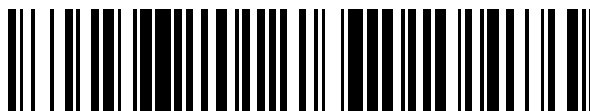


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 769**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.1995** **E 95923042 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014** **EP 0765386**

54 Título: **Métodos para la activación de células T in vivo por células dendríticas pulsadas con antígeno**

30 Prioridad:

14.06.1994 US 259774

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2015

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Stanford, California 94305 , US**

72 Inventor/es:

**ENGLEMAN, EDGAR G.;
LEVY, RONALD;
HSU, FRANK y
BENIKE, CLAUDIA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 530 769 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

Métodos para la activación de células T *in vivo* por células dendríticas pulsadas con antígeno

1. Introducción

La presente invención se refiere a métodos de usar células dendríticas humanas aisladas para presentar antígenos exógenos para la inducción de respuestas inmunitarias *in vivo*. En particular, se refiere al aislamiento de células dendríticas de sangre humana, exposición de las células a inmunoglobulinas derivadas de linfoma como antígenos, reinfusión de las células dendríticas autólogas pulsadas con antígeno en pacientes de linfoma para inducir y/o aumentar una respuesta inmunitaria reactiva a tumores. Los métodos de la invención descritos en el presente documento tienen una amplia gama de aplicaciones, incluyendo pero no limitadas a, el uso clínico de células dendríticas pulsadas con antígeno como vacunas y/o agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer y agentes infecciosos tal como virus.

2. Antecedentes de la invención

2.1. Generación de una respuesta inmunitaria

La introducción de un antígeno exógeno en un individuo provoca una respuesta inmunitaria que consiste en dos componentes principales, las respuestas inmunitarias celular y humoral, mediadas por dos poblaciones funcionalmente distintas de linfocitos conocidos como células T y B, respectivamente. Las células T se pueden dividir adicionalmente en dos subconjuntos por función y fenotipo. Un subconjunto de células T responde a estimulación por antígeno produciendo linfoquinas que "ayudan" o activan varios otros tipos celulares en el sistema inmunitario. Otro subconjunto de células T es capaz de desarrollarse a células efectoras citotóxicas específicas de antígeno, que son capaces de matar directamente las células diana positivas para el antígeno. Por otra parte, la respuesta de células B se lleva a cabo principalmente mediante proteínas secretoras, los anticuerpos. Los anticuerpos funcionan neutralizando antígenos o junto con otras células efectoras del sistema inmunitario mediando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Las células T cooperadoras (TH) se pueden distinguir de los linfocitos T citotóxicos (LTC) clásicos y las células B por su expresión en la superficie celular de un marcador glucoproteína denominado CD4. Aunque el mecanismo por el cual los TH CD4⁺ funcionan no se ha aclarado por completo, se ha descrito la existencia de subconjuntos funcionalmente distintos en el compartimento de células T CD4⁺ (Mosmann y Coffman, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7:145-173). En el ratón, las células T cooperadoras de tipo 1 (TH1) producen interleuquina-2 (IL-2) y γ -interferón (γ -IFN) tras la activación, mientras que las células T cooperadoras de tipo 2 (TH2) producen IL-4 e IL-5. Basado en el perfil de producción de linfoquinas, los TH1 parecen estar implicados en fomentar la activación y proliferación de otros subconjuntos de células T incluyendo LTC, mientras que los TH2 específicamente regulan la proliferación y diferenciación de células B, síntesis de anticuerpos, y cambio de clase de anticuerpo. Algunas células T CD4⁺, como los CTL CD8⁺, parecen ser capaces también de función efectora citotóxica.

Una segunda subpoblación de células T es la LTC clásica que expresa el marcador de superficie CD8. A diferencia de la mayoría de los TH, estas células muestran actividad citolítica tras contacto directo con células diana, aunque también son capaces de producir ciertas linfoquinas. *In vivo*, la función de los LTC es particularmente importante en situaciones donde una respuesta de anticuerpos sola es inadecuada. Hay una preponderancia de evidencia experimental de que los LTC más que las células B y sus productos anticuerpos desempeñan un papel principal en la defensa contra infecciones víricas y cáncer.

Una característica destacada de las respuestas de células tanto T como B es su exquisita especificidad para el antígeno inmunizante; sin embargo, los mecanismos para el reconocimiento del antígeno se diferencian entre estos dos tipos de células. Las células B reconocen antígenos mediante anticuerpos, sea actuando como receptores de superficie celular o como proteínas secretadas, que se unen directamente a antígenos en una superficie sólida o en solución, mientras que las células T solo reconocen antígenos que se han procesado o degradado en fragmentos pequeños y presentados en una fase sólida tal como la superficie de células presentadoras de antígenos. Además, los fragmentos antigénicos se deben presentar a las células T en asociación con moléculas de clase I o clase II codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El MHC se refiere a un grupo de genes que codifican proteínas con diversas funciones inmunológicas. En el hombre, el MHC se conoce como HLA. Los productos de genes de clase I se encuentran en todas las células somáticas, y se descubrieron originalmente como dianas de las principales respuestas de rechazos a trasplantes. Los productos de los genes de clase II se expresan principalmente en células de varios linajes hematopoyéticos, y están implicados en interacciones célula-célula en el sistema inmunitario. Lo que es más importante, se ha mostrado que las proteínas codificadas por el MHC funcionan como receptores para fragmentos antigénicos procesados de la superficie de CPA (Bjorkman et al., 1987, Nature 329: 506-512).

2.2. Células presentadoras de antígenos

La presentación de antígenos a células T se lleva a cabo por poblaciones de células especializadas denominadas células presentadoras de antígenos (CPA). Típicamente, las CPA incluyen macrófagos/monocitos, células B, y células dendríticas (CD) derivadas de médula ósea. Las CD algunas veces también se denominan CPA "profesionales". Las CPA son capaces de internalizar antígenos exógenos, cortándolos en fragmentos más pequeños en vesículas ricas en enzimas, y acoplando los fragmentos a productos de clase I o clase II codificados por MHC para su expresión en la superficie celular (Goldberg y Rock, 1992, *Nature* 357:375-379). Puesto que las CPA expresan tanto glucoproteínas de clase I como de clase II codificadas por MHC, pueden presentar fragmentos antigénicos tanto a células T CD4⁺ como CD8⁺ para el inicio de una respuesta inmunitaria.

Por definición, las CPA no solo pueden presentar antígenos a células T con receptores específicos de antígeno, sino que también pueden proporcionar todas las señales necesarias para la activación de las células T. Tales señales están incompletamente definidas, pero probablemente implican una variedad de moléculas de superficie celular así como citoquinas o factores de crecimiento. Además, los factores necesarios para la activación de células T indiferenciadas o no sensibilizadas pueden ser diferentes de los requeridos para la reactivación de células T de memoria previamente sensibilizadas. La capacidad de las CPA tanto de presentar antígenos como de administrar señales para la activación de células T se denomina comúnmente como una función celular accesoria. Aunque se ha mostrado que monocitos y células B son CPA competentes, sus capacidades presentadoras de antígenos *in vitro* parecen estar limitadas a la reactivación de células T previamente sensibilizadas. Por tanto, no son capaces de activar directamente poblaciones de células T funcionalmente indiferenciadas o no sensibilizadas.

Aunque se ha sabido durante mucho tiempo que las CPA podrían procesar y presentar antígenos a células T, no se mostró hasta relativamente recientemente que pequeños péptidos antigénicos podrían unirse directamente a moléculas codificadas por MHC (Babbitt et al., 1985, *Nature* 317: 359; Townsend et al., 1986, *Cell* 44: 959). Sin embargo, se cree que normalmente, los antígenos complejos se procesan proteolíticamente en fragmentos dentro de las CPA, y se asocian físicamente con las proteínas codificadas por MHC intracelularmente antes de dirigirse a la superficie celular como complejos. Se han propuestos dos rutas distintas para la presentación de antígenos (Braciale et al., 1987, *Immunol. Rev.* 98: 95-114). Se pensaba que los antígenos exógenos eran captados por las CPA, procesados y presentados por la ruta exógena a células T CD4⁺ restringidas a la clase II, mientras que la ruta endógena procesaba proteínas intracelularmente sintetizadas, tal como productos de genes víricos en células infectadas por virus, para la asociación con proteínas de MHC de clase I y presentación a LTC CD8⁺. Aunque las dos rutas en el procesamiento y presentación de antígenos pueden todavía ser correctas en algunos aspectos, la distinción se hace borrosa a la luz de recientes descubrimientos que los antígenos exógenamente añadidos también se pueden presentar a LTC restringidos a la clase I (Moore et al., 1988, *Cell* 54: 777).

El término "célula dendrítica" se refiere a una población diversa de tipos celulares morfológicamente similares encontrados en una variedad de tejidos linfoides y no linfoides (Steinman, 1991, *Ann. Rev. Immunol.* 9:271-296). Estas células incluyen CD linfoides del bazo, células de Langerhans de la epidermis, y células veladas en la circulación sanguínea. Aunque se clasifican colectivamente como un grupo basado en su morfología, altos niveles de expresión de MHC de clase II en superficie, y ausencia de otros ciertos marcadores de superficie expresados en células T, células B, monocitos, y células citolíticas naturales, actualmente no se sabe si derivan de un precursor común o pueden funcionar todas como CPA de la misma manera. Además, puesto que la gran mayoría de artículos publicados han utilizado CD aisladas de bazo de ratón, los resultados de estos estudios pueden no correlacionarse necesariamente con la función de CD obtenidas de otros tipos de tejidos. (Inaba et al., 1987, *J. Exp. Med.* 166:182-194; Hengel et al., 1987 *J. Immunol.*, 139:4196-4202; Kast et al., 1988, *J. Immunol.*, 140:3186-3193; Romani et al., 1989, *J. Exp. Med.* 169:1169-1178; Macatonia et al., 1989, *J. Exp. Med.* 169:1255-1264; Inaba et al., 1990, *J. Exp. Med.* 172:631-6640). Por ejemplo, a pesar de los altos niveles de expresión de MHC de clase II, las células de Langerhans epidérmicas de ratón, a diferencia de las CD esplénicas, no son CPA activas en reacción de leucocitos mixtos (MLR), a menos que se cultiven con factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Witmer-Pock et al., 1987, *J. Exp. Med.* 166:1484-1498; Heufler et al., 1988, *J. Exp. Med.* 167:700-705). La mayoría de las células de Langerhans humanas expresan los marcadores CD1 y CD4, mientras que las CD sanguíneas recién aisladas expresan CD4 débilmente, pero no CD1. Por otra parte, las CD de sangre periférica cultivadas expresan CD1c, pero no CD4. Además, no se ha establecido el nivel al que las características funcionales observadas con CD de ratón son aplicables a CD humanas, especialmente las CD obtenidas de tejidos no esplénicos; en parte, debido a las diferencias inherentes entre los sistemas inmunitarios humano y murino.

Además, la actividad de CD humanas *in vivo* no se ha estudiado antes de la presente invención. Aunque se ha descrito que células dendríticas murinas expuestas a proteínas idiotípicas de células de linfoma de ratón inducen inmunidad tumoral *in vivo*, tal éxito no se ha demostrado en pacientes humanos (Bohlen et al., 1991, *Publicación Internacional No. WO91/13632*). No hay indicación en la técnica de que tal enfoque sea adecuado para el uso clínico. De hecho, se sabe bien en la técnica que el cáncer es una enfermedad complicada, y la terapia realizada en modelos animales no predice adecuadamente su probabilidad de éxito en seres humanos. Tanto la eficacia como la toxicidad de una pauta terapéutica para cáncer humano solo se puede examinar apropiadamente en un ámbito clínico donde todos los factores variables están presentes.

3. Compendio de la invención

La presente invención se refiere al uso de CD dendríticas humanas aisladas y pulsadas con antígeno como CPA *in vivo* para inducir y/o aumentar respuestas inmunitarias específicas de antígeno. También se refiere a una composición farmacéutica que contiene dichas células.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los solicitantes de que las CD humanas parcialmente purificadas de sangre humana por centrifugación en gradiente de densidad secuencial funcionan como CPA potentes *in vivo* en pacientes con linfomas de células B. Como se muestra en el ejemplo 6, posteriormente, cuando se pulsan CD autólogas aisladas con inmunoglobulina "a medida" de células de linfoma de un paciente y se reinfunden en el paciente, se detecta una respuesta proliferativa de células T específicas de idiotipo. Lo que es más importante, el tumor del paciente experimenta una regresión sustancial a lo largo del curso de tal tratamiento. La invención descrita en el presente documento abarca una variedad de usos, incluyendo pero no limitados a, la administración *in vivo* de CD pulsadas con antígeno como vacunas para sensibilizar respuestas inmunitarias primarias y/o como agentes inmunoterapéuticos para aumentar las respuestas inmunitarias secundarias. Tales respuestas se pueden inducir contra cualquier antígeno de interés, que varían desde antígenos tumorales tal como idiotipos de linfoma, proteína supresora tumoral p53, antígeno de melanoma MAGE, y productos de oncogenes a agentes infecciosos tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

4. Breve descripción de las figuras

Figura 1. Se aislaron linfocitos de sangre periférica por centrifugación en gradiente de "FICOLL/HYPAQUE" de la sangre de la paciente sacada en el punto indicado en su pauta de terapia. Las células se sembraron a 4×10^5 células/pocillo de microtitulación con KLH o idiotipo de inmunoglobulina autóloga en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) con suero AB humano al 1%. Después de 3 días de cultivo, las células se pasaron y alimentaron con IMDM que contenía STF al 5% y 30 unidades/ml de IL-2. Después de un total de 5 días a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, las células se pulsaron durante 16 horas con 1 µCi/pocillo de ³H-timidina. Los datos se expresan como cuentas medias/minuto de cultivos cuadruplicados.

Figura 2A-2D. Se obtuvieron escáneres tomográficos computarizados contiguos del tórax antes del tratamiento con CD pulsadas con inmunoglobulina y dos meses después de la cuarta inmunización (recuerdo opcional). La Figura 2A y B demuestran la regresión de adenopatía paraaórtica. La figura 2C y D demuestran la regresión de una masa paracardiaca y adenopatía paraaórtica. Antes del tratamiento, se documentó que estas masas ganglionares progresaban lentamente.

5. Descripción detallada de la invención

Las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpo son polipéptidos compuestos de cadenas pesadas y ligeras, que poseen regiones variables muy específicas en sus extremos amino. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras colectivamente forman el único sitio de reconocimiento del antígeno de la proteína inmunoglobulina. Estas regiones variables contienen determinantes que pueden ellos mismos ser reconocidos como antígenos por el sistema inmunitario, y se denominan idiotipos.

Las neoplasias malignas de células B (linfomas, leucemias y mielomas de células B) son productos de proliferación clonal de células tumorales que sintetizan una única molécula de inmunoglobulina (o anticuerpo monoclonal) con regiones variables únicas en las cadenas pesadas y ligeras. Puesto que tales tumores son monoclonales en origen, la inmunoglobulina expresada por todas las células de un tumor determinado en un paciente es idéntica, y se puede distinguir de las células B normales en virtud de su único idiotipo. Los linfomas de células B son tumores de linfocitos maduros, que generalmente expresan inmunoglobulina en su superficie celular. Los determinantes idiotípicos de la inmunoglobulina de superficie de un linfoma de células B pueden servir por tanto como un marcador específico de tumor para el clon maligno ya que no se expresa por ningún otro tejido en el cuerpo.

Estudios en animales así como en seres humanos han demostrado la utilidad del idiotipo de inmunoglobulina como antígeno específico de tumor y como una diana para inmunoterapia pasiva *in vivo* (Campbell et al., 1990, J. Immunol. 145:1029; Campbell et al., 1988, J. Immunol. 141:3227). La inmunización activa contra determinantes idiotípicos en células B malignas ha producido resistencia al crecimiento tumoral en varios modelos animales de tumores singénicos, así como terapia antitumoral específica contra tumores establecidos (Campbell et al., 1988, J. Immunol. 141:3227; George et al., 1988, J. Immunol. 141:2168). Además, estudios preclínicos en primates no humanos han demostrado que la inmunización óptima con inmunoglobulina derivada de linfomas humanos requiere la conjugación de la proteína a una proteína soporte fuertemente inmunogénica tal como la hemocianina de lapa californiana (KLH) y la emulsión en un adyuvante.

En un estudio reciente, varios pacientes de linfoma con actividad de enfermedad mínima fueron inyectados repetidamente con proteína de idiotipo acoplada a KLH, emulsionada en una formulación adyuvante experimental (Kwak et al., 1992, New Eng. J. Med. 327:1209). Las condiciones de inmunización óptimas requerían el uso tanto de una proteína inmunógena tal como KLH como un adyuvante. En ausencia del adyuvante, se observaron respuestas inmunitarias específicas de idiotipo despreciables. Sin embargo, varios pacientes tratados con la combinación de KLH-idiotipo y adyuvante demostraron una respuesta inmunitaria anti-idiotipo *in vitro* y dos pacientes con

enfermedad perceptible experimentaron regresiones tumorales objetivas. Sin embargo, el uso de un adyuvante inmunológico se asoció con toxicidad. Además, un adyuvante humano aprobado, alumbre, puede no ser eficaz en inducir respuestas anti-idiotípicas.

La presente invención demuestra que en un paciente con linfoma de células B no hodgkiniano que no es elegible para trasplante de médula ósea puede tolerar la infusión de sus propias CD después de incubación *in vitro* de estas células con idiotipo de inmunoglobulina purificado aislado de células tumorales autólogas. Se muestra que el paciente genera una respuesta inmunitaria al idiotipo asociado con el tumor y regresión de la carga tumoral. Puesto que la inmunogenicidad de un antígeno aislado tal como una inmunoglobulina puede ser mala, y su inducción de inmunidad exitosa requiere su conjugación a un soporte inmunogénico y el uso de un adyuvante inmunogénico, las CD pulsadas con antígeno pueden sustituir estos dos requisitos en la presentación de antígenos *in vivo*. Aunque los procedimientos y métodos específicos descritos en el presente documento se ejemplifican usando CD aisladas de sangre humana e inmunoglobulina derivada de linfoma como antígenos, son meramente ilustrativos para la práctica de la invención. Procedimientos y técnicas análogas con igualmente aplicables. Por tanto, se pueden aislar CD de cualquier fuente donde se encuentren usando variantes del procedimiento descrito en el presente documento, pulsar con cualquier antígeno o fragmentos del mismo, y reinfundir en pacientes que contienen células o tejidos que expresan los antígenos para la destrucción inmunológica de tales células y tejidos.

5.1. Aislamiento de células dendríticas humanas

La presente invención se refiere a un sistema de presentación de antígenos que usa CD para la activación de células T *in vivo*. Debido a su presencia en bajos números en la mayoría de los tejidos, las CD se deben primero aislar y enriquecer. Aunque las CD se encuentran tanto en tejidos linfoides como no linfoides, una fuente natural y fácilmente accesible de CD en el hombre es la sangre periférica, que contiene una estimación de menos de 1 CD por 100 glóbulos blancos.

La potencia de la función celular accesoria de las CD en la presentación de antígenos permite el uso de estas células en números relativamente pequeños cuando se enriquecen, y no es necesaria la pureza absoluta para la generación de una respuesta de células T *in vivo*. Sin embargo, lo más preferible es que se use una población de CD muy purificada (>90%) para la administración *in vivo*.

Las CD se pueden aislar de un ser humano normal o de un paciente que padece una enfermedad. Además, tales individuos pueden ser tratados con factores estimulantes de colonias para aumentar su número de CD antes del aislamiento. Por ejemplo, se puede infundir GM-CSF ("LEUKINE", Immunex Corporation, Seattle, WA) en un individuo a 250 mcg/m²/día durante varios días hasta tres semanas por vía intravenosa antes de obtener leucocitos mononucleares de sangre periférica para la purificación de CD. Este procedimiento puede aumentar el rendimiento de CD para pulsar con antígeno y posterior infusión.

Las CD humanas se pueden aislar de cualquier tejido donde residan, usando una variedad de métodos de separación. El ejemplo 6, posteriormente, presenta variantes de tales métodos como ilustraciones para aislar CD de sangre periférica humana. Este procedimiento está principalmente diseñado para evitar la exposición de CD a antígenos tales como suero de ternera fetal, glóbulos rojos de oveja y anticuerpos monoclonales murinos que se han usado en la separación de leucocitos de sangre periférica. Puesto que las CD pueden ser capaces de presentar tales proteínas a células T, incluso en ausencia de otros antígenos exógenamente añadidos, los métodos convencionales de aislamiento de CD pueden producir la activación de células T no específicas para los antígenos de interés, potencialmente enmascarando de esta manera la respuesta buscada. Según este aspecto de la invención, se pueden aislar leucocitos mononucleares de sangre periférica (LMSP) de muestras de sangre, particularmente de capas leucocíticas o leucocitos preparados por aféresis, mediante centrifugación en gradiente de "FICOLL HYPaque" seguido por centrifugación discontinua en "PERCOLL" (Markowitz y Engleman, 1990, J. Clin. Invest. 85:955) seguido por centrifugación discontinua en "METRIZAMIDE" (2-[3-acetamido-5-N-metil-acetamido-2,4,6-triyodobenzamido]-2-desoxi-D-glucosa) o "NYCOPREP 1.068" NYCODENZ, N,N'-bis(2,3 dihidroxipropil)-5-[N-(2,3-dihidroxipropil) acetamido]-2,4,6-trilodo-isoftalamida. La fracción de alta densidad (HD) flotante contiene células T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$, células B, y células NK, mientras que las CD están en la fracción de baja densidad (LD) flotante de "METRIZAMIDE" o "NYCOPREP 1.068". La fracción LD se puede someter después a un segundo gradiente de "METRIZAMIDE" o "NYCOPREP 1.068" para obtener una población adicionalmente enriquecida de CD. Las CD también se pueden enriquecer más usando protocolos adicionales, dependiendo del nivel de pureza requerido. Las CD aisladas se pueden pulsar inmediatamente con cualquier antígeno de interés.

Alternativamente, las CD se pueden aislar por procedimientos que implican centrifugación en gradiente de densidad repetitiva, selección positiva, selección negativa, o una combinación de los mismos. Sin embargo, los métodos de gradiente de densidad anteriormente mencionados son preferidos porque no contienen proteínas xenogénicas en forma de anticuerpos de ratón o glóbulos rojos de oveja que pueden ser internalizados y presentados por las CD antes de la adición de un antígeno exógeno de interés. Los métodos de selección positiva pueden utilizar cromatografía de afinidad con anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie de CD. La selección positiva no requiere necesariamente el uso de anticuerpos que reconozcan determinantes específicos de CD. Por ejemplo, se pueden eliminar primero las células B y los monocitos de la fracción que contiene CD después de la centrifugación

en gradiente de densidad, adhesión a plástico y adsorción del receptor de Fc, después se puede usar un anticuerpo contra un antígeno de MHC de clase II para seleccionar positivamente para CD. La selección negativa incluye modificaciones del protocolo divulgado en el presente documento, anteriormente.

En esencia, una preparación celular que contiene CD se puede hacer reaccionar con uno o más anticuerpos dirigidos a antígenos de la superficie celular no expresados por CD para la eliminación de C no D. Se pueden usar anticuerpos contra cualquier marcador de células T, células B, monocitos, y granulocitos. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen anti-CD3, anti-CD4, anti-CD5, y anti-CD8 específicos para células T; anti-CD12, anti-CD19 y anti-CD20 específicos para células B; anti-CD14 específico para monocitos; y anti-CD16, y anti-CD56 específicos para células citolíticas naturales (Becton Dickinson, San Jose, CA y Ortho Diagnostics, NJ). Estos anticuerpos se pueden aplicar en cualquier combinación repetidamente o de una manera secuencial para el enriquecimiento de CD. Tras la unión a los anticuerpos, las células se pueden eliminar por adsorción a una superficie sólida recubierta con un anticuerpo anti-ratón, ya que la mayoría de los anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de superficie celular tienen origen en ratón, o si los anticuerpos están conjugados con biotina, las células unidas a los anticuerpos se pueden eliminar mediante una superficie recubierta con avidina o estreptavidina; o si los anticuerpos están conjugados a bolas magnéticas, las células que expresan antígenos reconocidos por los anticuerpos se pueden eliminar en un campo magnético (Harlow y Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

5.2. Uso de células dendríticas como células presentadoras de antígeno

El inicio de una respuesta inmunitaria está mediado por CPA, que procesan antígenos complejos en fragmentos más pequeños por degradación enzimática, y los presentan en asociación con moléculas codificadas por MHC a células T. Aunque los macrófagos/monocitos se han estudiado más extensamente como CPA, también se ha mostrado que las CD murinas poseen función celular accesoria potente. La presente invención demuestra que las CD aisladas de sangre humana presentan antígenos para la activación de células T específicas de antígeno *in vivo*.

5.2.1. Sistemas antigénicos para la presentación por células dendríticas

La función celular accesoria potente de las CD proporciona un sistema de presentación de antígenos para virtualmente cualquier epítipo antigénico que las células T y B son capaces de reconocer a través de sus receptores específicos. El ejemplo 6, posteriormente, demuestra que las CD humanas pueden presentar idiotipos de inmunoglobulina como antígenos a células T *in vivo*. La activación de células T se manifiesta por proliferación de células T en respuesta al antígeno. Por tanto, las CD pueden ser útiles *in vivo* en la presentación de antígenos codificados por agentes infecciosos tal como virus, microorganismos y sus productos, así como antígenos tumorales expresados por células cancerosas (Urban y Schreiber, 1992, *Ann. Rev. Immunol.* 10: 617-644).

Los agentes infecciosos contra los que puede ser aplicable la presente invención incluyen, pero no están limitados a, bacterias, parásitos, hongos, y virus. Las multitudes de antígenos codificados por estos agentes, que pueden ser procesados y presentados por CD incluyen, pero no están limitados a, proteínas de superficies externas, y proteínas estructurales incluyendo enzimas internas. Por ejemplo, los antígenos codificados por cualquier gen del genoma del VIH incluyendo los genes env, gag, pol, nef, vif, rev, y tat pueden ser todos presentados por CD *in vivo*. Además, una variedad de otros agentes infecciosos incluyendo virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, citomegalovirus, virus del herpes simple, varicela zoster, especies estafilocócicas y especies de *Mycobacterium* están abarcados dentro del ámbito de la invención.

Además de idiotipos de inmunoglobulinas como antígenos específicos de tumor, un gran número de antígenos asociados a tumores humanos han sido identificados por anticuerpos monoclonales (Reisfeld y Cheresch, 1987, *Adv. Immunol.* 40: 323-377). Aunque estos antígenos celulares se expresan selectivamente en cantidades mayores por ciertas células tumorales, no se ha establecido que provoquen naturalmente una respuesta inmunitaria en pacientes de cáncer o se puedan usar eficazmente para inducir tal respuesta. A diferencia de los modelos tumorales animales en los que se pueden inducir células T y B reactivas al tumor mediante hiperinmunización con células tumorales o antígenos tumorales, las células tumorales humanas intactas o proteínas oncogénicas no se pueden probar fácilmente en seres humanos sin un protocolo clínico aprobado. Por tanto, la mayoría de los estudios en seres humanos han utilizado linfocitos obtenidos de pacientes de cáncer cuyas células presumiblemente se han expuesto a antígenos expresados por sus células tumorales autólogas *in vivo*. Sin embargo, se ha mostrado en algunos sistemas que el desarrollo del tumor va acompañado por una disminución del grado de respuesta inmunitaria específica de tumor mediada por células supresoras, y si es así, las células T aisladas de pacientes de cáncer pueden estar ya bajo la influencia de tal supresión *in vivo* de modo que no funcionan de una manera similar a la de células T obtenidas de huéspedes inmunes a tumores. Además, estos intentos para activar células T humanas reactivas a tumores generalmente han usado monocitos como CPA, que se ha mostrado que son mucho menos eficaces que las CD, especialmente si las células T no se han sensibilizado adecuadamente *in vivo* contra los antígenos tumorales.

Las CD pulsadas con antígeno descritas en el presente documento se pueden usar como adyuvante celular para presentar antígenos tumorales *in vivo*. La función celular accesoria potente de las CD puede presentar antígenos

tumorales a células T de pacientes de cáncer *in vivo*, cuya respuesta inmunitaria es aparentemente inadecuada para eliminar los tumores *in vivo*. Se pueden usar células tumorales enteras en forma viable o irradiada, preparaciones de membrana tumoral, y antígenos tumorales purificados de fuentes naturales o expresados como productos recombinantes para pulsar CD *in vitro*.

Recientemente, se ha mostrado que los productos oncogénicos son capaces de inducir actividades de células T murinas. Por ejemplo, las formas oncogénicas del producto del gen ras p21, y el producto de fusión p210 del gen bcr-abl inducen respuestas proliferativas de células T, cuando se usan para inmunizar ratones (Peace et al., 1991, J. Immunol. 146: 2059-2065; Chen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1468-1472). Por tanto, las proteínas oncogénicas que son diferentes de sus homólogos celulares normales como resultado de sustituciones de aminoácidos pueden poseer nuevos determinantes inmunogénicos que son reconocibles por las células T. No es necesario que tales proteínas se expresen de forma natural en la superficie celular, como proteínas citoplásmicas o nucleares se pueden procesar, unir a productos codificados por el MHC intracelularmente, y translocar a la superficie celular en una forma compleja (Gould et al., 1989, J. Exp. Med. 170: 1051-1056). Puesto de los productos de los oncogenes se expresan en una variedad de tipos tumorales incluyendo cáncer de colon, leucemia y linfoma, las CD pulsadas con antígenos se pueden usar para activar células T *in vivo* contra tales cánceres. Otras moléculas que se asocian con varios tipos de cáncer también están abarcadas por la presente invención, e incluyen, pero no están limitadas a, el producto del gen HER-2/neu (Patente en los Estados Unidos No. 4.968.603), receptor de estrógeno, globulina de grasa de leche, proteína supresora tumoral p53 (Levine, 1993, Annu. Rev. Biochem. 62:623), mucina (Taylor-Papadimitriou, 1990, Publicación International No. W090/05142), telomerasas, proteínas de matriz nuclear, MART-1, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3 (van der Bruggen et al., 1991, Science 254:1643; Celis et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2105), GP100 (Bakker et al., 1994, J. Exp. Med. 179:1005), antígeno carcinoembrionario, tirosinasa y antígenos víricos del papiloma.

Los antígenos bacterianos, parasíticos, fúngicos, víricos y tumorales de origen celular o vírico se pueden introducir en CD por adición a cultivos de CD seguido por incubación, por lisis osmótica de pinosomas después de la captación pinocítica (Moore et al., 1988, Cell 54: 777-785) o por captación en liposomas que contienen antígenos. Los antígenos se pueden usar como polipéptidos enteros naturales purificados, polipéptidos enteros recombinantes purificados, organismos enteros o células en formas viables o muertas, fragmentos de proteínas generados por digestión enzimática o péptidos sintéticos producidos por métodos químicos de fase sólida (Creighton, 1983, Protein Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman and Co., N.Y. pp. 50-60). La cantidad de antígenos necesaria para pulsar CD puede variar dependiendo de la naturaleza, tamaño, y pureza de las moléculas. En general, se pueden usar polipéptidos a 1-100 µg/ml, y péptidos pequeños a 1-50 µg/ml. La introducción por lisis osmótica de pinosomas requiere cantidades mayores de proteínas en el intervalo de 200-500 µg/10⁶ CPA. Alternativamente, genes exógenos que codifican antígenos específicos de interés o vectores de expresión que contienen tales genes o partes de los mismos se pueden incorporar en CD en vectores de expresión usando métodos convencionales, incluyendo transfección, virus vaccinia recombinantes y retrovirus (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Este enfoque causa la expresión continua de genes integrados, lo que produce la ocupación del MHC por los productos génicos. Cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para introducir antígenos exógenos en CD así como cualquier otro comúnmente usado por los expertos en la materia se denominan colectivamente en el presente documento posteriormente pulsado con antígenos de CD.

5.2.2. Inducción de respuestas primarias y secundarias de células T *in vivo*

La presente invención se refiere a un método de activar una respuesta inmunitaria en un paciente humano hacia un antígeno. El método incluye el aislamiento de CD humanas, preferiblemente de sangre periférica, pulsar las células con un antígeno *in vitro*, y después administrar las células pulsadas con antígeno a un paciente cuyas células o tejidos expresan el antígeno.

La capacidad de las CD para procesar y retener fragmentos antigénicos durante varios días permite su uso como potentes inmunógenos *in vivo*. Las CD se pueden pulsar con antígenos según los varios métodos descritos en la sección 5.2.1, anteriormente, lavar, y administrar *in vivo* como vacunas y/o agentes inmunoterapéuticos para la provocación o aumento de una respuesta de células T preexistente pero débil. En un esfuerzo para aumentar el número de CD aisladas para pulsar con antígeno y posterior administración *in vivo*, las células aisladas se pueden expandir primero en número antes de la incubación con los antígenos. Se ha mostrado que GM-CSF y el factor de necrosis tumoral α inducen la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas humanas a CD (Caux et al., 1992, Nature 360:258). Por tanto, las CD aisladas se pueden expandir por tratamiento con tales citoquinas en cultivo.

La inmunización con CD pulsadas con antígeno puede aumentar tanto la magnitud como la especificidad de una respuesta. Puede ser deseable repetir tales inmunizaciones en intervalos de tiempo de días o semanas. La potencia de las CD como CPA puede aliviar la necesidad de usar adyuvantes convencionales para aumentar la respuesta, aunque no excluye el uso de adyuvantes para aumentar más la reactividad inmunitaria. Además, las CD pulsadas con antígeno se pueden administrar en combinación con citoquinas que pueden mantener su número y actividad

durante periodos prolongados *in vivo*. Tales citoquinas incluyen factores estimulantes de colonias tal como GM-CSF e interleuquinas tal como IL-12.

Las CD pulsadas con antígeno se pueden resuspender en cualquier solución salina fisiológica conocida a una concentración suficiente para inducir una respuesta inmunitaria detectada por ensayos que miden la proliferación de células T, citotoxicidad de células T, producción de anticuerpos o reducción del número de células o tejidos positivos para el antígeno. Un paciente habitualmente recibe el número total de CD aisladas pulsadas con el antígeno. Dependiendo del rendimiento de CD después de cada procedimiento de aislamiento, se puede infundir un paciente con varios millones hasta varios cientos de millones de CD. Las células se pueden infundir en pacientes autólogos, alogénicos con HLA coincidente e incluso alogénicos con HLA no coincidente.

6. Ejemplo: Reducción de linfoma de células B inducido por células dendríticas humanas autólogas pulsadas con idiotipo de inmunoglobulina

6.1. Materiales y Métodos

6.1.1. Separación de células

Se obtuvieron CD humanas de capas leucocíticas de pacientes de linfoma después de leucaféresis. Los LMSP se aislaron por centrifugación en gradiente de "FICOLL-HYPACUE" (Boyum, 1968, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21:21-29). Brevemente, se diluyó una capa leucocítica con PBS de Dulbecco sin iones divalentes tales como Ca^{2+} o Mg^{2+} (denominado como DPBS) hasta 10 ml. 10 ml de "FICOLL" se extendieron debajo en cada tubo y se centrifugaron a 1000 x g durante 35 minutos a temperatura ambiente. La interfase se recogió y lavó con DPBS tres veces.

Para separar además varias poblaciones celulares de la fracción de células mononucleares restantes, la preparación se fraccionó adicionalmente sobre un gradiente discontinuo de "PERCOLL" de cuatro capas (30%, 40%, 50,5% y 75%) (Pharmacia, Uppsala, Suecia) (Markowicz y Engleman, 1990, J. Clin. Invest. 85:955). Se preparó la densidad de "PERCOLL" original a 1,130 g/ml de DPBS y se hicieron 15 ml de una solución de "PERCOLL" al 50,5% y se agitó en un tubo de polipropileno cónico para crear una espuma en una superficie de la solución de "PERCOLL". En el tubo se extendieron debajo aproximadamente 6,5 ml de "PERCOLL" al 75%. El tubo se recubrió después suavemente con de 3 a 3,5 ml de "PERCOLL" al 40% gota a gota a lo largo del lateral del tubo que se rotaba lentamente, seguido por un recubrimiento de 2,5 ml de "PERCOLL" al 30% de la misma manera. Los gradientes se mantuvieron en hielo para su uso en aproximadamente 4 horas.

2,5-3x10⁸ LMSP en 5 a 10 ml de DPBS suplementado con suero humano al 5% se extendieron sobre el gradiente discontinuo de "PERCOLL" de cuatro capas. Las células se centrifugaron a 1000 x g durante 20-25 minutos a 4°C. Las células LD (monocitos) se recogieron de la interfase sobre la capa de "PERCOLL" al 50,5%, mientras que los linfocitos y CD se recogieron de la interfase entre las capas del 75% y 50,5%. Las fracciones celulares recogidas se diluyeron con DPBS al menos 3 volúmenes y se centrifugaron a 1000 x g durante 12 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces con DPBS suplementado con suero humano al 5% a 400 x g durante 5-6 minutos a 4°C.

Las células HD (3-7 x 10⁸/50 ml de RPMI que contenía suero humano mezclado al 10%) se cultivaron después durante la noche en recipientes de teflón a 37°C. Después de ello, las células cultivadas se sometieron a centrifugación en gradiente de "METRIZAMIDE" (15,5%) recubriendo las células sobre 10 ml de "METRIZAMIDE" al 15,5% (p/vol) (Sigma Chemical Co.) seguido por centrifugación a 650 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esta fracción se eliminó adicionalmente de monocitos contaminantes mediante un procedimiento de adsorción de fase sólida durante aproximadamente 20 minutos en placas petri recubiertas con IgG humana. La IgG era una preparación comercial probada y aprobada para uso humano intravenoso. Las CD se enriquecieron después sobre un segundo gradiente de "METRIZAMIDE" (14%). Las células HD del primer gradiente de "METRIZAMIDE" consistían en una mezcla de células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, células B y células NK. La pureza de las CD obtenidas usando este procedimiento era del 60-90%.

Alternativamente, las CD se podrían enriquecer después de un cultivo durante la noche por centrifugación sobre un gradiente discontinuo de "NYCOPREP 1.068" (Nycomed Pharma AS, Oslo, Noruega). Se resuspendieron aproximadamente 2,5 x 10⁸ células en 15-20 ml de una solución hecha de DPBS al 85%, suero humano al 10% y EDTA al 5%. Debajo de esto se extendió secuencialmente 4-5 ml de una solución de suero humano al 50%, EDTA al 10% y DPBS al 10%, seguido por 4 ml de una solución de "NYCOPREP 1.068" al 75%, DPBS al 24% y suero humano al 1%, seguido por 8 ml de "NYCOPREP 1.068" al 100%. Las células se centrifugaron a 400 x g durante 13 minutos a temperatura ambiente. La interfase y el precipitado se recogieron y diluyeron con al menos 3 volúmenes de DPBS que contenía suero humano al 10%, y se centrifugó a 800 x g durante 12 minutos a 20°C. Las células se lavaron dos veces con suero humano al 10% en RPMI a temperatura ambiente, y las CD ocuparon el 30-40% de la población celular total. Sin embargo, estas células se podrían enriquecer más por otra ronda de centrifugación en "NYCOPREP" para obtener una fracción LD del 80-90% de CD. Alternativamente, las células LD después del primer paso de "NYCOPREP" se podrían seleccionar negativamente mediante incubación con placas de petri recubiertas con anticuerpos para eliminar las células CD3⁺, CD14⁺, CD16⁺ y CD20⁺. La población de células no adherentes también contenía el 80-90% de CD. Sin embargo, la centrifugación en gradiente de densidad era preferida para

evitar el uso de proteínas xenogénicas en forma de anticuerpos contra marcadores de leucocitos. Todos los procedimientos descritos en el presente documento podrían producir un rendimiento de $1-2,5 \times 10^6$ células a partir de 400-500 ml de sangre completa.

- 5 Se evaluó la pureza de las CD después de cada paso por tinción con un anticuerpo anti-HLA-DR (anti-MHC de clase II) (CA141) conjugado a fluoresceína, y anti-CD14 (anti-monocito) conjugado a ficoeritrina. El análisis citofluorográfico de la población celular entera se evaluó por un separador celular activado por fluorescencia. Las células HLA-DR⁺ pero CD14⁻ representaban la población de CD.

10 **6.1.2. Producción de idiotipo de inmunoglobulina tumoral**

Todos los pacientes tenían un diagnóstico histopatológico de linfoma no hodgkiniano. Los estudios inmunofenotípicos de los tumores mostraron que eran de origen de células B, con la expresión en superficie de moléculas de inmunoglobulina compuestas tanto de cadenas pesadas como ligeras en un patrón monotípico. Se seleccionaron pacientes que tenían linfoma de células B de grado bajo y no eran elegibles para trasplante de médula ósea. Los estudios basales usados para evaluar la enfermedad clínica en todos los pacientes incluían exploración física completa, radiografía de tórax, recuentos sanguíneos y análisis bioquímicos rutinarios, escáner TAC abdominal y pélvico, con o sin linfangiografía bípoda, que eran todos normalmente parte del cuidado clínico rutinario de tales pacientes. Todos experimentaron reclasificación en grados durante el curso del estudio según los procedimientos objetivo usado en la línea basal.

Para producir que el linfoma de células B secrete su inmunoglobulina para su purificación para su uso como antígenos, una suspensión celular obtenida de la muestra de biopsia tumoral se lavó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se mezcló con el heterohibridoma sensible a HAT B5/K6H6 (B5) en una proporción de 1:4 o 1:5 (compañero de fusión:células tumorales). B5 es un heterohibridoma que se produjo por la fusión del compañero de fusión de mieloma de ratón NS-1 con una célula de linfoma humano. El clon B5 ha perdido la capacidad de secretar espontáneamente inmunoglobulina. Se identificó un subclón que había retenido la capacidad de secretar inmunoglobulina cuando se fusionaba con células B humanas. Este subclón se marcó con fármaco de modo que no sobreviviría en medio HAT. Estudios por Carroll et al. (1986, J. Immunol. Methods 89:61) muestran que B5 es un compañero de fusión útil para recatar la secreción de idiotipo de tumores de células B humanas no secretores. No se produce inmunoglobulina de ratón por B5 o hibridomas derivados de él.

La mezcla de células tumorales y células de compañero de fusión se lavó dos veces en solución de sal equilibrada de Hank (HBSS). El sobrenadante se aspiró y el precipitado celular se expuso a polietilenglicol (PEG) al 40% durante 2 minutos. El PEG se diluyó lentamente añadiendo HBSS, y las células se centrifugaron. Las células se resuspendieron después en medio completo (medio RPMI, suero bovino fetal al 10%, glutamina 4 mM) a una densidad de 2×10^6 células por ml, y después se añadieron 0,1 ml a los pocillos de una placa de microtitulación. Veinticuatro horas más tarde después de que las células se hubieran recuperado de la fusión con PEG, la selección para rescatar fusiones se empezó cambiando el medio a medio HAT (medio completo con la adición de hipoxantina 10^{-4} M, timidina $1,6 \times 10^{-3}$ M y aminopterina 4×10^{-5} M). Las placas de microtitulación que contenían las células se incubaron durante 10-20 días a 37°C en un incubador de aire humidificado con CO₂ al 5%. Los sobrenadantes se eliminaron de los pocillos y las células se alimentaron con el medio descrito anteriormente pero sin la aminopterina (medio HT).

Se usó un ensayo ELISA para determinar qué pocillos de la placa de microtitulación contenían hibridomas que secretaban la inmunoglobulina tumoral rescatada. La muestra de biopsia tumoral usada para la fusión celular contenía una gran predominancia de células malignas que expresaban un único tipo de cadena ligera, kappa o lambda. Los pocillos que secretaban inmunoglobulina con el tipo de cadena pesada y ligera correspondientes al inmunofenotipo conocido de la muestra de tumor se seleccionaron y expandieron.

Se diluyeron reactivos específicos de anti-cadena pesada de Ig humana de cabra en tampón bicarbonato de sodio 0,05 M (pH 9,5). Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con este anticuerpo en un volumen de 50 microlitros por pocillo. Las placas se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron después 5 veces con solución salina normal que contenía Triton X al 0,05% (tampón de lavado). La unión no específica se bloqueó incubando los pocillos con leche desnatada al 5% en PBS durante 1 hora y después lavando 5 veces con tampón de lavado. Se añadieron sobrenadantes de hibridoma (50 microlitros por pocillo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron otra vez y se revelaron con 50 microlitros por pocillo de peroxidasa de rábano conjugada a reactivos específicos de anti-cadena ligera de Ig humana de cabra. Las placas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. La reactividad del anticuerpo se determinó por sustrato ABTS añadido y la densidad óptica se leyó a 405 nm usando un lector de placas de microtitulación.

Según crecieron los hibridomas, se probó el contenido de inmunoglobulina de los sobrenadantes usando el ELISA descrito anteriormente. Se compararon diluciones de los sobrenadantes con una curva estándar generada usando inmunoglobulina humana purificada del mismo isotipo que se expresa en el tumor del paciente. Se confirmó que la proteína de idiotipo derivaba del linfoma del paciente clonando y comparando las secuencias de ADN de los genes de la región variable tanto del linfoma como de la fusión de rescate. Los hibridomas que producían constantemente

más de 2 microgramos por ml se expandieron a volúmenes grandes (2000-5000 ml). Se dejó aumentar la densidad celular hasta que el medio se agotó por completo y los sobrenadantes se recogieron y juntaron.

La proteína de idiotipo de tumor rescatada se purificó de sobrenadante total usando cromatografía de afinidad. Para la clase IgM, se acopló un anticuerpo monoclonal murino específico anti-cadena pesada de IgM humana a Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno o una matriz de fase sólida equivalente a una concentración de 2-6 mg/ml de bolas hinchadas (inmunoadsorbente). Los idiotipos tumorales rescatados de la clase IgA se purificaron usando una columna inmunoadsorbente que consistía en un anticuerpo de cabra o ratón específico de anti-IgA humana similarmente acoplado a una matriz de fase sólida. Los idiotipos de la clase IgG se purificaron usando una columna de proteína A acoplada a una fase sólida. El sobrenadante que contenía el idiotipo se dejó fluir por gravedad a través de la columna inmunoadsorbente. Después de la absorción, la columna se lavó con 200 ml de solución salina fisiológica para eliminar la proteína sin unir. El idiotipo se eluyó con tampón glicina-HCl 0,1 M (pH 2,4) usando la absorción a 280 nm para seguir la proteína efluente. El pico de proteína se recogió y el nivel de inmunoglobulina se midió usando una técnica de ELISA o absorción a 280 nm. La pureza de la proteína se determinó por SDS-PAGE.

6.1.3. Preparación de antígenos

Se obtuvo hemocianina de la lapa californiana *Megathura crenulata* (KLH) de Calbiochem, San Diego, California (Cat. #374805). La KLH fue suministrada en una forma que contenía más del 60% de proteína en tampón BES y sulfato de magnesio. La pureza de la proteína, que fue determinada por el vendedor, era mayor del 90%.

Antes del uso, la KLH se dializó extensamente contra solución salina fisiológica y después se pasó a través de una columna de detoxigel (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, Cat. #20339) en PBS a pH 7,4 o se pasó sobre un disco QAE Zeta Prep 15 (LKBm, Broma, Suecia, Cat. #224-202) usando Tris-HCl 25 mM pH 8,0. Se usó un gradiente de cloruro de sodio para eliminar la endotoxina que se adhirió a la columna. El paso repetido de la KLH sobre las columnas redujo la endotoxina a un nivel aceptable. Se usó el ensayo de lisado de amebocitos de limulus (LAL) para seguir los niveles de endotoxina.

La proteína específica de idiotipo purificada y KLH se dializaron después extensamente contra solución salina fisiológica estéril. Cada producto se concentró o diluyó después para alcanzar una concentración final de 1 mg/ml en cloruro de sodio. Las proteínas después se esterizaron por filtración a través de filtros de 0,45 µm. La concentración final se determinó midiendo la absorción a 280 nm o realizando un ELISA en una alícuota pequeña, reemplazable del producto final. El producto final se cargó asepticamente en envases estériles en una campana de flujo laminar. A continuación los viales se congelaron y almacenaron a -20°C hasta que se necesitaron. La esterilidad del producto final se confirmó por un ensayo de cultivo bacteriano de 5 días estándar realizado por un laboratorio clínico.

6.1.4. Pulsado de las células dendríticas con antígenos

Las CD enriquecidas se resuspendieron en medio RPMI a una concentración de aproximadamente un millón de células/ml. Las CD se separaron en dos cultivos independientes de cinco millones de células en placas de 24 pocillos. Cada conjunto de CD se cultivó después bien con proteína inmunoglobulina de idiotipo purificada estéril o KLH a una concentración de cincuenta microgramos/ml durante 4-5 horas o durante la noche en un incubador humidificado a 37°C con CO₂ al 5%.

6.1.5. Inyección de células dendríticas pulsadas con antígeno

Las CD pulsadas con proteína de idiotipo o KLH se lavaron tres veces en solución salina fisiológica, sin pirógenos, grado de inyección y se resuspendieron en un volumen de 100 ml en una bolsa de administración de inyección intravenosa. Para cada infusión, los pacientes recibieron el número total de CD aisladas de su propia sangre. Puesto que cada aislamiento rindió un número diferente de CD, cada infusión celular contenía entre 5×10^6 a 100×10^6 CD pulsadas con antígeno. Los pacientes se premedicaron con acetaminofeno y difenhidramina, y recibieron la transfusión de CD a través de un línea intravenosa periférica o un catéter central (si estaba disponible) durante un periodo de 30-60 minutos. Se siguieron los signos vitales continuamente antes de y durante la infusión. Toda la terapia fue seguida y supervisada de cerca por un médico. Los pacientes recibieron similarmente DC pulsadas con antígeno preparadas hasta cuatro veces.

Cualquier reacción sistémica al procedimiento se anotó cuidadosamente. Las reacciones sistémicas se puntuaron para temperatura, presión sanguínea, y signos de broncoespasmo, vasculitis, y/o formación de complejos inmunitarios. El riesgo de anafilaxia era extremadamente bajo con el uso de células autólogas.

6.1.6. Ensayo para respuesta proliferativa específica de idiotipo

Los ensayos proliferativos se adaptaron de las técnicas de Chain et al. (1987, J. Immunol. Methods 99:221). Se lavaron LMSP recientes, preparados por centrifugación en gradiente de "FICOLL-HYPAQUE", y se sembraron a una concentración de 4×10^5 células por pocillo en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) con suero humano

AB al 1 por ciento (IMDM-AB al 1%). Se añadió KLH o idiotipo de inmunoglobulina autóloga a concentraciones de 0 a 100 µg por mililitro en preparación IMDM-AB al 1% en cuádruplicado. Después de 3 días, las células se dividieron y alimentaron con IMDM que contenía STF al 5% y 30 unidades/ml de IL-2. Después de que las células se incubaran durante un total de cinco días a 37°C en una atmósfera que contenía dióxido de carbono al 5%, se pulsaron durante 16 a 20 horas con timidina marcada con ³H (1 µCi por pocillo). Los datos se expresan como cuentas medias por minuto de incorporación de [³H] timidina menos el fondo.

6.1.7. Ensayo para anticuerpos anti-idiotípicos

Se recubrieron placas de microtitulación con proteína de idiotipo o con un panel de otras inmunoglobulinas del mismo isotipo. Se diluyó en serie el suero de paciente. Se usaron muestras pretratamiento como control negativo. La unión de los anticuerpos en el suero del paciente al panel de prueba de inmunoglobulinas incluyendo el idiotipo del paciente se detectó por anticuerpos de cabra anti-cadena ligera humana-HRP específicos para la cadena ligera opuesta al idiotipo del paciente o por una mezcla de anticuerpos anti-cadena pesada humana específica de isotipo-HRP que no reaccionaban con el idiotipo del paciente.

6.2. Ejemplos

De tres pacientes inscritos en el estudio clínico, uno ha completado cuatro infusiones de CD pulsadas con inmunoglobulina. Este paciente entró en el estudio con enfermedad activa manifestada por masas tumorales fácilmente perceptibles en la tomografía computarizada de rayos X del tórax y abdomen. Después de proporcionar consentimiento informado el paciente se sometió a leucaféresis en el Centro Sanguíneo de la Universidad de Stanford en tres ocasiones a intervalos de cuatro semanas. Se aislaron las CD después de cada leucaféresis y se cultivaron alícuotas iguales (5×10^7 células) durante la noche con KLH o idiotipo de inmunoglobulina que se habían aislado de tumor del propio paciente. Las CD pulsadas con antígeno se lavaron extensamente para eliminar cualquier inmunoglobulina libre, se resuspendieron en solución salina isotónica y se infundieron por vía intravenosa. Dos semanas después de cada infusión, el paciente recibió 0,5 mg de proteína de idiotipo soluble en solución salina fisiológica estéril por vía subcutánea como un refuerzo, y un refuerzo de 0,5 mg separado de KLH estéril en un sitio subcutáneo separado. Las infusiones de células y refuerzos fueron bien toleradas y dos semanas después de cada infusión linfocitos recientes aislados de la sangre periférica se expusieron *in vitro* a dosis graduadas de KLH o idiotipo, y se ensayó su actividad proliferativa.

Antes de la infusión con CD, el paciente fracasó a responder a KLH o idiotipo de inmunoglobulina; sin embargo, después de la infusión de CD los linfocitos del paciente proliferaron en respuesta tanto a KLH como a idiotipo. Como se muestra en la figura 1, hubo poca o ninguna respuesta a estos antígenos antes de la infusión de CD pulsadas con antígeno, hubo respuestas proliferativas significativas después de la infusión inicial, y las respuestas aumentaron después de la tercera infusión. Además, el paciente también produjo anticuerpo anti-idiotípico en el suero que reaccionó con la proteína de idiotipo derivada de tumor del propio paciente. Lo más importante, la carga tumoral del paciente, que había estado aumentando durante más de un año antes de la infusión de CD se redujo en más del 50% cuando se midió después de la tercera infusión de CD pulsadas con antígeno y en casi el 100% después del cuarto tratamiento (Figura 2A-D).

Estos resultados demuestran la viabilidad y seguridad de aislar CD, pulsarlas con un antígeno tumoral, e infundir las células en pacientes autólogos a intervalos repetidos. Además sugieren que tales infusiones están asociadas con la inducción de respuestas inmunitarias clínicamente significativas.

REIVINDICACIONES

1. Uso de células dendríticas humanas aisladas que se han pulsado con un antígeno *in vitro* en la producción de un medicamento para activar una respuesta inmunitaria a un antígeno en un paciente humano.
2. El uso de la reivindicación 1 en el que las células dendríticas se aíslan de sangre periférica humana.
3. El uso de la reivindicación 1 en el que la respuesta inmunitaria está medida por células T.
4. El uso de la reivindicación 1 en el que la respuesta inmunitaria está medida por células B o sus anticuerpos secretados.
5. El uso de la reivindicación 1 en el que el antígeno está producido por células tumorales.
6. El uso de la reivindicación 5 en el que el antígeno está producido por células de tumor de células B.
7. El uso de la reivindicación 6 en el que el antígeno es una inmunoglobulina.
8. El uso de la reivindicación 1 en el que el antígeno es un microorganismo entero.
9. El uso de la reivindicación 1 en el que el antígeno es un virus.
10. El uso de la reivindicación 1 en el que el antígeno es un polipéptido.
11. El uso de la reivindicación 1 en el que el antígeno es un péptido.
12. Una composición farmacéutica que comprende células dendríticas humanas aisladas que se han pulsado con un antígeno *in vitro*.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en la que las células dendríticas se aíslan de sangre periférica humana.
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en la que el antígeno está producido por células tumorales.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14 en la que el antígeno está producido por células de tumor de células B.
16. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 en la que el antígeno es una inmunoglobulina.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en la que el antígeno es un microorganismo.
18. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en la que el antígeno es un virus.
19. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en la que el antígeno es un polipéptido.
20. La composición farmacéutica de la reivindicación 12 en la que el antígeno es un péptido.

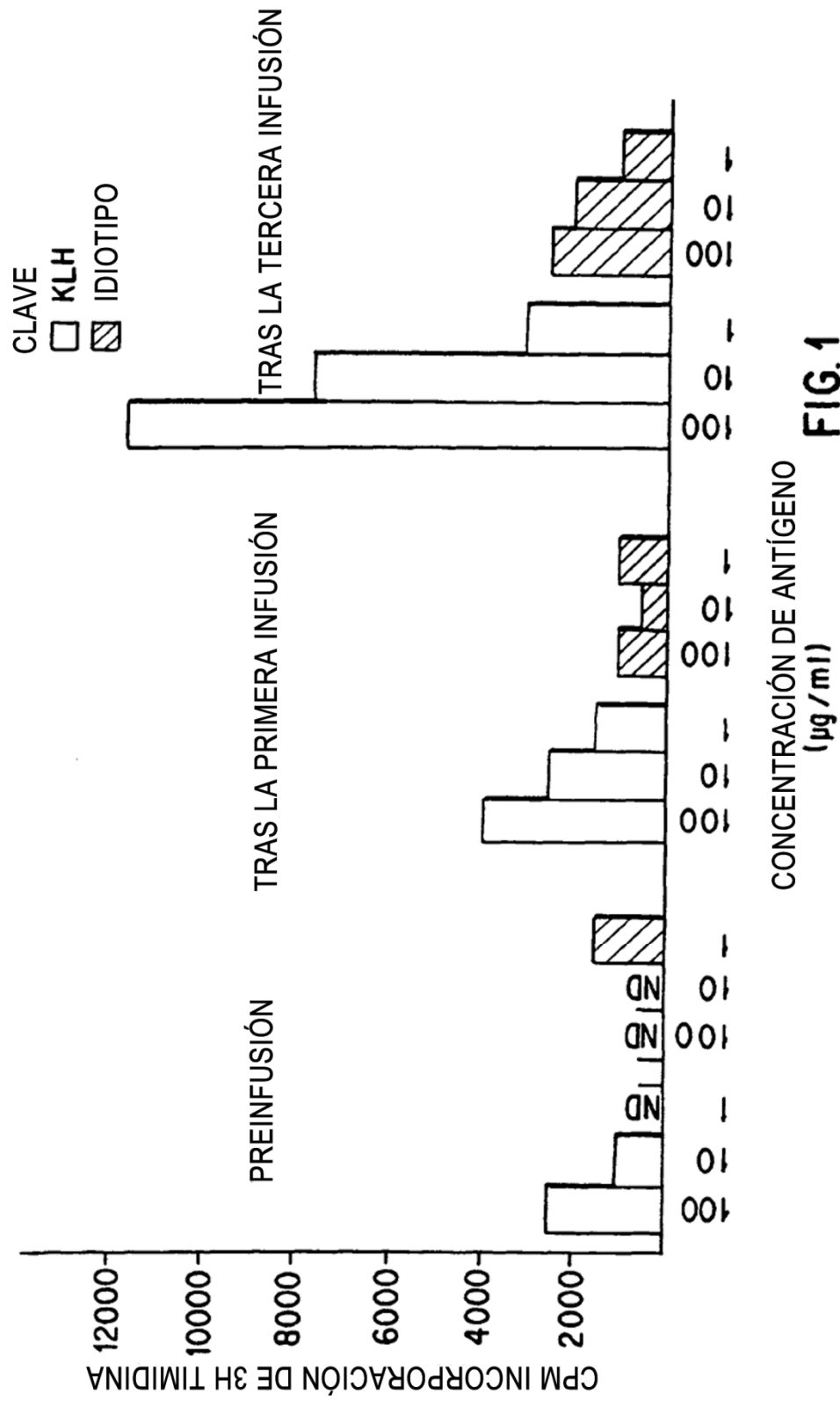


FIG. 1

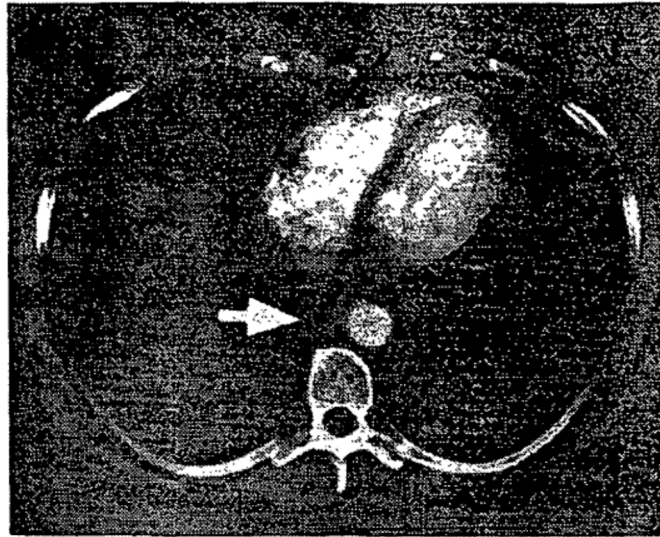


FIG.2A

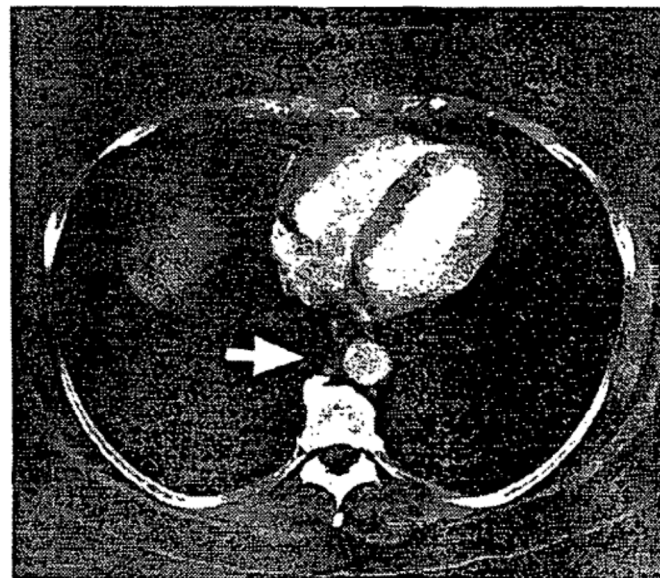


FIG.2B

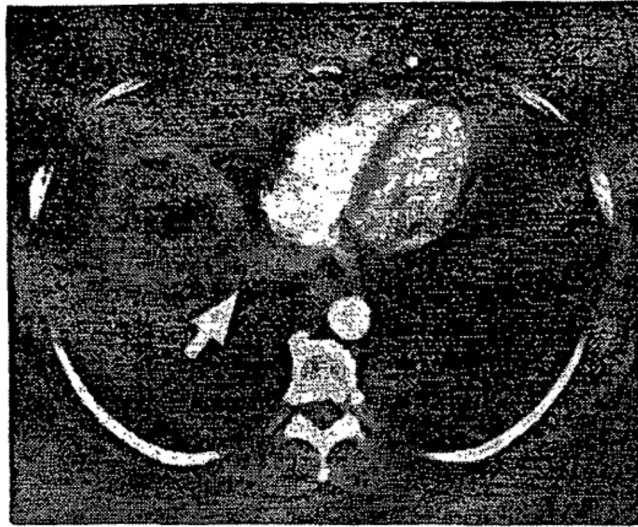


FIG.2C

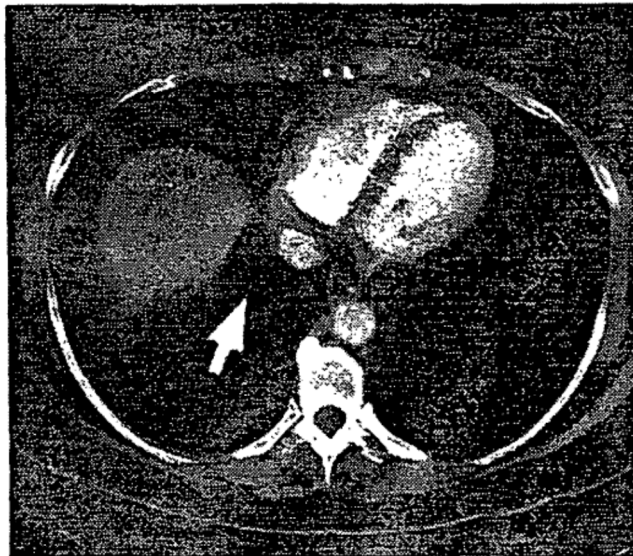


FIG.2D