): 121-124), se describen células dendríticas cargadas con el antígeno CEA asociado a tumor.
- En Fuessel S. et al. (Prostate 66 (2006): 811-821) se describen investigaciones clínicas en las que células dendríticas que se han cargado con PSA, antígeno prostático específico de membrana (PSMA), Survivina, prosteína y el receptor de potencial transitorio p8 (trp-P8) se administran a 8 pacientes.
- 25 Todos estos documentos muestran métodos de carga basados en antígeno de proteína(s) o en antígeno(s) de RNAm /ADNc.
- Un objeto de la presente invención es proporcionar células dendríticas que muestren propiedades inmunológicas mejoradas.
- 30 Estas DC deberían mostrar preferiblemente (a) una reducción de al menos el 80% de su capacidad fagocítica en comparación con iDC; (b) capacidad para migrar en respuesta a estímulos (que incluyen pero no se limitan a CCL19 y/o CD40L; (c) un fenotipo maduro, es decir elevada expresión en superficie de CD80, CD86, CD40, CD83, HLA-ABC y HLA-DR, (d) niveles de secreción de IL-12 medios o altos con o sin IL-10, (e) expresión en superficie del antígeno(s) cargado(s) tras estimulación con CD40L.
- La activación y el establecimiento de la respuesta inmune a corto plazo por las células T CD8⁺ (citotóxica) y de la respuesta inmune a largo plazo por las células T-células CD4⁺ (adaptativa) es otro objetivo a alcanzar por estas DC.
- 35 La presente invención se refiere a una célula dendrítica cargada con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína antigénica asociada a tumor o un fragmento del misma y al menos una proteína antigénica asociada a tumor o fragmento de la misma, donde la molécula de ácido nucleico es la transcriptasa inversa telomerasa (TERT) y el antígeno proteico es Survivina tal y como se define en las reivindicaciones.
- 40 El antígeno codificado por al menos una molécula de ácido nucleico se traducirá en una proteína endógena y es por lo tanto procesado por las DC y expuesto en su membrana celular formando un complejo con MHC-I. De esta manera, se desencadena la respuesta citotóxica, debido al hecho de que MHC-I expone antígenos exclusivamente a CD8⁺. Por otro lado, el antígeno proteico cargado en las DC será procesado por dichas DC como antígeno proteico extraño y expuesto en su membrana celular formando un complejo con MHC-II. De esta manera, se desencadena la respuesta adaptativa, debido al hecho de que MHC-II expone antígenos exclusivamente a CD4⁺. En consecuencia,
- 45 la carga doble con al menos una molécula de ácido nucleico y un antígeno tumoral proteico garantiza: (a) una respuesta a corto plazo del sistema inmune mediante la activación de la citotoxicidad a través de T-citotóxica, NK y NKT en el reconocimiento del antígeno expuesto mediante MHC-I, (b) la estabilidad de la respuesta citotóxica de CD4⁺ dependiente de la activación mantenida de CD8⁺ tras reconocer el antígeno expuesto mediante MHC-II; (c) la activación de la respuesta de memoria mediante anticuerpos por la cascada de activación de las células de memoria T y B tras reconocer el antígeno expuesto mediante MHC-II.
- 50 Brevemente, la estrategia de carga doble (a) activa a corto plazo la respuesta citotóxica, necesaria para la eliminación del tumor eficaz inicial, (b) amplía el intervalo de tiempo de la respuesta citotóxica, que es generalmente

transitoria y por lo tanto no muy eficaz al activar las células T-cooperadoras; (c) promueve la generación y mantiene el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa, la cual necesita mucho tiempo, pero a diferencia de la citotóxica activa el sistema inmune contra el tumor, incluso años después de concluir la terapia.

5 Las DC de la presente descripción están cargadas preferiblemente (a) con Antígenos Asociados a Tumores universales (o uTAA, que están presentes en más de 2, preferiblemente más de 5, más preferiblemente más de 10, incluso más preferiblemente más de 20, en particular, más de 30, tipos de tumores diferentes) y/o (b) con antígenos tumorales de tipo específico (TAA; característicos de un único tipo de tumor y/o de un único tipo de familia tumoral).
 10 Por ejemplo, este método puede ser aplicado para un uso combinado de los dos uTAA más comunes: Survivina y TElomerasa transcriptasa inversa (TERT). De hecho, la expresión de estos dos antígenos se limita a células tumorales, mientras que no se expresa en absoluto o a niveles muy insignificantes en las células o tejidos sanos. De hecho, la Survivina rescata células de la apoptosis (muerte celular programada) y TERT promueve la inmortalidad celular, dos características, que son más típicas de células desreguladas que de células sanas. En consecuencia, la Survivina se expresa casi exclusivamente durante el desarrollo embrionario y fetal, pero se vuelve indetectable en el tejido adulto normal diferenciado finalmente, mientras que se vuelve a expresar en líneas celulares tumorales y en
 15 varias células de cáncer humano con una frecuencia de 34 a 100%. También la proteína TERT, presumiblemente a partir su subunidad de ARN, se expresa casi exclusivamente por células tumorales, incluso en etapas muy tempranas de la tumorigénesis. Como un factor de pronóstico, la expresión de Survivina y TERT están asociadas significativamente con un mal pronóstico clínico en cánceres, como cáncer de mama, cáncer de ovario, neuroblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y cáncer de esófago. Puesto que la Survivina y TERT se expresan preferentemente en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal, los efectos adversos sobre células normales y diferenciadas son poco probables. De hecho, estudios recientes demostraron que los pacientes tratados con DC cargadas con péptidos de Survivina o RNAm o péptidos de TERT no desarrollan ningún suceso
 20 adverso relacionado con la inmunoterapia, que no sea una reacción local en la zona de vacunación, a pesar de la inducción de una reactividad inmunológica impresionante contra Survivina o TERT según se midió con IFN- γ ELISPOT. Además, la fuerte respuesta inmunológica contra Survivina y TERT en el momento de la respuesta tumoral pone de manifiesto la regresión del tumor, después de la vacunación.

Alternativamente, las DC de la presente descripción pueden ser utilizadas para tratar y/o prevenir tumores específicos. Por ejemplo, en el caso de cáncer de mama, las DC pueden cargarse con proteína HER2 y Muc-1 ARNm.

30 Otra posible combinación de antígenos (combinación de un antígeno universal con uno específico de tumor) para cargar en las DC en el caso del cáncer de próstata es PSA-proteína y Survivina-ARNm.

Finalmente, es posible cargar las DC simultáneamente con una mezcla de moléculas de ácido nucleico y una mezcla de antígenos proteicos.

35 Los antígenos asociados a tumores expresados específicamente por las células específicas de tumores son conocidos por el experto en la técnica. Por lo tanto el técnico puede elegir aquellos antígenos que sean necesarios para producir células dendríticas cargadas que puedan utilizarse para tratar o para vacunar profilácticamente sujetos que sufran de un tipo de cáncer definido o que corran el riesgo de padecer cáncer.

Las DC de la presente invención están por lo tanto cargadas con dos tipos diferentes de moléculas: molécula(s) de ácido nucleico y molécula(s) de proteína tal y como se define en las reivindicaciones.

40 Estudios comparativos indican que la transfección con ácido nucleico, ARNm en particular, es superior a otras técnicas de carga de antígeno en la generación de DC inmunopotentes. Además, la carga de DC con, por ejemplo, ARNm es simple y eficaz. La capacidad de amplificar las moléculas de ácidos nucleicos a partir de cantidades microscópicas de tejido tumoral extiende el uso de la vacunación con DC a todo tipo de paciente de cáncer.

45 La carga de DC con ácido nucleico-antígenos tumorales definidos codificados es simple, reproducible y eficaz. Las moléculas de ácidos nucleicos correspondientes a los productos de genes, cuya secuencia se conoce, se puede generar rápidamente *in vitro* usando cebadores apropiados y la reacción en cadena de la polimerasa, en el caso RNAm transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), acoplada a reacciones de transcripción. La preparación de ácidos nucleicos para el uso clínico del producto generado *in vitro* no derivado de células se puede realizar de una manera rentable y definida, mejorando y simplificando por lo tanto el proceso de
 50 aprobación reguladora. Esto contrasta con la complejidad y las limitaciones del uso de vectores virales, cuya disponibilidad está limitada a estudios de investigación y restringe su evaluación clínica. Además, particularmente el enfoque con ARN ofrece una disolución práctica a un problema común encontrado en este tipo de terapia: el hecho de que en la mayoría de los casos, no es posible obtener tejido tumoral suficiente para generar la cantidad de antígenos necesarios para un protocolo de inmunización eficaz y mantenido para el paciente con cáncer. En efecto,
 55 el enfoque con ARN permite una amplificación del antígeno de interés sencilla y directa basada en la PCR a partir de cantidades microscópicas de tejido tumoral, proporcionando una cantidad de antígeno virtualmente inagotable. Se ha demostrado que la incubación de monocitos humanos inmaduros derivados de las DC solamente con ARNm del antígeno en el medio es suficiente para sensibilizar a las DC para que estimulen una respuesta CTL específica de

antígeno, comparable, si no ligeramente superior a la que se asocia con las DC transfectadas en presencia de lípidos.

5 Tal como se utiliza aquí el término "proteína de antígeno asociada a tumor " se refiere a antígenos asociados a tumor que comprenden o consisten en estructuras proteínicas como polipéptidos, proteínas y péptidos. Los fragmentos de proteína de antígeno asociado a tumor de la presente invención tienen al menos 10, preferiblemente al menos 20, más preferiblemente al menos 30, incluso más preferiblemente al menos 50, restos contiguos de aminoácidos de dichos antígenos asociados a tumor.

10 De acuerdo con una realización preferida de la presente descripción, el antígeno asociado a tumor o fragmento del mismo codificado por lo menos por la molécula de ácido nucleico se selecciona entre (a) el grupo de uTAA, tales como, pero no limitado a Survivina y Telomerasa Transcriptasa Inversa (TERT) y/o (b) el grupo de antígenos asociados a tumores de tipo específico (TAA), como por ejemplo, pero no limitado a PSA, muc-1, etc. En una realización particularmente preferida, el antígeno asociado a tumor o fragmento del mismo codificado por al menos una molécula de ácido nucleico es la Transcriptasa Inversa de la Telomerasa (TERT).

15 Las células dendríticas de la presente invención tienen varias ventajas sobre las células dendríticas cargadas conocidas en la técnica: (a) el uso simultáneo de más antígenos permite aumentar el rango de focalización, incluso si el tumor primario muestra un patrón de expresión de (u)TAA diferente procedente de metástasis secundarias y/o cuando la progresión del tumor va acompañada de un cambio en el patrón de expresión de (u)TAA en uno o más focos tumorales; (b) la utilización de uTAA, posiblemente en combinación con TAA extiende la aplicabilidad de la terapia a prácticamente cualquier tumor; (c) la utilización uTAA, cuya expresión está casi completamente restringida a las células tumorales, aunque aumenta la eficacia de la terapia, reduce drásticamente el aumento de efectos adversos (graves) cualquiera; d) el uso de al menos un (u)TAA codificado por una molécula de ácido nucleico y de al menos una proteína (u)TAA desencadena y mantiene el establecimiento tanto de la respuesta citotóxica transitoria a corto plazo, como de la respuesta adaptativa estable a largo plazo.

25 En particular, el uso simultáneo de carga de ácido nucleico (por ejemplo, ARN) y proteína evita el riesgo de desencadenar la respuesta T-reg, que puede ser provocada por la activación única del MHC-II por medio del procesado y presentación de antígenos de proteínas exógenas, mientras que desencadena dos respuestas diferentes: (a) la citotóxica, rápida y a corto plazo mediada por las células T CD8⁺ que reconocen antígenos acoplados a moléculas MHC-I. Estas células atacan directamente a otras células que portan los antígenos presentadores de DC en sus superficies. Este tipo de respuesta está estrictamente controlada y por lo general requiere de una señal de activación MHC/antígeno muy fuerte, y/o señales de activación adicionales proporcionadas por las células T "colaboradoras", (b) la respuesta de memoria, estable y a largo plazo mediada por las células T CD4⁺ (Th), que estimula la actividad de los macrófagos, CTL y células B, produciendo estas últimas anticuerpos. De hecho, las T-colaboradoras regulan ambas respuestas inmunes innata y adaptativa y ayudan a determinar qué tipos de respuestas inmunes producirá el organismo. La memoria activa a largo plazo se adquiere solamente por la activación específica de células B y T y requiere que los antígenos que desencadenan tal activación sean fuertemente inmunogénicos.

40 Las DC de la presente invención, cargadas al menos con un (u)TAA codificado por una molécula de ácido nucleico y por lo menos por un antígeno de proteína (u)TAA definido en las reivindicaciones (a) principalmente pierden la capacidad de fagocitar. Esta característica es importante para asegurar la activación específica de las células T exclusivamente contra los antígenos de carga; (b) mantienen la capacidad de migrar en respuesta a estímulos, tales como CCL19 y/o CD40L. Esta característica permite a las DC pasar de la zona de inyección hacia los ganglios linfáticos y/o donde haya una alta concentración de células T; (c) muestran un fenotipo maduro es decir, una expresión de superficie alta de CD80, CD86, CD40, CD83, HLA- ABC y HLA-DR. Esta característica es importante para acoplar y activar la población de células T adecuada; (d) secretan niveles de IL-12 de moderados a altos y niveles de IL-10 de moderados a cero. Esta característica garantiza que las DC mantengan la respuesta citotóxica (IL-12) y aumenten potencialmente la activación de las células T colaboradoras (IL-10); (e) muestran la expresión de superficie del antígeno(s) cargado por estimulación con CD40L. Esta característica es importante para determinar la especificidad de estimulación de las DC de células T; (f) después de la extracción y otro periodo de cultivo después de un ciclo de congelación/descongelación muestran la típica morfología dendrítica, que se caracteriza por la adhesión y la presencia de varios dedos, que se alargan desde el cuerpo celular pequeño y redondo, así como por la presencia de grupos de células. Esta característica constituye un sello distintivo de la funcionalidad de las DC como células presentadoras de antígeno (APC), (g) se pueden almacenar a entre -80 y -180°C sin perder su fenotipo activo y/o su funcionalidad.

55 a presente invención se refiere además también al uso de DC maduras, cargadas con TERT en combinación con un antígeno de proteína tumoral Survivina o fragmentos de los mismos tal y como se define en las reivindicaciones, preferiblemente capaz de migrar pero no de fagocitar, en el tratamiento de pacientes que sufren diferentes cánceres sólidos y sanguíneos.

La presente invención, especialmente en sus realizaciones preferidas, ofrece numerosas ventajas sobre la técnica anterior, tales como el aislamiento de gran cantidad de monocitos puros de las PBMNC del paciente, una tasa de

5 transformación de monocitos periféricos (pMos) en DC maduras entre 40-80%, protocolos adecuados de utilización GMP y *re-vivo*, un laboratorio adecuado según GMF estándar, posibilidad de un proceso libre de suero, una terapia virtualmente aplicable a cualquier tipo de tumor sólido y sanguíneo, disponibilidad de gran cantidad de fenotipos y DC maduras funcionales, un producto listo para usar que puede almacenarse durante años, una respuesta citotóxica fuertemente aumentada, una respuesta adaptativa fuertemente incrementada, la inhibición de la respuesta T-reg, una técnica con una mínima manipulación de las células, sin necesidad de tejido/células tumorales, posibilidad de exponer antígenos tumorales con MHC-I como resultado de la carga con ARNm acoplada a la activación simultánea del MHC-II como resultado de su combinación con el antígeno administrado en forma de proteína, la combinación de un antígeno de expresión universal y específico del cáncer, una viabilidad celular alta después de un ciclo de congelación/descongelación, y la conservación total de la funcionalidad celular y del fenotipo después de un ciclo de congelación/ descongelación.

10 Tal como se usa aquí, el término "fragmento" se refiere a una parte o tramo de un antígeno universal o asociado a un tumor de tipo específico, que retiene al menos un epítipo de la proteína de tipo silvestre.

15 Por consiguiente, un "fragmento" antigénico de tipo universal o asociado a un tumor de tipo específico, utilizado para cargar en células dendríticas, se une al menos a un receptor de células T, que promueve una respuesta inmune altamente específica contra las células que expresan dicho antígeno universal o asociado a un tumor de tipo específico. El "fragmento" se refiere también a una parte o tramo de antígeno universal o asociado a un tumor de tipo específico, modificado y sintetizado *in vitro* con el fin de aumentar su actividad inmunogénica.

El término "fragmento" se refiere a ambos ARN y antígeno de proteína.

20 La definición de "antígeno de la proteína del tumor" incluye también el exudado y lisado del tumor y además proteínas y péptidos completos o partes de los mismos, aislados o producidos químicamente/recombinantemente. Según la presente invención también están incluidos en la definición de antígenos asociados a tumor y fragmentos de los mismos los antígenos asociados a tumor y fragmentos de los mismos, que incluyen modificaciones de aminoácidos (delecciones, sustituciones, inserciones). Con la condición de que estas moléculas modificadas exhiban todavía funcionalidades similares o incluso idénticas a las del antígeno asociado a tumor de tipo silvestre o fragmentos del mismo.

25 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico es un ácido ribonucleico, preferiblemente ARNm.

30 La DC cargadas al mismo tiempo con ARNm y proteínas/péptidos específicos del tumor pierden casi completamente la capacidad de fagocitar pero mantienen la capacidad de migrar en respuesta a estímulos; muestran alta producción de IL-12 con o sin secreción moderada de IL-10; mejoran la respuesta de las células T citotóxicas, ya que el antígeno codificado por ARNm es procesado como proteína endógena por las DC y por lo tanto complejo con MHC-I; inducen la respuesta T-mem a través de MHC-II, debido al hecho de que las proteínas exógenas son procesadas por las DC para ser complejadas con MHC-II, no activan T-reg.

35 Las DC se cargan con el antígeno codificado por ARNm por las razones siguientes:

- Las DC transfectadas con ARNm son tanto o más potentes que las DC pulsadas con péptidos en las respuestas CTL de estimulación *in vitro* (Boczkowski, D. et al (2000) Cancer Res 60 (4): 1028-1034);

- Las DC transfectadas con ARNm son APC más eficaces, capaces de estimular respuestas CD8⁺ *in vitro* (Gilboa, E. y J. Vieweg (2004). Immunol Rev 199:251-63);

40 • la transfección con ARNm es tan eficaz que puede inducir y contribuir al proceso de maduración de DC (Weissman, D. et al (2000) J Immunol 165 (8): 4710-7 y Heiser, A. et al (2002). J Clin Invest 109 (3): 409-17);

- el ARNm se puede cargar en las DC por transfección pasiva con una alta eficacia, medida como respuesta de CTL (Nair, S.K.(1998). Gene Ther 5 (11): 1445-6).

45 Aunque el método de carga del ARNm y de una molécula de ácido nucleico, presenta numerosas ventajas sobre otras técnicas de carga, este enfoque tiene al menos también un talón de Aquiles: aunque provoca una potente respuesta CTL mediante la activación de las células CD8⁺, no puede inducir una respuesta CD4⁺ eficaz, incluso si tal respuesta ha demostrado ser crítica para el establecimiento de una respuesta inmune eficaz contra tumores. De hecho, las células CD4⁺ proporcionan funciones importantes para la expansión y la persistencia de CTL CD8⁺; estimulan el sistema inmunitario innato en el foco del tumor e inhiben la angiogénesis local. Una respuesta inmune antitumoral óptima requiere por lo tanto la activación simultánea de ambas respuestas inmunes impulsadas por las células T CD8⁺ y CD4⁺.

50 Con el fin de lograr este objetivo, se ha introducido una segunda etapa de carga, junto con el enfoque de carga con ARNm: la carga de proteínas de antígeno por incubación pasiva. Las DC estimuladas por incubación con ARNm, muestran una mayor capacidad, por ejemplo, para fagocitar péptidos cortos. Por lo tanto, resultó que el uso del enfoque de carga doble era ventajoso para inducir ambas líneas de respuesta inmune de células T CD8⁺ y CD4⁺.

Este enfoque constituye una gran mejora en inmunoterapia del cáncer con DC, ya que puede, al mismo tiempo, inducir la respuesta a corto plazo por la activación de la CD8⁺, así como la respuesta de memoria de larga duración, mediante la activación de las células T CD4⁺.

El enfoque de carga doble tiene varias ventajas sobre otros métodos, conocidos en la técnica:

- 5
- activación específica de ambas líneas citotóxica y de memoria del sistema inmune;
 - Ausencia de la respuesta T-reg;
 - El uso de diferentes antígenos para dirigir la activación de cada una de las líneas del sistema inmune con el aumento consiguiente de la sensibilidad y la potencia del estímulo;
 - Terapia aplicable virtualmente a cualquier tipo de tumor sólido y sanguíneo;
- 10
- Combinación de antígenos tumorales universales y de tipo específico;
 - Total conformidad con GMP y utilización *re-vivo*;
 - Listo para usar, que puede almacenarse durante años;
 - Manipulación mínima de las células;
 - No requiere tejido tumoral/células;
- 15
- Activación simultánea de los complejos MHC-I y MHC-II tras la carga con (u)TAA codificado por moléculas de ácido(s) nucleico(s) y (u)TAA antígeno(s) de proteína(s), respectivamente;
 - Elevada viabilidad celular después de un ciclo de congelación/descongelación;
 - Elevada conservación de la funcionalidad celular y del fenotipo después de un ciclo de congelación/descongelación;
 - Versatilidad del método.
- 20
- De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, la molécula de ácido nucleico comprende además ARNm completo de tipo silvestre, un fragmento del ARNm de tipo silvestre, ARNm completo modificado *in vitro*, una mezcla de dos o más ARNm completo de tipo silvestre o modificado, o fragmentos.
- 25
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el antígeno de proteína comprende un antígeno completo de tipo silvestre; un fragmento del antígeno de tipo silvestre; un antígeno completo modificado *in vitro*; un fragmento de antígeno modificado *in vitro*; una mezcla de dos o más antígenos completos o fragmentos de tipo silvestre o modificados; antígenos completos o fragmentos unidos a xenoantígenos, tales como, pero no limitados a hemocianina de lapa (KLH); lisado y péptidos tumorales, aislados o producidos químicamente/por recombinación. El término antígeno de proteína comprende además la mezcla de antígeno de proteína, péptido y lisado.
- 30
- La producción de células dendríticas de la presente descripción se puede cargar con cualquier tipo de antígeno asociado a tumor. El antígeno asociado a tumor es preferiblemente un antígeno asociado a un tumor específico seleccionado del grupo que consiste en antígeno carcino-embriionario (CEA), mucina (MUC), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), BRCA y ras, y/o un antígeno asociado a tumor universal seleccionado del grupo que consiste en Survivina y TERT. El antígeno asociado a tumor es Survivina.
- 35
- De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, las células dendríticas son de origen humano o animal.
- 40
- Las células dendríticas de la presente invención se basan preferentemente en la expansión de las DC autólogas de sangre periférica de sujetos humanos. Las células mononucleares de sangre periférica (PBM-NC) se recogen mediante leucoféresis seguida de elutriación o centrifugación en gradiente (es decir, centrifugación en gradiente de Ficoll), con el fin de aumentar la fracción de monocitos (Mo), que constituyen los precursores de DC seleccionados. Esta manera de obtener los Mos de sujetos asegura una alta pureza y grandes cantidades de precursores de DC que se pueden cultivar por lo tanto inmediatamente, sin la necesidad de pasos intermedios, tales como el enriquecimiento mediante el uso de perlas, que son por un lado, no conformes a GMP y por otro lado, pueden ser una fuente de contaminación. A continuación los Mos se diferencian en un laboratorio conforme a GMP, con un medio de cultivo, no sólo conforme a GMP sino también libre de suero y conforme a utilización *re-vivo*.
- 45
- Las DC se cargan con molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) preferentemente cuando aún están inmaduras, maduran y a partir de entonces se cargan con los antígeno(s) de proteína(s). Alternativamente, las DC se pueden cargar en primer lugar con molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) y posteriormente con antígeno(s) de proteína(s) cuando están todavía inmaduras y madurar después. Además, las DC se puede cargar primero con molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) y posteriormente madurar y cargarse con antígenos(s) de proteína(s) al mismo tiempo. Finalmente, la

secuencia de carga con molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) primero y con antígeno(s) de proteína(s) después puede ser invertida. De acuerdo con el método utilizado, es posible modular la respuesta inmune conducida por las DC cargadas.

5 Las DC pueden madurar por medio de la adición de uno de los combinados estándar disponibles actualmente, pero preferentemente mediante el uso de Ribomunil e INF- γ .

Las DC maduras se inyectan en los pacientes preferiblemente sólo si al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, más preferiblemente al menos el 80% de ellas tiene una carga doble.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la preparación de células dendríticas *ex vivo* como se define en las reivindicaciones, donde se proporcionan las células dendríticas, comprendiendo la etapa de:

10 • Cargar dicha célula con al menos una molécula de ácido nucleico que codifique un antígeno asociado a tumor y al menos una molécula de proteína que sea un antígeno asociado a tumor o fragmento del mismo como se describió anteriormente, donde la molécula de ácido nucleico es la Telomerasa Trascriptasa Inversa (TERT) y proteína antigénica es Survivina; y opcionalmente

• Madurar de dichas DC.

15 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la fuente de células dendríticas consiste en sus precursoras autólogas, es decir monocitos derivados de PBMNC. Los monocitos son diferenciados en DC inmaduras tras 5-6 días de cultivo en CellGro, con GM-CSF e IL-4 añadidos.

20 Como alternativa las células dendríticas pueden aislarse directamente a partir de sangre completa. Los protocolos para el aislamiento directo de las células dendríticas y la diferenciación de monocitos en células dendríticas son conocidos en la técnica. El presente protocolo asegura que el 40-80% de los Mos iniciales se convierte en DC, mientras que los protocolos actuales garantizan aproximadamente 10-20%.

25 Las DC maduran finalmente *in vitro* para aumentar los niveles de moléculas co-estimuladoras y para desencadenar una respuesta citotóxica de las células T específica de tumor fuerte y duradera. El combinado de maduración según la presente invención es completamente conforme a GMP y asegura una producción prolongada de IL-12, con o sin una moderada secreción de IL-10 en comparación con los métodos actualmente empleados. Además, estas DC son capaces de producir niveles altos de IL-12 y cantidades moderadas de IL-10 tras estimulación con CD40L y siguen siendo viables, activas fenotípica, morfológica y funcionalmente tras un ciclo de congelación/descongelación, incluso después de un año de conservación congeladas en DMSO al 10% o glicerol al 10% (-150°C). Cuando el método descrito en esta patente se utiliza para fabricar un producto final conforme a GMP, su puesta a la venta está condicionada a pasar con éxito un estricto Control del Producto Final (EPC), diseñado para determinar firmemente la viabilidad, la actividad fenotípica, morfológica y funcional, la estabilidad tras conservación por ultracongelación y un ciclo de congelación/descongelación, la pureza y esterilidad de las DC, que debe ser aplicado al paciente. El producto final se almacena preferentemente en glicerol (10%) o DMSO (10%), es decir, medios de congelación que hacen que el producto esté listo para usar al preservar su calidad durante un largo período, que son conformes a GMP y que no provocan efectos secundarios a las concentraciones utilizadas. Estos medios de congelación proporcionan también actividad de larga duración (secreción de IL-12, estimulación y migración de las células T) del producto. Las DC con carga doble pierden casi totalmente su capacidad de fagocitar, pero conservan su capacidad de migrar en respuesta a estímulos y en menor grado, de migrar de forma espontánea, manifiestan alta producción de IL-12 con o sin secreción moderada de IL-10, y mejoran la respuesta citotóxica de las células T y T-MEM, sin provocar la activación de T-REG.

40 De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, las células dendríticas inmaduras maduran durante o después de la carga así como durante la carga del antígeno de proteína.

Las células dendríticas maduran preferiblemente mediante la adición de Ri-bomunil e INF- γ .

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a células dendríticas diferenciadas y/o cultivadas, cargadas y maduras según el método descrito en la presente invención.

50 Otro aspecto mas de la presente invención se refiere a una preparación de calidad farmacéutica/clínica que comprende células dendríticas según la presente invención, puesto que las células dendríticas de la presente invención se pueden suministrar en una preparación de calidad farmacéutica/clínica. Dicha preparación se puede emplear en el tratamiento o prevención de prácticamente cualquier tipo de cánceres sólidos y sanguíneos. Las DC maduras con carga doble, se inoculan preferente semanal o quincenalmente. Dado que este producto consiste en un producto autólogo y por lo tanto puede mostrar muchos componentes individualistas, la vía de administración puede variar entre administración semanal o mensual, según los resultados observados en el paciente durante el seguimiento continuo. Las DC se pueden administrar preferentemente por vía intradérmica o intranodal. Alternativamente, pueden ser administradas por vía paranodal, perinodal, subcutánea o intravenosa, dependiendo del cáncer tratado.

55

Las DC se administran preferiblemente lo más próximas posible al tumor. La dosis estándar comprende preferiblemente aproximadamente $7-13 \times 10^6$ DC, disueltas hasta un volumen final de 0,5-1 ml del medio de congelación.

5 La terapia se compone de un número de inyecciones comprendidas entre 2 y 20. El producto se almacena preferentemente pero no exclusivamente en glicerol al 10% o DMSO al 10% descongelado durante un máximo de 10' a temperatura ambiente y se administra inmediatamente.

10 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la administración del producto puede ir acompañada por la administración de agentes inmunoestimulantes y/o coadyuvantes. Su uso en concomitancia con la quimioterapia es también adecuado, así como durante las pausas entre los ciclos de quimioterapia, pero no en concomitancia con tratamientos inmunosupresores y/o en presencia de cantidades muy reducidas de las células T (objetivos preferentes de la activación del sistema inmune impulsado por DC contra el cáncer).

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a la utilización de células dendríticas según la presente invención para la preparación de una vacuna para el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto.

15 Las células dendríticas de la presente invención, que se cargan con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno asociado a tumor (véase más arriba) y con al menos una molécula de proteína que sea un antígeno asociado a tumor (véase más arriba) puede ser convenientemente utilizada para tratar un sujeto que padece cáncer o para evitar que una persona desarrolle cáncer.

demás la presente invención se ilustra mediante las siguientes figuras y ejemplos, aunque no está restringida a los mismos.

20 Fig. 1 muestra la expresión de Survivina y PSA en DC inmaduras, semimaduras, no cargadas y, DC maduras cargadas con ARNm de Survivina así como con ARNm de Survivina + péptido, cultivadas como se describe en los ejemplos.

Fig. La figura 2 muestra el fenotipo de DC no cargadas inmaduras, semi-maduras, y DC maduras cargadas con ARNm de Survivina así como con ARNm Survivina + péptido, cultivadas como se describe en los ejemplos.

25 Fig. 3 muestra la secreción de IL-10 e IL-12 por inmaduros, semi-maduros, por DC no cargadas inmaduras, semi-maduras, y DC maduras cargadas con ARNm de Survivina así como con ARNm Survivina + péptido, cultivadas como se describe en los ejemplos.

30 Fig. La figura 4 muestra la inducción de proliferación de células T después de incubación con DC no cargadas inmaduras, semi-maduras, y DC maduras cargadas con ARNm de Survivina así como con ARNm Survivina + péptido cultivadas como se describe en los ejemplos.

Fig. 5 presenta la migración de células inmaduras espontánea e inducida (por CCL19) que muestran, DC no cargadas inmaduras, semi-maduras, y DC maduras cargadas con ARNm de Survivina así como con ARNm Survivina + péptido cultivadas como se describe en los ejemplos.

35 Fig. La figura 6 presenta la fagocitosis espontánea e inducida (por CCL19) mostrada por DC no cargadas inmaduras, semi-maduras, y DC maduras cargadas con ARNm de Survivina así como con ARNm Survivina + péptido cultivadas como se describe en los ejemplos.

Fig. La figura 7 muestra la estimulación citotóxica de las células T y de T-mem tras la incubación con DC de carga doble, mientras que el número de T-reg está fuertemente inhibido tras la incubación con DC de carga doble.

EJEMPLOS

40 **1.- Experimentos piloto pre-clínicos**

Los monocitos se aíslan a partir del producto de leucoféresis de los pacientes y se monitoriza para los siguientes marcadores.

FITC	PE	ECD	PC5	PC7
CD14	CD19	CD3	CD16	CD45
CD41	GPA	n.a.	n.a.	CD45

5 Posteriormente, los PBMCs recogidos por leucofóresis son separados con Ficoll, contabilizados y monitorizados de nuevo como se ha descrito anteriormente. En este punto, las células separadas con Ficoll o las células derivadas por elutriación se disponen para la adhesión durante 2 h en CellGro, al que se añade GM-CSF(1000-2500 U/ml) e IL-4 (400-1000 U/ml). Posteriormente, las células no adherentes se descartan con el sobrenadante y las células adherentes se vuelven a cultivar en CellGro, al que se añade GM-CSF (1000-2500 U/ml) e IL 4-(400-1000 U/ml), a una concentración de 1-2 Mio/ml durante 5-6 días con el fin de transdiferenciar los monocitos en DC inmaduras. Posteriormente, las células se cargan con el ARNm. Poco después, las DC se lavan dos veces en PBS, se recuentan y se centrifugan a 300xg durante 10'. Se vuelven a suspender en medio CellGro y se incuban en una didisolución que contiene ARNm (0,1-100 µg/ARN 1x10⁶ DC) durante 2-4 h en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO₂. Sin lavado, a continuación los cultivos se incubaron con una didisolución de antígeno de proteína(0,1-100 µg d

10 péptido/1x10⁶ DC) durante 2-12 h en una incubadora humidificada a 37°C/5% de CO₂. A partir de entonces, sin lavar, se añaden a los cultivos Ribomunil (0.1-10 µg / ml) e INF- γ (400-1000 U/ml) y se dejan madurar durante 8-24h. Las DC maduras se almacenan en alícuotas cada una de al menos 10 millones de DC en glicerol (disolución acuosa) al 10%.

15 El control de calidad (QC) se lleva a cabo como se describe a continuación: una parte alícuota de las células se descongela y se cultiva durante 48 horas.

Fenotipo:

FITC	PE	PC5	PC7
CD80	CXCR4	CD83	CD45
CD80	CD19	CD3	CD45
HLA-ABC	HLA-DR	CD40	CD45

20 Las células maduras muestran sobrerregulación de CXCR4, CD40, CD80, CD83, HLA-ABC y HLA-DR.

La viabilidad de las células se mide con un contador Casy con un software conforme a GMP y debe ser por lo menos ≥ 70%.

La contaminación por células T y células-B se controla mediante la detección por FACS del número de células CD3 y CD19 positivas. La contaminación se mantiene siempre inferior al 25%.

25 Funcionalidad:

El test de actividad inmune se lleva a cabo mediante el análisis de la producción de IL-12 vs IL-10 según un ensayo ELISA validado por ISO 9002 y por inducción de la proliferación de linfocitos por medio de la reacción mixta de leucocitos.

30 La fagocitosis y la actividad de migración de dl-DC se controla por la captación de dextrano-FITC y el ensayo Transwell, respectivamente.

2. Diseño del estudio clínico

Título: "Un estudio de Fase I, abierto, aleatorio para investigar la seguridad de la inmunoterapia activa con DC totalmente maduras, con carga doble de ARNm-TERT y péptido-Survivina en sujetos con cáncer epitelial de ovario avanzado, 8 semanas después de completado el tratamiento coadyuvante"

35 *Fase:* Fase I

Indicaciones: Cáncer epitelial de ovario avanzado

40 *Objetivos del estudio:* Investigar la seguridad de la inmunoterapia activa con DC (células dendríticas) totalmente maduras, con carga doble de ARNm-TERT Transcriptasa Inversa de la Telomerasa) y péptido-Survivina, en pacientes con cáncer de ovario avanzado, 8 semanas después completar la terapia adyuvante. La eficacia en términos de la reducción de Células Tumorales Diseminadas (DTC) se investigará como un objetivo secundario.

45 *Diseño del estudio:* Se trata de un ensayo de fase I abierto en pacientes con cáncer epitelial de ovario avanzado. Los pacientes se distribuirán al azar en el grupo de tratamiento A con una administración semanal vs el grupo de tratamiento B con administración cada dos semanas. Cada paciente recibirá un total de 8 inyecciones intradérmicas. El curso de tratamiento consiste en una inyección una vez a la semana durante 8 veces para el grupo de tratamiento A y 1 inyección una vez cada quince días durante 8 veces para el grupo de tratamiento B.

Se hará un seguimiento de los parámetros de seguridad de los pacientes y el estado del tumor se evaluará en las semanas 12, 24, 36, 48, 72 y 96 hasta la progresión de la enfermedad. Al final del tratamiento (7 semanas para el grupo de tratamiento A y 14 semanas para el grupo de tratamiento B), se hará un seguimiento de los pacientes durante 24 meses hasta que la enfermedad evolucione, el fallecimiento, o el final del estudio. Una vez que la enfermedad evoluciona, se hará un seguimiento de los pacientes hasta su fallecimiento o el final del estudio.

5 A fin de cumplir con las normas de referencia cGCP, los primeros 6 pacientes se observarán en condiciones controladas durante 48 horas. Serán tratados secuencialmente, a intervalos de 48 horas.

Tamaño de la muestra prevista: 25 pacientes.

10 Duración del tratamiento: Cada paciente recibirá un total de 8 inyecciones intradérmicas, administrados de manera paraumbilical. El curso de tratamiento consta de 8 ciclos de inyección (1 inyección por ciclo), una vez a la semana para el grupo de tratamiento A y una vez cada quince días para el grupo de tratamiento B.

15 Estudio de tratamiento: El IMP consiste en $1 \times 10^{7 \pm 30\%}$ DC totalmente maduras autólogas, cargadas doblemente con ARNm-TERT y péptido-Survivina, diluido en 0,5 ml de una disolución de congelación estándar, compuesta por 10 % de DMSO, disuelto en una disolución de agua fisiológica de glucosa al 5%; contenida en un criovial de 2 ml, etiquetado conforme a GMP. El IMP se suministra ultracongelado y una vez descongelado a temperatura ambiente durante un máximo de 10 minutos, debe ser administrado inmediatamente.

La producción del IMP se realiza como se describe a continuación:

20 Los pacientes son sometidos a leucoféresis y los PBMC recogidos son transportados en 24 horas a 2-20° C a la instalación estéril donde la fracción de monocitos se enriquece por medio centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll. Después de Ficoll, la pureza de los monocitos se incrementa por la siembra de las células resultantes en CellGro simple e incubándolas durante 2 horas a 37° C/5% de CO₂. En este punto, las células no adherentes (linfocitos) se lavan y las adherentes (monocitos) se siguen cultivando a una concentración final de $1-2 \times 10^6$ / ml en CellGro, complementado con IL-4 y GM-CSF.

25 Una vez sembradas en presencia de IL-4 y GM-CSF, las células se cultivaron durante 5 días. En este punto, se lavan, se siembran en CellGro normal y se incubaron al principio con ARNm-TERT durante 2 h. En este punto, sin lavado, las células maduran completamente por incubación a 37° C/ 5% de CO₂ en Cellgro, suplementado con Ribomunil e INF- γ durante 16 h. En este punto las células adherentes y maduras se lavan una vez en PBS y finalmente se les añade péptido-Survivina durante 2 horas a 37° C/5% de CO₂. Posteriormente, las células se recogen, se recuentan y se prueba su viabilidad y pureza, antes de ser separadas en viales de $1 \times 10^7 \pm 30\%$ células cada uno, y se congelan en 0,5 ml de una disolución de congelación, compuesta por DMSO al 10%, disuelto en una didisolución de agua fisiológica de glucosa al 5%

30 La recolección de IMP incluye el almacenamiento de 8 viales de IMP para ser inyectados en el paciente; 1 muestra estéril; 1 muestra de conservación; 3-5 muestras EPC y muestras excedentes potenciales. La puesta a la venta del producto está estrictamente condicionada al cumplimiento de los criterios de EPC para esterilidad, viabilidad, fenotipo, pureza, funcionalidad y estabilidad. Una vez que el lote sale al oficialmente mercado, cada vial IMP se entrega separadamente en hielo seco al lugar del estudio, donde puede ser almacenado en la caja de transporte sellada como máximo durante 24 horas. Una vez descongelado a temperatura ambiente durante un máximo de 10 minutos, el IMP debe ser inyectado inmediatamente al paciente antes de 10 minutos por vía intradérmica y paraumbilical.

40 3. Prueba del Principio

Los monocitos aislados de controles sanos por leucoféresis son sometidos a un enriquecimiento posterior a través de elutriación y después se controlan los siguientes marcadores:

FITC	PE	ECD	PC5	PC7
CD14	CD19	CD3	CD16	CD45
CD41	GPA	n.a.	n.a.	CD45

45 y se recuentan. En este punto los monocitos se dividen en alícuotas de 5×10^7 células cada uno y se congelan en DMSO al 10%, se diluyen en una disolución acuosa de glucosa al 5% hasta un volumen final de 1,8 ml. Las alícuotas se almacenan a -150° C hasta su uso. Al menos 14 alícuotas pertenecientes al mismo lote se descongelaron al mismo tiempo y se agruparon para realizar cada experimento. Tras la descongelación las células se lavaron una vez con PBS, se controlaron dichos marcadores, viabilidad y cantidad. Posteriormente se sembraron en CellGro, al que se añade GM-CSF (1000-2500 U/ml) e IL-4 (400-1000 U/ml). Posteriormente, las células no adherentes se descartan con el sobrenadante y las células adherentes se vuelven a cultivar en CellGro, al que se

- añade GM-CSF (1000 U/ml) e IL-4 (400 U/ml), a una concentración de 1-2 Mio/ml durante 5 días con el fin de que los monocitos se transdiferencien en DC inmaduras. Posteriormente, las células se cargan con ARNm. Poco después, las DC se lavan una vez con PBS, se recuentan y se centrifugan a 1000 rpm durante 10'. Se vuelven a suspender en un medio CellGro y se incuban en una disolución que contiene ARNm (50 ng de RNA/1*10⁶ DC) durante 2 h en una incubadora humidificada a 37° C/ 5% de CO₂. Sin lavado, se añade posteriormente a los cultivos Ribomunil (100 µg/ml) e INF-γ (1000 U/ ml) y se deja madurar durante 16 horas. En este punto, las células se lavaron una vez con PBS y se volvieron a sembrar en CellGro simple, al que se añade la disolución de antígeno de proteína (1-10 µg de péptido/1*10⁶ DC) y se incubó durante 2 h en una incubadora humidificada a 37° C/ 5% de CO₂. Dependiendo de la clase de experimento, el péptido se cargó alternativamente antes de madurar o durante la maduración con el combinado de maduración. Posteriormente, las células se lavaron una vez con PBS y las adherentes se recogieron y se procesaron inmediatamente o, alternativamente se dividieron en alícuotas de 1*10⁷ DC en DMSO al 10%, se diluyeron en una disolución acuosa de glucosa al 5% hasta un volumen final de 0,5 ml.

El control de calidad (QC) se realizó como se describe a continuación.

En la recogida o tras un ciclo de congelación/descongelación las células se cultivaron durante 12-24h.

- 15 Al inicio del QC y en determinados momentos (0-4 12/14 y 24 horas) se realizó un control de las células de los siguientes parámetros:

FITC	PE	PC5	PC7
CD14 (My4)	CD19	CD3	CD45
CD80	CD40	CD83	CD45
Survivina	HLA-DR	HLA-ABC	CD45
TERT	HLA-DR	HLA-ABC	CD45
TERT	Survivina	CD83	CD45

Además de la morfología, viabilidad y secreción de IL-10 e IL-12

Materiales y Métodos

20 1. Experimentos piloto preclínicos

1.1. Aislamiento de células

Se llevaron a cabo leucoféresis y elutriaciones con equipamiento GAMBRO y siguiendo las instrucciones de preparación.

1.2 Purificación en Ficoll

- 25 Se mezclan 10 ml de sangre/producto recolectado por aféresis con 30 ml de PBS + tampón de citrato al 10%. Posteriormente se añaden 30 ml de la mezcla a 20 ml de Ficoll y se centrifugan durante 20' a 2000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se recogen las interfases y se centrifugan 10' a 1200 rpm a temperatura ambiente. Finalmente, los gránulos se volvieron a suspender en PBS, se lavaron dos veces durante 10' a 1200 rpm a temperatura ambiente y se volvieron a suspender en CellGro.

30 1.3 Cultivo celular

Las DC se cultivaron en matraces de plástico en CellGro al que se añade GM-CSF (400-1000 U/ml) e IL-4 (100 a 400 U/ml) durante 5-6 días y se maduran tras la adición de Ribomunil (0.5-1 µg/ml) e INF-γ (200-1000 U/mL) durante 24 horas.

1.4. FACS

- 35 Se incuban 50 µL de sangre completa ó 50 µL de una suspensión celular (DC descongeladas, a una concentración final de 1x10⁶ células/ml en PBS, BSA al 1%, NaN₃ al 1%) durante 15' a temperatura ambiente con la cantidad apropiada de anticuerpos FACS, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (los eritrocitos de sangre completa se lisan químicamente), se lavan a 800 rpm (RT) con 1,5 ml ó 0,8 ml de PBS, respectivamente, se vuelven a suspender en 0,5 ml de PBS, se complementan con un fijador y además se procesa con FACS ®

1.5 ELISA

Las DC congeladas se descongelan y se vuelven a cultivar en RPMI complementado con HS al 2% hasta una concentración final de 1×10^6 células/ml. Después de 24 horas, el sobrenadante se recoge y se analiza para IL-10 e IL-12p70 humana, utilizando el KIT ELISA ISO 9002 de CellScience y siguiendo las instrucciones del producto.

1.6 Reacción mixta de leucocitos

- 5 Las DC congeladas se descongelan, y co-cultivan a una concentración final de 1×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en forma de U con la fracción no adherente de PBMNC separados por Ficoll de un donante sano a una concentración final de 1×10^6 células/pocillo en un medio RPMI con 2% de suero humano (off the Clot, AB), complementado con 10% de AlamarBlue® hasta un volumen final de 150 μ L. La proliferación causa la reducción del colorante que se cambia de la forma oxidada (no fluorescente, azul) a la forma reducida (fluorescente, rojo). Se mide la absorbancia durante 2-7 días, cada 4h, en un lector de placas a 595 nm con una longitud de onda de referencia de 620 nm.

1.7 Aislamiento de DTC

El aislamiento de las DTC se realiza según el protocolo facilitado con el kit de OncoQuick (Gentech).

1.8. Transcripción y purificación del ARNm de Survivina

- 15 La transcripción y purificación del ARNm de Survivina se llevan a cabo, de acuerdo con los protocolos del fabricante, mediante el uso de los Kit T7/T3 mMessage mMACHINE® (Ambion) y del Mini Kit Oligotex ARNm (Qiagen), respectivamente.

1.8 Síntesis de proteínas

- 20 Todas las proteínas/péptidos específicos de tumor utilizados se sintetizan de acuerdo con las normas GMP de la American Peptide Company, Inc. o de otras compañías igualmente certificadas, que producen péptidos de grado GMP para uso clínico. Los antígenos de proteínas se preparan a partir de ADNc (Origene) de acuerdo con la instrucción y mediante el Kit Proteína EasyXpress Síntesis de grado investigación (Qiagen).

1.10 Western blot

- 25 Las células se lisan en un tampón Frackelton durante 20' en hielo y se centrifugan a 1000g 10' a 4° C. Después de recoger el sobrenadante, la concentración de proteína se mide con el ensayo de Bradford y se añade tampón de muestra azul a cada muestra en una proporción de 4:1. Después de preparar un gel de poliacrilamida, las proteínas se transfieren y adsorben en una membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana se lava con TBS-T y se incuba primeramente 1h en 10 ml aproximadamente de disolución de bloqueo, compuesta de TBS-T I1 al que se añaden 0,5 ml de Tween-20 y 5% de leche y posteriormente 10 ml del primer anticuerpo diluido en TBS-T sin leche, al que se añaden 3% de BSA y 0,02% de NaN_3 , durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se lava tres veces con TBS-T y se incuba con el anticuerpo secundario durante 40' a temperatura ambiente. Finalmente la expresión de la proteína se detecta con el Kit ECL.

2. Estudio clínico y Prueba del Principio

1.1 Aislamiento de células

- 35 Se llevan a cabo la leucofóresis y elutriación con el equipo de GAMBRO y siguiendo las instrucciones de preparación.

1.2 Congelación de monocitos

- 40 Se hace un recuento de las células obtenidas por elutriación y se hace una caracterización por FACS. Finalmente, los monocitos se dividen en alícuotas de 3×10^7 celdas cada una y se congelan en DMSO al 10%, se diluyen en una disolución acuosa de glucosa al 5% hasta un volumen final de 1,8 ml. Las alícuotas se almacenan a -150 °C hasta su utilización.

1.3 Cultivo celular

Las DC se cultivaron en matraces de plástico en CellGro al que se añade GM-CSF (1000 U/ml) e IL-4 (400 U/ml) durante 5 días y se maduran tras añadir Ribomunil (100 g / ml) e INF- γ (1000 U/ml) durante 16 h.

- 45 1.4. FACS

Se incuban 50 μ l de suspensión celular (de una muestra que alcanza una concentración final de 1×10^6 células/ml en PBS, con o sin 0,5% de BSA, EDTA 2 mM) durante 15' en el refrigerador y en oscuridad con la cantidad de

anticuerpos FACS apropiada, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se lavan a 4° C aproximadamente a 1000 rpm con 1,0 ml de PBS con o sin 0,5% de BSA, EDTA 2 mM, se vuelven a suspender en 0,5 ml de PBS, se suplementan con fijador y se procesan adicionalmente por FACS®

1.5 ELISA

- 5 Las DC recolectadas o congeladas se descongelan y se vuelven a cultivar en CellGro en presencia o en ausencia de CD40L hasta una concentración final de 1×10^6 células / ml. En punto de control específico, distribuido a lo largo de 24 horas, se recoge el sobrenadante y se analiza para IL-10 e IL-12p70 humanas, utilizando el KIT ELISA ISO 9002 de CellScience y siguiendo las instrucciones del producto.

1.6 Transcripción y purificación del ARNm de TERT

- 10 La transcripción del ARNm de TERT se realiza, de acuerdo con los protocolos del fabricante, mediante la utilización de los kits T7/T3 de mMessage mMACHINE® (Ambion).

1.7 Péptido de Survivina

- 15 El péptido de Survivina fue proporcionado por Global peptide o American Peptide Company, Inc., como producto liofilizado. Una vez reconstituido en agua, fue almacenado a -80° C en partes alícuotas iguales de 100 µg/ml cada una.

Resultados

Experimentos piloto preclínicos

- 20 Todos los resultados mostrados en esta sección se realizaron con DC, cultivadas como se describió anteriormente y se congelaron en glicerol al 10%. La viabilidad celular, después de la descongelación, fue > 75%. Los resultados obtenidos con la disolución de glicerol al 10% son comparables o ligeramente superiores a aquellos obtenidos tras congelación con DMSO al 10%. La congelación de células en glicerol presenta una gran ventaja sobre la congelación de con DMSO al no requerir una etapa de centrifugación para eliminar las sustancias tóxicas (DMSO) y por lo tanto permite una inyección más sencilla de las DC en los pacientes, sin necesidad de herramientas y equipos especiales (centrífuga, flujo de lámina, medio ambiente estéril).

- 25 Para garantizar que las DC incubadas con ARNm de Survivina y antígeno de proteína (PSA) fueron cargadas efectivamente, se realizó un Western Blot para determinar si el ARNm fagocitado fue traducido y si el antígeno de la proteína fue expresado por DC.

- 30 1 células de Mio se lavaron dos veces en PBS, se lisaron en tampón Frackelton y se procesaron por Western Blot. Los resultados presentados en la figura. 1 muestran que las DC inmaduras (iDC) y las DC semi-maduras, sin carga (smDC) no expresan ni Survivina ni PSA. Las DC maduras, cargadas con ARNm de Survivina (mDC), expresan este antígeno, pero no PSA y las DC maduras, cargadas con Survivina y PSA (dmDC), expresan ambos antígenos. Estos resultados confirman que el procedimiento de carga es funcional tanto para el ARNm y para la proteína cargadas y es muy eficaz, sin necesidad de portadores o medios activos de transfección.

- 35 En 10 pacientes se ha demostrado que las DC, cultivadas como se describe en el presente protocolo expresaron grupos de CD diferentes en su superficie, de acuerdo con las diferentes fases de maduración. Las DC no estimuladas no expresan marcadores de maduración, como CD80 y CD83, pero expresan marcadores inmaduros, como CCR3. Las DC semimaduras, sin carga presentan una combinación de marcadores inmaduros, como CCR3, así como de CD80 bajo, y de marcadores maduros, como el CD83. Las DC completamente maduras, cargadas de ARNm de Survivina sólo presentaban marcadores maduros, como CD80 y CD83, pero no marcadores inmaduros, como CCR3 (Fig. 2).

- 45 Para determinar si el presente protocolo permite no sólo la maduración fenotípica, sino también funcional de las DC, se analizó la secreción de IL-10 e IL-12 en el sobrenadante. Se sabe que IL-12 incrementa la habilidad del sistema inmune de matar células tumorales y puede interferir con el flujo de sangre hacia el tumor. IL-12 mejora la eliminación del tumor mediante la estimulación de la activación de la células T citotóxicas. Por otro lado, se ha demostrado que la IL-10 tienen un efecto inhibitorio significativo en varios aspectos de la función de DC; tales como la expresión de moléculas coestimuladoras y la capacidad de sintetizar la IL-12. Es importante destacar que las DC tratadas con IL-10 se vuelven en tolerogénicas. Normalmente, las iDC no producen ni IL-10 (o muy poca), ni IL-12, mientras que las DC secretan altos niveles de IL-12 y niveles muy bajos o nulos de IL-10.

- 50 Como era de esperar, las iDC no producen IL-12 y sólo una mínima cantidad de IL-10, mientras que las DC semimaduras, sin carga, las DC maduras cargadas de ARNm de Survivina, y las DC maduras cargadas con ARNm de Survivina + proteína, cultivadas siguiendo nuestro protocolo producen niveles altos de IL-12 y niveles muy bajos de IL-10 (Fig. 3).

Para demostrar aún más que las DC según la presente invención son activos funcionales, se evalúan sus efectos sobre la proliferación heteróloga de células T mediante una reacción de mezcla de leucocitos.

5 La incubación de DC semimaduras, sin carga, y de DC maduras, cargadas con ARNm/Survivina + proteína incrementa la proliferación de células T, mostrando que las DC cultivadas como se describe en el presente ejemplo presentan un efecto positivo alto en al menos uno de los principales agentes del sistema inmune (células T), mostrando un beneficio potencial en la eliminación del tumor. Como era de esperar, la incubación de iDC con células T no aumentó su tasa de proliferación (fig. 4).

10 Las iDC se caracterizan por una fuerte potencialidad de migración, que no es inducible por la adición de CCL19 debido a la falta de expresión de CXCR4/CCR7 en iDC. Las DC semimaduras, por el contrario, responden a la inducción de CCL19 pero todavía mantienen la capacidad de migración espontánea, aunque en menor medida, si se comparan con iDC. Las DC maduras, cargadas (casi) completamente pierden la capacidad de migrar de forma espontánea pero migran tras inducción de CCL19 (fig. 5). Esto significa que las DC sin carga semimaduras, así como las DC maduras cargadas con ARNm de Survivina + proteínas son capaces de moverse desde el lugar de la inyección hacia la fuente del estímulo (es decir, el sitio del tumor) y por lo tanto no necesitan ser inyectadas directamente entre los nódulos, sino que pueden ser inyectadas también en los alrededores del tumor. Este hecho hace más fácil el uso de la vacuna de DC, ya que no requiere herramientas específicas, tales como un dispositivo de ultrasonido, para determinar exactamente la posición de los nódulos linfáticos.

Por último, se investigó si las DC cultivadas como se describe en el protocolo eran todavía capaces de fagocitar activamente de manera espontánea o en respuesta a CCL19.

20 Las iDC se caracterizan por una fuerte capacidad fagocítica, que no es inducible por CCL19, debido a la falta de expresión de CXCR4/CCR7 en iDCs. Las DC semimaduras y las DC cargadas con ARNm de Survivina, por el contrario, responden a la inducción de CCL19 pero todavía mantienen la capacidad de fagocitosis espontánea, aunque en menor medida si se comparan con iDC. Las DC Maduras cargadas con ARNm de Survivina y proteínas pierden completamente la capacidad de fagocitar tanto de forma espontánea y como por inducción de CCL19.

25 Esto significa que las DC no cargadas semimaduras, así como las DC cargadas con ARNm, preparadas siguiendo el protocolo de la presente invención están listas para fagocitar el antígeno tumoral, mostrando un fenotipo muy activo que puede aumentar fuertemente la respuesta inmune directa frente al tumor, mientras que las DC con carga doble (ARNm + proteína) y las DC completamente maduras están preparadas para inducir la proliferación de las células T y la activación pero pierden su capacidad de fagocitar además el tejido tumoral, aumentando la especificidad de la respuesta inmune hacia el antígeno ya captado (fig. 6).

Finalmente, las DC con carga doble, con ARNm y proteína, se muestran capaces de inducir una respuesta citotóxica y de memoria elevada sin provocar la activación de la respuesta T-Reg, tras la incubación *in vitro* con linfocitos alogénicos (fig. 7).

2. Prueba del principio

35 Todos los resultados mostrados en esta sección se realizaron a partir de DC cultivadas a partir de monocitos congelados derivados de elutriaciones de controles sanos. Se compararon los lotes siguientes :

40 - **Lote 1:** los monocitos se transdiferenciaron durante 5 días en DC inmaduras (iDC), cargadas con ARNm de TERT, maduraron y se cargaron finalmente con Survivina. Las células no se congelaron, sino que fueron analizadas en momentos puntuales inmediatamente después de recolectarlas y después de volverlas a cultivar 24 horas : 0h (recolección), 4h y 24h;

- **Lote 2:** los monocitos se transdiferenciaron durante 5 días en DC inmaduras (iDC), cargadas con ARNm de TERT, maduras y cargadas con Survivina al mismo tiempo. Las células fueron congeladas en DMSO y se analizaron en la recolección, después de descongelarse y tras volverse a cultivar 4 y 24h;

45 - **Lote 3:** los monocitos se transdiferenciaron durante 6 días en DC inmaduras (iDC), cargadas con ARNm de TERT, maduraron y se cargaron finalmente con Survivina. Las células fueron congeladas en DMSO y se analizaron después de descongelarse y tras volverse a cultivar 12 y 24 horas.

La viabilidad de los monocitos, al descongelarse, siempre fue $\geq 70\%$. Durante la prueba del principio, se compararon los diferentes métodos de carga:

50 - **Lote 1:** 2h de incubación con 50 ng / ml de ARNm-TERT, seguidas de 16h de maduración y 2h de incubación posterior con 10 $\mu\text{g/ml}$ de péptido de Survivina;

- **Lote 2:** 2h de incubación con 50 ng/ml de ARNm-TERT, seguidas de 16h de incubación con 10 $\mu\text{g/ml}$ de péptido de Survivina y combinado de maduración, administrados al mismo tiempo;

- **Lote 3:** 2h incubación con 50 ng/ml de ARNm-TERT, seguidas de 16h de maduración y 2h de incubación posterior con 10 $\mu\text{g/ml}$ de péptido de Survivina.

Tras 5 días de cultivo en CellGro al que se añade GM-CSF e IL-4, más del 50% de la cantidad inicial de monocitos se convirtió en DC inmaduras, la mitad de ellas presentando un fenotipo adherente. Por el contrario, si las células se cultivaban durante 6 días, sólo el 10% de las células eran adherentes.

5 Después de 2 h de incubación en presencia de ARNm-TERT al menos el 70% de las células se convirtió en adherentes. Cuando el péptido de Survivina se administra con el combinado de maduración, las células formaron agregados adecuados, mientras que si el péptido de Survivina se administra después del combinado de maduración, las células tienden a mostrar dendritas más largas y evitar la formación de agregados compactos. Después de completarse la carga (en cualquier forma) y la maduración, más del 95% de las células eran adherentes. En el caso de que las células se cultivaran en presencia de GM-CSF e IL-4 durante 6 días en lugar de 5, las células adherentes constituían aproximadamente el 50% de la cantidad total.

10 En el momento de recolectarlas, la viabilidad celular era comparable entre los 3 lotes, mostrando que el tiempo de diferenciación, el método de carga y el programa de maduración no afectaba a este parámetro, que se mantuvo siempre por encima del límite del 70% (Nicolette et al., 2007).

15 Después del ciclo de congelación/descongelación, la viabilidad celular era comparable entre los 2 lotes analizados y sólo disminuyó ligeramente en el caso de que se comparasen los resultados obtenidos en el momento de la recolección. Una vez más, el método de carga y el programa de maduración no afectaron a la viabilidad, que se mantuvo siempre por encima del límite del 70%:

20 La viabilidad de los lotes cultivados con las diferentes variaciones del protocolo principal es comparable tras la recolección y tras la descongelación.

Lote	Referencia en %	En la recolección	Al descongelar
01	≥ 70	80,2	n.a.
02	≥ 70	84,4	77,7
03	≥ 70	78,8	78,4

25 Los antígenos de carga TERT y Survivina no fueron nunca detectables en la superficie celular después de la recolección o después de descongelación por FACS. Después de volverse a cultivar, la expresión en superficie de los dos antígenos se incrementó entre 4 y 12h. Entre 12 y 24h. se mantuvo estable. Si las células se estimulan con CD40L, después volverse a cultivar durante 4h, la expresión en superficie de los 2 marcadores aumenta en comparación con la detectada en las células cultivadas en medio normal. No obstante, después de 12 horas, cuando la expresión de los antígenos 2 alcanzó su nivel máximo, los efectos de CD40L se hicieron indetectables:

a) Detección de los antígenos de carga (TERT y Survivina) entre la recolección y el cultivo posterior durante 24 horas en un medio normal;

TERT y la expresión de Survivina en la superficie celular en %: medio normal					
Lote	En la recolección	Al descongelar	Tras 4h del recultivo	Tras 12h del recultivo	Tras 24h del recultivo
01	n.d.	n.a.	30,2	n.a.	82,5
02	n.d.	n.d.	27,6	n.a.	96
03	n.d.	n.d.	n.a.	90,8	91,5

30 b) Detección de los antígenos de carga (TERT y Survivina) entre la recolección y el cultivo posterior durante 24 horas en presencia de estimulación con CD40L.

TERT y la expresión de Survivina en la superficie celular en %: en presencia de estimulación CD40L					
Lote	En la recolección	Al descongelar	Tras 4h del recultivo	Tras 12h del recultivo	Tras 24h del recultivo
01	n.d.	n.a.	47,4	n.a.	84,9
02	n.d.	n.d.	35,2	n.a.	95,2
03	n.d.	n.d.	n.a.	91,4	89,7

5 Estos resultados mostraron que las DC cultivadas según las diferentes variaciones del método descrito en esta patente son capaces de responder a estímulos fisiológicos, tales como CD40L mediante el aumento de su tasa de expresión en la superficie de los antígenos cargados, incrementando por lo tanto su capacidad de inducir una respuesta inmune impulsada por las células T contra las células que expresan los antígenos mencionados.

10 En la recolección, ambos lotes 1 y 2 mostraron un fenotipo maduro, de acuerdo con la expresión de los marcadores estándar para DC funcionales, es decir, alta expresión de CD40, CD80, CD83, HLA-ABC y HLA-DR, aparejado a una expresión de CD14 baja o ninguna (CD inmaduras), así como de CD3 (células T) y de CD19 (células B), que se utiliza para determinar los niveles de contaminación potencial de linfocitos. En consecuencia, los diferentes métodos de carga y los programas de maduración no afectaron al fenotipo del producto final, que parecía cumplir con los estándares descritos en la bibliografía (Nicolette et al., 2007).

Los resultados obtenidos después de un ciclo de congelación/descongelación mostraron que el producto final se mantuvo estable según el fenotipo (ver la comparación entre fenotipo en la recolección y en la descongelación para el lote 2:

15 a) Detección del fenotipo de DC del lote 1 entre la recolección y el cultivo posterior después de 24 horas en un medio normal

Lote 01					
Marcador	En la recolección	Al descongelar	Tras 4h del recultivo	Tras 12h del recultivo	Tras 24h del recultivo
CD80	76,2	n.a.	86,9	n.a.	99,6
CD83	73,7	n.a.	74,1	n.a.	94,6
HLA-ABC	89,5	n.a.	99,1	n.a.	99,9
HLA-DR	90	n.a.	98	n.a.	99
CD40	88,6	n.a.	66	n.a.	98,7
CD14	9,9	n.a.	10,4	n.a.	0,4
CD19	1,5	n.a.	0,1	n.a.	0,6
CD3	0,7	n.a.	0,2	n.a.	0,1

b) Detección del fenotipo de DC del Lote 2, entre la recolección y el cultivo posterior después de 24 horas en presencia de estimulación de CD40L

20

Lote 02					
Marcador	En la recolección	Al descongelar	Tras 4h del recultivo	Tras 12h del recultivo	Tras 24h del recultivo
CD80	72,4	98,7	88,4	n.a.	99,3
CD83	81,8	81,8	64,4	n.a.	85,7
HLA-ABC	90,5	99,4	99,3	n.a.	100
HLA-DR	91,2	97,7	54,7	n.a.	99,9
CD40	87,7	92	67,2	n.a.	98,9
CD14	8	4,8	2,7	n.a.	0,7
CD19	2,5	1	0,2	n.a.	0,7
CD3	1,8	0,4	0,2	n.a.	0,5

c) Detección del fenotipo de DC del Lote 3, entre la recolección y el cultivo posterior después de 24 horas en presencia de estimulación de CD40L

Lote 03					
Marcador	En la recolección	Al descongelar	Tras 4h del recultivo	Tras 12h del recultivo	Tras 24h del recultivo
CD80	n.a.	34,2	n.a.	56,1	49,3
CD83	n.a.	29,3	n.a.	59,7	44,6
HLA-ABC	n.a.	97,2	n.a.	98,8	95,8
HLA-DR	n.a.	57,1	n.a.	64,4	53,1
CD40	n.a.	32,3	n.a.	98,2	46,5
CD14	n.a.	18,3	n.a.	8,3	13,3
CD19	n.a.	6,2	n.a.	7,3	5,4
CD3	n.a.	39,7	n.a.	38,9	45,3

5 Curiosamente, si las células se transdiferenciaran durante 6 días en lugar de durante 5, su fenotipo se relacionaría con un fenotipo no funcional, es decir la superficie de expresión de CD40, CD80 y CD83 disminuiría a un tercio de los niveles normales, mientras que la de HLA-DR a aproximadamente la mitad. Después de volver a cultivar durante 24h, el fenotipo de las células diferenciadas durante 5 días se mantuvo en general estable, mientras que cuando fueron diferenciadas durante 6 días, se incrementaron ligeramente los niveles de los marcadores fenotípicos maduros (Fig. 10), aunque no pudieron llegar a sus niveles normales. Los resultados cuestionan que más de 5 días de diferenciación, al menos en DC cultivadas según el método descrito por esta patente, pueden inducir un fenotipo no funcional, que tenga como resultado una menor actividad de las DC (expresión de CD83 reducida) y una capacidad reducida para acoplarse a las células T (expresión de CD80 reducida), acompañados por la presentación menos eficaz de las células T CD4⁺ (reducción de expresión de HLA-DR. Estas características se acompañan de alteración de la morfología, es decir pérdida de la adhesión celular, compatible con DC menos funcionales y fenotípicamente menos maduras. La utilización de las variaciones del mismo método descritas en esta patente no afectan a la maduración fenotípica de las DC, proporcionando las DC maduras tanto morfológica y fenotípicamente del estado de la técnica.

20 Después de cultivarse nuevamente, la producción de IL-10 e IL 12-aumenta, Curiosamente, sólo la secreción de IL-12 parece estar afectada positivamente por CD40L, mientras que la secreción de IL-10 es independiente de este tipo de estimulación. La secreción de IL-12 es siempre por lo menos el doble de la de IL-10. Según la publicación de

López et al., 2005, tal patrón sería más eficaz si se comparase con la secreción única de IL-12 para activar el sistema inmune contra el cáncer, debido a su compatibilidad para activar las dos respuestas citotóxicas (con la IL-12) y adaptativa (con la IL-10):

a) Análisis de la secreción de IL-10 al volver a cultivar durante 24h. en medio normal

5

IL-10: recultivo en un medio normal			
Lote	Tras 4h del recultivo	Tras 12h del recultivo	Tras 24h del recultivo
01	3,87	n.a.	130,17
02	11,58	n.a.	240,17
03	n.a.	n.d.	15,74

b) Análisis de la secreción de IL-10 al volver a cultivar durante 24h en presencia de estimulación con CD40L

IL-10: recultivo en un medio + CD40L			
Lote	Tras 4h del recultivo	Tras 12h del recultivo	Tras 24h del recultivo
01	3,34	n.a.	97,27
02	13,41	n.a.	143,33
03	n.a.	n.d.	3,61

c) Análisis de la secreción de IL-12 al volver a cultivar durante 24h en medio normal

IL-12: recultivo en un medio normal			
Lote	Tras 4h del recultivo	Tras 12h del recultivo	Tras 24h del recultivo
01	268,47	n.a.	433,37
02	503,94	n.a.	826,81
03	n.a.	n.d.	17,77

10

d) Análisis de la secreción de IL-12 al volver a cultivar durante 24h en presencia de estimulación con CD40L

IL-12: recultivo en un medio + CD40L			
Lote	Tras 4h del recultivo	Tras 12h del recultivo	Tras 24h del recultivo
01	347,06	n.a.	658,51
02	574,75	n.a.	865,89
03	n.a.	n.d.	10,18

Por el contrario, las células diferenciadas durante 6 días fueron incapaces de secretar ni IL-10 ni IL-12, lo que confirma el patrón de maduración ya observado con respecto a morfología y fenotipo.

Conclusiones

5 El método descrito en los ejemplos se puede aplicar con diferentes variaciones, según el objetivo principal. Por ejemplo, cuando es importante obtener una preparación grado clínico, como se requiere para el uso de las DC como herramientas terapéuticas, el antígeno de la proteína es probable que este constituido por un péptido, debido al hecho de que los costes y la disponibilidad de un péptido conforme a GMP es más favorable que el de la proteína GMP correspondiente. Cada péptido, de acuerdo con su longitud y su inmunogenicidad puede ser administrado en una secuencia diferente teniendo en cuenta la administración acoplada al antígeno de ARNm y al combinado de maduración. Aunque, en general, la carga del antígeno de ARNm en combinación con un antígeno de proteína puede realizarse ya sea en DC cultivadas durante 5 o 6 días, el uso específico simultaneo de ARNm-TERT y Survivina produce los mejores resultados con DC diferenciadas de 5 días.

10 Los experimentos realizados hasta ahora muestran que el uso del antígeno específico puede requerir ajustes/variaciones menores del protocolo para obtener los mejores resultados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células dendríticas cargadas con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína antigénica asociada a tumor o fragmento de la misma y al menos una proteína antigénica asociada a tumor o fragmento de la misma, donde la molécula de ácido nucleico codifica la Transcriptasa Inversa Telomerasa (TERT) y la proteína antigénica asociada a tumor es Survivina y donde dichos fragmentos tienen al menos 10 restos de aminoácidos contiguos de dicha proteína antigénica asociada a tumor.
2. Célula según la reivindicación 1, caracterizada porque la molécula de ácido nucleico es un ácido ribonucleico, preferiblemente ARNm, y/o un ácido desoxirribonucleico.
3. Célula según la reivindicación 1, caracterizada porque la proteína antigénica es un péptido de Survivina.
- 10 4. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque las células dendríticas son de origen humano o animal.
5. Célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque las células dendríticas están maduras.
- 15 6. Método de preparación de células dendríticas *ex vivo* tal y como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde se han proporcionado células dendríticas, que comprende las etapas:
- 20 -Cargar dichas células con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno o un fragmento del mismo asociado a tumor y al menos una molécula de proteína que es un antígeno o un fragmento del mismo asociado a tumor, donde la molécula de ácido nucleico es Transcriptasa Inversa Telomerasa y la proteína antigénica es Survivina y donde tales fragmentos tienen al menos 10 restos de aminoácidos contiguos de dicha proteína asociada a tumor.
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque las células dendríticas han sido proporcionadas por transdiferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras.
8. Método según la reivindicación 7, caracterizado porque las células dendríticas inmaduras maduran al cargar o después de la carga así como durante la carga del antígeno de proteína.
- 25 9. Preparación farmacéutica que comprende células dendríticas tal y como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
10. Preparación según la reivindicación 9, caracterizada porque la preparación comprende además al menos un excipiente farmacéutico, al menos un agente estimulante de la inmunidad, al menos un coadyuvante.
- 30 11. Células dendríticas tal y como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su utilización como vacuna para el tratamiento o prevención de cáncer en los individuos.

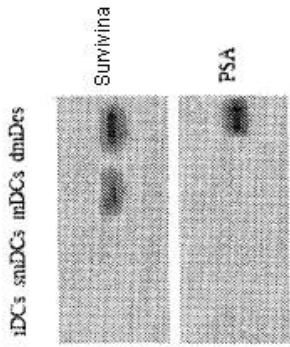


Figura 1

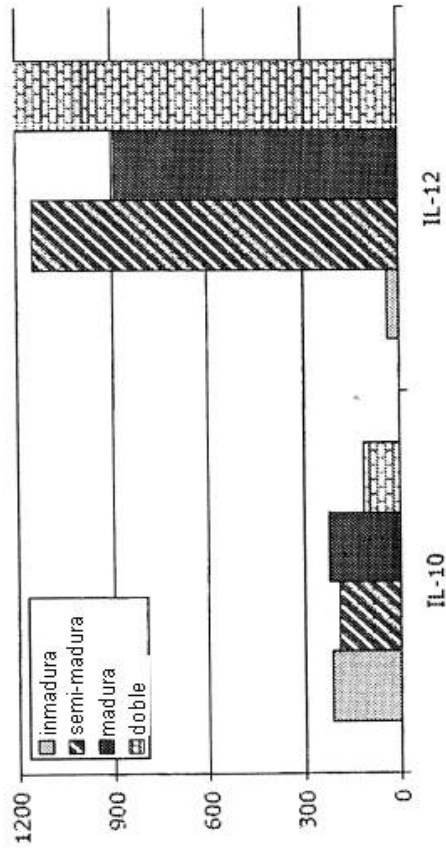


Figura 3

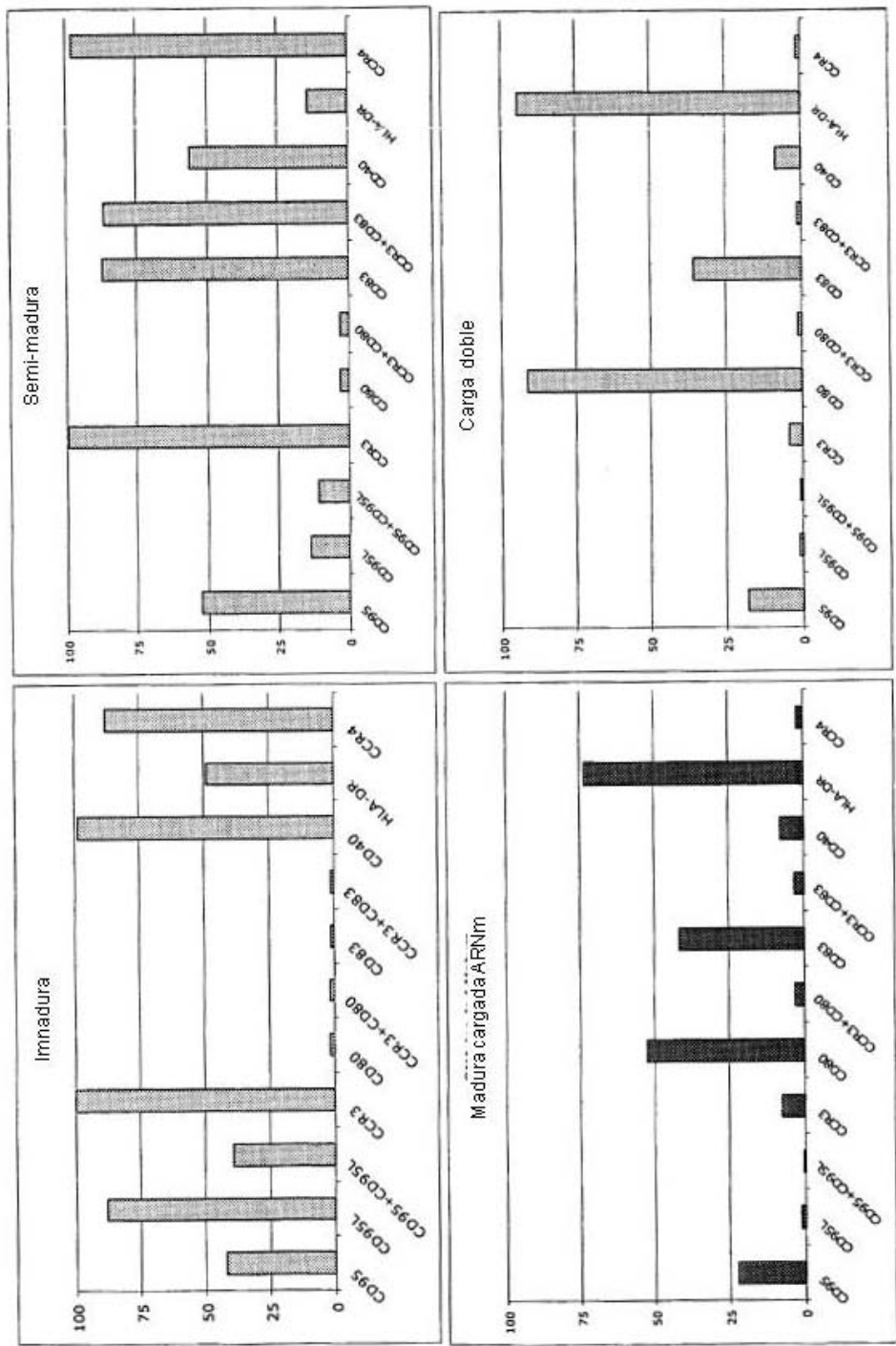


Figura 2

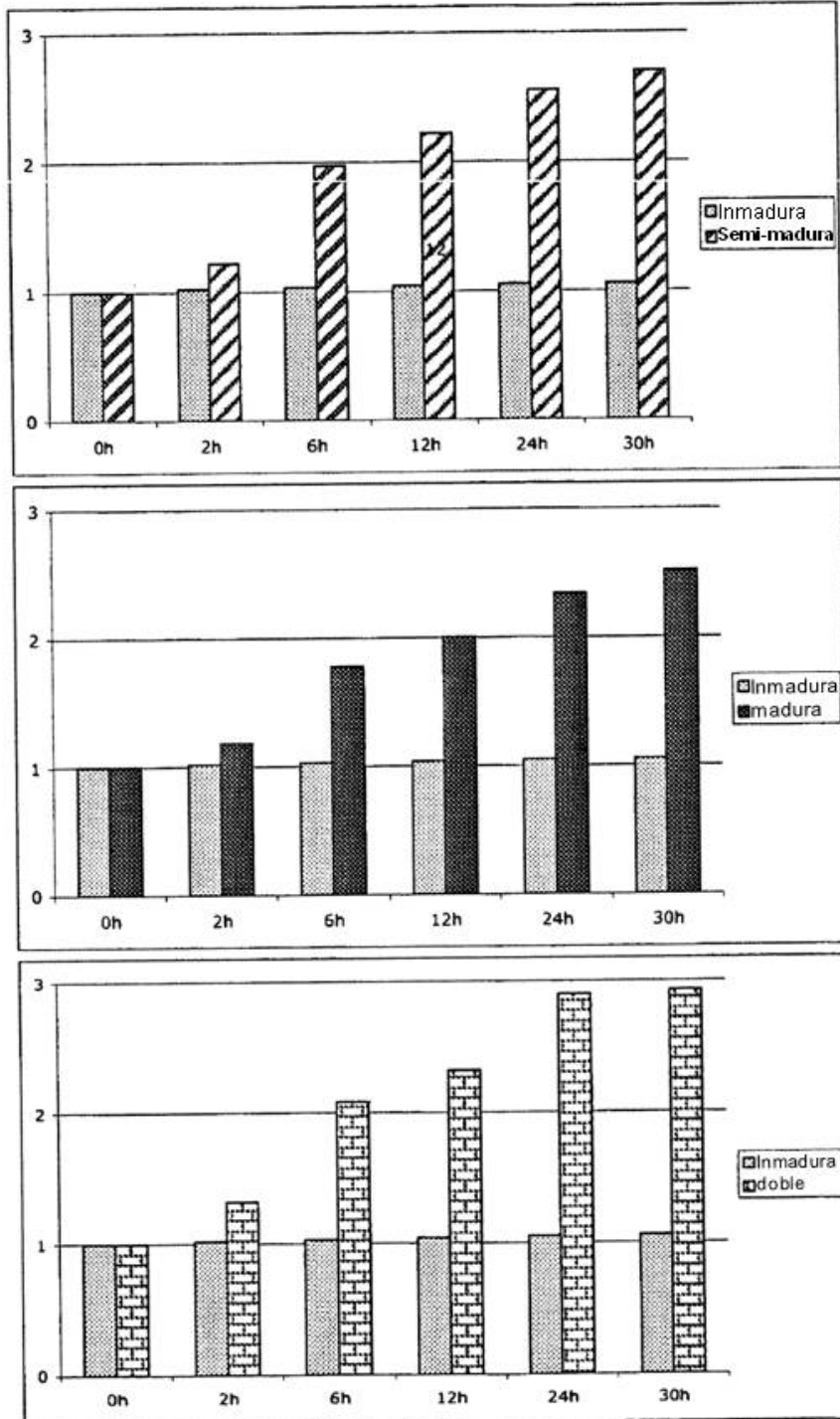


Figura 4

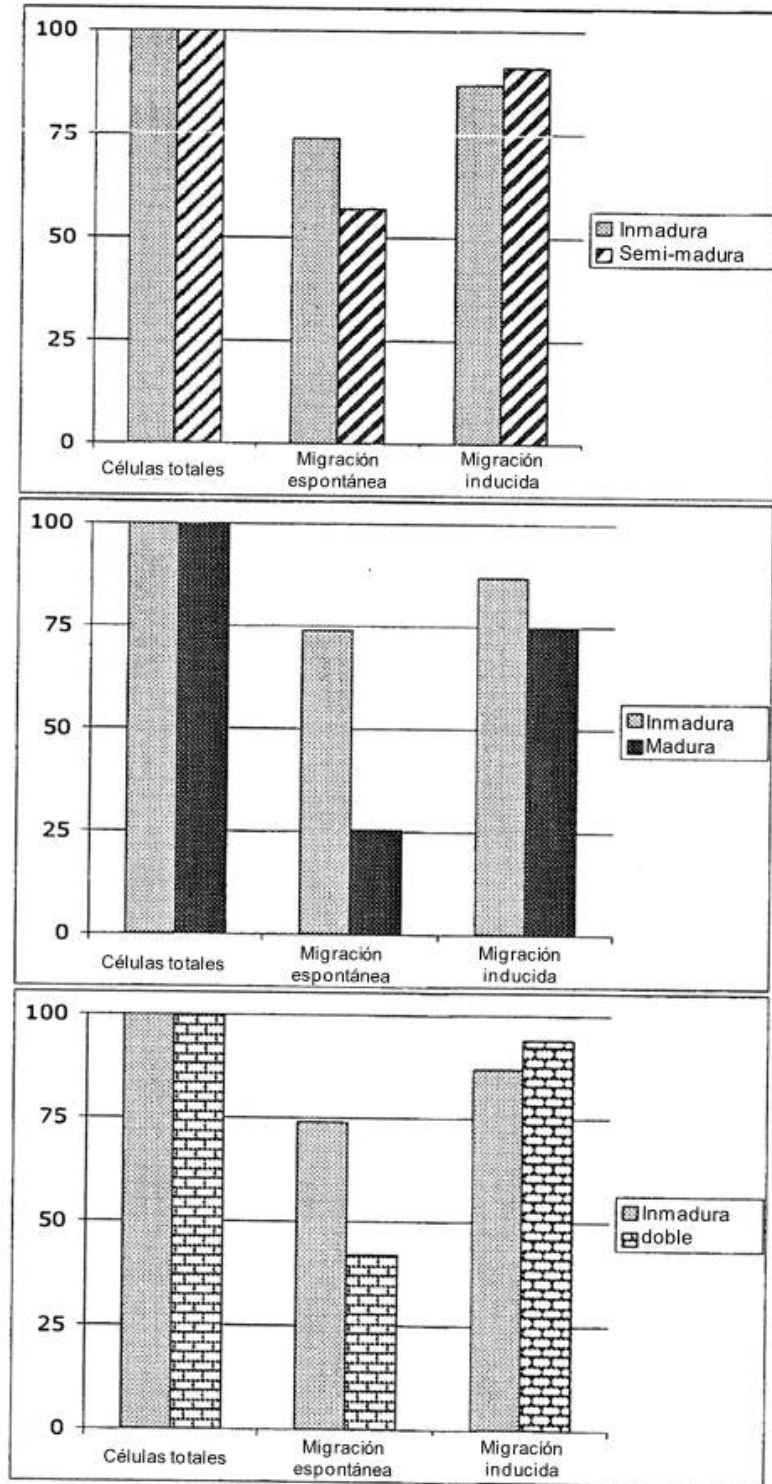


Figura 5

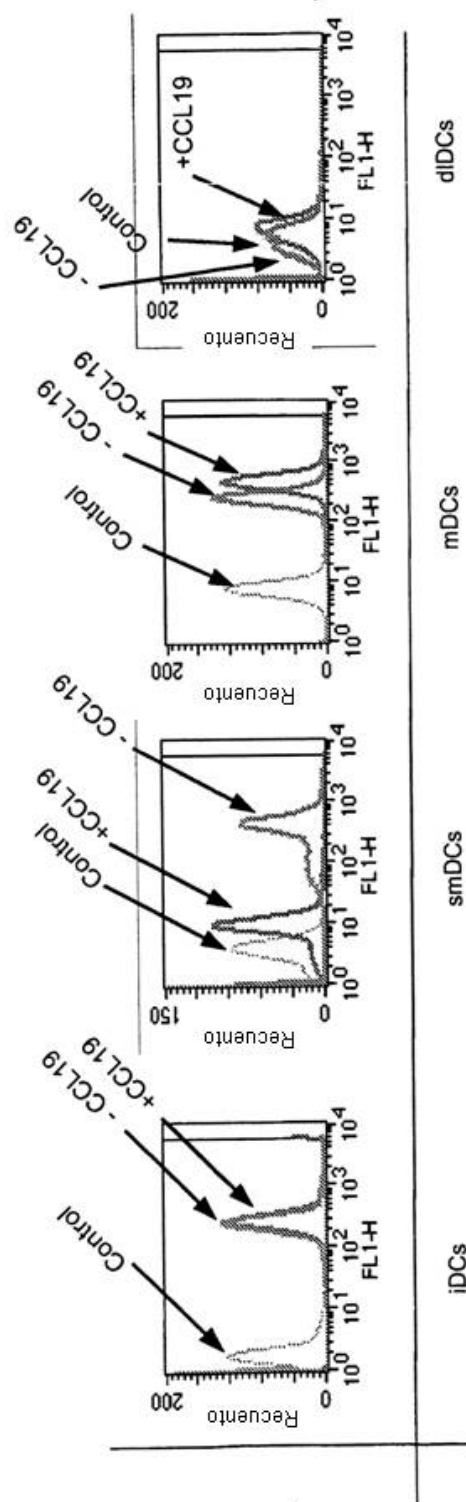


Figura 6

	Células T sin estimular			Células T estimuladas dIDCs		
	T-reg	T-citotóxica	T-mem	T-reg	T-citotóxica	T-mem
CD3	76.7	76.8	68.2	77.3	76.2	74.2
CD127	75.3	45.3	43.1	82.7	86.2	66.2
CD62L	72.4	2.1	1.8	96.2	95.8	35.8
CCR7	48.9	53.2	49.8	91.9	82.5	52.5
CD95	78.8	75.1	83.2	89.4	88.7	68.6
CD38	82.1	62.1	73.8	77.5	90.1	60.8
CD134	21.9	23.8	19.3	36	89.8	13.8
CD4	88.9	32.6	72.9	51.4	41.5	51.2
CD38+CD4	52.8	14.1	50.7	13.4	14.6	14.2
CD152	72.9	3.1	2.5	2	2.2	2.8
CD5	94.7	2.5	94.3	92.4	87.5	93.9
IL-2+CD5	51.5	1.5	1.3	0.8	0.4	1.3
CD38+CD5	32.2	8.2	5.1	5.9	11.4	28.7
CD134+CD122	72.1	1.4	1.3	0.9	1.2	1.4
CD122	65.1	3.8	3.1	3.1	3.5	4.2
CD4+CD5	46.6	6.9	5.9	50.7	32.6	51
IL-4	82	1.5	0.9	1.1	0.8	1.5
CD25	92.4	2.1	1.7	2.3	0.6	2.5
IL-4+CD25	31.1	0.8	0.6	0.7	1.1	0.9
CD38+CD25	51.9	1.6	1.2	2.1	2.9	2.3
CD4+CD25	72.2	2	1.5	1.7	1.8	1.9
CD38+IL-4	71.5	1.1	0.7	0.9	0.4	1.1
CD4+IL-4	31.7	1.3	0.8	1	0.5	1.3
CD127+CD62L	22	1.8	1.5	5.6	0.2	5.2
CD38+CD62L	41.2	1	0.7	2.1	2.7	2.3
CD4+CD62L	23	1.4	1.2	3.7	2.1	3.4
CD4+CD127	51.4	1.6	0.2	30.9	10.4	33.5
CD38+CD127	29.9	8.3	7.1	7.1	1.1	8.9
CD45RO	91.7	1.1	90	11.1	3.7	90.7
CD45RO+CD95	18.1	15.2	2.3	18.8	1.9	18.2
CD4+CD95	34.9	12.9	0.6	14.2	1.3	14.1
CD38+CD95	48.9	7	6.3	9	1.2	9.6
CD4+CD45RO	44.7	5.6	3.1	27.8	1.1	48.4
CD45RO+CD38	31.9	5.6	4.9	26.6	0.8	28.6
CD8	21.8	71.3	36.7	22.2	67	26
CD8+CD134	5.8	32.8	2.6	11.4	2.7	2.7
CD28	22.9	24.5	15	24.1	23.4	23.4
CCR7+CD28	1.6	21.8	1	11.4	1.8	1.8
CD8+CD28	5.4	10.5	3.1	15	5.5	5.5
CCR7+CD4	2.1	2	43.2	1.7	22.2	12.2

Figura 7