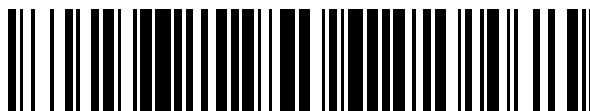


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 565**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0784 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06818153 .6**
96 Fecha de presentación: **07.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1971680**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.09.2008**

54 Título: **Método para generar células dendríticas empleando un descenso de temperatura**

30 Prioridad:
08.12.2005 DK 200501742

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.06.2012

73 Titular/es:
DANDRIT BIOTECH A/S
SYMBION SCIENCE PARK, FRUEBJERGVEJ 3
2100 COPENHAGEN &OSLASH;, DK

72 Inventor/es:
KIRKIN, Alexei;
DJANDJOUGAZIAN, Karine y
ZEUTHEN, Jesper

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

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).

ES 2 382 565 T3

DESCRIPCIÓN

Método para Generar Células Dendríticas Empleando un Descenso de Temperatura.

Campo Técnico

- 5 La descripción se refiere a métodos y medios útiles para inducir respuestas inmunitarias contra malignidades y enfermedades infecciosas. Más concretamente, la invención está relacionada con métodos mejorados para generar células presentadoras de antígenos.

Técnica Anterior

- 10 Las terapias inmunitarias basadas en células dendríticas que explotan los mecanismos naturales de presentación de antígenos representan el método no tóxico más prometedor para el tratamiento del cáncer. Éste se puede utilizar como único tratamiento, o como un coadyuvante para otros tipos de terapias tales como, por ejemplo, la cirugía, la radiación y la quimioterapia. La estrategia se basa en la manipulación *ex vivo* y la reintroducción de productos celulares para sortear las competencias inmunitarias con el fin de inducir respuestas inmunitarias específicas de tumores. De este modo, el último objetivo de tales terapias inmunitarias basadas en células dendríticas es la inducción de células efectoras específicas de tumores *in vivo* y los enfoques recientes se han centrado en los
- 15 linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) capaces de reconocer y eliminar células tumorales. Además, el tratamiento de enfermedades infecciosas tales como, por ejemplo, el VIH se puede beneficiar de las estrategias de vacunación basadas en las células dendríticas.

Presentación de antígenos

- 20 La inducción de respuestas inmunitarias específicas de tumores requiere la participación de células presentadoras de antígenos profesionales (CPA) que expresan moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) así como moléculas co-estimuladoras unidas a la membrana y secretadas. Además, dichas CPA deben ser capaces de absorber, procesar y presentar antígenos en asociación con las moléculas del CPH.

- 25 Las células dendríticas (CD) son las CPA profesionales del sistema inmunitario con capacidad para activar tanto células no sensibilizadas previamente como células T de memoria. Las fases que conducen a la maduración de las CD están asociadas con ciertas propiedades de la célula. Las células CD inmaduras son particularmente útiles en la absorción de antígenos extracelulares por medio de fagocitosis o pinocitosis y el procesamiento de antígenos a péptidos en compartimentos endocíticos tales como endosomas y fagosomas. Aquí los péptidos están unidos a las moléculas del CPH de clase II. Las CD inmaduras también tienen la capacidad única de cargar los péptidos de proteínas exógenas a la ruta de presentación del CPH de clase I, un proceso denominado presentación cruzada.

- 30 La capacidad para estimular eficazmente una respuesta inmunitaria activando las células T coadyuvantes de tipo 1 CD4⁺ (células Th1) y las células T citotóxicas CD8⁺ (CTL) depende de forma crucial de una CD madura. Solamente las CD completamente maduras equipadas con un panel de moléculas co-estimuladoras unidas a la membrana y accesorias tales como, por ejemplo, CD40, CD80, CD83, CD86 y CPH de clase II pueden inducir eficazmente la proliferación y diferenciación de linfocitos T específicos de antígenos¹.

- 35 Un papel significativo de la actividad co-estimuladora de las CD es proporcionado por las citoquinas secretadas, en particular la IL-12p70. Su papel en la activación de las células T y su polarización hacia una respuesta de tipo Th1 fueron claramente demostrados por Heufler et al. (1996)¹. Además, Inoue et al. (2005) informaron de una buena correlación entre la presencia de CD maduras que expresan IL-12 en el tumor y la supervivencia del paciente. Las CD maduras para la vacunación deben producir cantidades limitadas de la citoquina IL-10 inhibidora de las células Th1.
- 40

CCR7 es el receptor para las quimioquinas CCL19 y CCL21 que son producidas por las células del estroma en los ganglios linfáticos. Las CD que expresan niveles suficientes de CCR7 activado migran al ganglio linfático en respuesta a CCL19 o CCL21². Aquí se encuentran con los linfocitos T y pueden iniciar una respuesta inmunitaria.

Protocolos para la generación de CD maduras

- 45 Se han descrito muchos protocolos para la generación de CD maduras. El protocolo "convencional" más utilizado en la actualidad para la inducción de CD emplea un cóctel de maduración que consiste en IL-1β, IL-6, TNF-α y prostaglandina E2. A pesar de la actividad migratoria debida a CCR7 y de la actividad inmunoestimuladora *in vivo*, la CD madurada por medio de este cóctel genera CD con una capacidad reducida para producir IL12p70³.

- 50 Un segundo grupo de protocolos de maduración de CD comprende ácido poliinosínico:policitídílico, poli-(I:C). Éste se utiliza normalmente combinado con citoquinas tales como TNF α, IL-1β, IFN-γ e IFN-α. La CD generada mediante este método produce IL-12p70, pero normalmente expresa bajos niveles de CCR7. Los bajos niveles de expresión de CCR7 que caracterizan las CD obtenidas en presencia de poli-(I:C) restringen su migración *in vivo* a los ganglios linfáticos.

Recientemente, una solicitud de patente publicada US 2005/0003533 A1 describía un método para la maduración de células dendríticas que expresaban CCR7 que con posterioridad, después de la estimulación con CD40L, pudieron ser inducidas a producir IL-12p70.

5 Por consiguiente todavía existe un requerimiento no satisfecho para el desarrollo de métodos normalizados para generar células dendríticas maduras que expresen elevados niveles de CCR7 activado y que también produzcan una cantidad suficiente de IL-12p70.

10 Además, a pesar de los esfuerzos de muchos investigadores, las vacunas basadas en células dendríticas para su uso en la terapia contra el cáncer han proporcionado en general respuestas inmunitarias con una eficacia clínica modesta. Estas vacunas han sido producidas principalmente por medio de manipulación ex vivo y carga de antígenos de CD autólogas. La demanda creciente con respecto a la seguridad del paciente requiere un elevado nivel de reproducibilidad y conformidad con las cuestiones reguladoras. De este modo, existe una fuerte necesidad de métodos que generen CD equipadas apropiadamente que induzcan eficazmente respuestas inmunitarias y en particular proporcionen respuestas clínicas mejoradas.

15 Además, las CD generadas ex vivo también podrían ser implementadas como una vacuna terapéutica en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas crónicas tales como el VIH y la hepatitis B y C, donde el enfoque de vacuna tradicional no está funcionando eficazmente. Los resultados de los estudios preclínicos y clínicos primarios⁴⁻⁵ indican que la inmunoterapia basada en CD podría ser una estrategia prometedora para el tratamiento de pacientes con infecciones crónicas por VIH y hepatitis B y C. Como con la inmunoterapia para el cáncer, la respuesta clínica eficaz contra estos agentes infecciosos intracelulares está asociada con la inducción de la respuesta coadyuvante Th1 requerida para el desarrollo de células efectoras CD8⁺⁵. Por lo tanto, se puede esperar que las células dendríticas generadas ex vivo tengan las mismas características para tratar tanto el cáncer como las enfermedades infecciosas crónicas.

Descripción de la invención

25 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para generar células dendríticas empleando temperaturas por debajo de 37°C durante el desarrollo de células progenitoras en células dendríticas inmaduras.

En un segundo aspecto, la descripción hace referencia a una población de células dendríticas, donde dichas células son generadas mediante un método para generar células dendríticas empleando temperaturas por debajo de 37°C durante el desarrollo de células progenitoras y células dendríticas inmaduras.

30 En un tercer aspecto, la descripción hace referencia a una composición farmacéutica que comprende una población de células dendríticas donde dichas células se generan mediante un método para generar células dendríticas empleando temperaturas por debajo de 37°C durante el desarrollo de células progenitoras y células dendríticas inmaduras.

35 En un cuarto aspecto, la descripción hace referencia al uso de la población de células, donde dichas células se generan mediante un método para generar células dendríticas empleando temperaturas por debajo de 37°C durante el desarrollo de células progenitoras y células dendríticas inmaduras, para la estimulación y/o expansión de células T.

40 En un quinto aspecto, la descripción hace referencia al uso de la población de células, donde dichas células se generan mediante un método para generar células dendríticas empleando temperaturas por debajo de 37°C durante el desarrollo de células progenitoras y células dendríticas inmaduras, para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.

En un sexto aspecto, la descripción hace referencia al uso de la población de células, donde dichas células se generan mediante un método para generar células dendríticas empleando temperaturas por debajo de 37°C durante el desarrollo de células progenitoras y células dendríticas inmaduras, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer o de enfermedades infecciosas.

Breve Descripción de los Dibujos

La invención se explica con detalle más abajo mediante la referencia a los dibujos, en los que

La **Figura 1** ilustra el efecto de la temperatura sobre importantes moléculas de la superficie co-estimuladoras y accesorias de las CD.

50 La **Figura 2** ilustra el efecto de la temperatura sobre la cantidad de IL-10 producida por las CD durante los días iniciales del cultivo (A) y producidas por CD inmaduras (B) y CD maduras (C).

La **Figura 3** ilustra el efecto de las temperaturas de 31°C, 34°C y 37°C sobre la producción de IL-12p70 por células dendríticas inmaduras (A) y maduras (B, C) generadas mediante el nuevo método y un método convencional.

La **Figura 4** ilustra el efecto de la baja temperatura sobre la expresión de CCR7.

La **Figura 5** ilustra el fenotipo de CD inmaduras y maduras generadas mediante el método de acuerdo con la invención (A) y en comparación con un método "convencional" (B).

La **Figura 6** ilustra la estabilidad fenotípica de CD maduras a lo largo del tiempo.

5 La **Figura 7** ilustra el fenotipo y la actividad alo-estimuladora (MLR) de las CD el día 7 y el día 10.

La **Figura 8** ilustra la actividad alo-estimuladora de CD generadas con el método de acuerdo con la invención y un método "convencional".

La **Figura 9** ilustra la presentación funcional de antígenos CMV medida mediante la inducción de IFN- γ (análisis ELISPOT).

10 **Descripción detallada de la Invención**

La presente invención se describe con detalle más abajo. Para los efectos de la interpretación se aplicarán las siguientes definiciones y cuando sea apropiado, los términos utilizados también incluirán el plural y viceversa.

Definiciones

15 "Etapa de diferenciación" según se utiliza en la presente memoria, representa la etapa en la que se permite que las células se diferencien en respuesta a factores de diferenciación definidos.

"Etapa de maduración" según se utiliza en la presente memoria, representa la etapa en la que se permite que las células maduren en respuesta a la presencia de factores de maduración.

"Descenso de temperatura" o "disminución de temperatura" según se utiliza en la presente memoria, representa aquella temperatura que es inferior a 37°C.

20 Un método para generar células dendríticas es el método bien conocido de J.H. Peters que fue el primero en describir la capacidad de los monocitos para transformarse en células de tipo CD *in vitro*, primero espontáneamente y más tarde en presencia de GM-CSF e IL-4⁶. Después de las publicaciones de Romani et al., (1994)⁷ y Sallusto & Lanzavecchia (1994)⁸, los monocitos cultivados en presencia de estas dos citoquinas se utilizaron ampliamente para la preparación de CD. El procedimiento comienza con el aislamiento de monocitos de sangre periférica y su cultivo en presencia de GM-CSF e IL-4 durante 5-7 días. Las células obtenidas tienen las propiedades de las CD inmaduras por los bajos niveles de moléculas co-estimuladoras y la elevada actividad endocítica. Durante la maduración inducida por LPS, TNF-alfa u otros agentes de maduración, las células regulan significativamente al alza las moléculas co-estimuladoras y accesorias, tales como p. ej. CD40, CD80, CD83 y CD86, y regulan a la baja la actividad endocítica.

30 El cultivo tisular *in vitro* se realiza en general a 37°C. Se sabe que las células de Langerhans son funcionalmente activas a la temperatura ambiente de la piel a 29-31°C, y algunos estudios han documentado el efecto biológico *in vitro* de la disminución de las temperaturas de cultivo en sistemas celulares tales como p. ej. células de Ovario de Hámster Chino (CHO) y macrófagos alveolares de suídos.

35 En contraste con el trabajo de Basu et al. (2003) Int. Immunol. 15(9): 1053-61 que investigó el efecto de temperaturas de tipo febril sobre la activación y maduración de las CD, el descenso de temperatura solamente se ha sometido a ensayo en pocos casos para determinar su efecto sobre el crecimiento de células de mamíferos. Dexter et al. (1977) sugirieron utilizar 33°C para cultivar células pluripotenciales hematopoyéticas⁹. Athanasas-Platsis et al. (1995) descubrieron que la expresión del marcador de las células de Langerhans, CD1a sobre monocitos estaba regulado al alza durante un cultivo de 24 horas a 34°C en comparación con 37°C¹⁰.

40 Nadie ha descrito, que sepan los autores de la presente invención, cómo generar células dendríticas inmaduras o maduras empleando un descenso de temperatura.

En una realización, la invención hace referencia a un método para generar células dendríticas empleando temperaturas por debajo de 37°C durante el desarrollo de células progenitoras y células dendríticas inmaduras.

45 La IL-10 es un regulador negativo del desarrollo de CD y es producida durante la activación de una línea celular de monocitos en presencia de GM-CSF¹¹. Kirkley et al. (2003) informaron de que la producción de IL-10 por una línea celular de macrófagos estimulada con LPS se reducía significativamente en respuesta a un descenso en la temperatura de incubación de 37°C a 31°C¹². La reducción de temperatura comprendida en el método de la presente invención puede proporcionar de este modo mejores condiciones para la generación de CD, p. ej. por medio de una baja concentración de IL-10.

- Se ha sometido a ensayo el efecto de cultivar monocitos en presencia de GM-CSF e IL-4 a diferentes temperaturas (31°C, 34°C y 37°C) sobre el nivel de expresión de CD1a de CD inmaduras, una molécula extremadamente sensible al efecto inhibitor de IL-10. Los autores de la presente invención descubrieron que las CD generadas a temperaturas más bajas tenían niveles superiores de su expresión. Todos los demás experimentos se realizaron a 34°C. La siguiente observación de principios fue que los niveles de IL-10 detectados en los sobrenadantes eran en efecto significativamente inferiores tras el cultivo a una temperatura más baja.
- En una realización la invención hace referencia a un método, en el que las células dendríticas generadas son células dendríticas maduras.
- En una realización la invención hace referencia a un método, en el que el desarrollo de las células progenitoras y las células dendríticas inmaduras comprende la diferenciación de dichas células.
- En una realización la invención hace referencia a un método, en el que la temperatura es inferior a 37°C durante la diferenciación.
- En una realización la invención hace referencia a un método, en el que la temperatura es de 31°C a 37°C. La temperatura puede ser cualquiera de las temperaturas 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, o 36°C.
- En una realización la invención hace referencia a un método, en el que la temperatura es 34°C.
- En una realización la invención hace referencia a un método, en el que las células progenitoras son células progenitoras autólogas.
- En una realización la invención hace referencia a un método, en el que las células progenitoras se seleccionan entre células progenitoras mieloides o células pluripotenciales.
- En una realización la invención hace referencia a un método, en el que las células progenitoras mieloides son monocitos.
- En otra realización la invención hace referencia a una población de células dendríticas generadas mediante el método de acuerdo con la invención.
- En una realización la descripción hace referencia a una población de células Dendríticas, donde dichas células expresan CCR7 y/o IL-12p70
- En una realización la descripción hace referencia a una población de células dendríticas, donde dichas células expresan CD1a, CD14^{low}, CD83, CD86 e IL-10^{low}.
- En una realización la descripción hace referencia a una población de células dendríticas, que comprende adicionalmente al menos un antígeno presentado en asociación con una molécula del CPH en la superficie celular.
- En una realización la descripción hace referencia a una población de células dendríticas, donde dicho al menos un antígeno es un antígeno tumoral.
- En una realización la descripción hace referencia a una población de células dendríticas, donde dicho antígeno tumoral se selecciona de un grupo que comprende; antígeno de cáncer testicular, antígeno de diferenciación específico del linaje, antígeno expresado en exceso en tumores, antígeno mutado o expresado de forma aberrante, y antígeno viral.
- En una realización adicional la descripción hace referencia al uso de la población de células dendríticas definida antes, para la estimulación y/o expansión de células T.
- En una realización la descripción hace referencia al uso de la población de células dendríticas para la estimulación o expansión de células T, donde dichas células T son células T autólogas.
- En una realización la descripción hace referencia al uso de la población de células dendríticas para la estimulación o expansión de células T, donde dicho uso es un uso *in vitro*.
- En otra realización más la descripción hace referencia al uso de la población de células dendríticas para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto.
- En otra realización más la descripción hace referencia a una composición farmacéutica que comprende una población de células dendríticas donde dicha población se define como antes.
- En una realización la descripción hace referencia al uso de la composición farmacéutica como medicamento.

En una realización la descripción hace referencia a una composición farmacéutica que comprende una población de células dendríticas que comprende adicionalmente coadyuvantes y excipientes convencionales.

En una realización alternativa la descripción hace referencia al uso de células dendríticas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer o enfermedades infecciosas.

5 En una realización la descripción hace referencia al uso de la población de células dendríticas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer o enfermedades infecciosas, donde dicho cáncer se selecciona del grupo que comprende: melanoma, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de pulmón, o podría ser cualquier clase de cáncer.

10 En una realización la descripción hace referencia al uso de la población de células dendríticas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer o enfermedades infecciosas, donde las enfermedades infecciosas se seleccionan del grupo que comprende: VIH y hepatitis u otras enfermedades infecciosas crónicas.

EJEMPLOS

15 A continuación se ilustra esta invención por medio de los siguientes ejemplos que no se pretende que sean limitantes en modo alguno.

Ejemplo 1: Generación de células dendríticas empleando un descenso de temperatura.

Se generaron células dendríticas típicamente a partir de capa leucocitaria obtenida del banco de sangre. Se diluyeron 60 mL de la capa leucocitaria con 60 mL de Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco sin Ca y sin Mg (DPBS, Producto Núm. BE17-512F, Cambrex, Bélgica), y se aplicaron a cuatro tubos de 50 mL que
20 contenían cada uno 15 mL de Lymphoprep (Producto Núm. 1053980, AXIS-SHIELD PoC AS, Noruega). Después de la centrifugación (460 g, 30 min, 20°C), se transfirieron 10-20 mL de la capa superior de plasma a tubos separados. Se estimó que éste era plasma aproximadamente al 40% (plasma diluido). La preparación final de plasma incluye la adición de heparina (25 UI/mL) y centrifugación (1500 g, 15 min, 4°C). Las células mononucleares se cosecharon de la interfase, se diluyeron dos veces con DPBS que contenía EDTA y se lavaron por medio de 4-5 centrifugaciones, la
25 primera a 250 g, la segunda a 200 g y la siguiente a 150 g, todas las centrifugaciones a 4°C, 12 min. Antes de la última centrifugación se contaron las células utilizando un Contador Coulter (Beckman Coulter, modelo Z2), y se estimó la cantidad de monocitos como el número de células con un tamaño medio de alrededor de 9 µm). Las células se pueden almacenar a -80°C (en plasma diluido con DMSO al 10%, 10⁷ monocitos por vial), o utilizar inmediatamente en experimentos.

30 Las células se suspendieron en medio de adsorción (RPMI 1640 (Cambrex) con un suplemento de L-glutamina 2 mM y plasma al 2%) a una concentración de 2 x 10⁶ monocitos/mL. Se colocaron 5 mL de la suspensión celular en matraces Falcon T25 no tratados con TC. Después de 1 hora de adsorción a 37°C, se separaron las células no adherentes, se enjuagaron las células adherentes dos veces con RPMI 1640 templado, y se añadieron a cada matraz 7 mL de medio de cultivo (RPMI 1640 con un suplemento de L-glutamina 2 mM y plasma al 1%).

35 Los matraces se colocaron a diferentes temperaturas: 31°C, 34°C y 37°C en incubadoras con CO₂ separadas. Se añadieron los factores de diferenciación GM-CSF y IL-4 a concentraciones finales de 100 ng/mL y 50 ng/mL respectivamente los días 1, 3 y 5.

Se añadió TNF-alfa a una concentración final de 10 ng/mL el día 6 para inducir la maduración y se elevó la temperatura a 37°C durante las últimas 24 horas de incubación.

40 El día 7, se cosecharon las células y se determinó su fenotipo mediante análisis FACS. Las células se tiñeron utilizando anticuerpos conjugados directos CD1a-ficoeritrina (PE), CD14-isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD83-PE, CD86-PE, HLA-DR, -P, -Q-FITC (todos de Pharmingen, Beckton Dickinson, Brøndby, Dinamarca) y CCR7-FITC (R&D Systems Europe, Abington, Reino Unido). Se utilizaron controles de isotipo apropiados. Las muestras se analizaron utilizando el Citómetro de Flujo FACSCalibur (Beckton Dickinson) y el programa CELLQuest (Beckton Dickinson).
45

El resultado de los experimentos representativos se muestra en la figura 1. Más células cultivadas a temperaturas reducidas expresan CD1a en comparación con las células cultivadas a 37°C, mientras se observaban menos células CD83 y CD86 positivas para las poblaciones de células cultivadas a temperaturas inferiores. El índice de fluorescencia media (IFM) para CD1a fue dos veces más alto tras el cultivo a 31°C y 34°C en comparación con 37°C. El grado de maduración evaluado por medio del porcentaje de CD que expresaban CD83 y CD86 fue inferior a 31-34°C. Esto refleja o bien una menor sensibilidad a los factores de maduración de las células cultivadas a temperatura reducida, o bien que el propio proceso de maduración requiere una temperatura de 37°C.
50

Ejemplo 2: Efecto del descenso de temperatura sobre la producción de IL-10

Se investigó la producción de IL-10, que es un regulador negativo de las CD, durante la diferenciación de monocitos a células dendríticas. Se midió su concentración en el sobrenadante de cultivo tomada los días 1, 3 y 5. Se midió la producción de IL-10 por medio de un ELISA sándwich que incluía anticuerpo de captura (Ab), patrón o muestra, Ab de detección biotinilado, y HRP-estreptavidina utilizando el kit "Ready-Set-Go" de eBioscience esencialmente de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes con algunas modificaciones. Después de la unión durante la noche del Ab de captura a placas de 96 pocillos Nunc maxisorp y del lavado, se prolongó la etapa de bloqueo durante al menos 3 horas a la temperatura ambiente. Se generó una curva patrón por medio de siete diluciones seriadas del patrón, empezando con 200 pg/mL de IL-10. Los patrones y las muestras se incubaron a la temperatura ambiente durante 2 horas, seguido de incubación a 4°C durante la noche. Las siguientes etapas se realizaron de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Se utilizó solución sustrato de tetrametilbenzidina del mismo kit en la reacción enzimática de HRP, y después de terminar la reacción, se midió la densidad óptica con corrección de la longitud de onda como la diferencia entre las lecturas a 490 y 620 nm. Los resultados de uno de dichos experimentos se presentan en la figura 2A. La producción espontánea de IL-10 por los monocitos fue baja durante el primer día, y se reguló al alza significativamente después de la adición de GM-CSF e IL-4 el día 1. Las células cultivadas a 34°C hasta el día 5 producen en general cantidades significativamente inferiores de IL-10 en comparación con las células cultivadas a 37°C. El ensayo de los diferentes cultivos de CD el día 5 mostró un patrón similar (figura 2B). La reducción de la producción de IL-10 a 34°C en comparación con 37°C continuó incluso después del lavado de las células el día 5, poniéndolas a 37°C, añadiendo agente de maduración el día 6 y recogiendo los sobrenadantes el día 8 (figura 2C). Estos resultados indican que las células cultivadas a temperaturas por debajo de 37°C adquieren un fenotipo estable de baja producción de IL-10.

Ejemplo 3: Efecto del descenso de temperatura sobre la producción de IL-12p70.

Los autores de la presente invención también han investigado el efecto de la temperatura sobre la producción de IL-12p70. Se midió la producción de IL-12p70 por medio de un ELISA sándwich que incluía Ab de captura, patrón o muestra, Ab de detección biotinilado, y HRP-estreptavidina. Se utilizaron kits "DuoSet ELISA Development System" para IL-12p70 (R&D Systems) esencialmente de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes con algunas modificaciones. Después de la unión durante la noche del Ab de captura a las placas de 96 pocillos Nunc maxisorp y del lavado, se prolongó la etapa de bloqueo hasta al menos 3 horas a la temperatura ambiente. Se generó la curva patrón por medio de siete diluciones seriadas del patrón, empezando con 500 pg/mL de IL-12p70. Los patrones y las muestras se incubaron a la temperatura ambiente durante 2 horas seguido de incubación a 4°C durante la noche. Las siguientes etapas se realizaron de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Se utilizó una mezcla de peróxido de hidrógeno-tetrametilbenzidina como solución sustrato para HRP, y después de terminar la reacción enzimática se midió la densidad óptica con una corrección de la longitud de onda entre las lecturas de 490 y 620 nm.

TABLA 1. Efecto de la temperatura durante los primeros 5 días de cultivo sobre la producción de IL-12p70 durante la maduración inducida por un mimético de MCM.

Cultivo de CD	Temperatura de incubación hasta el día 5	Producción de IL-12p70 durante la maduración, pg/ml
36/04-3-3	34°C	35,1
36/04-3-4	37°C	14,1
17/05-2-1	34°C	55,2
17/05-2-3	37°C	35,7
18/05-2-1	34°C	19,0
18/05-2-3	37°C	3,7

Como se puede observar (Tabla 1), las células generadas a 34°C producen niveles significativamente superiores de IL-12p70.

Ejemplo 4: Selección de plástico para el cultivo de tejido.

Los autores de la presente invención han comparado dos tipos de plásticos para el cultivo de tejidos: Poliestireno no para el cultivo de tejidos (PS) (Producto Núm. 353813, T25 BD-Bioscience, EEUU) y plástico Primaria™ (Producto

Núm. 353813, T25 BD-Bioscience, EEUU). El experimento se configuró de una manera similar al procedimiento descrito en el ejemplo 1, utilizando superficies de plástico previamente tratadas durante 15-45 min. con 2% de plasma autólogo como fuente de componentes tales como p. ej. componentes extracelulares como fibrinógeno y fibronectina, en medio AIM-V sin suero a 34°C hasta el día 5, después de lo cual los tejidos se colocaron a 37°C. Se añadieron los agentes de maduración; TNF-alfa, IL-1 beta, IL-6 y prostaglandina E2 el día 6, y los cultivos se cosecharon el día 8.

Las células progenitoras tienen, dependiendo de las condiciones de crecimiento, la opción de evolucionar a macrófagos o CD. Después de unos pocos días en cultivo, las células destinadas a evolucionar a macrófagos formarán cultivos de células adherentes mientras las células destinadas a evolucionar a CD formarán cultivos de células unidas más laxamente. Inicialmente se sembró un número igual de células y se adhirieron a los diferentes plásticos para cultivo de tejidos. La inspección de los cultivos de CD desde el día 6 por medio de microscopía óptica reveló un número de células adherentes significativamente menor sobre plástico Primaria™ en comparación con las células desarrolladas sobre otro tipo de plástico. En general, los cultivos desarrollados sobre plástico Primaria™ también parecían más "limpios", esto es, menos desechos, reflejando menor grado de muerte celular durante la maduración.

Los autores de la presente invención sometieron a ensayo el uso de diferentes concentraciones de plasma para el pre-tratamiento del plástico. No se observaron diferencias significativas en las propiedades de las CD tras el tratamiento del plástico Primaria™ con plasma al 2%, 10%, 20% o 40% (datos no mostrados). Sin embargo, los autores de la presente invención observaron que la cantidad de linfocitos contaminantes descendía con las concentraciones crecientes de plasma hasta el 10%. Por lo tanto, los autores de la presente invención incluyeron la etapa de tratar el plástico Primaria™ con plasma al 10% en el método descrito en el experimento 1 en los siguientes experimentos.

En los siguientes experimentos los autores de la presente invención han comparado el método de la invención con un "método convencional" que se realiza como se describe más abajo a menos que se indique de otro modo.

Las células dendríticas fueron generadas típicamente a partir de capa leucocitaria obtenida del banco de sangre. Se diluyeron 60 mL de capa leucocitaria con 60 ml de Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco libre de Ca y libre de Mg (DPBS, Producto Núm. BE17-512F, Cambrex, Bélgica), y se aplicaron a cuatro tubos de 50 mL, conteniendo cada uno 15 mL de Lymphoprep (Producto Núm. 1053980, AXIS-SHIELD PoC AS, Noruega). Después de la centrifugación (460 g, 30 min, 20°C), se transfirieron 10-20 mL de la capa de plasma superior a tubos separados. Se cosecharon las células mononucleares de la interfase, se diluyeron dos veces con EDTA-PBS sin calcio y magnesio y se lavaron por medio de 3 centrifugaciones, la primera a 250 g, la segunda a 175 g y la última a 110 g, todas las centrifugaciones a 4°C, 12 min. Antes de la última centrifugación se contaron las células utilizando un Contador Coulter (Beckman Coulter, modelo Z2), y se estimó la cantidad de monocitos como el número de células con un tamaño medio de alrededor de 9 µm).

Las células se suspendieron en medio de adsorción (RPMI 1640 (Cambrex) con un suplemento de L-glutamina 2 mM y plasma autólogo inactivado con calor al 1 %) a una concentración de 2×10^6 monocitos/mL. Se colocaron 5 mL de la suspensión celular en matraces Primaria™ T25 no tratados. Después de una hora de absorción a 37°C, las células no adherentes se separaron, y se añadieron 5 mL de medio de cultivo (RPMI 1640 con suplemento de L-glutamina 2 mM y plasma al 1%) a cada matraz.

El día 1 se cambió el medio por medio de nueva aportación. El día 3 se añadieron 2 ml de medio. El día 5 las células no adherentes se cosecharon y se colocaron en matraces Primaria™ T25 con medio de nueva aportación.

Los matraces se colocaron a 37°C en una incubadora con CO₂. Se añadieron los factores de diferenciación GM-CSF e IL-4 a concentraciones finales de 100 ng/mL y 50 ng/mL, respectivamente los días 1, 3 y 5.

Se añadió TNF-α o un cóctel de Citoquinas (IL-1, IL-6, TNF-α y PGE-2) el día 6 para inducir la maduración.

El día 7, las células se cosecharon y se determinó su genotipo mediante análisis FACS.

Ejemplo 5: Producción de IL-12p70.

La Figura 3 ilustra la medición de la producción de IL-12 p70 a lo largo de dos días (día 7 y día 8) en la que los autores de la presente invención fueron capaces de demostrar que las células dendríticas generadas mediante el nuevo método producen cantidades significativamente mayores de IL-12 p70 que las células dendríticas generadas mediante un método convencional.

Ejemplo 6: Expresión de CCR7.

Para investigar el efecto de la baja temperatura sobre la expresión de CCR7, los autores de la presente invención emplearon un cóctel de maduración que consistía en IL-1beta, IL-6, TNF-alfa y prostaglandina E2 en lugar de utilizar solamente TNF-alfa. El resultado de los experimentos presentado en la figura 4 está comparando tres temperaturas

diferentes con el nuevo método y un método convencional. Se puede observar que la expresión de CCR7 es superior con el nuevo método en comparación con el método convencional.

Los autores de la presente invención también sometieron a ensayo la funcionalidad de la expresión del receptor CCR7 por las células dendríticas generadas mediante el nuevo método en un análisis de migración convencional (Chemotx Disposable Chemotaxis System (Modelo 116-5) de Neuro Probe, Gaithersburg, MD, EEUU). Aquí los autores de la presente invención observaron migración de células dendríticas hacia las quimioquinas CCL19 con las CD generadas mediante el nuevo método (datos no mostrados) verificando la expresión de un receptor CCR7 funcional.

Ejemplo 7: Rendimiento celular.

El nuevo método descrito en la presente memoria también mostró un aumento del rendimiento celular en comparación con un método convencional. En tres rondas diferentes los autores de la presente invención encontraron un rendimiento celular superior a todas las temperaturas sometidas a ensayo (31°C, 34°C y 37°C) con el nuevo método en comparación con el método convencional. Véase la tabla 2.

TABLA 2

Temperatura/Método		31°C	34°C	37°C
Nuevo método				
	1)	2,2 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	2,6 x 10 ⁶
	2)	2,6 x 10 ⁶	1,8 x 10 ⁶	1,3 x 10 ⁶
	3)	1,7 x 10 ⁶	2,0 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶
Método convencional				
	1)	1,7 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶	0,9 x 10 ⁶
	2)	1,3 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁶	0,6 x 10 ⁶
	3)	0,8 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁶	0,6 x 10 ⁶

Ejemplo 8: Variaciones de marcador de lote a lote de CD generadas mediante el nuevo método.

Conforme a los requerimientos de GMP para la producción de células dendríticas con fines médicos, debe haber escasas variaciones de lote a lote en las propiedades de las células dendríticas. Con este fin los autores de la presente invención llevaron a cabo la preparación de células dendríticas a partir de sangre de 8 donantes diferentes durante un período de tres semanas, utilizando los mismos lotes de todos los reactivos empleados y 0,5% de plasma autólogo como adición al medio AIM-V. Para la comparación, se llevó a cabo la producción de CD utilizando el método "convencional" (37°C). Los experimentos se realizaron sobre PBMC descongeladas. La Tabla 3 resume las propiedades de las CD generadas en estos experimentos. En contraste con la elevada variabilidad en las propiedades de las CD generadas mediante el método "convencional", se observó un grado muy bajo de variabilidad en las propiedades de las CD obtenidas mediante el nuevo método.

TABLA 3. Diferentes marcadores expresados en porcentaje de células dendríticas generadas mediante un método convencional o mediante el nuevo método.

	CD1a		CD14		CD86 _{high}		HLA-D		CD83		CCR7	
Donante	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
23/05	56	44	73	18	28	70	98	100	28	70	ND	ND

	CD1a		CD14		CD86 ^{high}		HLA-D		CD83		CCR7	
Donante	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N	S	N
24/05	41	85	2	1	49	99	99	100	75	99	ND	ND
25/05	0	10	17	1	80	99	99	100	83	99	63	98
26/05	50	69	9	1	90	99	100	100	91	99	85	98
27/05	53	86	9	1	93	100	100	100	93	100	90	99
28/05	69	73	37	12	25	86	97	100	41	86	18	81
29/05	66	84	60	2	43	96	98	100	43	99	17	95
30/05	86	89	25	1	63	99	100	100	63	99	56	98
X:	53	68	29	5	59	94	99	100	65	94	55	95
S: método convencional, N: método de acuerdo con la invención, ND: No determinado, X: Valor medio.												

Finalmente, la figura 5A representa fenotipos de células dendríticas inmaduras (día 5) y maduras (día 8) generadas mediante el nuevo método. Aquí, los autores de la presente invención también midieron la expresión de CD80, receptor de manosa (RM) y dos marcadores de células de Langerhans - CD207 (langerina) y E-cadherina. Como se pudo observar, las células generadas mediante el método de acuerdo con la invención no son células de Langerhans.

La Figura 5B representa el fenotipo de células dendríticas inmaduras (día 5) y maduras (día 8) generadas mediante el nuevo método y un método convencional. Aquí, los autores de la presente invención han teñido las células para la expresión de marcadores de CD convencionales. Las células inmaduras (día 5) muestran una población CD1a más limpia. La población madura (día 8) está mostrando una expresión de HLA D, CD83 y CD86 elevada y uniforme en células generadas mediante el nuevo método en comparación con el método convencional. Asimismo, la expresión de CCR7 es expresada más uniformemente con el nuevo método.

Ejemplo 9. Estabilidad de las células dendríticas generadas mediante el nuevo método.

Después de la inyección en el organismo, las células dendríticas deben migrar y llegar al ganglio linfático con el fin de estimular las células T. Por lo tanto es muy importante que las CD mantengan su fenotipo durante varios días. Una manera común de llevar a cabo un ensayo de estabilidad consiste en cosechar las células el día 8, lavar las citoquinas y continuar cultivando las células en ausencia de citoquinas estimuladoras. Los autores de la presente invención han llevado a cabo esta clase de experimentos cultivando las células sin citoquinas durante dos días. La Figura 6 representa los resultados del análisis FACS de CD cosechadas el día 8 y después de dos días adicionales de cultivo. Parece claramente que la expresión de los parámetros medidos: CD1a, CD14, CD83, HLA-D y CCR7 permanecen en gran parte inalterados y de este modo el fenotipo permanece estable.

En un experimento similar, sin lavar las citoquinas el día 8, los autores de la presente invención sometieron a ensayo tanto el fenotipo como la actividad alo-estimuladora de las células dendríticas el día 7 o el día 10. La Figura 7A y 7B muestra el fenotipo y la actividad alo-estimuladora, respectivamente. Los resultados muestran que el efecto alo-estimulador es todavía elevado después de 10 días de cultivo y el perfil fenotípico se asemeja al perfil medido el día 7, verificando la elevada estabilidad de las células dendríticas generadas.

Ejemplo 10. Alo-estimulación por células dendríticas generadas mediante el nuevo método.

Los autores de la presente invención han comparado las capacidades alo-estimuladoras de las CD obtenidas mediante el método "convencional" y el método de acuerdo con la invención. Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con suero humano AB al 5%. Las células de respuesta fueron células mononucleares obtenidas de donantes sanos mediante separación por densidad de la capa leucocitaria de sangre periférica. Las células

estimuladoras fueron células dendríticas maduras radiadas obtenidas después de una exposición de 2 días al cóctel de citoquinas de maduración descrito en el ejemplo 4. Las células estimuladoras, $0,1 \times 10^6$ células en 100 μ l, se mezclaron con números titulados de células estimuladoras (en 100 μ l) como se muestra en la Figura 8 y se cultivaron durante 5 días en placas de microtitulación de 96 pocillos con el fondo en U. Se añadió ^3H -timidina (0,1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) durante las últimas 18 horas. Con posterioridad, las células se cosecharon para el recuento por centelleo. Los datos se dan como los valores medios de cpm de cuatro cultivos repetidos. Se utilizó la prueba de Wilcoxon para estimar las diferencias entre los dos métodos utilizados para la generación de CD. Como se pudo observar, las células dendríticas obtenidas mediante el método de acuerdo con la invención tienen 3-10 veces más actividad alo-estimuladora.

Ejemplo 11. Presentación de antígenos por las células dendríticas generadas mediante el nuevo método.

Para dilucidar el potencial de las CD para presentar antígenos a las células T, se llevó a cabo un análisis ELISPOT para INF γ con células T estimuladas por CD desnudas o pulsadas con un péptido de CMV. Se eligió el análisis ELISPOT para INF γ ya que el análisis proporciona un claro resultado a nivel de una sola célula y las células T tras encontrarse con el antígeno presentado por las CPA liberan INF γ . El péptido de CMV utilizado está restringido a HLA-A2 y se sabe que el material del donante es HLA-A2 positivo, y como el 80% de la población tiene una respuesta a CMV, se eligió este modelo de virus. La Figura 9 representa los resultados de un análisis ELISPOT que demuestra que existe una fuerte respuesta de las células T estimuladas con CD cargadas con el péptido de CMV indicando que estas CD son capaces presentar antígenos a las células T.

Referencias

1. Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N., y Schuler, G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur. J. Immunol.*, 26: 659-668, 1996.
2. Scandella, E., Men, Y., Gillesen, S., Forster, R., y Groettrup, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 100: 1354-1361, 2002.
3. Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., y Enk, A. H. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.*, 27: 3135-3142, 1997.
4. Chen, M., Li, Y. G., Zhang, D. Z., Wang, Z. Y., Zeng, W. Q., Shi, X. F., Guo, Y., Guo, S. H., y Ren, H. Therapeutic effect of autologous dendritic cell vaccine on patients with chronic hepatitis B: a clinical study. *World J. Gastroenterol.*, 11: 1806-1808, 2005.
5. Lu, W., Arraes, L. C., Ferreira, W. T., y Andrieu, J. M. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat. Med.*, 10: 1359-1365, 2004.
6. Peters, J. H., Xu, H., Ruppert, J., Ostermeier, D., Friedrichs, D., y Gieseler, R. K. Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 329: 275-280, 1993.
7. Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P.O., Steinman, R. M., y Schuler, G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.*, 180: 83-93, 1994.
8. Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.*, 179: 1109-1118, 1994.
9. Dexter, T. M., Allen, T. D., y Lajtha, L. G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell Physiol*, 91: 335-344, 1977.
10. Athanasas-Platsis, S., Savage, N. W., Winning, T. A., y Walsh, L. J. Induction of the CD1a Langerhans cell marker on human monocytes. *Arch. Oral Biol.*, 40: 157-160, 1995.
11. Lehmann, M. H. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor triggers interleukin-10 expression in the monocytic cell line U937. *Mol. Immunol.*, 35: 479-485, 1998.
12. Kirkley, J. E., Thompson, B. J., y Coon, J. S. Temperature alters lipopolysaccharide-induced cytokine secretion by RAW 264.7 cells. *Scand. J. Immunol.*, 58: 51-58, 2003.
- Basu, S. y Srivastava, P.K. Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90. *International Immunology*, 15 (9): 1053-1061, 2003.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la generación de células dendríticas maduras que emplea temperaturas por debajo de 37°C durante el desarrollo de células progenitoras y células dendríticas inmaduras.
- 5 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la evolución de las células progenitoras y las células dendríticas inmaduras comprende la diferenciación de dichas células.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1-2, donde la temperatura es de 31°C a 37°C.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la temperatura es 34°C.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las células progenitoras son células progenitoras autólogas.
- 10 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde las células progenitoras se seleccionan entre células progenitoras mieloides o células pluripotenciales.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde las células progenitoras mieloides son monocitos.

Fig. 1

A: Efecto de la temperatura sobre la expresión de marcadores de CD

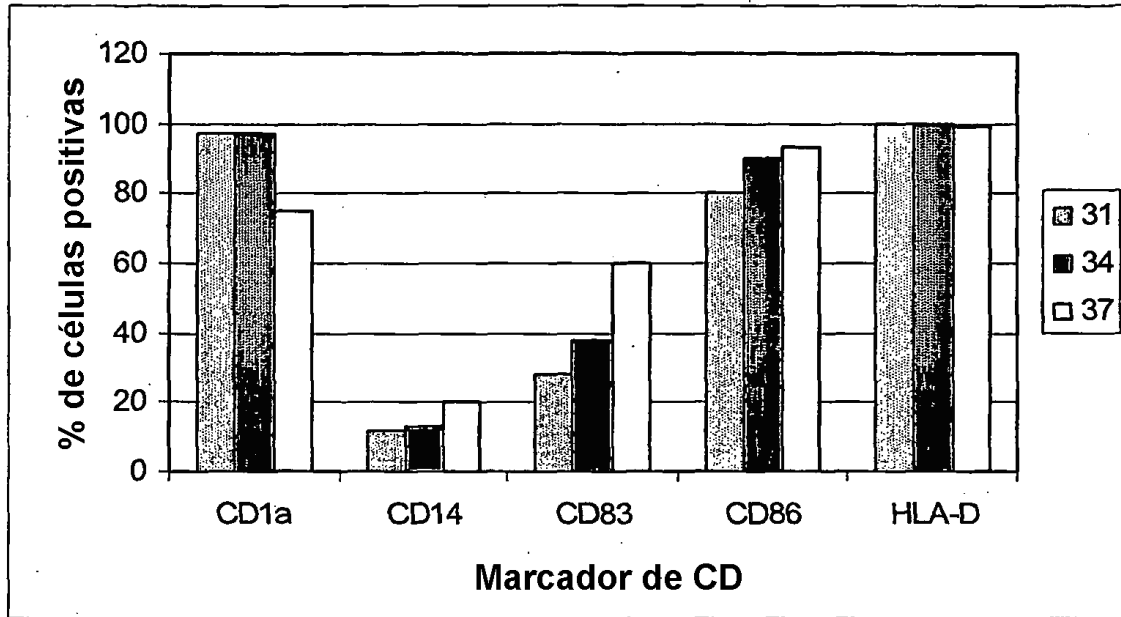


Fig. 2

**Efecto de la temperatura sobre la producción de IL-10 por
CD inmaduras y maduras**

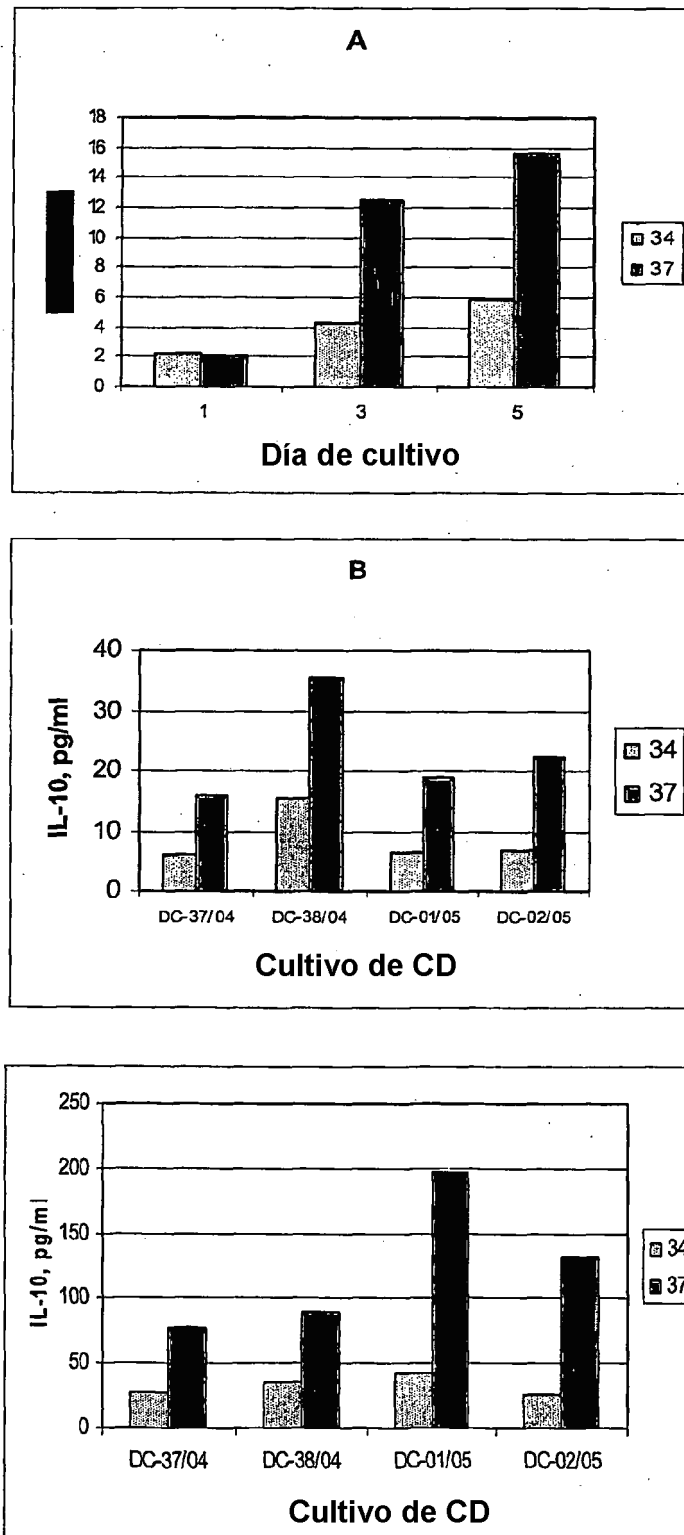


Fig. 3
Expresión de IL-12

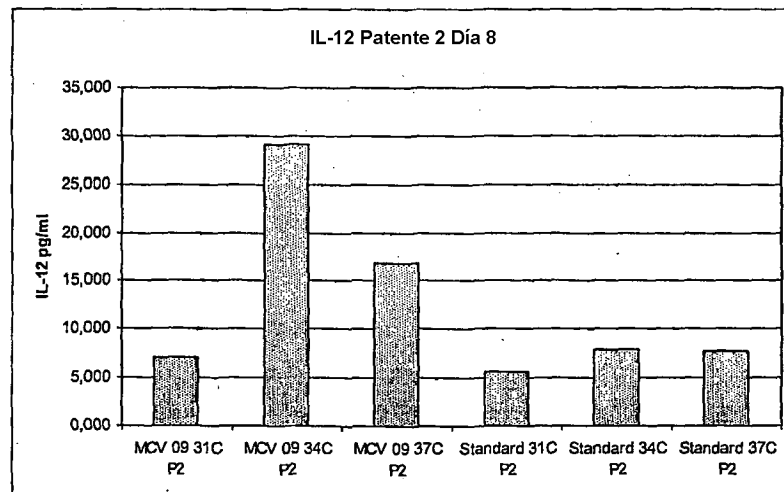
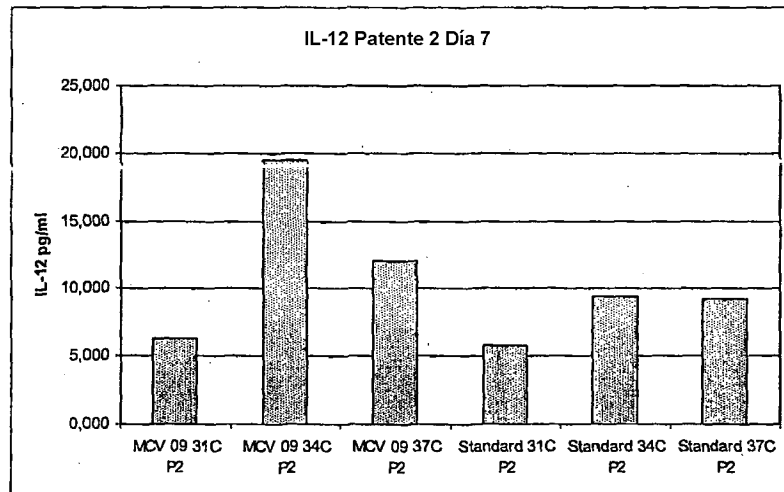
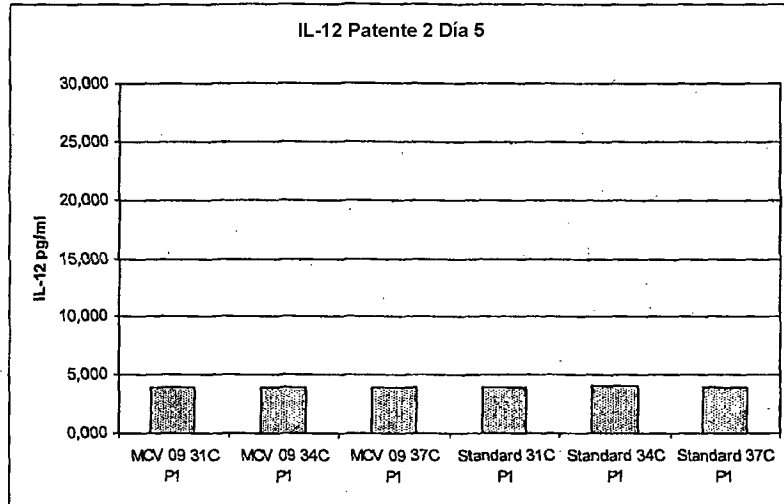


Fig. 4

Expresión de CCR7 por CD maduras generadas a diferentes temperaturas

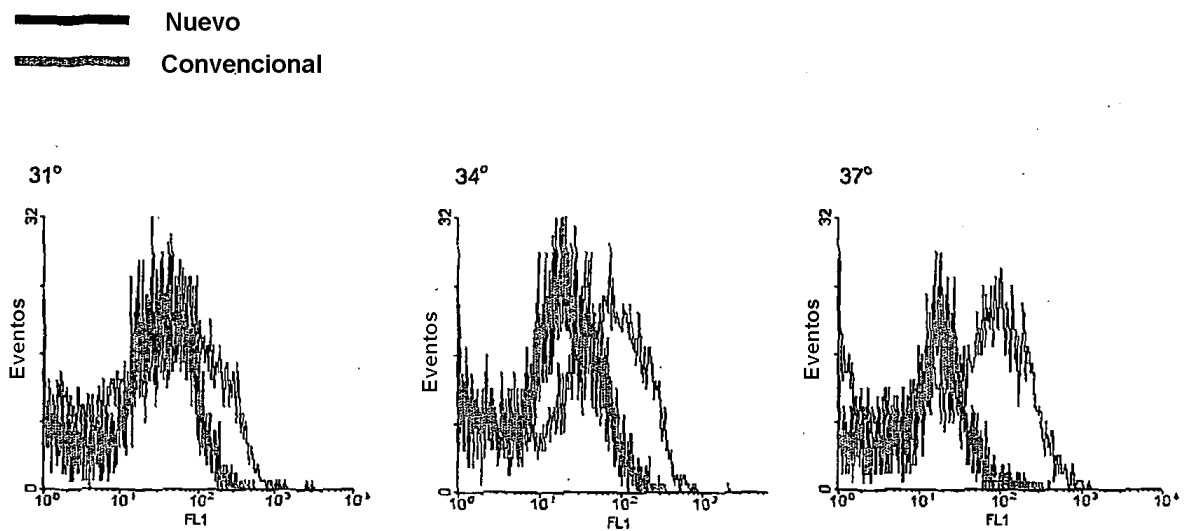


Fig. 5A
Comparación el fenotipo de CD inmaduras y maduras generadas mediante el nuevo método

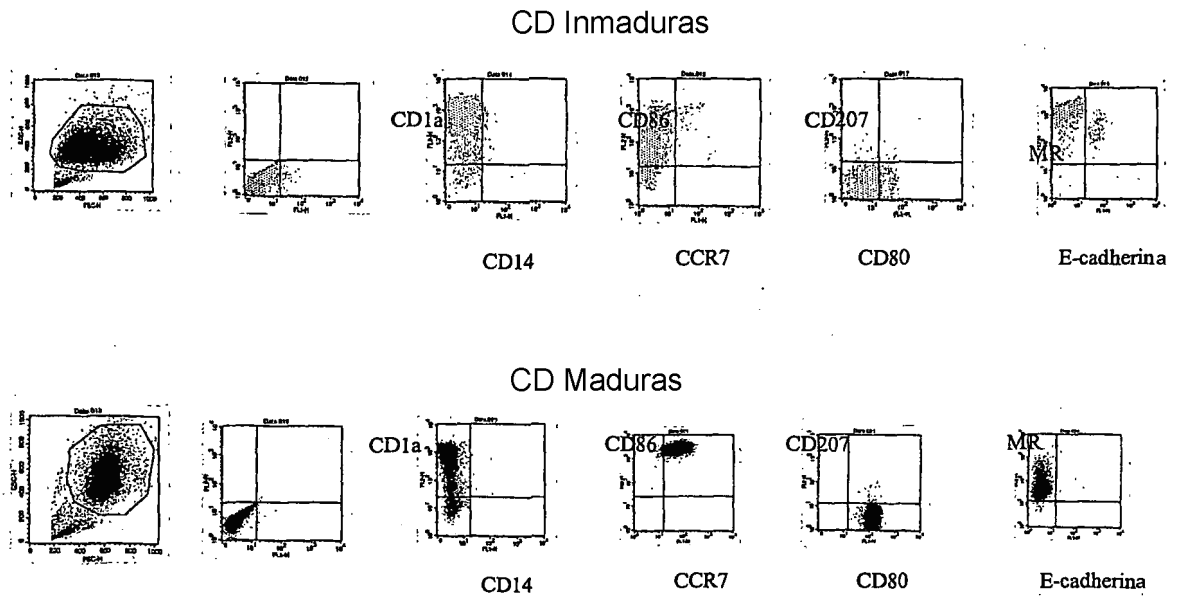
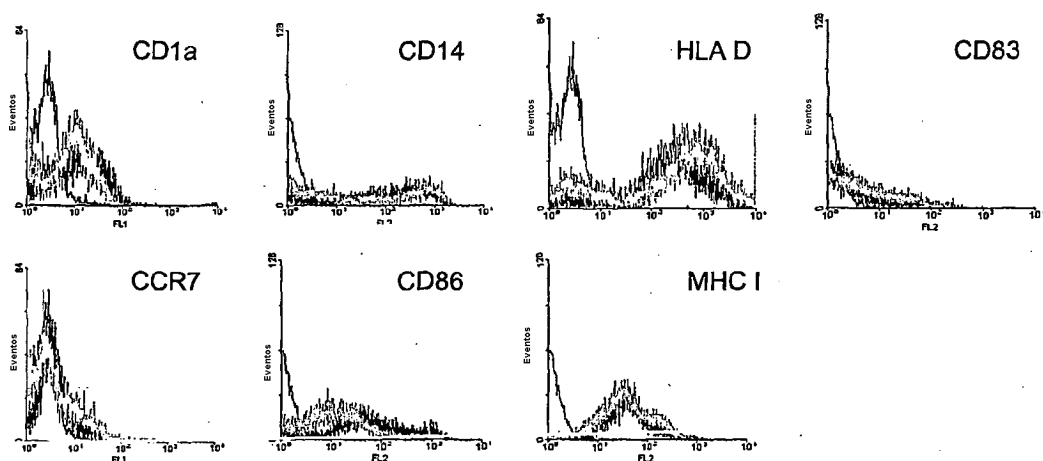


Fig. 5B

**Comparación entre CD generadas de acuerdo con el nuevo método y
CD generadas mediante un método convencional**

CD inmaduras Día 5

— Convencional
— Nuevo



CD maduras Día 8

— Convencional
— Nuevo Método

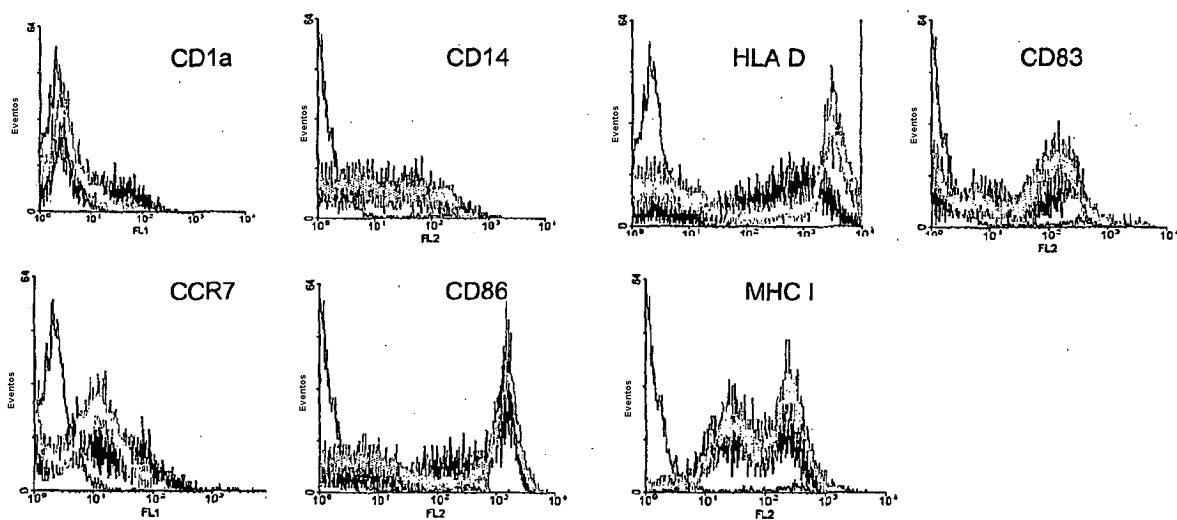


Fig. 6
Ensayo de Estabilidad

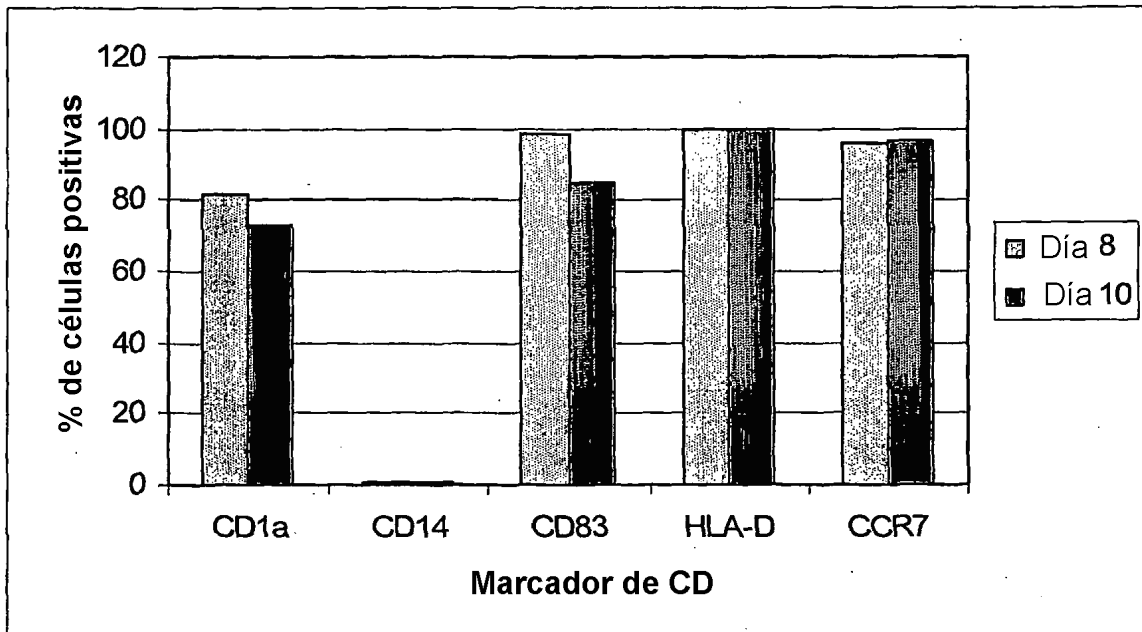
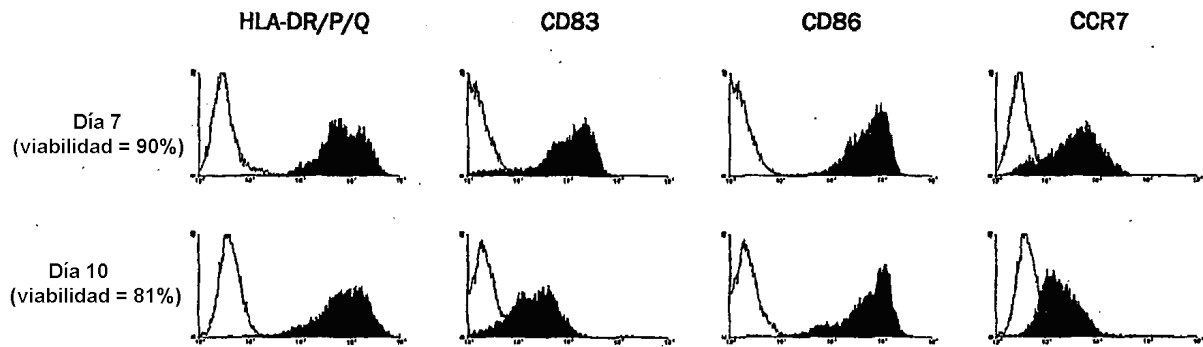


Fig. 7

Las CD mantienen el fenotipo y la capacidad estimuladora de células T hasta el día 10

CD mantienen fenotipo maduro después de 10 días de cultivo



CD mantienen capacidad estimuladora células T tras 10 días de cultivo

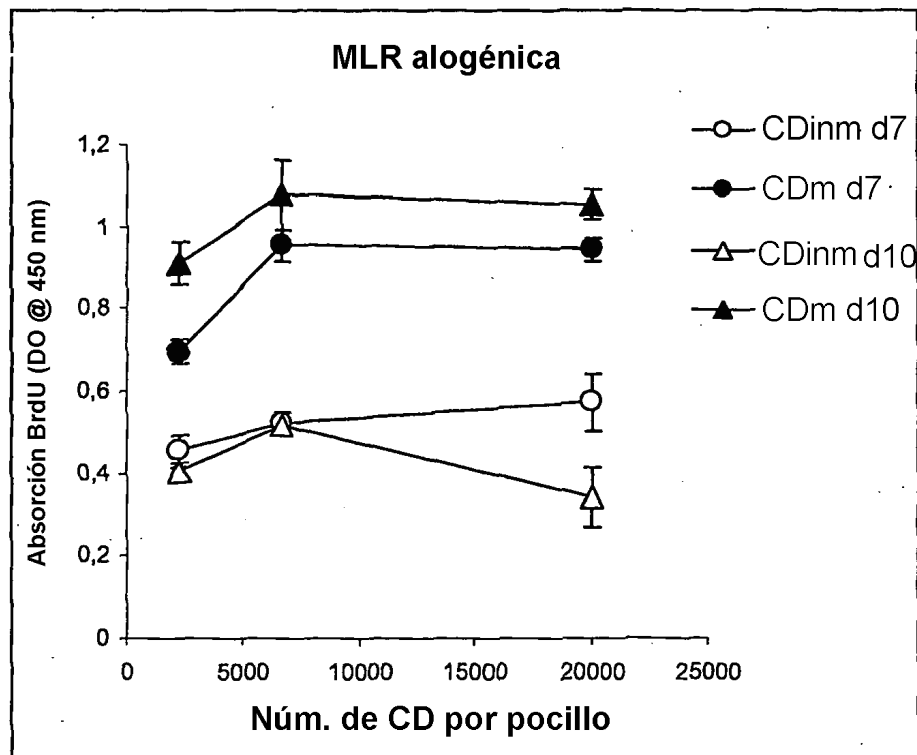


Fig. 8

Alo-reactividad de células dendríticas generadas mediante un “método convencional” (antiguo) o el método de la invención (nuevo)

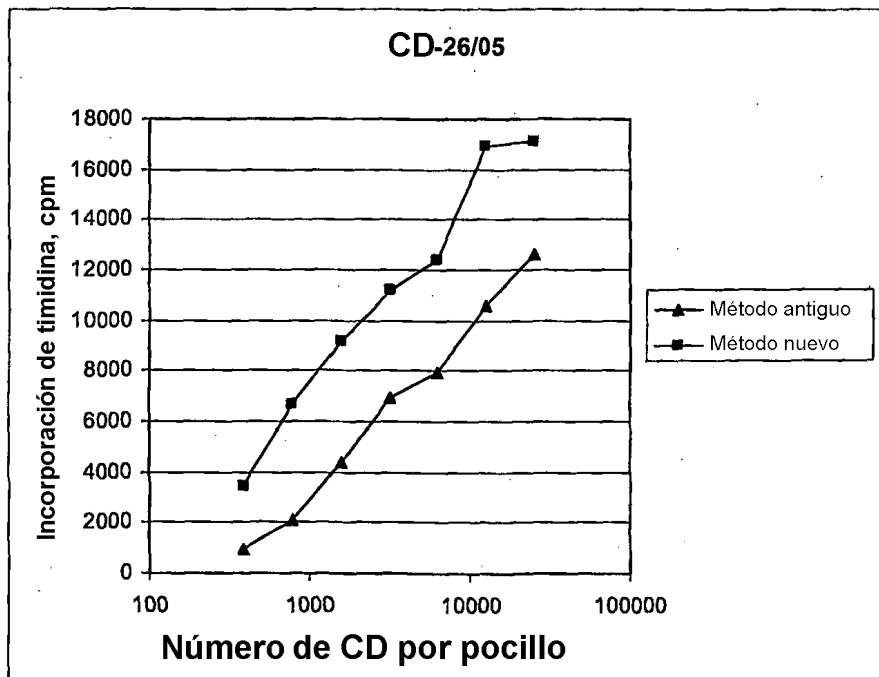
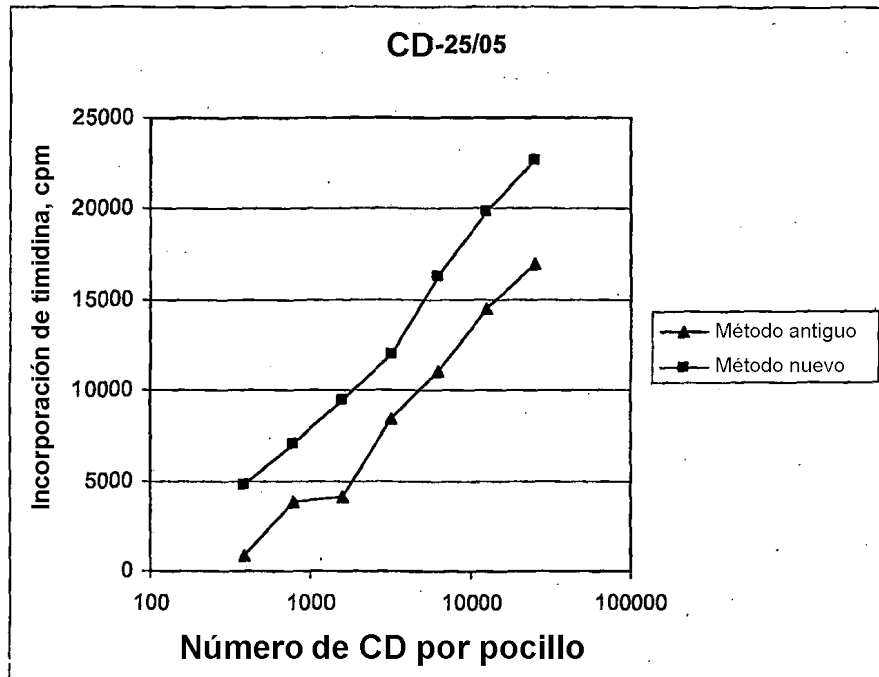


Fig. 9

ELISPOT

