

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 870**

51 Int. Cl.:
C12N 5/07 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03794972 .4**
96 Fecha de presentación: **29.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1537203**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.06.2005**

54 Título: **Utilización de células dendríticas (CD) que expresan interleucina 12 (IL-12)**

30 Prioridad:
13.09.2002 AT 13752002

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2012

73 Titular/es:
**FORSCHUNGSINSTITUT FUR KREBSKRANKE
KINDER
KINDERSPITALGASSE 6
1090 WIEN, AT**

72 Inventor/es:
FELZMANN, Thomas

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 381 870 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

Utilización de células dendríticas (CD) que expresan interleucina 12 (IL-12).

5 La presente invención se refiere a la utilización de células dendríticas (CD) que expresan interleucina 12 (IL-12).

Aunque se ha producido un progreso considerable en el desarrollo de técnicas de identificación de antígenos asociados a tumores, a menudo los métodos tradicionales para la administración de dichos antígenos son toscos e inadecuados. Muchos adyuvantes en principio disponibles han sido descubiertos empíricamente y no se conoce bien su mecanismo de acción estimuladora del sistema inmunitario. Además, los estudios preclínicos han sugerido que muchos adyuvantes convencionales facilitan la generación de algún tipo de respuesta inmunitaria pero no desencadenan otras armas importantes del sistema inmunitario, como la actividad de los CTL. Particularmente, no se ha podido lograr ninguna generación de inmunidad citolítica antitumoral mediante tales adyuvantes.

15 Esto ha conducido a la aplicación de las CD como adyuvantes. En dichos experimentos, las CD cargadas *in vitro* con un antígeno asociado a tumor han provocado el rechazo del tumor en sistemas tumorales de ratón experimentales y ha aumentado la inmunidad antitumoral en los pacientes. Las CD capturan y procesan antígenos en la periferia, migran a los órganos linfoides, expresan moléculas coestimuladoras de linfocitos y segregan citocinas a fin de iniciar y guiar las respuestas inmunitarias.

20 El antígeno es presentado por las CD en moléculas CMH de clase I y clase II, que se unen a péptidos durante su maduración biosintética, proporcionando de este modo una representación continuamente actualizada de la composición proteínica intracelular y ambiental. Los receptores de linfocitos T presentes en los linfocitos T citotóxicos (CTL) reconocen péptidos antigénicos unidos a moléculas CMH de clase I, mientras que los complejos peptídicos de CMH de clase II son reconocidos por los linfocitos T cooperadores (HTL).

25 Algunos estímulos de maduración producen una polarización de HTL de tipo 1 caracterizada por la liberación de IL-12 [Cella, 1996], que posteriormente estimula el desarrollo de la inmunidad citolítica. Otros, por el contrario, no lo hacen y favorecen la polarización de HTL de tipo 2, que estimulan la inmunidad humoral. Los lipopolisacáridos (LPS) son estímulos de maduración clásicos que dan lugar a la secreción de IL-12 por parte de las CD [Hilkens, 1997].

30 Sin embargo, se ha demostrado [Langenkamp, 2000] que, tras la maduración con LPS, las CD producen IL-12 sólo temporalmente y resultan resistentes a una estimulación adicional. El agotamiento de la producción de citocinas afecta al proceso de polarización de los linfocitos T. Poco después de la estimulación, las CD estimulan fuertes respuestas de HTL de tipo 1, mientras que más tarde las mismas células estimulan preferentemente los HTL de tipo 2.

35 En el documento WO 01/39600 A1, se ha descrito el uso de Hsp27 como agente antiinflamatorio utilizado para la maduración de las CD. Sin embargo, dichas CD no están cargadas con un antígeno tumoral, sino que el contacto con el antígeno más bien tiene lugar únicamente después de que se haya producido la maduración. Por lo tanto, en dicho documento no puede tener lugar ninguna carga de antígeno antes de la maduración.

40 En el documento WO 01/09288 A1, las CD se preparan por ejemplo mediante la adición de TNF alfa en el medio de cultivo. Sin embargo, es conocido el hecho de que el TNF alfa no estimula la molécula heterodimérica completa de IL-12, sino únicamente una de las dos subunidades. Además, según el documento WO 01/09288 A1, el contacto con el antígeno se hace efectivo únicamente después de la maduración de las CD, de modo que las células descritas en dicho documento no se cargan en ningún caso contra un patógeno o un tumor específicos.

45 En el documento WO 02/34887 A2, se utilizan dos clases diferentes de adyuvantes de ácidos nucleicos, en concreto CpG por un lado y poli I:C por otro, para estimular las CD. Sin embargo, es conocido el hecho de que los poli I:C y los CpG pueden liberar IL-12 en CD humanas únicamente con una eficiencia muy baja. Además, en dicho documento no se describe ninguna "carga" específica de patógeno o de tumor de las CD junto con la liberación de IL-12.

50 En el documento WO 01/51077 A1 se describen métodos para la regulación de la producción de IL-12 por parte de agonistas y antagonistas de CCR5, aunque tampoco en este caso se utilizan CD específicamente "cargadas".

55 En Wang y otros (Zhonghua xue ye xue za zhi, 21(7), (2000), pág. 345-348) se describe que la proliferación de células CD(4)(+) tras el cultivo con CD debe ser un buen indicador como instrumento para verificar el progreso de una inmunoterapia. Se cargaron CD de PBMC con un antígeno tumoral de la línea celular XG-7, que a continuación podía estimular más células CD(4)(+) que CD. Sin embargo, dicho documento no describe la administración de ningún estímulo de maduración.

60 En Felzmann y otros (Cancer Lett. 168 (2001), 145-154) se dan a conocer unos métodos para la maduración de las CD mediante exposición a CD40L o LPS. En Rieser y otros (Urol. Int. 63 (1999), 151-159) se describen CD maduras y la inducción de respuestas inmunitarias en pacientes con carcinoma de células renales metastásico. En Felzmann

y otros (Cancer Lett. 161 (2000), 241-250) se describe la carga de toxoide tetánico en líneas celulares linfoblastoides. En Banchereau y otros (Nature 392 (1998), 245-252) se repasan las CD y el control de la inmunidad. En Gitlitz y otros (Curr. Urol. Rep. 2 (2001), 46-52) se describe una inmunoterapia del carcinoma de células renales basada en CD. En Hilkens y otros (Blood 90 (1997), 1920-1926) se da a conocer que las CD requieren factores inductores de IL-12 exógenos para dirigirse al fenotipo Th1.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención consiste en dar a conocer unos medios mejorados para el tratamiento de infecciones víricas y tumores utilizando CD.

Así, la presente invención da a conocer células dendríticas activas (CD) liberadoras de interleucina 12 (IL-12) que se cargan con un antígeno contra un tumor específico para su utilización en el tratamiento de un paciente que padece dicho tumor específico, caracterizándose dichas CD porque se cargan con el antígeno contra el tumor específico y a continuación se tratan con lipopolisacárido (LPS) e interferón gamma (IFN- γ) a fin de obtener CD específicas del tumor liberadoras de IL-12.

Aunque es conocido que es posible inducir la liberación de IL-12 en las CD, este concepto no se consideró adecuado ni necesario para el tratamiento de pacientes con tumores o para el tratamiento de pacientes que padecen infecciones víricas graves. Esto fue debido principalmente a que la liberación de IL-12 de las CD es temporal y, por consiguiente, adecuada para inducir una respuesta inmunitaria celular suficiente contra el tumor o el patógeno únicamente durante un intervalo de tiempo limitado. Sorprendentemente, mediante la presente invención se ha podido poner de manifiesto que la aplicación de este concepto, que consiste en desencadenar la secreción de grandes cantidades de IL-12 por parte de CD, por ejemplo mediante exposición a una combinación de LPS e IFN- γ en medio de cultivo sin suero de ternera fetal, da lugar a una estabilización de la enfermedad durante un período prolongado sin efectos secundarios tóxicos notables. Sin embargo, es importante administrar las CD según la presente invención en un estado en el que la liberación de IL-12 siga teniendo lugar, es decir inmediatamente después de la preparación de las CD liberadoras de IL-12 específicas del tumor o el patógeno o, por lo menos, al cabo de entre 1 y 10 horas, particularmente al cabo de entre 2 y 6 horas, idealmente al cabo de aproximadamente 2 horas de haber terminado la preparación. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método para la administración de las CD según la presente invención en una cantidad eficaz a un paciente que padece un tumor o a un paciente infectado con el patógeno específico.

Efectivamente, el tratamiento dado a conocer con la presente invención es bien tolerado. Por consiguiente, la presente invención ha podido demostrar que dichas CD activas, a diferencia de las CD agotadas que ya no producen IL-12, son capaces de inducir inmunidad citolítica en un modelo humano *in vitro* y rechazo del tumor en un modelo tumoral de ratón. En el apartado de ejemplos de la presente solicitud se muestran unos primeros resultados preliminares de un ensayo clínico de fase I de la presente invención que demuestran la viabilidad y falta de toxicidad de un agente terapéutico inmunitario de TIAT (inmunoterapia antitumoral) con CD secretoras de IL-12 para el tratamiento del cáncer.

Otro método para desencadenar la liberación de IL-12 por parte de las CD consiste en la administración de una señal mediada por la interacción de las moléculas CD40 de la superficie de las CD con su ligando CD40L. La combinación de LPS e IFN- γ pone de manifiesto la mejor estimulación de la IL-12 en el presente contexto terapéutico para el ensayo de fase I según la presente invención.

La utilización o el método según la presente invención también resultan preferidos para los pacientes que han sido sometidos a un trasplante de médula ósea y que padecen una infección vírica resultante de la consiguiente deficiencia inmunitaria en el transcurso de dicho trasplante antes del tratamiento con las CD según la presente invención.

La presente invención se puede utilizar en una amplia variedad de tumores. Preferentemente, el tumor específico a tratar con las CD según la presente invención es un tumor maligno sólido avanzado. En principio, cualquier tumor en cualquier estadio puede ser el objetivo de una respuesta citolítica inmunitaria inducida con las CD según la presente invención.

La presente invención se lleva a cabo preferentemente utilizando CD autólogas. Por consiguiente, resulta preferido utilizar CD o células precursoras de CD extraídas del paciente que padece una infección por dicho patógeno específico o del paciente que presenta dicho tumor específico o, en el contexto de un trasplante de médula ósea, extraídas de la médula ósea del donante. Estas CD autólogas dan lugar a las menores reacciones adversas, ya que el sistema inmunitario del paciente las reconoce como "propias".

La carga de las CD se puede llevar a cabo con cualquier antígeno o mezcla de antígenos específicos para el tumor, por ejemplo con polipéptidos aislados o producidos químicamente o por recombinación. Preferentemente, sin embargo, las CD se cargan con un antígeno procedente de un lisado de células tumorales del paciente que padece dicho tumor específico. Dichas preparaciones tumorales autólogas han mostrado éxitos significativos en los ensayos clínicos según la presente invención.

Para un seguimiento y un control adecuados de la administración de las CD y de la respuesta inmunitaria del paciente a las mismas, resulta preferido cargar adicionalmente las CD con un antígeno trazador, particularmente hemocianina de lapa californiana (KLH). En principio, cualquier neoantígeno, es decir, un antígeno al que el sistema inmunitario humano no se ha enfrentado nunca, es adecuado como antígeno trazador.

5 Con el fin de mejorar aún más la respuesta inmunitaria según la presente invención, puede resultar preferido cargar adicionalmente las CD con un adyuvante, particularmente toxoide tetánico. En principio, cualquier antígeno de recuerdo, es decir, un antígeno contra el cual se espera una fuerte respuesta inmunitaria debido a las vacunas sistemáticas anteriores, es adecuado como antígeno adyuvante.

10 La fuente de CD no es crítica. Dado que la preparación de CD a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) es una técnica estándar, también resulta preferido generar las CD para su utilización según la presente invención a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), particularmente PBMC del paciente al que, tras la carga, se transferirán dichas CD.

15 Las células activadas según la presente invención son CD liberadoras de interleucina 12 (IL-12) que se cargan con un antígeno contra un tumor específico.

20 Las CD activadas según la presente invención se pueden cargar preferentemente con un antígeno de una célula tumoral. Dicho antígeno se puede generar mediante la lisis de células tumorales o tejido tumoral; el antígeno tumoral se puede generar en cualquier sistema de expresión recombinante, o pequeños péptidos derivados del antígeno tumoral se pueden generar por síntesis química.

25 Según una forma de realización preferente, las CD activadas según la presente invención se cargan adicionalmente con un antígeno trazador.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y figuras, aunque sin limitarse a los mismos.

30 Figura 1: Fenotipo inmunitario de CD inmaduras y maduras. Se representa un fenotipo inmunitario típico de las CD antes (histogramas vacíos) y después (histogramas rellenos) de la exposición a un estímulo de maduración de LPS/IFN- γ .

35 Figura 2: Reacción leucocitaria mixta. Las CD se maduraron con LPS/IFN- γ y se utilizaron para desencadenar la proliferación en linfocitos alogénicos. Como control positivo se utilizaron los superantígenos SEA y SEB. Se indica el valor promedio \pm EEM de 18 experimentos independientes.

40 Figura 3: Producción del heterodímero IL-12 p70 por parte de las CD. Se maduraron cultivos de CD con LPS/IFN- γ y se determinó la secreción de IL-12 al cabo de 24 horas. Se indican los datos individuales (izquierda) y el valor promedio \pm EEM (derecha) de 23 experimentos independientes.

45 Figura 4: Expansión específica de antígeno de linfocitos T autólogos. Se utilizaron CD activas (círculos rellenos, n = 10) y agotadas (círculos vacíos, n = 10) cargadas con lisado soluble autólogo de LCL para la expansión de linfocitos T específica de antígeno. Se indica el número absoluto de células como valor promedio \pm EEM en los días de reestimulación en una escala logarítmica.

50 Figura 5: Distribución de subconjuntos de linfocitos T CD3+ durante la expansión específica de antígeno. Se utilizaron CD activas (gráfico superior, n = 10) y CD agotadas (gráfico inferior, n = 10) cargadas con lisado autólogo derivado de LCL para estimular los linfocitos T autólogos semanalmente durante cuatro semanas. La distribución de subconjuntos de linfocitos T CD3+ se determinó semanalmente por fenotipado inmunitario (HTL CD4+, barras rellenas; CTL CD8+, barras vacías). El porcentaje de las subpoblaciones se indica como media \pm EEM en los días de reestimulación.

55 Figura 6: Actividad citolítica de los linfocitos T tras la expansión específica de antígeno. Se utilizaron CD activas (círculos rellenos, n = 3) y CD agotadas (círculos vacíos, n = 5) cargadas con lisado autólogo derivado de LCL para estimular los linfocitos T autólogos semanalmente durante cuatro semanas. En el día 28, se analizó la actividad citolítica de la población de linfocitos T expandida. Se indica el porcentaje de lisis específica como valor promedio \pm EEM en las proporciones de efectores/diana indicadas.

60 Figura 7: Fenotipo inmunitario de CD de ratón inmaduras y maduras. Se representa un fenotipo inmunitario típico de las CD antes (histogramas vacíos) y después (histogramas rellenos) de la exposición a un estímulo de maduración de LPS/IFN- γ . Se representan los resultados de un experimento representativo.

65 Figura 8: Concentración de heterodímero IL-12 p70 en los sobrenadantes de cultivo tras diferentes periodos de estimulación con LPS/IFN- γ . Las CD se lavaron 2 horas después de la estimulación con LPS/IFN- γ y se recultivaron

durante 24 horas en medio de cultivo de CD o se dejaron durante 24 horas en un medio sin eliminar el LPS y el IFN- γ . Se indican los datos de tres experimentos como valor promedio \pm EEM.

Figura 9: Protección de ratones de un tumor que expresa NPT como antígeno modelo. Se inmunizaron grupos de 5 ratones según se indica con CD activas o agotadas, o con reactivos de control. Las CD se cargaron con lisado de K-Balb-NPT (barras rellenas), proteína NPT recombinante (barras rayadas) o péptidos sintéticos derivados de NPT (barras vacías). Para la provocación del tumor se utilizaron células tumorales naturales K-Balb y células tumorales K-Balb-NPT. Los controles se provocaron con células tumorales K-Balb-NPT. Se muestra un experimento representativo.

Ejemplo

Métodos

Generación de células dendríticas humanas

Se recogen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por leucocitaféresis (Amicus, Baxter, Viena, Austria). El producto de la leucocitaféresis se diluye con PBS 1:5 y se dispone una capa de solución de Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) por debajo. El gradiente se centrifuga durante 30 min a 2.200 rpm, a una temperatura comprendida entre 18°C y 20°C, sin frenado. La capa de PBMC se transfiere a otro tubo de centrifuga y las células se lavan con exceso de PBS. Las PBMC se cuentan en un equipo Sysmex F820 (Sysmex, Kobe, Japón) y se congelan en alícuotas correspondientes. Para la generación de las CD, se descongela una alícuota de PBMC y se cuenta. Se cultivan un millón de CD/ml en medio AIM-V (Invitrogen Corporation, Bethesda, Maryland, EE.UU.) con un 1% de plasma humano AB (Octaplas, Octapharm, Viena, Austria) durante dos horas a 37°C en un incubador humidificado. Las células no adherentes se eliminan lavando cuidadosamente la placa. Las células adherentes se cultivan durante 5 días en medio AIM-V complementado con un 2% de plasma humano, 400 U/ml de IL-4 (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Alemania) y 1.000 U/ml de GM-CSF (Roche, Basilea, Suiza). En el día 5, las células se recuperan, se lavan con PBS y se vuelven a suspender en AIM-V sin plasma. Un millón de CD/ml se exponen a 1-10 μ g de antígeno durante 2 horas a 37°C. Sin lavar, el cultivo de CD se complementa hasta una concentración final de 200 U/ml de LPS (US Pharmacopeia, Rockville, Maryland, EE.UU.), 50 ng/ml de IFN- γ (Boehringer Ingelheim, Viena, Austria), 400 U/ml de IL-4, 1.000 U/ml de GM-CSF y plasma humano hasta una concentración final del 2%. Las células se incuban durante 2 horas a 37°C para su aplicación como CD liberadoras de IL-12 activas y durante 48 horas para su aplicación como CD agotadas. Al terminar la etapa de maduración, las CD se lavan dos veces con PBS.

Generación de células dendríticas de ratón

A diferencia de las CD humanas, las CD murinas se generan a partir de mielohemocitoblastos de médula ósea. Aparte de esto, el procedimiento es parecido al del sistema humano. Se recogen mielohemocitoblastos de médula ósea de ratón de ratones Balb/c a partir de los huesos largos cortando los extremos de los mismos y enjuagando los ejes con una jeringuilla. Las células de médula ósea se cultivan en medio RPMI (Invitrogen Corporation, Bethesda, Maryland, EE.UU.) con un 10% de suero de ternera fetal (PAA Laboratories, Linz, Austria) durante 6 días en presencia de 5 ng/ml de IL-4 murina, y 3 ng/ml de GM-CSF murino (ambos adquiridos a través de Invitrogen Corp., Bethesda, Maryland, EE.UU.) en una placa de 24 pocillos con una densidad de 10^6 CD/pocillo. La carga con antígeno se lleva a cabo del mismo modo que para las CD humanas (véase anteriormente). Para la maduración se utiliza LPS en una concentración de 100 ng/ml y se utiliza IFN- γ murino (Invitrogen Corporation, Bethesda, Maryland, EE.UU.) a una concentración de 10 ng/ml. El comité de seguridad animal de la facultad de Medicina de la Universidad de Viena aprobó todos los experimentos con animales.

Fenotipado inmunitario

El fenotipo inmunitario se analiza antes y después de la maduración según procedimientos estándar. Los receptores Fc de IgG se bloquean mediante la adición de 50 μ l de solución de IgG al 4% a cada tubo de ensayo. Para el análisis de las CD humanas, se utilizan los siguientes pares de AcM: IgG FITC - IgG PE; CD45 FITC - CD14 PE; MHCII FITC - MHCI PE; CD1a FITC - CD83 PE; CD86 FITC - CD80 PE. Para el análisis de las CD de ratón, se utilizan los siguientes AcM: CD11b PE, CD11c FITC, CMH II PE, CD80 PE, CD40 FITC, CD86 PE. Los AcM se adquirieron a través de DAKO, Glostrup, Dinamarca, Immunotech, Marsella, Francia, o Invitrogen Corporation, Bethesda, Maryland, EE.UU. La citometría de flujo se lleva a cabo utilizando un equipo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, California, EE.UU.).

Reacción leucocitaria mixta

Las PBMC se aíslan por centrifugación en gradiente a partir de sangre periférica, tal como se ha descrito anteriormente, y se resuspenden en AIM-V/2% de plasma humano. Las CD (10.000, 2.000 o 400) se colocan por triplicado (100 μ l por pocillo) en una placa de fondo redondo de 96 pocillos y a cada pocillo se añaden 10^5 células mononucleares alogénicas en 100 μ l de medio. Para una referencia positiva, se estimulan 10^5 células

mononucleares en 100 µl de medio con enterotoxina estafilocócica A/B (SEA/SEB, Toxin Technologies Inc., Sarasota, Florida, EE.UU.) hasta 100 ng/ml de concentración final. Las células mezcladas se incuban durante 4 días. En el día 4, se añaden 25 µl de solución de timidina marcada con tritio (NEN Life Science Products, Boston, Massachusetts, EE.UU.) a cada pocillo y las células se incuban durante otras 18 horas. Por último, las células se recogen con un dispositivo de recolección Skatron (Skatron, Lier, Noruega) y la timidina marcada con tritio que ha resultado incorporada se cuenta con un contador Beta TriLux (Wallac Oy, Turku, Finlandia).

ELISA para IL-12

Se recubre el número apropiado de pocillos con anticuerpo anti-IL-12 (Invitrogen Corporation, Bethesda, Maryland, EE.UU.) en PBS y la placa se incuba durante una noche a 4°C. Al día siguiente, se lava la placa, se añaden 250 µl de solución de bloqueo (2% de albúmina de suero bovino en PBS) y la placa se incuba a temperatura ambiente durante 3 horas. La placa se lava de nuevo y se añaden las muestras y los patrones de IL-12 (Invitrogen Corp., Bethesda, Maryland, EE.UU.) en la dilución apropiada. Las concentraciones de los patrones son 2.500, 500, 100, 20, 4 pg/ml. La placa se incuba a temperatura ambiente durante una noche. Tras otra etapa de lavado, se añaden 75 µl de solución de anticuerpo anti-IL-12 biotinilado (Invitrogen Corporation, Bethesda, Maryland, EE.UU.), la placa se incuba a temperatura ambiente durante 4 horas, se lava de nuevo y se incorporan 75 µl de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Chemicon, San Diego, California, EE.UU.). Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se añaden 100 µl de PNPP (Sigma, St. Louis, Misuri, EE.UU.) en tampón de dietanolamina (48 ml de dietanolamina 10 M, 0,25 ml de MgCl₂ 1 M, 20 ml de HCl 3 M, ajustado a 500 ml de agua y pH = 9,8) y la placa se incuba durante 50 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden 50 µl de NaOH 3 M para detener la reacción y la placa se mide con un lector de placas ELISA (Anthos, Salzburgo, Austria) a 405 nm utilizando 690 nm como longitud de onda de referencia.

Inducción *in vitro* de una respuesta inmunitaria citolítica

Se generaron líneas celulares B linfoblastoides transformadas con VEB (LCL) por infección de linfocitos B con VEB producidos por células B95.8. Se cultivaron LCL en medio RPMI (Life Technologies, Grand Island, Nueva York, EE.UU.) complementado con un 10% de suero de ternera fetal (PAA Laboratories, Linz, Austria) y L-glutamina. Los cultivos en crecimiento continuo se transfirieron a medio RPMI complementado con un 4% de plasma humano. Se prepararon lisados de LCL mediante cinco ciclos de congelación y descongelación en agua estéril. Los componentes particulados se separaron de la solución proteínica por centrifugación. La concentración proteínica se determinó utilizando un ensayo proteínico Bio-Rad (Bio-Rad, Munich, Alemania) según las especificaciones del fabricante. Los linfocitos autólogos se expusieron en una proporción previamente optimizada de 5:1 a CD cargadas con proteína soluble derivada de LCL. Como control negativo se utilizaron CD sin carga. Los cultivos se mantuvieron en medio X-VIVO 15 (Bio-Whittaker, Watersville, Maryland, EE.UU.) complementado con un 1% de plasma humano y 10 ng/ml de IL-2 ("Proleukin", Chiron, Emeryville, EE.UU.) a una concentración inicial de 1×10^6 linfocitos/ml. Los linfocitos se reestimularon semanalmente durante cuatro semanas. El número de células se determinó utilizando un equipo Coulter Z2 (Coulter, Hialeah, Florida, EE.UU.). La distribución de subgrupos de linfocitos se analizó por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales contra CD3, CD4 y CD8 (todos adquiridos a través de Invitrogen Corp., Bethesda, Maryland, EE.UU.) según procedimientos estándares.

La actividad citolítica generada en los cultivos de linfocitos T se determinó contra nuevas células diana autólogas y alogénicas. Las LCL se lavaron en medio y se resuspendieron en 1 ml de tampón que contenía EuCl₃ 80 µM (Fluka, Buchs, Suiza), DTPA-Na₂ 400 µM, 250 µg/ml de dextranosulfato (PM 500.000), Hepes 50 mM (pH 7,4), NaCl 93 mM, MgCl₂ 2 mM y KCl 5 mM (todos ellos de Merck, Darmstadt, Alemania) y se incubaron durante no más de 15 min a 4°C en una rueda giratoria. A continuación, se añadieron 20 µl de CaCl₂, se prosigió la incubación durante otros 5 minutos y se lavó 3 veces con un tampón que contenía Hepes 50 mM (pH 7,4), NaCl 93 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM y glucosa 10 mM. El sedimento se resuspendió en 20 ml de medio y se preincubó en una plataforma de agitación en matraces de cultivo de tejidos de 75 cm² durante 40 min a 37°C. Finalmente, las células se lavaron de nuevo, se resuspendieron en un medio y se ajustó su cantidad a 5×10^4 /ml. Se transfirieron 100 µl de esta suspensión celular al número adecuado de pocillos en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se dispusieron pocillos adicionales para la determinación de la liberación espontánea y máxima (esta última mediante lisis de las células en Triton X-100 al 1%) de Eu en las LCL. Los linfocitos T preestimulados se recogieron, se lavaron una vez y se ajustaron relaciones efectores/diana de 25/1, 12,5/1 y 6,25/1 (volumen final, 200 µl). La placa se centrifugó a 500 rpm durante 5 min sin frenado. Tras 4 horas de incubación a 37°C, la placa se centrifugó de nuevo y se transfirieron 25 µl de los sobrenadantes a una placa de 96 pocillos de fondo plano y la misma se almacenó a 4°C. Antes de la medición, se incorporaron 200 µl de solución de refuerzo, la placa se agitó cuidadosamente y se analizó la fluorescencia por fluorimetría con resolución temporal en un contador Wallac 1420 VICTOR multietiqueta (Wallac, Turku, Finlandia). Los resultados se calcularon como porcentaje de lisis específica mediante la fórmula: % de lisis = (recuento experimental - liberación espontánea) x 100/(liberación máxima - liberación espontánea).

Modelo tumoral de ratón

Se utilizó la línea celular tumoral de ratón K-Balb, que es singénica con respecto a la cepa Balb/c. Esta línea celular ha sido diseñada para expresar la neomicina fosfotransferasa (NPT) por transferencia génica por retrovirus. Esta proteína xenogénica se ha utilizado como antígeno tumoral artificial en experimentos de inmunización. Se utilizaron tres fuentes de antígenos. En primer lugar, la proteína NPT recombinante se generó en un sistema de expresión bacteriana disponible comercialmente (Qiagen, Hilden, Alemania) que presenta una etiqueta de histidina para la purificación proteica según las recomendaciones del fabricante. En segundo lugar, se analizó en la secuencia de la NPT la presencia de péptidos noaméricos que tienen una alta probabilidad de unirse a moléculas de H2b y ser presentados por las CD de ratones Balb/c. Para este análisis se utilizó la base de datos SYFPEITHI de ligandos y motivos peptídicos del CMH (<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com>). Se encontró que los péptidos GYDWAQQTI y PVLVKTDL eran los que tenían una mayor probabilidad de enlace. La tercera fuente de antígeno fue el lisado celular tumoral completo obtenido a través de cinco ciclos de congelación y descongelación con una etapa posterior de centrifugación con el fin de eliminar los componentes particulados del lisado. La concentración proteica de estos lisados se determinó del mismo modo que la concentración proteica de los lisados derivados de LCL (véase anteriormente).

Se cargaron CD con 1 µg/ml de péptidos sintéticos derivados de NPT, con la proteína NPT recombinante o con 10 µg/ml de lisado de K-Balb-NPT por incubación de las mismas durante 2 horas en medio sin suero. A continuación, sin lavado previo, se incorporó suero a los cultivos y las CD recibieron el estímulo de maduración de LPS/IFN-γ durante 2 o 24 horas. Tras la maduración, las CD se lavaron dos veces en PBS y se recuperaron en NaCl a una concentración de 10⁷ CD/ml. Se inyectaron por vía subcutánea un millón de CD cargadas de antígeno y maduras en el lomo de ratones Balb/c rasurados en grupos de cinco ratones. La inmunización se repitió al cabo de 1 semana y, al cabo de otras 2 semanas, los ratones se provocaron con 10⁶ células K-Balb o K-Balb-NPT cultivadas en medio desprovisto de suero de ternera fetal durante, como mínimo, una semana antes de la inyección. Las células tumorales se inyectaron por vía subcutánea en el costado opuesto de los ratones y se controló el crecimiento del tumor.

Diseño del ensayo clínico

Se seleccionaron pacientes pediátricos con tumores sólidos de la infancia que habían agotado todas las opciones terapéuticas convencionales. Se obtuvo tejido tumoral por cirugía y se rompió mecánicamente a fin de generar una suspensión de células individuales. Se evaluó la proporción de células tumorales y del estroma en un laboratorio de diagnóstico por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) según procedimientos estándar utilizando marcadores informativos de anomalías citogenéticas de las células tumorales. Las suspensiones de células individuales contenían un 50-90% de células tumorales. El comité de ética del hospital infantil St. Anna de Viena (Austria) aprobó el presente ensayo clínico.

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de los pacientes por leucocitaféresis y se generaron CD tal como se ha descrito anteriormente. Las CD se cargaron con 10 µg/10⁶ CD/ml de lisados autólogos de células tumorales generados mediante cinco ciclos de congelación y la eliminación de los componentes particulados por centrifugación. La concentración de proteínas solubles se determinó tal como se ha descrito para los lisados derivados de LCL. Además, las CD se cargaron con hemocianina de lapa californiana (KLH), que se utilizó como antígeno trazador en ensayos de hipersensibilidad retardada (DTH) y con toxoide tetánico (TT) como adyuvante (ambas sustancias se adquirieron a través de Calbiochem, San Diego, California, EE.UU.). A continuación, las CD recibieron un estímulo de maduración de LPS/IFN-γ durante 2 horas. Las CD cargadas con antígeno se lavaron tres veces y se mezclaron en una proporción de 1:1 con células tumorales autólogas irradiadas. Las CD (1-10 x 10⁶/m²) se inyectaron en zonas próximas a los ganglios linfáticos sin tumor a intervalos semanales durante tres semanas con un periodo de descanso de tres semanas tras tres inyecciones. Este procedimiento se repitió tres veces. Además, los pacientes recibieron tratamiento con IFN-γ a fin de favorecer la expresión de moléculas de CMH de clase I, contribuyendo así a prevenir la elusión de la inmunidad citolítica. El IFN-γ se administró durante las tres semanas de aplicación de la vacuna tumoral mediante tres inyecciones subcutáneas por semana en dosis estándares.

Se llevó a cabo una evaluación básica de los parámetros clínicos y de laboratorio y un seguimiento de las enfermedades antes y después del tratamiento con los métodos adecuados. Se realizaron otros diagnósticos cuando se consideró clínicamente necesario. Los efectos secundarios del tratamiento se evaluaron de acuerdo con las normas de la OMS. se utilizaron ensayos de DTH contra KLH y contra células tumorales irradiadas para evaluar la eficacia del procedimiento de inmunización. Se inyectaron por vía intradérmica lisado de células tumorales (1 µg en 100 µl de NaCl), KLH (1 µg en 100 µl de NaCl), 100 µl de medio de cultivo de CD, o 100 µl de NaCl. Se utilizaron la inflamación y el enrojecimiento en el punto de inyección como medida de la inducción de una respuesta inmunitaria.

Resultados

1. Análisis de células dendríticas humanas

1.1. Fenotipo inmunitario

Se generaron CD inmaduras y se sometieron a un estímulo de maduración con LPS/IFN- γ . Antes y después de la maduración se analizó en el fenotipo inmunitario el aumento del marcador de CD CD83, el aumento de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, el aumento de las moléculas de CMH de clase I y CMH de clase II y la disminución del marcador de monocitos CD14. También se incluyó un análisis de la molécula de CD1a, que se supone que aumenta en las CD inmaduras, el marcador leucocitario común CD45 y los controles de isotipo. Todos los marcadores mostraron la modulación típica esperada, excepto el CD1a, que parece ser una característica de las CD cultivadas en medio complementado con plasma humano en lugar de suero de ternera fetal (figura 1).

1.2. Reacción leucocitaria mixta

Se cocultivaron CD maduras con PBMC alogénicas a fin de analizar la capacidad estimuladora de las CD. Se puso de manifiesto de forma coherente que las CD expuestas a un estímulo de maduración con LPS/IFN- γ pueden desencadenar una proliferación de linfocitos alogénicos comparable a cuando se utilizan los superantígenos SEA y SEB como estímulo de proliferación (figura 2).

1.3. Secreción de IL-12

Se recogió el sobrenadante de los cultivos de CD 24 horas después de la exposición al estímulo de maduración con LPS/IFN- γ y se determinó la concentración de moléculas heterodiméricas IL-12 p70. La concentración promedio de IL-12 fue de $2,4 \pm 0,4$ ng/10⁶ CD/ml (figura 3). Las CD que maduraron durante 2 horas y se recultivaron durante 24 horas produjeron cantidades de heterodímero IL-12 p70 casi idénticas que las CD maduras durante 24 horas.

2. Generación *in vitro* de la inmunidad citolítica

Las CD se cargaron con proteína soluble derivada de lisado de LCL y se utilizaron para estimular linfocitos T autólogos. La estimulación se repitió cuatro veces a intervalos semanales. En el día de la estimulación, se registró el número de células y se determinó el porcentaje de HTL y CTL. La actividad citolítica de los cultivos se analizó en un ensayo de CTL en el día 28. La capacidad estimuladora de las CD "activas" secretoras de IL-12 se comparó con la capacidad estimuladora de las CD "agotadas", que ya no liberan IL-12.

2.1. Expansión de linfocitos T específica de antígeno

Se observó una expansión de linfocitos T específica de antígeno con obtención de 531 ± 198 millones de linfocitos T aproximadamente idéntica cuando se utilizaron CD activas para la estimulación y de 318 ± 228 millones de linfocitos T cuando se utilizaron CD agotadas (figura 4). Además, en los primeros momentos no se observaron grandes diferencias en la cinética de crecimiento de los linfocitos T específicos de antígeno a pesar de que los linfocitos T expuestos a las CD activas tendían a proliferar mejor en comparación con la exposición a las CD agotadas.

2.2. Distribución de subpoblaciones de linfocitos T durante la expansión específica de antígeno

En cada instante de reestimulación, se determinó la distribución de subconjuntos de linfocitos T CD3+ mediante fenotipado inmunitario (figura 5). Cuando se utilizaron CD activas secretoras de IL-12 (n = 10), se observó una disminución progresiva del porcentaje de HTL CD4+ (del $77 \pm 4\%$ al $44 \pm 7\%$) acompañada por un aumento relativo de los CTL CD8+ (del $23 \pm 6\%$ al $56 \pm 7\%$). En cambio, cuando se utilizaron CD agotadas (n = 10) para la estimulación de los linfocitos T, el porcentaje de HTL (del $79 \pm 4\%$ en el día 7 y el $73 \pm 3\%$ en el día 28) y el de CTL (del $21 \pm 4\%$ en el día 7 y el $27 \pm 3\%$ en el día 28) permanecieron estables. Este hecho dio lugar a un porcentaje significativamente mayor de HTL al comparar cultivos estimulados con CD agotadas y cultivos estimulados con CD activas (p = 0,0016 en el día 28). Se observó el efecto contrario al comparar el porcentaje de CTL, que fue significativamente mayor tras la estimulación con CD activas que con la estimulación con CD agotadas (p = 0,0016 en el día 28).

2.3: Actividad citolítica de los linfocitos T tras la expansión específica de antígeno.

Los linfocitos T se expusieron a CD activas secretoras de IL-12 cargadas con lisado de LCL (n = 3) o a CD agotadas (n = 5), que no liberan IL-12. Los cultivos se reestimularon semanalmente durante cuatro semanas y se sometieron a análisis de su actividad citolítica en el día 28. La lisis específica alcanzó el $55 \pm 9\%$ tras la estimulación con CD activas en comparación con el $12 \pm 5\%$ tras la estimulación con CD agotadas (p = 0,0034) en la proporción más alta de efectores/diana de 25/1. Se observó la misma tendencia para una relación de efectores/diana de 12,5/1 ($27 \pm 7\%$ frente a $7 \pm 2\%$, p = 0,0125) y de 6,25/1 ($30 \pm 8\%$ frente a $4 \pm 1\%$, p = 0,0047).

3. Análisis de las células dendríticas murinas

3.1. Fenotipo inmunitario

Se maduraron CD murinas con LPS/IFN- γ y se analizó el fenotipo inmunitario de las CD inmaduras y maduras. Se utilizaron AcM dirigidos contra CD11b, CD11c, CMH II, CD80, CD40, CD86 para caracterizar el estado de maduración de las CD. Se detectó de forma coherente el habitual fenotipo CD11b/CD11c de CD maduras. También se observó un aumento de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, así como de las moléculas CD40 y CMH II.

5

3.2. Secreción de IL-12

Se analizó el contenido del sobrenadante del cultivo de CD para determinar la presencia de IL-12 un día después de la exposición al estímulo de maduración con LPS/IFN- γ . Las CD se lavaron 2 horas después de la estimulación con LPS/IFN- γ y se recultivaron durante 24 horas en medio de cultivo de CD (CD activas) o se dejaron durante 24 horas en medio sin eliminar el LPS y el IFN- γ (CD agotadas). En general, se detectaron aproximadamente 2 ng/10⁶ CD/ml (figura 8). Las CD que se maduraron durante 2 horas produjeron cantidades de heterodímero IL-p70 24 casi idénticas que las CD maduras durante 24 horas.

10

4. Inducción de inmunidad antitumoral en un modelo de tumor de ratón

Después de haber obtenido pruebas que sugieren el importante papel de la IL-12 en la inducción de una respuesta inmunitaria citolítica *in vitro*, se intentó confirmar los datos *in vivo*. Para ello, se diseñó un modelo de tumor de ratón que permitió inmunizar contra un antígeno modelo determinado. La línea celular tumoral de ratón K-Balb se diseñó para que expresara la proteína bacteriana NPT, que confiere resistencia al análogo de neomicina G418. Además, se produjo proteína NPT recombinante en un sistema de expresión bacteriano y se purificó por afinidad. Finalmente, se utilizó un software de predicción de epítopos para identificar péptidos noaméricos derivados de NPT con una elevada probabilidad de unirse a las moléculas H2b que presentan antígeno de CD de ratones Balb/c.

20

Se cargaron CD inmaduras con los péptidos noaméricos sintéticos derivados de NPT, la proteína NPT recombinante o proteína soluble obtenida de células K-Balb-NPT mediante procedimientos repetidos de congelación y descongelación. Las CD cargadas se expusieron a LPS/IFN- γ durante 2 horas y se inyectaron a los animales en grupos de 5 ratones como CD activas secretoras de IL-12, o se maduraron durante 24 horas con LPS/IFN- γ , se lavaron y se inyectaron como CD agotadas que habían perdido su capacidad de liberar IL-12. En los grupos de control, se inyectaron a los ratones células tumorales K-Balb-NPT irradiadas, proteína NPT recombinante, péptidos sintéticos derivados de NPT o CD sin cargar. Los ratones inmunizados se provocaron con células K-Balb-NPT transgénicas o con células K-Balb naturales y se controló el crecimiento tumoral (figura 9).

25

30

Independientemente de la pauta de inmunización, los ratones provocados con células tumorales K-Balb naturales desarrollaron tumores de crecimiento progresivo. Ocurrió lo mismo en los grupos de control, a excepción de 1 ratón, tras la inmunización con CD sin cargar. Y lo que es más importante, en los grupos de ratones inmunizados con CD activas secretoras de IL-12 y provocados con células tumorales K-Balb-NPT, la mayoría de los ratones fueron capaces de rechazar el tumor (3/5 inmunizados con CD cargadas con lisado de K-Balb-NPT, 5/5 inmunizados con CD cargadas con proteína NPT recombinante, 4/5 inmunizados con CD cargadas con péptido sintético). En cambio, prácticamente todos los ratones inmunizados con CD agotadas fueron incapaces de rechazar los tumores de K-Balb-NPT (1/5 inmunizados con CD cargadas con lisado de K-Balb-NPT, 0/5 inmunizados con CD cargadas con proteína NPT recombinante, 1/5 inmunizados con CD cargadas con péptido sintético). Todos los ratones provocados con células tumorales K-Balb naturales desarrollaron tumores de crecimiento progresivo, lo que demuestra una respuesta de rechazo específica de antígeno dirigida a la proteína NPT expresada por las células tumorales K-Balb-NPT.

35

40

45

Ensayo de fase I para demostrar la viabilidad y falta de toxicidad de una inmunoterapia con CD secretoras de IL-12

Se incluyeron en el presente ensayo pacientes que padecían tumores malignos pediátricos sólidos que ya no disponían de ninguna opción terapéutica convencional. Los objetivos principales consistían en evaluar la viabilidad y la toxicidad de las TIAT con CD. En el estudio se inscribieron 20 pacientes, 12 de los cuales completaron el tratamiento. La inmunoterapia TIAT con CD individual cumplía todos los criterios de calidad, incluidos un fenotipo inmunitario típico de CD inmaduras y maduras, respectivamente, la liberación de entre 1 y 5 ng de IL-12/10⁶ CD/ml y una buena capacidad estimuladora en una reacción leucocitaria mixta. La inmunoterapia TIAT con CD se puede generar en una cantidad suficiente para completar el programa terapéutico.

50

55

Tabla 1:
Pacientes incluidos en el ensayo clínico de fase I TIAT con CD.

Paciente	Diagnóstico	Edad	Sexo	Ciclos
SH001	Carcinoma hepatocelular	15	M	3
TM002	Osteosarcoma	21	M	3
JS003	Carcinoma hepatocelular	10	F	1
BG004	Osteosarcoma	17	F	1
AE005	Osteosarcoma	8	M	3
MR006	Carcinoma de células renales	7	M	3
SiH007	Sarcoma de Ewing	22	F	3
SA008	Carcinoma hepatocelular	13	M	2
LS009	Linfoma no hodgkiniano	14	M	0
BT010	Neuroblastoma	20	F	0
AR011	Tumor de Wilms	11	F	3
JS012	Carcinoma de células renales	16	F	3
SH(2)013	Carcinoma hepatocelular	15	M	3
RC014	Tumor de Wilms	12	F	3
JS(2)015	Carcinoma de células renales	16	F	3
NH016	Sarcoma de Ewing	13	F	0
TP017	Sarcoma de Ewing	22	M	0
GK018	Osteosarcoma	15	M	0
MK019	Osteosarcoma	10	F	3
LS020	Osteosarcoma	13	F	3

5 El tratamiento fue bien tolerado y se pudo administrar en régimen ambulatorio. No se observaron efectos secundarios tóxicos importantes del tratamiento. La aparición de fiebre leve, muy probablemente causada por un tratamiento complementario con IFN- γ que se aplicó con la intención de aumentar *in situ* la expresión de moléculas CMH de clase I en las células tumorales, se pudo controlar con antipiréticos. El picor en el punto de inyección de las CD se trató de forma local con antihistamínicos.

10 Como ensayo *in vivo* para evaluar la respuesta a la TIAT con CD se llevó a cabo un ensayo de hipersensibilidad retardada. Se inyectaron a los pacientes por vía intradérmica células tumorales autólogas irradiadas o el antígeno trazador KLH, así como un control del medio y un control negativo. Todos los pacientes que completaron el tratamiento mostraron una respuesta positiva a KLH. Este hecho proporciona una prueba convincente de que la TIAT con CD tiene capacidad para desencadenar inmunidad. Sin embargo, en estos ensayos no se pudo detectar ninguna inmunidad antitumoral. Las inyecciones de control no produjeron ninguna respuesta.

15 Todos los pacientes padecían la enfermedad en un estadio avanzado y presentaban un historial de quimioterapia y radioterapia abundantes, así como diversas intervenciones quirúrgicas. Por consiguiente, en este ensayo no se observó ninguna regresión tumoral objetiva. Sin embargo, varios de los pacientes presentaron una estabilización de la enfermedad durante un período prolongado.

Discusión de los resultados

25 La inducción exitosa de la secreción de IL-12 por parte de las CD parece tener un papel clave en la generación de una respuesta de HTL de tipo 1, que contribuye a la actividad antitumoral de los CTL [Cella, 1996]. En respuesta a los LPS, las CD producen IL-12 temporalmente durante entre aproximadamente 18 y 20 horas después de la maduración [Langenkamp, 2000]. Por lo tanto, las CD tomadas en los primeros momentos tras la inducción de la maduración inducen una fuerte polarización de los HTL de tipo 1, mientras que las mismas células tomadas en momentos posteriores favorecen las células polarizadas HTL de tipo 2. Estos resultados indican una regulación dinámica de la generación de la función de las células efectoras.

35 Se observó que las CD activas secretoras de IL-12 eran capaces de desencadenar igualmente la expansión de los CTL y los HTL. En cambio, las CD agotadas que habían perdido la capacidad de liberar IL-12 causaron una expansión predominante de HTL. En consecuencia, los linfocitos T estimulados por la exposición a CD activas, pero no a CD agotadas, adquirieron capacidad para la lisis específica de antígeno de las células diana. Se utilizaron dos sistemas modelo para demostrarlo. Uno era un modelo humano *in vitro* que utiliza CD cargadas con proteína soluble de LCL transformadas con VEB para la estimulación de linfocitos T autólogos. En este sistema se pudo mostrar la lisis específica de antígeno de las LCL. El segundo modelo era un modelo tumoral murino. Se puso de manifiesto que los ratones estaban protegidos contra una provocación tumoral tras la inmunización con CD activas, pero no con CD agotadas cargadas con antígeno. Además, se inició un ensayo clínico piloto de fase I a fin de obtener pruebas de la viabilidad y la falta de toxicidad de las CD secretoras de IL-12.

45 Las respuestas inmunitarias citolíticas mediadas por los CTL son dependientes de la presentación de antígenos a través de las moléculas CMH de clase I, que derivan sus péptidos antigénicos de las proteínas citoplásmicas, ya sea

de proteínas propias sintetizadas de forma endógena o de proteínas ajenas en el transcurso de una infección intracelular. Los paradigmas actuales sostienen que sólo las CD profesionales presentadoras de antígeno pueden inducir una respuesta inmunitaria primaria. De este modo, las CD tienen que incorporar antígenos ajenos de las células somáticas infectadas con el fin de presentarlos a los CTL, si no resultan ellas mismas infectadas y obligadas a sintetizar dichos antígenos de forma endógena o habilitadas para ello. Sin embargo, un extenso conjunto de pruebas apoya la idea de que, en las CD, los antígenos derivados de forma exógena y tomados como muestra se canalizan principalmente a la ruta de presentación de antígenos del CMH de clase II. Para resolver esta aparente contradicción, se concibió el concepto de presentación cruzada. Apoyado por pruebas obtenidas *in vitro* e *in vivo*, dicho concepto implica la presentación del antígeno derivado de forma exógena en la ruta de presentación de antígenos del CMH de clase I por parte de las CD. Sin embargo, últimamente ha surgido cierta controversia que pone en duda la importancia de esta presentación cruzada.

Recientemente, se han utilizado CD cargadas *ex vivo* con antígenos asociados a tumores o derivados de virus con fines terapéuticos en inmunoterapias antitumorales o inmunoterapia adoptiva para infecciones víricas en pacientes inmunodeprimidos. En este contexto, la presentación cruzada tiene una importancia central, ya que con frecuencia se aplican antígenos como proteínas solubles. Las CD expuestas a estos antígenos los absorben por fagocitosis y, sin presentación cruzada, se procesarían exclusivamente a través de la ruta del CMH de clase II y, por consiguiente, no darían lugar a inmunidad citolítica. Sin embargo, las condiciones que favorecen la presentación cruzada no están bien definidas y la mayor parte de las pruebas de la presentación cruzada de antígenos exógenos a CTL que da lugar a la inmunidad citolítica antitumoral o antivírica son indirectas.

En la inmunidad antitumoral y antivírica, el papel de los CTL ha recibido la mayor parte de la atención porque la mayoría de los tumores o de células infectadas por virus expresan moléculas CMH de clase I, pero no moléculas CMH de clase II. Además, los CTL son capaces de lisar células directamente tras el reconocimiento de los complejos péptido-CMH de clase I, y se ha demostrado su capacidad para erradicar grandes masas *in vivo*. Esta preferencia ha resultado apoyada por estudios de transferencia adoptiva en los que las líneas y clones de CTL específicos para los antígenos restringidos al CMH de clase I que se han estimulado *in vitro* pueden mediar una inmunidad antitumoral o antivírica cuando se transfieren de nuevo a los portadores del tumor. Además, los estudios recientes sugieren que la inmunización utilizando péptidos tumorales cargados en CD pueden dar lugar a una inmunidad antitumoral [Nestle, 2001] y una inmunidad antivírica [De-Bruijn, 1998] productivas.

Una conclusión implícita en la presente invención es que las CD activas en los primeros momentos tras la maduración con LPS/IFN- γ cumplen las condiciones para la presentación cruzada de antígenos exógenos a los CTL. En cambio, las CD agotadas parecen haber perdido esta capacidad. Según la presente invención, la liberación de IL-12 se utiliza como marcador para las CD activas [Langenkamp, 2000]. Sin embargo, puede considerarse que el efecto de la IL-12 sobre los CTL está mediado por HTL polarizados de tipo 1 que, a su vez, favorecen la presentación cruzada, la expansión de los CTL y la actividad citolítica. Una respuesta de linfocitos T exitosa contra antígenos intracelulares, como antígenos derivados de virus o antígenos asociados a tumores, se basa tanto en los CTL como en los HTL. Sin embargo, los HTL han recibido menos atención, lo que resulta sorprendente teniendo en cuenta el papel fundamental de estas células en la regulación de la mayoría de respuestas inmunitarias específicas de antígeno. A pesar de que se había imaginado desde hacía tiempo que la ayuda de los HTL en el desarrollo de los CTL se produce a través de la elaboración de linfocinas, pruebas más recientes han indicado que una vía fundamental para la administración de ayuda para los CTL, que depende de los HTL, utiliza CD como intermediario. Particularmente, las interacciones entre CD40L y CD40 sobre los HTL y las CD parecen cruciales en la activación de las CD para la presentación de antígenos a precursores de los CTL y la coestimulación de los mismos. En este contexto, las CD representan los conductos críticos entre los HTL y los CTL que son específicos para epítomos restringidos por CMH de clase II y CMH de clase I, respectivamente. En este contexto, parece tener una importancia notable el hallazgo de una ampliación aproximadamente equivalente de los HTL y los CTL tras la estimulación con CD activas, pero no con CD agotadas.

Debido a las pruebas convincentes en los dos sistemas modelo utilizados según la presente invención, se inició un ensayo clínico piloto de fase I. Se trataron pacientes que padecían tumores malignos sólidos avanzados de la infancia con CD autólogas activas liberadoras de IL-12 cargadas con proteína soluble derivada del tumor del paciente. Se llevaron a cabo ensayos clínicos utilizando CD cargadas con antígenos tumorales para diferentes enfermedades neoplásicas. Sin embargo, las CD utilizadas en estos ensayos eran inmaduras o maduras con TNF α . Dichas CD no tienen capacidad de liberar IL-12. Por consiguiente, teniendo en cuenta los presentes experimentos preclínicos, dichas CD deben ser consideradas inferiores a las CD secretoras de IL-12 utilizadas en el presente ensayo. Todos los pacientes del presente estudio padecían una enfermedad en estadio avanzado y presentaban un historial de quimioterapia y radioterapia abundantes. Por consiguiente, en estos pacientes no se observó ninguna regresión tumoral objetiva. Sin embargo, varios de los pacientes presentaron una estabilización de la enfermedad durante un período prolongado. La toxicidad del tratamiento con la presente inmunoterapia con CD fue mínima.

En resumen, se puso de manifiesto en un modelo humano *in vitro*, así como en un modelo tumoral murino *in vivo*, que las CD activas que secretan IL-12 poco después de su maduración, a diferencia de las CD agotadas, que han perdido su capacidad de liberación de IL-12 en momentos más tardíos, favorecen la generación de respuestas

5 inmunitarias citolíticas *in vitro*. Las CD activas están habilitadas para la presentación cruzada de antígenos exógenos sobre las moléculas CMH de clase I a los CTL, mientras que las CD agotadas no tienen esta capacidad. La expansión y la actividad citolítica de los CTL depende de forma crítica de la presencia de IL-12. Los resultados proporcionados por la presente invención tienen importancia para el tratamiento adoptivo de infecciones víricas en pacientes inmunodeprimidos con linfocitos T específicos de antígeno expandidos *ex vivo*. Un ensayo clínico piloto de fase I indicó la viabilidad y la falta de toxicidad del tratamiento de enfermedades neoplásicas con esta inmunoterapia con CD.

10 **Referencias**

- 10 Cella M. y otros, J.Exp Med 184:747, 1996
- Hilkens C.M. y otros, Blood 90:1920, 1997
- 15 Langenkamp A. y otros, Nat Immunol 1:3116, 2000
- Nestle F.O. y otros, Nat Med 7:7615, 2001
- 20 De-Bruijn M.L. y otros, Cancer Res 58:724, 1998

REIVINDICACIONES

- 5 1. Células dendríticas (CD) activas que liberan interleucina 12 (IL-12) que se cargan con un antígeno contra un tumor específico para su utilización en el tratamiento de un paciente que padece dicho tumor específico, caracterizadas porque las CD se cargan con el antígeno contra el tumor específico y se tratan a continuación con lipopolisacárido (LPS) e interferón gamma (IFN- γ) a fin de obtener CD específicas del tumor que liberan de IL-12.
- 10 2. CD activas según la reivindicación 1, caracterizadas porque dicho tratamiento se lleva a cabo tras un trasplante de médula ósea.
- 15 3. CD activas según la reivindicación 1 o 2, caracterizadas porque dicho tumor específico es un tumor maligno avanzado.
- 20 4. CD activas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizadas porque dichas CD son CD que han sido extraídas del paciente que padece dicho tumor específico o del donante de médula ósea.
- 25 5. CD activas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizadas porque las CD se han cargado con un antígeno procedente de una célula tumoral de dicho paciente que padece dicho tumor específico.
- 30 6. CD activas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizadas porque las CD se cargan adicionalmente con un antígeno trazador.
- 35 7. CD activas según la reivindicación 6, caracterizadas porque dicho antígeno trazador es la hemocianina de lapa californiana (KLH).
- 40 8. CD activas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizadas porque las CD se cargan adicionalmente con un adyuvante, particularmente el toxoide tetánico.
- 45 9. CD activas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizadas porque las CD se han generado *in vitro* a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
10. Kit que comprende
- LPS,
 - IFN- γ y
 - un antígeno contra un tumor específico
- a fin de proporcionar CD específicas de tumor que liberan IL-12 para su utilización en el tratamiento de un paciente que padece dicho tumor específico.
11. Kit según la reivindicación 10, caracterizado porque el antígeno es un antígeno procedente de una célula tumoral de un paciente que padece dicho tumor específico.

Fig. 1

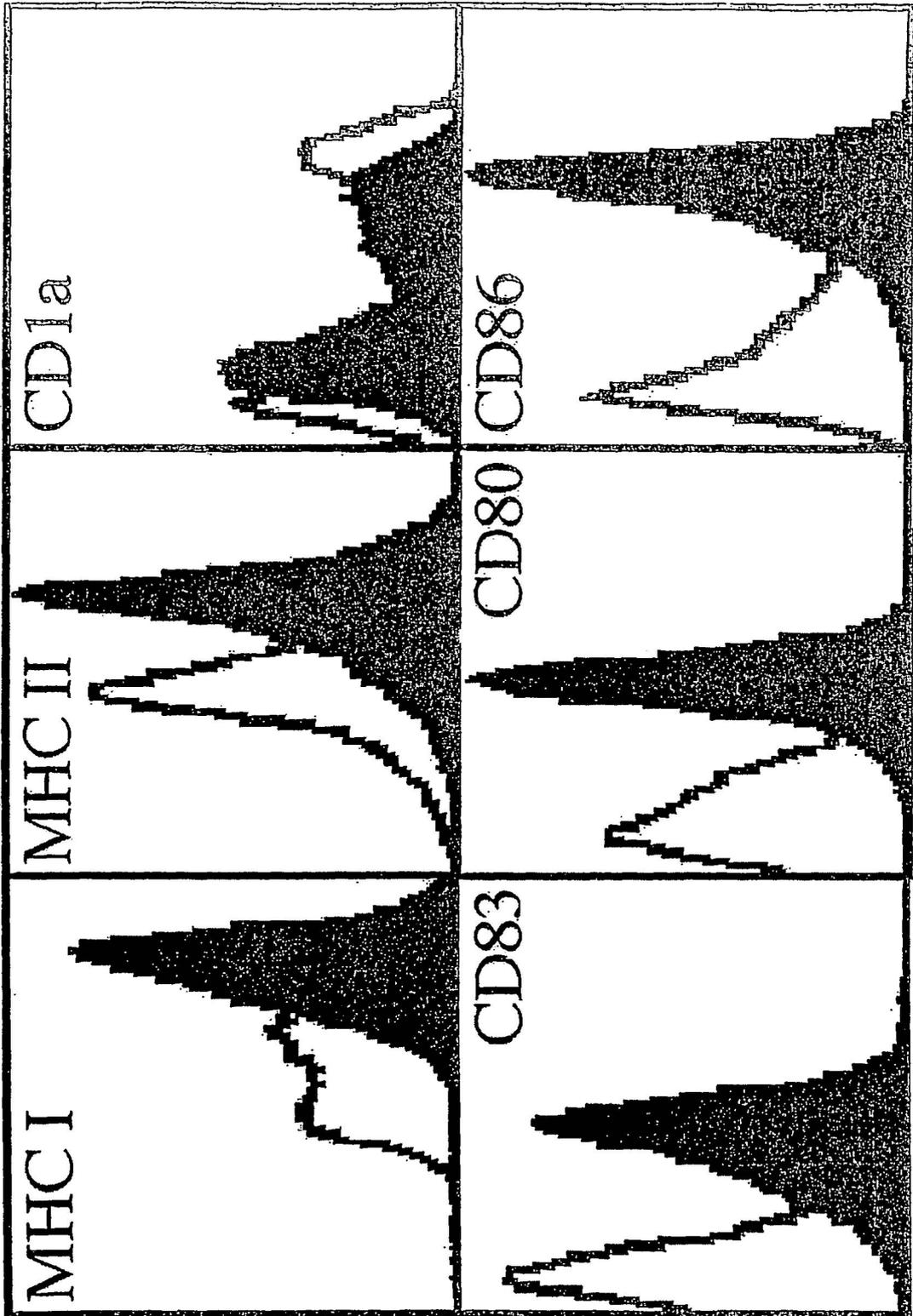
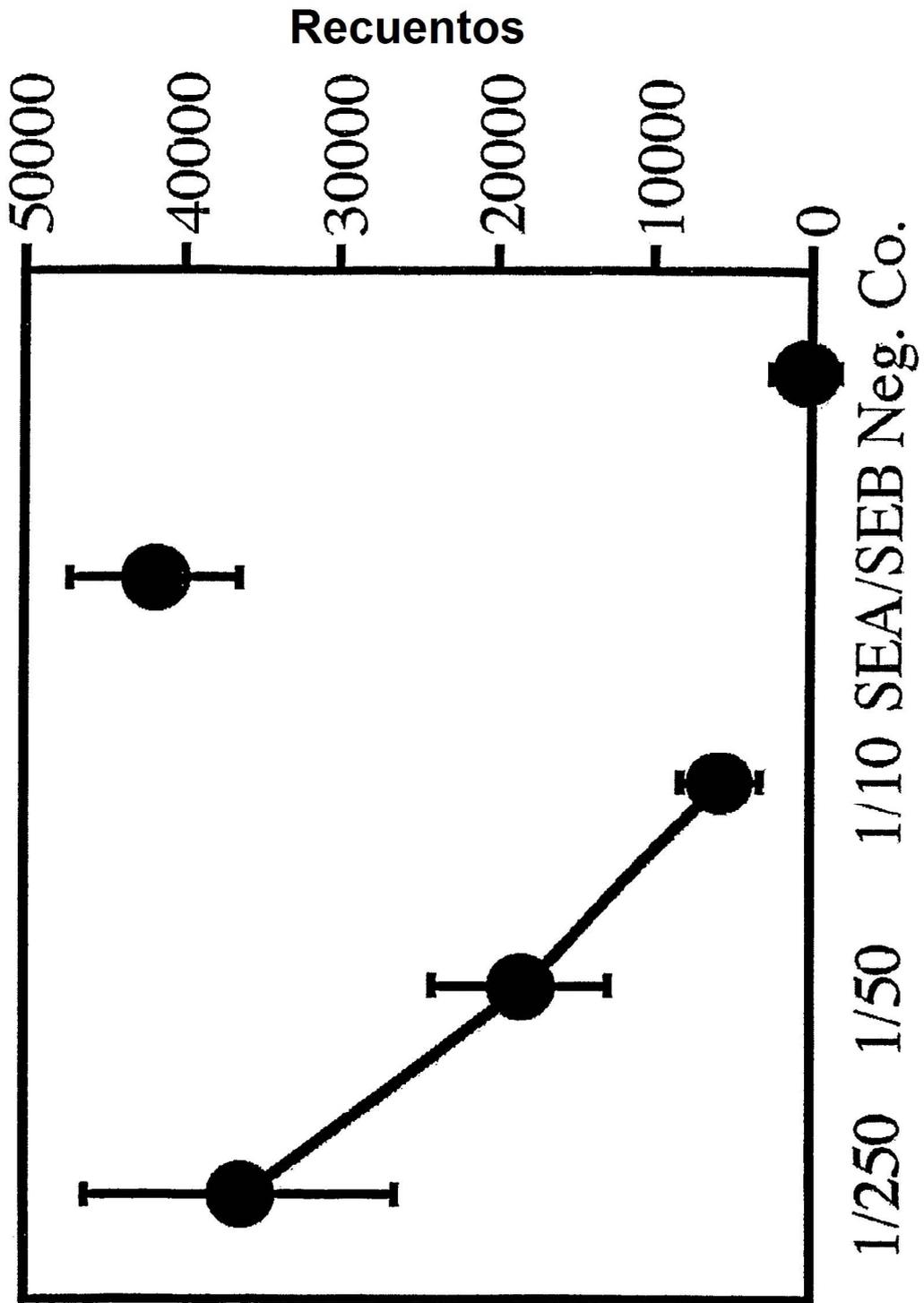


Fig. 2



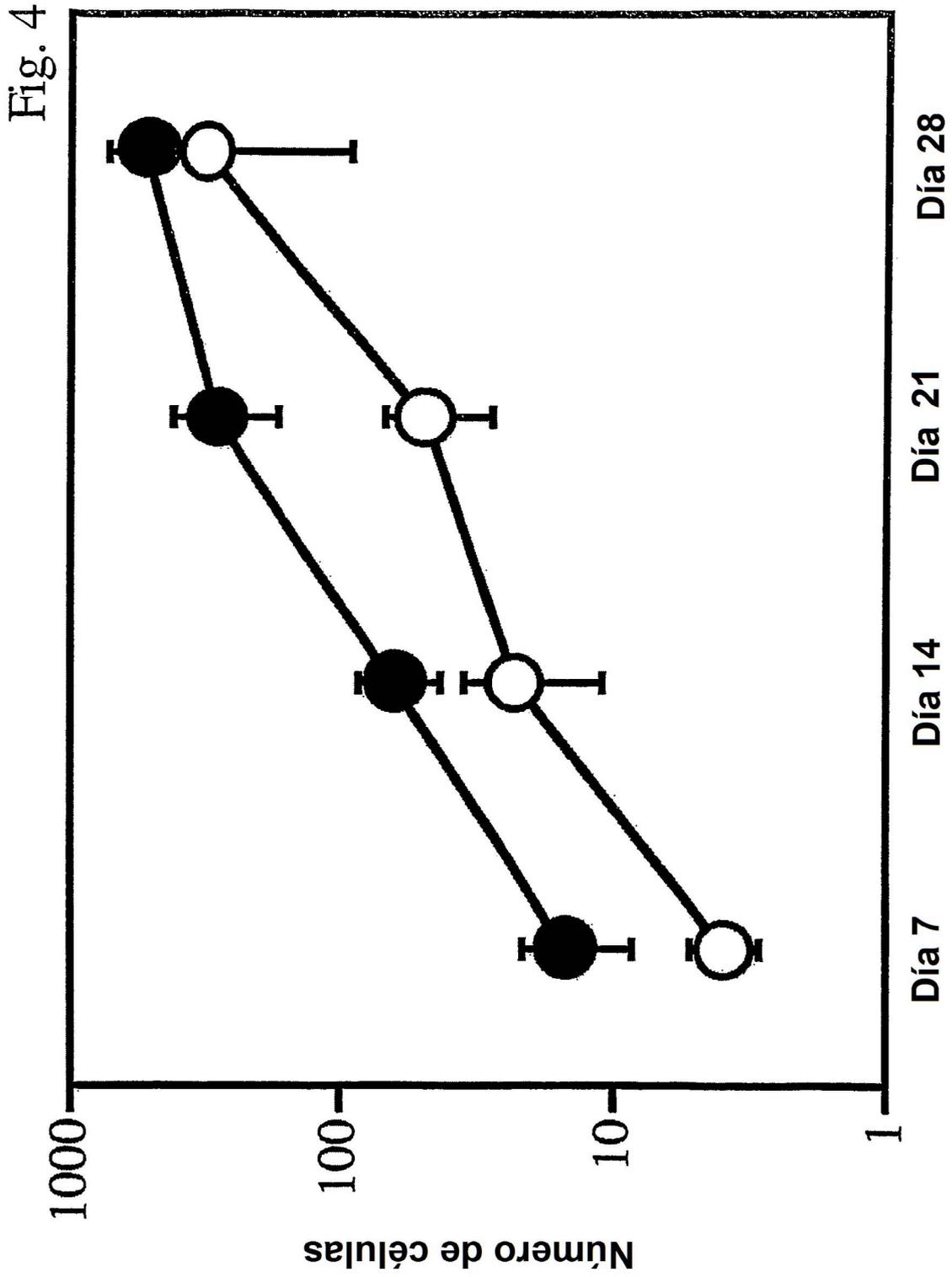


Fig. 5

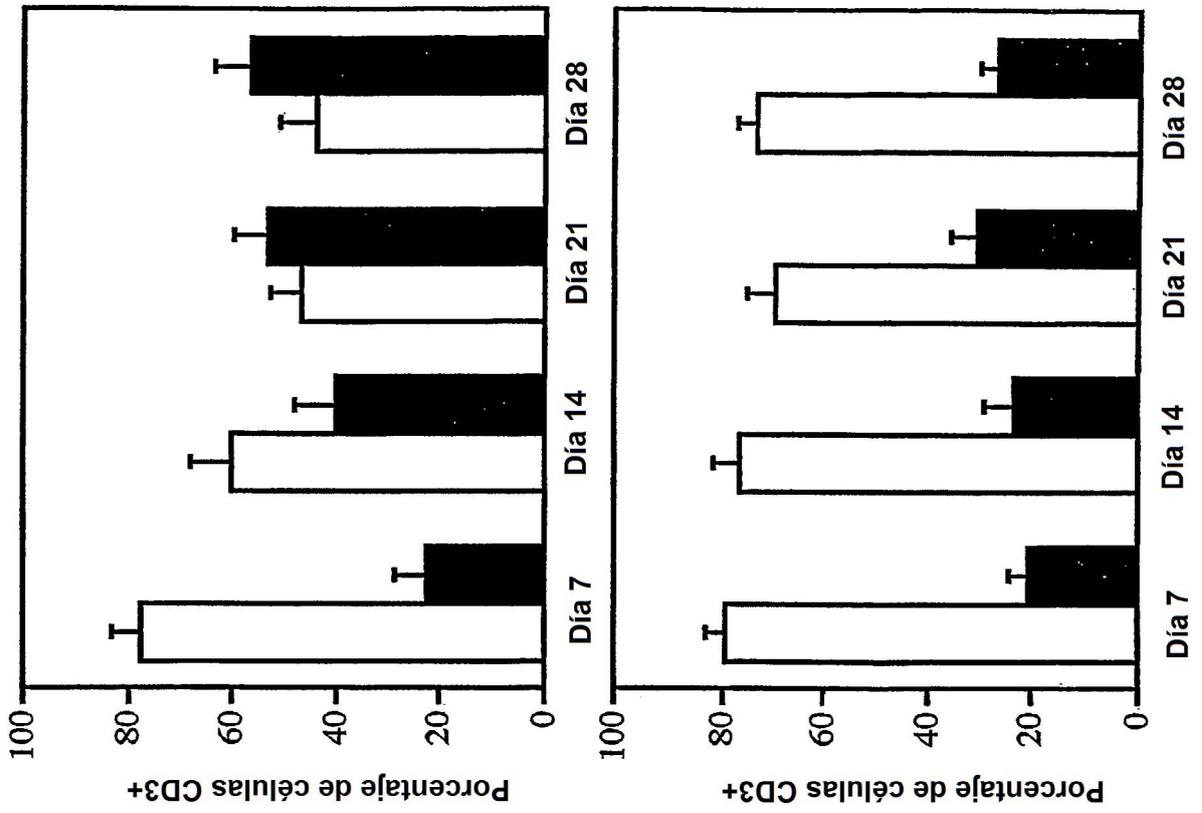


Fig. 6

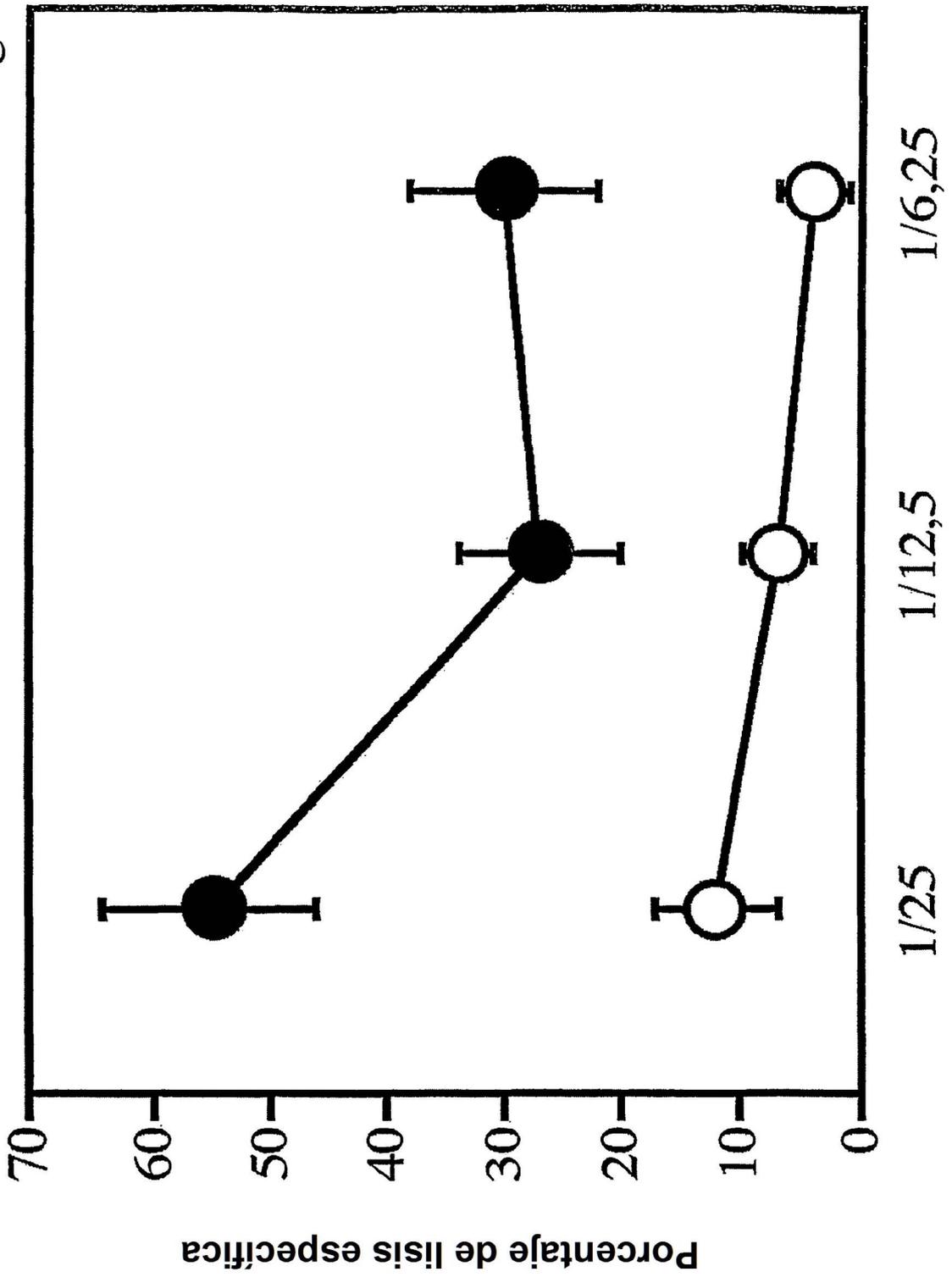


Fig. 7

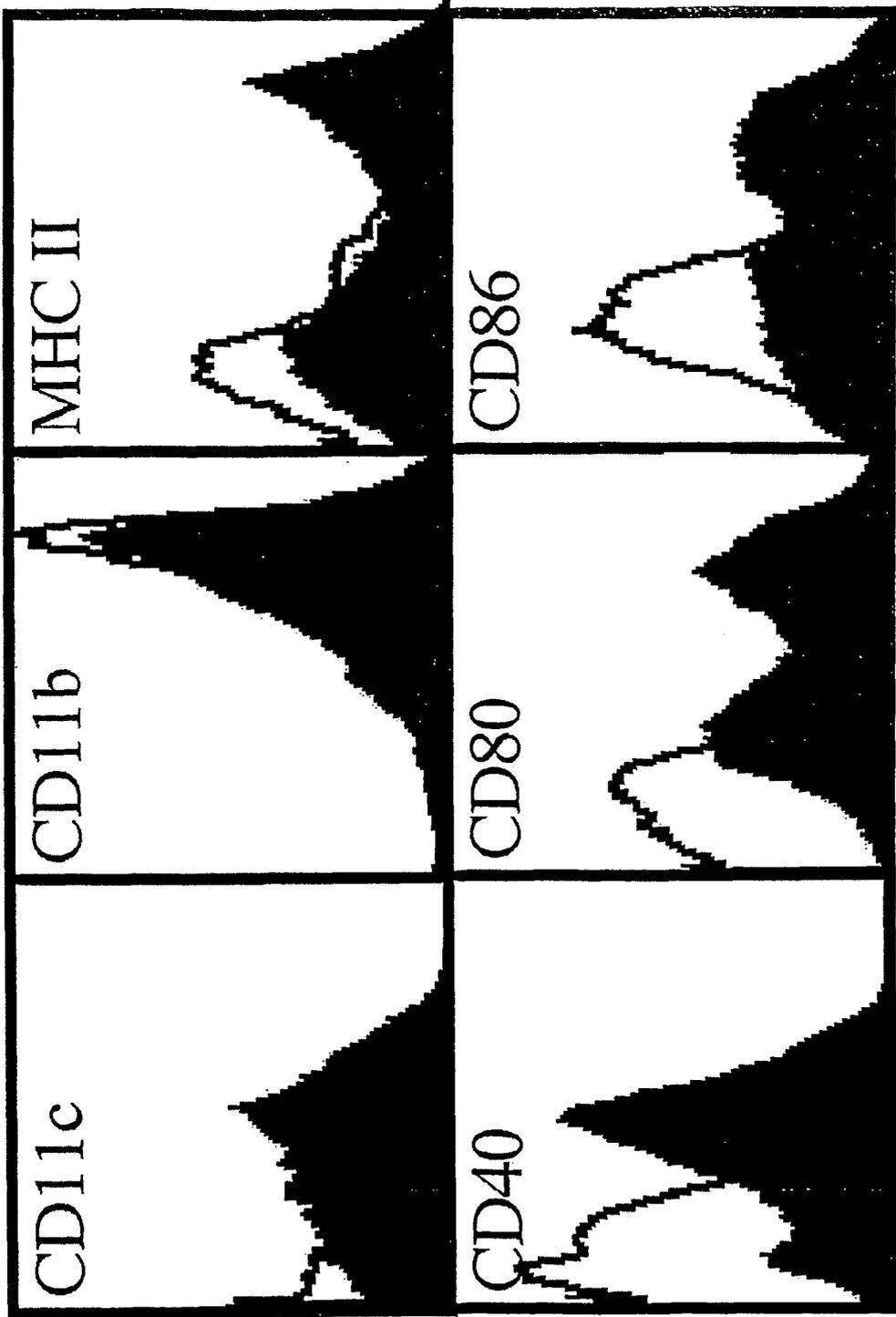


Fig. 8

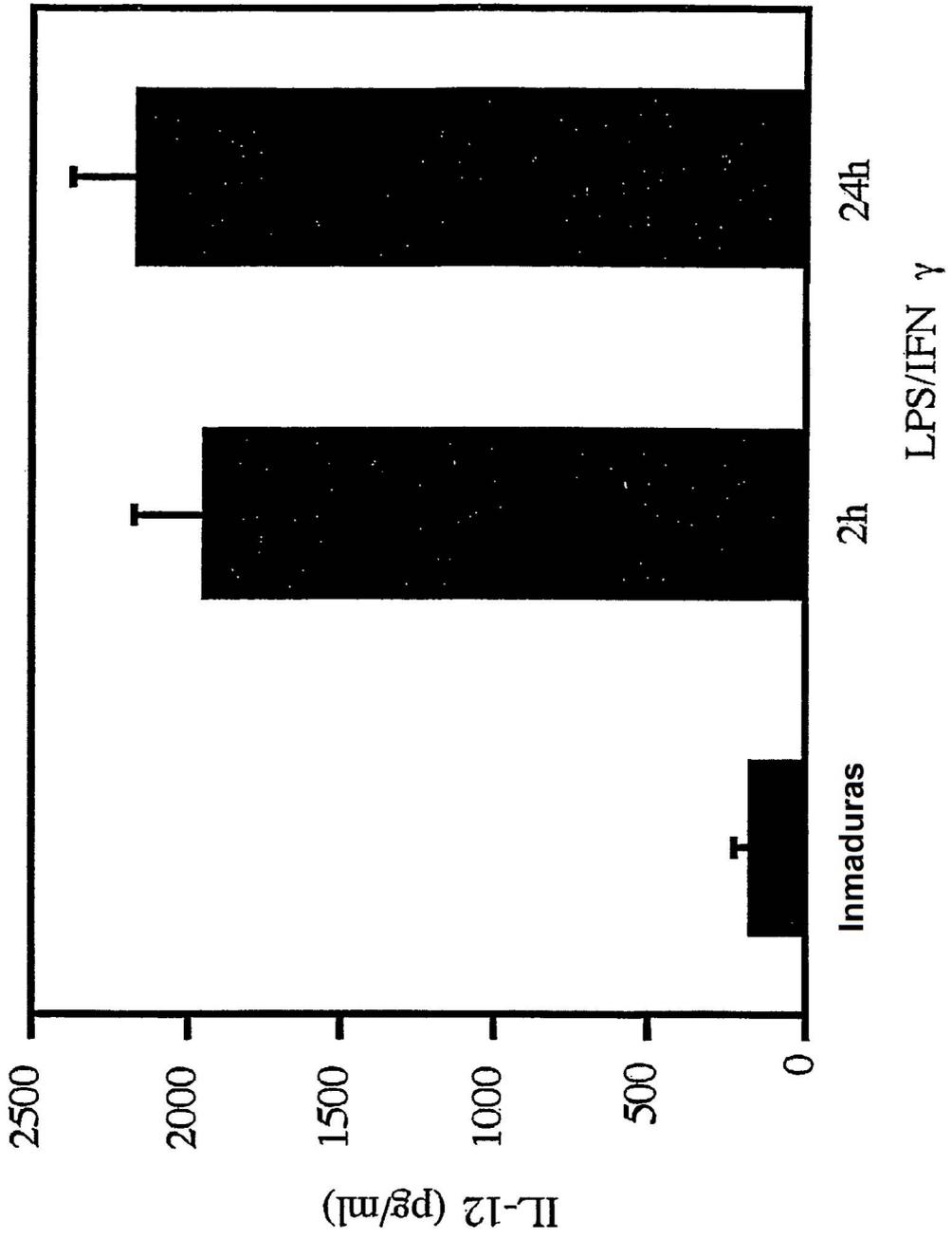


Fig. 9

