

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 835**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2007 E 07723717 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2004807**

54 Título: **Composiciones para la preparación de células dendríticas maduras**

30 Prioridad:

28.03.2006 EP 06006373
15.09.2006 US 825822 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2015

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN DEUTSCHES
FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND
UMWELT (GMBH) (100.0%)
INGOLSTÄDTER LANDSTRASSE 1
85764 NEUHERBERG, DE**

72 Inventor/es:

SCHENDEL, DOLORES J.;
BIGALKE, IRIS y
ZOBYWALSKI, ANKE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 535 835 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

Composiciones para la preparación de células dendríticas maduras

La invención se refiere a nuevas composiciones para la preparación de células dendríticas maduras, así como a métodos para la maduración *in vitro* de células dendríticas inmaduras y a los usos terapéuticos de las células dendríticas que se pueden obtener por el método de la invención.

Las células dendríticas (de aquí en adelante DC por la expresión inglesa *Dendritic Cells*) tienen un alto potencial en un paciente como adyuvantes en la inducción de células asesinas y auxiliares específicas de tumores (Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. *The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. Curr. Opin. Immunol.* 2003 Apr; 15(2): 138-47. Review. Banchereau J, Palucka AK. *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat. Rev. Immunol.* 2005 Apr; 5(4):296-306. Review. Salcedo M, Bercovici N, Taylor R, Vereecken P, Massicard S, Duriau D, Vernel-Pauillac F, Boyer A, Baron-Bodo V, Mallard E, Bartholeyns J, Goxe B, Latour N, Leroy S, Prigent D, Martiat P, Sales F, Laporte M, Bruyys C, Romet-Lemonne JL, Abastado JP, Lehmann F, Velu T. *Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. Cancer Immunol. Immunother.* 2005 Sep 27:1-11 [En edición electrónica antes que impresa]).

Para este fin, las células dendríticas maduras que han sido maduras *in vitro* a partir de células dendríticas inmaduras procedentes de un paciente, se cargan con antígenos específicos de tumores y se vuelven a inyectar en el organismo, preferiblemente en los ganglios linfáticos o en su proximidad. En el interior de los ganglios linfáticos las células dendríticas interactúan con los linfocitos T naturales dando como resultado la transducción de señales activas durante la llamada sinapsis inmunológica y la subsiguiente proliferación de linfocitos T efectoras, que a su vez median las respuestas antitumorales como la citotoxicidad (linfocitos T citotóxicos = CTL), la activación de macrófagos y las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado. Las DC regulan las polarizaciones de los linfocitos T auxiliares (h) CD4+. Los linfocitos Th1, por ejemplo, mantienen los CTL por secreción de ciertos patrones de citoquinas (por ejemplo, interferón gamma e IL-2, TNF-beta). Por otro lado, los linfocitos Th2 inducen anticuerpos así como eosinófilos y la desgranulación de los mastocitos por IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. Nat. Immunol.* 2000 Oct; 1(4):311-6, O'Gara, A: *Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity* 1998, 8: 275-283, Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. *Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. Immunol. Today.* 2000 Oct; 21(10):479-83. Review).

Para la terapia con células dendríticas, es esencial que esté disponible un número suficiente de CD principales. Puesto que, en un paciente, sólo el 0,2% de los leucocitos son células dendríticas, es necesario disponer de un método eficaz para la producción *in vitro* de células dendríticas maduras.

En la técnica, se han propuesto varios métodos para la preparación de células dendríticas maduras a partir de células mononucleares de sangre periférica, monocitos u otras células progenitoras mieloides (Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH.: *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. Eur. J. Immunol.* 1997 Dec; 27(12):3135-42). Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Nair SK, Thomas EK, Morse MA, Lysterly HK. *A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. Blood.* 2000 Nov 15; 96(10):3499-504. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilken CM, Kapsenberg ML, Kirkwood JM, Storkus WJ, Kalinski P.: *Alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. Cancer Res.* 2004 Sep 1;64(17):5934-7. Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A.: *Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. Nat. Immunol.* 2005 Aug; 6(8):769-76. Epub 2005 Jul 3. 2005 Aug; 6(8):769-76. 2005. Gautier G, Humbert M, Deauvieu F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EE, Trinchieri G, Caux C, Garrone P.: *A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. J. Exp. Med.* 2005 May 2; 201(9):1435-46. 2005).

Se acepta que el cultivo de células mononucleares de sangre periférica, monocitos u otras células progenitoras mieloides con GM-CSF y con IL-4 o IL-13 da como resultado la producción *in vitro* de células dendríticas inmaduras (Ahn JS, Agrawal B. *IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. Int. Immunol.* 2005 Oct; 17(10):1337-46. Epub 2005 Sep 2). Sin embargo, hasta la fecha, no existe ningún método satisfactorio disponible para la maduración de las células dendríticas inmaduras. Jonuleit H. *et al.*, (1997, supra) describen un proceso de maduración utilizando una composición que comprende TNF- α , IL-1, IL-6 y la prostaglandina E2 (PG) (el denominado cóctel de Jonuleit). Las células dendríticas producidas por incubación de células dendríticas inmaduras con esta composición muestran los marcadores de superficie de células dendríticas maduras y pueden ser así recolectadas. Sin embargo, estas células no producen IL-12p70 activa biológica, que es el factor más importante para la inducción de células Th1 en los ganglios linfáticos.

Mailliard, R. *et al.*, describen una composición que comprende TNF- α , IL-1, interferón α , interferón γ y poli (I:C) (Mailliard, R. *et al.*, 2004, supra.). En contraste con el cóctel de Jonuleit anterior, la incubación de células dendríticas inmaduras con este cóctel llamado de Kalinski da como resultado células dendríticas maduras (como se demuestra por los marcadores de superficie respectivos), que producen IL-12p70. Sin embargo, estas células son muy

adherentes al fondo de los matraces de cultivo y son, por lo tanto, casi imposibles de recolectar. Es, por lo tanto, muy difícil, si no imposible, obtener con este método células dendríticas maduras suficientes para la terapia de vacunación.

5 El documento WO 00/47719 describe un compuesto (R848) que se propone para la preparación de células dendríticas maduras. En los experimentos descritos en esta solicitud, las células dendríticas inmaduras son estimuladas sólo con R848. Sin embargo, R848 como la única sustancia de maduración no es capaz de proporcionar todas las características adecuadas para las células dendríticas clínicas. Todos los experimentos se han llevado a cabo con suero fetal de ternera (FCS) y, por lo tanto, no aplicable en condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP) debido a que las condiciones libres de suero fetal de ternera son cruciales para un proceso de GMP.

10 Por lo tanto, se necesitan todavía métodos mejorados para la preparación de células dendríticas maduras a partir de células dendríticas inmaduras.

La invención proporciona un método para la maduración *in vitro* de al menos una célula dendrítica inmadura, que comprende estimular dicha célula dendrítica inmadura con TNF- α , IL-1 β , IFN γ , un agonista de TLR7/8 y prostaglandina E2 (PG).

15 La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la combinación de TNF- α , IL-1 β , IFN γ , un agonista de TLR7/8 y prostaglandina E2 (PG) es especialmente adecuada para promover la maduración *in vitro* de células dendríticas. Especialmente, y como se demuestra en el Ejemplo, las células dendríticas maduras obtenidas utilizando dicha combinación expresan sorprendentemente IL-12p70 en cantidades considerables y son sorprendentemente fáciles de recolectar, lo que permite obtener células dendríticas maduras en cantidades considerables. Dichas poblaciones de células dendríticas maduras no pudieron ser producidas con los cócteles conocidos en la técnica, y especialmente no con el cóctel de Jonuleit ni con el cóctel de Kalinski, como se explicó anteriormente.

25 Los métodos individuales para la preparación de las células dendríticas maduras, por ejemplo, a partir de células mononucleares de sangre periférica humana, monocitos u otras células progenitoras mieloides, y de las mismas DC inmaduras, que han sido aisladas directamente de la sangre, son conocidos en la técnica (Berger TG, Strasser E, Smith R, Carste C, Schuler-Thurner B, Kaempgen E, Schuler G. *Efficient elutriation of monocytes within a closed system (Elutra) for clinical-scale generation of dendritic cells. J. Immunol. Methods.* 2005 Mar; 298(1-2):61-72. Erratas en: *J. Immunol. Methods.* 2005 Aug; 303(1-2):152. Strasser EF, Berger TG, Weisbach V, Zimmermann R, Ringwald J, Schuler-Thurner B, Zingsem J, Eckstein R. *Comparison of two apheresis systems for the collection of CD14+ cells intended to be used in dendritic cell culture. Transfusion.* 2003 Sep; 43(9):1309-16. Erratas en: *Transfusion.* 2003 Oct; 43(10):1502. Campbell JD, Piechaczek C, Winkels G, Schwamborn E, Micheli D, Hennemann S, Schmitz J. *Isolation and generation of clinical-grade dendritic cells using the CliniMACS system. Methods Mol. Med.* 2005; 109:55-70. Dubsky P, Ueno H, Piqueras B, Connolly J, Bancheau J, Palucka AK. *Human dendritic cell subsets for vaccination. J. Clin. Immunol.* 2005 Nov; 25(6):551-72).

35 Por lo tanto, los métodos básicos, tales como períodos de incubación, medios utilizados, etc., para producir células dendríticas maduras a partir de células dendríticas inmaduras, son conocidos en la técnica. La presente invención se refiere a la utilización de una nueva combinación de factores en el contexto de estos métodos de la técnica anterior. El método de la presente invención puede, por lo tanto, ser realizado fácilmente por los expertos en la técnica, simplemente realizando los métodos de la técnica anterior, pero utilizando la combinación de factores antes identificada durante la incubación de células dendríticas inmaduras con el fin de obtener células dendríticas maduras.

45 Además, puesto que cada uno de los componentes individuales ya ha sido utilizado individualmente en la técnica, los expertos en esta técnica pueden determinar fácilmente a que concentración se debe utilizar cada factor. Adicionalmente, el experto sería capaz de adaptar la concentración individual de un factor dado dependiendo de las composiciones de los factores y componentes del suero que crecen especialmente en el medio de cultivo celular.

50 Como orientación general, TNF- α e IL-1 β se podrían usar a concentraciones desde 1 ng/mL hasta 50 ng/mL, más preferiblemente desde 5 ng/mL hasta 40 ng/mL, e incluso más preferiblemente a 10 ng/mL. La PG se podría usar a concentraciones desde 50 ng/mL hasta 5000 ng/mL, preferiblemente desde 50 ng/mL hasta 1000 ng/mL, incluso más preferiblemente desde 50 ng/mL hasta 500 ng/mL o a concentraciones de 100 ng/mL o 250 ng/mL. El IFN γ podría usarse a una concentración entre 500 U/mL y 10.000 U/mL, preferiblemente entre 1000 y 5000 U/mL, y más preferiblemente a 1000 o 5000 U/mL. Finalmente, el agonista de TLR7/8, preferiblemente R848, podría usarse a una concentración entre 0,2 y 5 μ g/mL, preferiblemente de 0,5 μ g/mL a 2 μ g/mL, más preferiblemente 1 μ g/mL.

55 De acuerdo con la invención, las células dendríticas inmaduras se cultivan con la combinación anterior de factores. Esto se puede realizar añadiendo los factores al medio de cultivo. Alternativamente, el medio de cultivo en el que se han cultivado las células dendríticas inmaduras es sustituido por un medio que ya contiene los factores. En una realización más preferida, las sustancias antes mencionadas son parte de una composición añadida al medio de cultivo de dicha célula dendrítica inmadura.

Dicho medio de cultivo puede ser de cualquier tipo adecuado, es decir, puede contener o no suero humano, puede estar complementado o no con otros suplementos animales, como proteínas, aminoácidos o antibióticos. En una realización preferida, el medio se produce y utiliza bajo condiciones de buenas prácticas de fabricación (GMP).

5 Después que se completa el período de maduración, las DC se pueden recolectar por pipeteo, agitación (manual o mecánica) y lavado con solución salina, componentes del medio (por ejemplo, RPMI) o medio completo sin citoquinas. Las células se pueden recoger, centrifugar y las citoquinas se pueden separar por lavado realizando al menos una o más nuevas puestas en suspensión de las DC sedimentadas.

10 Las células dendríticas inmaduras pueden ser tratadas adicionalmente con un ligando de TLR3, preferiblemente poli (I:C), por ejemplo, a una concentración entre 10 y 50 ng/mL, preferiblemente 20 ng/mL. El ligando de TLR3 se puede añadir por separado a las células o puede formar parte de la composición que comprende también los otros factores.

15 En una realización preferida de la invención, dicho agonista de TLR7/8 es un compuesto de tipo imidazoquinolina modificador de la respuesta inmunitaria, más preferiblemente 4-amino-2-etoximetil- α,α -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolina-1-etanol (R848). La producción de dicho compuesto está descrita con detalle en el documento WO 00/47719. Sin embargo, también se pueden utilizar otros agonistas de TLR7/8 como imiquimod (R837), loxoribina análogo a guanina, agonistas de TLR8 como los RNA monocatenarios que se unen a TLR7/8, por ejemplo, poli (U) monocatenario y RNA40 monocatenario o combinaciones de los agonistas de TLR7/8.

20 En una realización más preferida, la célula dendrítica inmadura utilizada como material de partida del método de la invención es una célula dendrítica inmadura derivada de monocitos. Preferiblemente, se usan progenitores monocíticos obtenidos de sangre periférica o por leucofóresis y enriquecidos por centrifugación en gradiente de densidad, elutriación o simplemente técnicas de adherencia a plástico.

Alternativamente, también es posible obtener células progenitoras monocíticas a partir de células progenitoras CD34+ por diferenciación *in vitro* a células CD14+, por ejemplo, con FLT3L, SCF, TPO, IL-3 y/o IL-6.

25 Preferiblemente, dicha célula dendrítica inmadura se obtiene incubando células mononucleares de sangre periférica, monocitos u otras células progenitoras mieloides humanos con GM-CSF e IL-4 o IL-13. Como ya se ha expuesto anteriormente, los métodos correspondientes son conocidos en la técnica. Además, dichos métodos se describen en el Ejemplo.

30 Se puede usar cualquier medio adecuado para el acondicionamiento fisiológico de células de mamíferos, por ejemplo, que contenga aminoácidos estándares, factores de crecimiento, fuente de carbono, sistema tampón o ciertas sales. El cultivo celular se puede realizar a 37°C de acuerdo con la composición del medio a ciertas concentraciones de CO₂.

Además, las DC inmaduras se pueden obtener directamente de sangre periférica, por ejemplo, por leucofóresis.

En una realización especialmente preferida, la célula dendrítica inmadura es de origen humano, aunque pueden presentarse situaciones, por ejemplo, aplicaciones en investigaciones científicas o en medicina veterinaria, en las que se pueden usar células dendríticas inmaduras cuyo origen sea de otro mamífero.

35 En consecuencia, en una realización preferida adicional, el método de la invención comprende las siguientes etapas:

- a) preparar células mononucleares a partir de sangre periférica,
- b) incubar las células mononucleares de la etapa a) con GM-CSF e IL-4 o IL-13,
- c) incubar las células obtenidas en la etapa b) con un cóctel que comprende TNF α , IL-1 β , IFN γ , un agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) y, opcionalmente, un agonista de TLR3, preferiblemente poli (I:C), y
- 40 d) recolectar la célula o células dendríticas maduras.

En la etapa a), las células mononucleares se pueden obtener por leucofóresis de sangre periférica. Además, las células mononucleares se pueden aislar por separación magnética o por FACS, elutriación o adherencia a plástico o centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, metricamida)

45 Preferiblemente, la incubación en la etapa b) dura de 1 a 9, preferiblemente de 2 a 9, más preferiblemente de 2 a 6 días. Sin embargo, también es factible suprimir las etapas a) o b) si se usan DC inmaduras recién aisladas de sangre periférica/por leucofóresis. Además, es posible que la etapa b) dure sólo horas y se pueda realizar en combinación con la etapa c).

La incubación en la etapa c) puede durar de 12 horas a 72 horas, preferiblemente 24 horas o 20 horas.

50 Como ya se ha expuesto anteriormente, los expertos en la técnica podrán adaptar estos periodos de incubación, si es necesario.

La incubación de las células dendríticas inmaduras y la recolección ya han sido descritas anteriormente.

En una realización más preferida de la invención, la célula o células dendríticas maduras son cargadas además *in vitro* con uno o más antígenos. La carga de las células maduras con dichos antígenos se describe más adelante con más detalle.

- 5 Preferiblemente, se supone que dicho antígeno o antígenos provocan la maduración de los linfocitos T efectores dentro de los ganglios linfáticos.

Más preferiblemente, y como se describe también más adelante, dicha carga se realiza incubando la célula o células dendríticas maduras con al menos un péptido de dicho antígeno o transfectando la célula o células dendrítica con RNA o DNA que codifica el antígeno.

- 10 La invención se refiere además a una población de células dendríticas maduras, obtenibles por el método de la invención, en donde la célula dendrítica inmadura es de origen humano, y en donde se usa TNF α a una concentración de 1 ng/mL a 50 ng/mL, se usa IL -1 β a una concentración de 1 ng/mL a 50 ng/mL, se usa IFN γ a una concentración de 500 U/mL a 10.000 U/mL, se usa el agonista de TLR7/8 a una concentración de 0,2 μ g/mL a 5 μ g/mL, se usa PGE2 a una concentración de 50 ng/mL a 5000 ng/mL y se usa el agonista de TLR3 a una
15 concentración de 10 ng/mL a 50 ng/mL.

Como se ha expuesto anteriormente, las células dendríticas maduras obtenidas por el método de la invención producen cantidades considerables de IL-12p70 y son fáciles de recolectar. Estos efectos combinados no se observaron ni con el cóctel de Jonuleit ni el de Kalinski en los experimentos presentados en la presente memoria (véase el Ejemplo).

- 20 Como se demuestra en el Ejemplo y especialmente en las Figuras 7 y 8, la población de células dendríticas maduras de la invención es capaz de estimular la producción de interferón-gamma tanto de las células asesinas naturales (Figura 8) como de los linfocitos T específicos de péptidos (Figura 7).

- En consecuencia, las células dendríticas obtenibles por el método de la invención son especialmente adecuadas en el contexto de la activación *in vivo* de linfocitos T, con el fin de tratar enfermedades en las que sea necesaria dicha
25 activación de linfocitos T. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende la población de células dendríticas maduras. Además, la invención se refiere también a la población de células dendríticas maduras para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedades oncogénicas y enfermedades infecciosas (por ejemplo, provocadas por virus, bacterias, bacterias u hongos intracelulares).

- 30 En una realización preferida, dicha población de células dendríticas maduras es obtenible por un método de la invención en el que las células se incuban también con poli (I:C). Como se ha indicado anteriormente, dichas células dendríticas son especialmente capaces de estimular las células NK y son tan potentes como las células incubadas de acuerdo con la invención sin poli (I:C) en la estimulación de linfocitos T específicos de péptidos.

- Preferiblemente, para el tratamiento de las enfermedades anteriores, las células dendríticas se cargan *in vitro* con
35 antígenos que se supone que provocan la maduración de los linfocitos T efectores dentro de los ganglios linfáticos. Dichos métodos son conocidos en la técnica (Dieckmann D, Schultz ES, Ring B, Chames P, Held G, Hoogenboom HR, Schuler G. *Optimizing the exogenous antigen loading of monocyte-derived dendritic cells. Int. Immunol.* 2005 May; 17(5):621-35. Epub 2005 Apr 11. Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, Fukuda T, Saotome H, Ryan JL, Kufe DW, Ohno T. *Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin-12. J. Immunother.* 2004 Nov-Dec; 27(6):452-9. Gong J, Koido S, Kato Y, Tanaka Y, Chen D, Jonas A, Galinsky I, DeAngelo D, Avigan D, Kufe D, Stone R. *Induction of anti-leukemic cytotoxic T lymphocytes by fusion of patient-derived dendritic cells with autologous myeloblasts. Leuk. Res.* 2004 Dec; 28(12):303-12. Grunebach F, Kayser K, Weck MM, Muller MR, Appel S, Brossart P. *Cotransfection of dendritic cells with RNA coding for HER-2/neu and 4-1 BBL increases the induction of tumor antigen specific cytotoxic T lymphocytes. Cancer Gene Ther.* 2005 Sep; 45 12(9):749-56. Kyte JA, Kvalheim G, Aamdal S, Saeboe-Larssen S, Gaudernack G. *Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination. Cancer Gene Ther.* 2005 Jun; 12(6):579-91. Navabi H, Croston D, Hobot J, Clayton A, Zitvogel L, Jasani B, Bailey-Wood R, Wilson K, Tabi Z, Mason MD, Adams M. *Preparation of human ovarian cancer ascites-derived exosomes for a clinical trial. Blood Cells Mol. Dis.* 2005 Sep-Oct; 35(2):149-52. Escudier B, Dorval T, Chaput N, Andre F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulaire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Lantz O, Tursz T, Angevin E, Zitvogel L. *Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. J. Transl. Med.* 2005 Mar 2; 3(1):10. Kawamura K, Kadowaki N, Suzuki R, Udagawa S, Kasaoka S, Utoguchi N, Kitawaki T, Sugimoto N, Okada N, Maruyama K, Uchiyama T. *Dendritic cells that endocytosed antigen-containing IgG-liposomes elicit effective antitumor immunity. J. Immunother.* 2006 Mar-Apr; 29(2):165-74. Griffioen M, Borghi M, Schrier PI, Osanto S, Schadendorf D. *Analysis of T-cell responses in metastatic melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with tumor lysates. Cancer Immunol. Immunother.* 2004 Aug; 53(8):715-22. Epub 2004 Mar 3. Su Z, Dannull J, Yang BK, Dahm P, Coleman D, Yancey D, Sichi S, Niedzwiecki D, Boczkowski D, Gilboa E, Vieweg J.

Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. J. Immunol. 2005 Mar 15; 174(6):3798-807).

La carga de células dendríticas con antígenos respectivos podría realizarse por desplazamiento competitivo de péptidos dentro de soluciones del surco de unión al MHC, o para antígenos más complejos, como proteínas y lisados tumorales originales o lisados de líneas de células tumorales, por medio de fagocitosis de las DC inmaduras y un tratamiento apropiado. También son factibles métodos de transfección (lipofección, electroporación o simplemente incubación de ácidos nucleicos desnudos) y la introducción de ácidos nucleicos, tales como plásmidos que codifican antígenos, RNA o DNA de ellos y especialmente RNA de tumores originales o líneas de células tumorales en las DC. También puede ser posible utilizar como fuentes de antígenos de cualquier tipo otras combinaciones antigénicas con moléculas de MHC originales, tales como fragmentos de membranas o exosomas.

Como se ha indicado anteriormente, la población de células dendríticas maduras se puede administrar directamente al organismo para producir linfocitos T activos contra, por ejemplo, un tipo de célula cancerosa seleccionado. La administración de estas células, frecuentemente con vehículos farmacéuticamente aceptables, se realiza por cualquiera de las vías utilizadas normalmente para la introducción de una célula en contacto final con las células de sangre o de tejidos de mamífero.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vías intra-articular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea (preferiblemente intradérmica o subcutánea), incluyen vehículos tales como soluciones para inyección estériles isotónicas acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hagan que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de puesta en suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. La administración por vía intravenosa o intraperitoneal es el método de administración preferido para las células dendríticas de la invención.

La dosis de las células dendríticas administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para producir con el tiempo una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente, o para inhibir el crecimiento de células cancerosas o para inhibir una infección. Así, las células se administran a un paciente en una cantidad suficiente para provocar una respuesta de CTL eficaz al virus o al antígeno tumoral y/o para aliviar, reducir, curar o detener al menos parcialmente los síntomas y/o complicaciones de la enfermedad o infección. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". La dosis se determinará teniendo en cuenta la actividad de las células dendríticas producidas y el estado del paciente, así como el peso o área superficial del paciente que ha de tratarse. La magnitud de la dosis será determinada también teniendo en cuenta la existencia, naturaleza y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañen la administración de una célula particular en un paciente particular. Para determinar la cantidad eficaz de la célula que se ha de administrar en el tratamiento o profilaxis de enfermedades tales como cáncer (por ejemplo, melanoma metastásico, cáncer de próstata, etc.), el médico necesita evaluar los niveles circulantes en plasma, la toxicidad del CTL, la progresión de la enfermedad y la inducción de la respuesta inmunitaria contra cualquier tipo de célula introducida.

Antes de la infusión, se obtienen muestras de sangre y se conservan para su análisis. Generalmente, al menos aproximadamente 10^4 a 10^6 , y típicamente entre 10^8 y 10^{10} , células se infunden por vía intravenosa o intraperitoneal a un paciente de 70 kg durante aproximadamente 60-120 minutos. Preferiblemente, se usan números de células de al menos 10^7 /punto de vacunación. Las inyecciones pueden ser repetidas, por ejemplo 4 veces, en un intervalo de 2 semanas y se deben administrar preferiblemente cerca de los ganglios linfáticos por inyecciones intradérmicas o subcutáneas. Se pueden realizar inyecciones de recuerdo después de una pausa de 4 semanas. Se monitorizan atentamente los signos vitales y la saturación de oxígeno por oximetría de impulsos. Las muestras de sangre se obtienen 5 minutos y 1 hora después de la infusión y se conservan para su análisis. Aproximadamente cada mes se repite la reinfusión de células en un total de 10-12 tratamientos en un período de un año. Después del primer tratamiento, las infusiones se pueden realizar en ambulatorio según el criterio del médico. Si la reinfusión se administra en ambulatorio, el participante es monitorizado durante al menos 4 horas después de cada terapia.

En cuanto a su administración, las células de la presente invención se pueden administrar a una tasa determinada por la DL_{50} (u otra medida de la toxicidad) del tipo de células y los efectos secundarios del tipo de células a diversas concentraciones, con relación al peso y la salud general del paciente. La administración se puede realizar en una sola dosis o en dosis divididas. Las células de esta invención pueden complementar otros tratamientos de un estado por terapia convencional conocida, incluyendo agentes citotóxicos, análogos de nucleótidos y modificadores de la respuesta biológica. Del mismo modo, opcionalmente se añaden modificadores de la respuesta biológica al tratamiento por células dendríticas. Por ejemplo, las células se administran opcionalmente con un adyuvante, una citoquina, tal como GM-CSF, IL-12 o IL-2, o con KLH.

Como se ha indicado anteriormente, la invención también se refiere al uso combinado de TNF- α , IL-1 β , IFN γ , un agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) y, opcionalmente, un agonista de TLR3, preferiblemente poli (I:C) para la preparación de al menos una célula dendrítica madura. Además, la invención se refiere también a una composición que comprende TNF- α , IL-1 β , IFN γ , un agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) y, opcionalmente, un agonista de TLR3, preferiblemente poli (I:C). Como se ha indicado anteriormente, en ambos casos,

preferiblemente dicho agonista de TLR7/8 es un compuesto modificador de la respuesta inmunitaria de tipo imidazoquinolina, preferiblemente 4-amino-2-etoximetil- α,α -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolina-1-etanol (R848).

Breve descripción de las Figuras

Figura 1:

5 Generación de diferentes células dendríticas maduras (DC)

A. Recuperación de las DC recolectadas después del cultivo de células primarias (6 días de diferenciación + 24 horas de maduración) calculada con relación a todas las células sembradas (células mononucleares) o a los monocitos CD14+ detectados por recuento manual en la cámara de Neubauer y análisis por FACS (CD14). La viabilidad detectada debido a la incorporación cuantitativa de 7AAD se midió dentro de FL-3 de FACS Calibur. La línea discontinua indica los niveles de las DC maduras con el cóctel de Jonuleit patrón oro.

B. Expresión en superficie de moléculas específicas de DC para las DC después de cultivo de DC primarias. La baja expresión de CD14 en comparación con la alta expresión de la molécula CD83 específica de DC indica un estado maduro de las DC, detectado por análisis por FACS (porcentaje de todas las células sin ventana de restricción, adquisición de 10.000 células en total).

15 C. Expresión en superficie de las moléculas co-estimuladoras, CD80 y CD86, después de cultivo de DC primarias detectada por análisis por FACS. Expresión del receptor 7 de quimioquinas (CCR7=CD197) como indicación del potencial migratorio de las DC en los ganglios linfáticos. Se detecta un porcentaje positivo de acuerdo con la superposición con el anticuerpo de control isotípico.

20 DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IL-6 (15 ng/mL) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/mL)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IFN alfa (3000 UI/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

DC3 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (100 ng/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + R848 (1 μ g/mL)

25 DC4 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 μ g/mL)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 μ g/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

30 Figura 2:

Estabilidad de la maduración (Ensayo de separación por lavado) de diferentes DC maduras

Las DC se separaron por lavado de las citoquinas y se cultivaron 40 horas más después de maduración con un medio de cultivo de DC solo con suero y gentamicina.

35 A. Viabilidad de diferentes DC maduras después de la separación por lavado detectadas debido a la incorporación de 7AAD.

B. Bajos niveles de expresión en la superficie de CD14 inducidos en comparación con los altos niveles de expresión de CD83 después de separación por lavado.

C. Expresión de las moléculas co-estimuladoras, CD80 y CD86, y CCR7 después de la separación por lavado.

40 DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IL-6 (15 ng/mL) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/mL)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IFN alfa (3000 UI/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

45 DC3 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (100 ng/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + R848 (1 μ g/mL)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 μ g/mL)

50 DC5 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 μ g/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

Figura 3:**Crioconservación de diferentes DC maduras.**

Las DC fueron congeladas y conservadas bajo una fase gaseosa de nitrógeno líquido y analizadas después de descongelación.

- 5 A. Viabilidad de diferentes DC maduras después de la separación por lavado detectadas debido a la incorporación de 7AAD.
- B. Bajos niveles de expresión en la superficie de CD14 en comparación con los altos niveles de expresión de CD83 después de congelación.
- C. Expresión de las moléculas co-estimuladoras, CD80 y CD86, y CCR7 después de congelación.
- 10 DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IL-6 (15 ng/mL) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/mL)
- DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IFN alfa (3000 UI/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)
- 15 DC3 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (100 ng/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)
- DC4 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)
- DC5 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

20 Figura 4:**Análisis de la capacidad aloestimuladora de diferentes DC maduras en una reacción linfocitaria mixta.**

- A. Control funcional de la capacidad proliferante de los linfocitos T autólogos: solo linfocitos T dentro del medio, linfocitos T estimulados con la tercera parte (= cinco donantes de MNC mixtos) (irradiados 10^5 /pocillo con 4000 rad, relación linfocitos estimuladores:linfocitos respondedores 1:1), linfocitos T + IL-2 (5 UI/mL) y PHA 10 µg/mL últimas 68 horas, linfocitos T estimulados con 50 UI/mL de IL-2. Número de linfocitos T 10^5 /pocillo. Después de un co-cultivo durante 7 días, se midió la proliferación por incorporación de 3H-timidina las últimas 24 horas. Todos los valores se calculan de cinco pocillos repetidos.
- 25 B. Control funcional de la capacidad proliferante de un linfocito T respondedor alogénico ilustrativo.
- C. Control negativo de la proliferación de diferentes DC maduras irradiadas (4000 rad) (10^4 /pocillo, de acuerdo con el número de linfocitos de la relación de ensayo de DC:linfocitos respondedores 1:10)
- 30 D. Proliferación de linfocitos T autólogos estimulados por diferentes DC maduras (número de DC 10^4 /pocillo, número de linfocitos T 10^5 , relación de DC:linfocitos respondedores 1:10)
- E. Proliferación de un linfocito T respondedor alogénico ilustrativo estimulado por diferentes DC maduras (número de DC 10^4 /pocillo, número de linfocitos T 10^5 , relación DC:linfocitos respondedores 1:10).
- 35 F. Resumen de los datos de proliferación de tres linfocitos T respondedores independientes en comparación con linfocitos T autólogos estimulados por diferentes DC maduras.
- DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IL-6 (15 ng/mL) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/mL)
- 40 DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IFN alfa (3000 UI/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)
- DC3 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (100 ng/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)
- 45 DC4 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)
- DC5 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

Figura 5:

Producción de IL-12p70 e IL-10 por DC maduras utilizando diferentes cócteles

Se cultivaron DC inmaduras con diferentes cócteles de maduración y se determinaron las cantidades de IL-12p70 e IL-10 por ELISA estándar. Las barras rellenas indican IL-12p70 y las barras vacías IL-10, respectivamente.

- 5 A. Medio sobrenadante de cultivos primarios de maduración después de 7 días.
 B. Medio sobrenadante de cultivos de DC maduras y lavadas y los fibroblastos transfectados por CD40L después de un período de co-cultivo de 24 horas, lo que representa un ensayo de la señal 3 como se describe en Materiales y Métodos.

10 C. Se determinaron los cocientes IL-12p70/IL-10 para las poblaciones de DC maduras en diferentes cócteles, basándose en los valores de pg/mL del ensayo de la señal 3.

Para el cálculo se supuso que IL-12p70 e IL-10 tienen un potencial biológico teóricamente igual. Los círculos rellenos indican un cociente positivo entre 0 y 3,5, las líneas de puntos valoran las intensas diferencias de las DC maduras con el cóctel de Jonuleit o Kalinski para la secreción de IL-12p70.

15 DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IL-6 (15 ng/mL) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/mL)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IFN alfa (3000 UI/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

20 DC3 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (100 ng/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)

25 DC5 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

Figura 6:

Expresión de la EGFP en las DC transfectadas con RNA transcrito *in vitro* que codifica la EGFP

30 Las superposiciones de histogramas de citometría de flujo muestran el RNA transfectado de la EGFP en DC maduras (curvas rellenas) 24 horas después de la electroporación y las correspondientes DC no transfectadas (curvas vacías) como controles negativos. Las DC fueron maduras en los cuatro cócteles indicados, se introdujo el RNA por electroporación, las DC fueron devueltas a sus medios correspondientes que contenían los cócteles de maduración y se recolectaron para citometría de flujo 24 h más tarde. Los números indican los porcentajes de las DC positivas a la EGFP y sus intensidades de fluorescencia medias. Estos datos son representativos de dos experimentos con mediciones a las 24 y 48 horas.

35 DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IL-6 (15 ng/mL) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/mL)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IFN alfa (3000 UI/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

40 DC4 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

Figura 7:

45 **Respuesta de los linfocitos autólogos de un donante positivo a HLA-A*0201 a DC pulsadas con péptidos de virus**

50 Se evaluaron las respuestas de linfocitos T en un experimento de IFN γ -ELISPOT usando linfocitos (fracción 3 de Elutra enriquecida con linfocitos T = 54,76% de células CD3+) que fueron activados en primer lugar durante 7 días con DC maduras pulsadas con péptidos y a continuación estimulados de nuevo durante 24 horas con monocitos más péptidos de CEF. Para los análisis ELISPOT, se estimularon 4×10^3 linfocitos activados *in vitro* autólogos con 2×10^3 monocitos junto con la mezcla de cinco péptidos de CEF. Se calculó la media \pm error típico para los pocillos por

triplicado. Nota: debido a las insuficientes recuperaciones, no se incluyeron en el ensayo los linfocitos activados por las células DC2.

DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IL-6 (15 ng/mL) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/mL)

5 DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IFN alfa (3000 UI/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

DC3 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (100 ng/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)

10 DC4 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

15 **Figura 8:**

Respuesta al interferón-gamma de los linfocitos autólogos estimulados con DC maduras

Se estimularon linfocitos de un donante con HLA-A*0201 con DC autólogas maduras usando el cóctel de Jonuleit, el cóctel de Kalinski y los tres nuevos cócteles descritos en la presente memoria.

20 Los linfocitos de sangre periférica (PBL) se sometieron a elutriación y se separaron los contenidos en la fracción 3, en la que el 54,8% de las células eran linfocitos T CD3+ y el 17,7% células CD56+, que es característico de células asesinas naturales (NK). (A) Los PBL de la fracción 3 de elutriación se incubaron directamente con las diferentes poblaciones de DC maduras utilizando los diferentes cócteles y se midió su secreción de interferón-gamma (IFN-gamma) después de 24 horas en un ensayo ELISPOT estándar.

25 DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IL-6 (15 ng/mL) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/mL)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + IFN alfa (3000 UI/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL)

30 DC3 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (100 ng/mL) + IFN gamma (1000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL)

35 DC5 = TNF-alfa (10 ng/mL) + IL-1beta (10 ng/mL) + PGE2 (250 ng/mL) + IFN gamma (5000 UI/mL) + R848 (1 µg/mL) + poli (I:C) (20 ng/mL).

Ejemplo

El siguiente ejemplo representa la descripción de un experimento como un ejemplo representativo de al menos tres experimentos independientes realizados utilizando células de diferentes donantes.

1. Material y métodos

40 **Leucoféresis y elutriación**

Para obtener monocitos como una población de células progenitoras para la generación de células dendríticas humanas, los inventores utilizaron un sistema cerrado de elutriación por ELUTRA (Gambro BCT, Lakewood, USA).

45 Después del consentimiento informado, donantes sanos, inmovilizados fueron sometidos a leucoféresis durante 180 minutos con el separador de células COBE Spectra (Gambro BCT, Inc. Lakewood, USA) utilizando un programa para MNC modificado (V6.1): el factor de separación se ajustó a 700 con una tasa de recogida de 0,8 mL/min y un hematocrito diana de sólo 1-2%. Se analizaron los glóbulos sanguíneos resultantes por un contador automático de sangre ACT Dif (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania) para establecer las condiciones para el sistema ELUTRA.

50 Los productos de leucoféresis se trataron por ELUTRA (Gambro BCT, Lakewood, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante por un método de elutriación centrífuga en contraflujo usando una velocidad del rotor fija (2400 rpm) y se controló por ordenador el ajuste escalonado del caudal de los medios seguido por recolección a rotor parado. Luego se prepararon 5000 mL de tampón de desarrollo que contenía solución salina tamponada de Hanks (Biochrom, Berlín, Alemania) con 1% de albúmina de suero humano (Octalbin®, Octapharma, Langen,

Alemania). El proceso ELUTRA dio como resultado cinco fracciones, con monocitos enriquecidos en la fracción del rotor parado. La composición celular de las fracciones se caracterizó por un contador de sangre automático ACT Diff (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania) y análisis por FACS.

Análisis por FACS de las fracciones de ELUTRA

- 5 Células del producto de leucoféresis original y de las cinco fracciones de ELUTRA se incubaron durante 30 minutos con los siguientes anticuerpos de ratón monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE): controles del isotipo de IgG (clon X-40), anti-CD14-FITC (clon: MΦP9), anti-CD19-FITC (clon: 4G7), anti-HLA-DR-FITC (clon: L243) (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) y anti-CD3-PE (clon UCHT1), anti-CD56-PE (C5.9), anti-CD16-PE (clon: DJ130c) y como control adicional CD14-PE (TÜK4) (Dako Diagnostics, Hamburgo, Alemania) y anti-CD67-FITC (clon: 80H3) (Immunotech, Marsella, Francia). Las células se lavaron y se volvieron a poner en suspensión en PBS + 2% de suero fetal de ternera (Biochrom, Berlín, Alemania). Se realizó un análisis por citometría de flujo en un dispositivo FACS Calibur usando el programa informático Cellquest Pro (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania).

Generación de células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos a partir de monocitos elutriados

- 15 Las células de la fracción del rotor parado o de la denominada posteriormente fracción 5 se usaron directamente para la generación de DC si las células CD14+ representaban más del 60% de todas las células detectadas por análisis por FACS. Las células de la fracción 5 se recolectaron de la bolsa de recogida de ELUTRA y se lavaron una vez con PBS + 0,5% de suero humano y se sembraron a 35×10^6 /matraz de cultivo celular de 175 cm² (NUNC, Wiesbaden, Alemania) en 35 mL de un medio de DC que contenía RPMI 1640 con muy baja cantidad de endotoxinas (Biochrom, Berlín, Alemania), 1,5% de suero humano (mezcla de hombres adultos AB-positivos) (Banco de Sangre de la Universidad de Tubinga, Alemania) y 10 µg/mL de gentamicina (Biochrom, Berlín, Alemania) y se cultivaron durante seis días a 37°C y 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada. El día 1, se suplementaron 3 y 6 cultivos de células con 100 ng/mL de GM-CSF (Leukine[®] by Berlex, Richmond, USA) y 20 ng/mL de IL-4 humana recombinante (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) en 7 mL de medio de DC recientemente preparado por matraz.

25 Maduración de células dendríticas

Los procesos de maduración fueron inducidos añadiendo diferentes combinaciones de citoquinas y otros reactivos, como se indica, a las DC inmaduras el día 6, junto con 7 mL de medio de DC recientemente preparado adicional definido en la presente memoria por matraz:

- 30 **Cóctel de Jonuleit:** 10 ng/mL de TNF-α, 10 ng/mL de IL-1-β, 15 ng/mL de IL-6 (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) y 1 µg/mL de prostaglandina E2 (Minprostin[®], Pharmacia/Pfizer, Erlangen, Alemania),

Cóctel de Kalinski: 10 ng/mL de TNF-α, 10 ng/mL de IL-1-β (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania), 3000 UI/mL de IFNα (Roferon A[®], Roche, Welwyn Garden City, Inglaterra), 1000 UI/mL de IFNγ (ImukinR, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania) y 20 ng/mL de RNA bicatenario (poly I:C, InVivogen, Toulouse, Francia).

- 35 **Nuevo cóctel 1:** 10 ng/mL de TNF-α, 10 ng/mL de IL-1-β (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania), 5000 UI/mL de IFNγ (Imukin[®], Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania), 1 µg/mL de R848 (InVivogen, Toulouse, Francia) y 250 ng/mL de prostaglandina E2.

Como variación del cóctel 1, se utilizaron los mismos componentes excepto que la concentración de IFNγ se redujo hasta 1000 UI/mL y la de la prostaglandina E2 hasta 100 ng/mL.

Nuevo cóctel 2: similar al cóctel 1 más 20 ng/mL de RNA bicatenario (poly I:C, InVivogen, Toulouse, Francia).

- 40 Como control, un matraz sólo recibió 7 mL de medio recientemente preparado y sirvió como las DC inmaduras (datos no mostrados).

Recolección de células dendríticas

- 45 Después de incubación de las DC con los cócteles de maduración durante 24 horas, se recolectaron las células lavándolas dos veces con PBS + 0, 5% de suero humano con agitación suave, se contaron las células en una cámara de Neubauer y se prepararon para el análisis.

Análisis por citometría de flujo (FACS)

Fenotipado de las DC:

- 50 Las DC se marcaron con los siguientes anticuerpos de ratón monoclonales conjugados con fluoresceína con especificidades para controles del isotipo (clon X-40), CD14 (FITC, MΦP9), CD19 (FITC, clon: 4G7), CD86 (FITC, clon: 2331 FUN-1), CD80 (PE, clon: L307.4) (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania) y CD209 (PE, clon: DCN46) (Pharmingen, San Diego, USA) y CD3 (FITC, clon: UCHT1), CD56 (FITC, clon: C5.9a), CD1a (FITC, clon: NA1/34)

(Dako, Hamburgo, Alemania) y HLA-DR (PE, clon: B8.12.2), CD40 (PE, clon: mAb89), CD83 (PE, clon: HB15a) (Immunotech, Marsella, Francia).

5 La tinción de CCR7 se realizó con un hibridoma de rata BLR-2 (clon 8E8) (E. Kremmer, GSF) en comparación con el control del isotipo para IgG2a del hibridoma EBNA-A2 (clon R3) por incubación de las DC en líquidos sobrenadantes de cultivo durante 60 minutos, seguido de lavado posterior y detección con anticuerpo de ratón secundario contra la IgG de rata conjugada con cianina 5 (Jackson Immuno, West Grove, USA).

10 Para analizar la vitalidad, las DC se sedimentaron y volvieron a poner en suspensión durante 20 minutos en 7-aminoactinomicina D (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania) a concentraciones finales de 10 µg/mL en PBS + 2% de suero fetal de ternera. Después del lavado, las células se analizaron en el tercer canal de la máquina FACS Calibur.

Comprobación de la estabilidad de la maduración (Ensayo de separación por lavado)

Las DC maduras, recolectadas y lavadas, se volvieron a sembrar a 2,5 - 3 x 10⁶/9 mL de medio de DC recientemente preparado sin citoquinas en matraces de cultivo de células de 25 cm² (NUNC, Wiesbaden, Alemania).

Después de aproximadamente 44 horas, las DC se recolectaron y fenotiparon por análisis por FACS.

15 Ensayo de la señal 3

Las DC se co-cultivaron con células que imitaban a linfocitos T como se ha descrito anteriormente (Kalinski, 2004). En resumen, las DC maduras recolectadas y lavadas, se volvieron a sembrar sobre placas de 96 pocillos a concentraciones de 2 x 10⁴/pocillo y se incubaron junto con fibroblastos de ratón transfectados de forma estable con CD40L humano (Garrone P, Neidhardt EM, Garcia E, Galibert L, van Kooten C, Banchereau J. *Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. J. Exp. Med.* 1995 Nov 1; 182 (5):1265-1273) a concentraciones de 5 x 10⁴/pocillo. Para controlar la proliferación de cada población celular sola, se analizaron las DC sin adiciones y los fibroblastos CD40L en medio estándar. Después de 24 horas, las placas se centrifugaron y se reunieron los líquidos sobrenadantes de 8 pocillos duplicados para análisis de IL-10 e IL-12p70 por ELISA.

ELISA (IL-12p70/IL-10)

25 Se detectaron la secreción de IL-12p70 e IL-10 por las DC durante el proceso de maduración (DC primarias) y las DC del ensayo de la señal 3 por ELISA cuantitativo estándar. El ELISA se realizó utilizando conjuntos de parejas de anticuerpos previamente analizados para la detección de IL-12p70 e IL-10 (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción del sustrato colorimétrico con tetrametilbencidina y H₂O₂ se midió después de detenerla con H₃PO₄ a 450 nm y corrección de la longitud de onda a 620 nm y se analizó por el ajuste fácil del programa informático (SLT, Crailsheim, Alemania).

Crioconservación de células dendríticas

35 Después de recolección y lavado, se recogieron 20-25 x 10⁶ DC en 0,5 mL de albúmina de suero humano al 20% fría (Octalbine®, Octapharma, Langen, Alemania) y se mezclaron suavemente con 0,5 mL (cantidades iguales) de solución de congelación recientemente preparada que contenía 10% de glucosa (Braun, Melsungen, Alemania), 20% de DMSO (CryoSURE®, WAK-Chemie, Dessau-Thornau, Alemania) en 20% de albúmina de suero humano. Los criotubos (NUNC, Wiesbaden, Alemania) se conservaron durante una noche a -80°C y se transfirieron a la fase gaseosa de un recipiente de nitrógeno líquido.

Reacción linfocitaria mixta

40 Las DC se maduraron *in vitro* como se ha indicado, se lavaron 2 veces en PBS + 0,5% de suero humano, se irradiaron con 40 Gy y se cultivaron en microplacas de fondo redondo de 96 pocillos a 1 x 10⁴/pocillo (NUNC, Wiesbaden, Alemania) en RPMI 1640 + 1,5% de suero humano. Las células crioconservadas de la fracción 3 después del procedimiento ELUTRA de diferentes donantes se utilizaron como fuente de células respondedoras y se sembraron a 1 x 10⁵/pocillo en las DC de donantes alogénicos.

45 Como control para la activación de linfocitos T por medio de las diferencias del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se usó la tercera parte de las células como sigue: como células estimulantes se utilizó una mezcla de células mononucleares (MNC) de 5 donantes independientes obtenidas de la capa leucocítica después de irradiación de 40 Gy. El potencial de proliferación inespecífico general de los linfocitos T se controló por incubación de células respondedoras con IL-2 (Proleukin® de Chiron, Emeryville, USA) a 50 UI/mL y fitohemaglutinina a 10 µg/mL (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Alemania).

50 Después de 6 días, se pulsaron las células con 0,5 µCi/pocillo de ³H-timidina (Amersham-Pharmacia, Friburgo, Alemania) y se determinó la absorción de ³H-timidina después de 24 horas utilizando un dispositivo de contador β (Wallac, Friburgo, Alemania).

Transfección de EGFP-RNA en las DC

Se produjo *in vitro* EGFP-RNA y se sometió a electroporación en las DC maduras a las 24 horas como se ha descrito anteriormente (Nair, S. K., Boczkowski, D., Morse, M., Cumming, R. I., Lyster, H. K. and Gilboa, E. (1998). *Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. Nat. Biotechnol.* **16**:364-369. Javorovic, M., Pohla, H., Frankenberger, B., Wolfel, T. and Schendel, D.J. (2005). *RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis. Mol. Ther.* **12**:734-743), con la excepción de que cada cubeta de electroporación de 0,4 cm contenía un volumen total de 300 μ L, incluyendo 8 μ g de EGFP-RNA y 3×10^6 de las DC. Después de la electroporación, las DC se devolvieron a sus medios de maduración originales y se incubaron en una placa de 24 pocillos a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 o 48 horas antes del análisis por citometría de flujo.

Ensayo ELISPOT de la activación de linfocitos T específica de virus

Para su activación, los linfocitos de la fracción 3 de ELUTRA se cultivaron a 1×10^6 células/pocillo con 1×10^5 DC virales cargadas de péptidos en placas de 24 pocillos, en medio RPMI 1640 con 10% de suero humano; el tercer día se añadieron 30 U/ml de IL-2 y se recolectaron los linfocitos el séptimo día. Los péptidos que se unieron a HLA-A*0201 incluían: CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV), EBV-BMLF1₂₈₀₋₂₈₈ (GLCTLVAML), proteína₅₈₋₆₆ M1 de la gripe (GILGFVFTL) o la mezcla de CEF (PANATecs GmbH, Tubinga, Alemania) que contenía dos péptidos adicionales, EBV-LMP-2₄₂₆₋₄₃₄ (CLGGLTMV) y la RNA-polimerasa PA₄₆₋₅₄ de la gripe (FMYSDFHF). Los linfocitos T activados *in vitro* y monocitos autólogos más péptidos de CEF se incubaron en medio RPMI 1640 que contenía L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina/estreptomicina (100 U/ml), 10% de suero humano AB (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) y 20 U/ml de IL-2 a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. Se realizó un análisis de IFN γ -ELISPOT como se ha descrito (Becker, C., *et al.*, (2001). *Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN γ capture assay. Nat. Med.* **7**:1159-1162. Pohla, H., *et al.*, (2000). *Allogeneic vaccination for renal cell carcinoma: Development and monitoring. Bone Marrow Transplant.* **25**:83-87), con la excepción de que se usaron para la detección placas de PVDF previamente revestidas con anticuerpos (Mabtech AB, Nacka, Suecia) y estreptavidina-fosfatasa alcalina y una solución de BCIP/NBT más sustrato lista para usar (Mabtech). Los puntos se contaron usando el sistema lector ELR03 de AID con el programa informático 3.2.3 (AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Alemania).

2. Resultados y conclusiones

Cultivo de DC primarias

La fracción 5 de ELUTRA del ejemplo descrito (DC034) contenía: 80,6% de células CD14+ y los siguientes contaminantes, 2,89% de células CD3, 2,2% de CD56, 1,47% de CD19 y 7,72% de CD67+ y era por lo tanto apropiada para generar células dendríticas.

La mayor recuperación de células dendríticas, basándose en las células sembradas totales así como en los monocitos (células CD14+), se encontró usando el cóctel de Jonuleit, mientras que la menor se encontró usando el cóctel de Kalinski (Figura 1A). Un número de células bajo representa poca capacidad de recolección de las DC sin utilizar raspadores de células ni digestión enzimática. Este hallazgo representa una gran desventaja del cóctel de Kalinski en nuestro sistema que podría ser debido a un mayor grado de adherencia y un estiramiento fino de los velos dendríticos de las DC maduras con este cóctel. La viabilidad de las células dendríticas recolectadas determinada por tinción con 7AAD mostró más del 97% de células vivas utilizando el cóctel de Jonuleit mientras que las células maduras con el cóctel de Kalinski alcanzaron sólo el 79,5%, los nuevos cócteles de la invención oscilaron entre estos dos valores (Figura 1A).

La expresión de moléculas co-estimuladoras, como CD80 y CD86, reflejó la presencia de células presentadoras de antígenos, particularmente células dendríticas. La Figura 1B muestra un alto nivel de expresión de estas moléculas en todas las DC maduras con diferentes cócteles. La CD14 es una molécula monocítica, pero bajo la influencia de GM-CSF/IL-4 y los cócteles de maduración desaparece rápidamente de las superficies de las células dendríticas. En la presente memoria se muestra que las DC generadas con todos los cócteles liberan la expresión de CD14 como una prueba evidente de una diferenciación en la dirección de las DC, en lugar de la también posible diferenciación en la dirección de los macrófagos.

Por otro lado CD83 sirve como el marcador más importante para indicar el estado de maduración de las DC. La expresión de CD83, en combinación con la expresión casi indetectable de CD14, demostró que en las cinco poblaciones de DC maduras, las células tenían una identidad DC y eran altamente maduras (Figura 1B).

El receptor 7 de las quimioquinas (CD197) indica un potencial migratorio de las DC hacia los ganglios linfáticos junto con gradientes de quimioquinas de CCL19 y CCL21 en las vénulas endoteliales altas. Todas las diferentes poblaciones de DC maduras expresaron CCR7 a niveles altos (Figura 1C).

Las DC después de separación por lavado de citoquinas de maduración (Ensayo de Separación por lavado)

La estabilidad del estado de maduración es una característica importante de las DC clínicamente aplicables, debido a que los pacientes con enfermedades malignas muestran con frecuencia altos títulos en suero de citoquinas

inhibidoras (por ejemplo, IL-10, TGF-beta, IL-6). Estas citoquinas pueden influir sobre las DC inyectadas revirtiéndolas a un estado inmaduro y haciendo que el sistema inmunológico de un paciente tolere antígenos tumorales vacunados.

- 5 Para analizar si los nuevos cócteles de la invención inducían una maduración estable, se analizaron importantes moléculas marcadoras de DC después de separar por lavado todas las citoquinas y se incubaron las DC al menos 40 horas después de una nueva siembra en medio solo. Notablemente, se encontró menor viabilidad en las DC maduras con el cóctel de Kalinski (Figura 2A). La Figura 2A muestra, como se esperaba, que la viabilidad se pierde con el tiempo, debido a que se agotan las DC y las células en dicho estado después de haber transcurrido más de 60 horas de la incubación con el cóctel de maduración no son ya adecuadas para terapia. Solo por razones del ensayo, se comprobó la expresión en superficie de ciertas moléculas, como re-inducción de CD14, lo que indicaría una reversión a las DC inmaduras. Como muestra la Figura 2B, las cinco DC maduras diferentes que expresan niveles muy bajos (menos del 1%) de CD14 retienen mientras altos niveles del marcador CD83 para la maduración de DC. Una vez más las DC maduras con el cóctel de Kalinski mostraron valores de CD83 ligeramente menores que las DC maduras con los otros cócteles.
- 10
- 15 La Figura 2C muestra la estabilidad de altos niveles de expresión de las moléculas co-estimuladoras, CD80 y CD86, y de mantenimiento del potencial migratorio por la expresión de CCR7.

Las DC después de congelación y descongelación

En esta etapa, los autores de la presente invención buscaron un método para la generación de un alto número de DC que son luego criopreservadas.

- 20 Puede ser concebible congelar monocitos o alternativamente, congelar las DC maduras completas, incluso después de la carga de antígenos. La Figura 3 muestra la viabilidad y los marcadores de maduración de las diferentes DC maduras después de los procesos de congelación, conservación dentro de la fase gaseosa de nitrógeno líquido y descongelación. Es aceptable una viabilidad de más del 80%, que se obtuvo por las DC maduras con el cóctel de Jonuleit y los nuevos cócteles de la invención (Figura 3A), pero no por las DC maduras con el cóctel de Kalinski y el cóctel 5 (conteniendo ambos poli (I:C)). Los marcadores CD83 y CCR7 de las DC se expresaron a niveles altos y sólo se detectaron números muy bajos de células CD14 en todas las poblaciones de DC descongeladas (Figura 3B y C).
- 25

Capacidad aloestimuladora de las DC

- 30 Para analizar las capacidades funcionales de las DC, los autores de la presente invención utilizaron una reacción linfocitaria mixta con las DC como células estimuladoras frente a los linfocitos T alogénicos. Para controlar las capacidades vitales de los linfocitos T, se analizó la inducción de la proliferación contra un número máximo de diferentes moléculas del MHC (tercera parte = 5 donantes mixtos de MNC), estímulos mitógenos (PHA) y la citoquina IL-2 estimuladora de linfocitos T. La Figura 4 muestra estos controles para los linfocitos T autólogos (4A) y un respondedor ilustrativo de los linfocitos T alogénicos (4B). La Figura 4C muestra las DC irradiadas sin linfocitos respondedores y se comprobó que el ensayo sólo determinó la proliferación por los linfocitos respondedores. La Figura 4D indica la baja inducción de linfocitos T autólogos en comparación con un respondedor alogénico (Figura 4E).
- 35

- 40 En la Figura 4F, se resumieron la proliferación de 3 linfocitos T respondedores alogénicos independientes después de la co-incubación con diferentes DC maduras en comparación con los linfocitos T autólogos del donante de DC. Como se esperaba de las diferencias de MHC entre los 3 linfocitos T respondedores respectivos y las DC se observó una alta capacidad estimuladora. Una vez más, las DC maduras con el cóctel de Kalinski no mostraron niveles de estimulación comparables con las otras DC maduras, lo que puede ser debido a la menor viabilidad y a un mayor porcentaje de células muertas durante el procedimiento de ensayo.

Liberación de IL-12p70 e IL-10 de las DC

- 45 Durante los procesos de diferenciación y maduración, las DC segregan citoquinas en su líquido sobrenadante de cultivo. La Figura 5A muestra la secreción de IL-12p70 biológicamente activa (barras rellenas) y de IL-10 (barras vacías) en cultivos de DC primarias. Las DC maduras con el cóctel de Jonuleit no segregan cantidades detectables de IL-12p70, mientras que el cóctel de Kalinski, así como los nuevos cócteles de la invención, inducen IL-12p70 en intervalos de ng por mL. Estos resultados indican una capacidad de la composición para inducir la producción de citoquinas en las DC. En la Figura 5B, es visible que después de un encuentro simulado de las DC con los potenciales linfocitos T dentro de los ganglios linfáticos por medio del ligando CD40, aún es posible volver a inducir IL-12p70 de las DC maduras en el cóctel de Kalinski y en menor grado usando también los nuevos cócteles de la invención.
- 50

- 55 La IL-10, como una potencial citoquina Th2, contra-regula la polarización de Th1. Teniendo en cuenta este efecto, los autores de la invención calcularon los valores de ambas citoquinas reguladoras importantes que tienen un potencial biológico teóricamente igual y determinaron el cociente IL-12p70/IL-10. La Figura 5C representa los resultados que muestran que el cóctel de Kalinski es superior al de Jonuleit, como se ha descrito en la bibliografía,

pero los nuevos cócteles de la invención también mostraron cocientes positivos para la re-inducción de IL-12 después de 24 horas de ligamiento a CD40 y por lo tanto segregaron más IL-12p70 que las DC maduras con el cóctel de Jonuleit.

5 Para resumir los resultados se describe en la presente memoria una nueva combinación de sustancias, incluyendo un ligando de TLR7/8 y otras citoquinas y suplementos, que es capaz de inducir la maduración completa de las DC e inducir las capacidades reguladoras de Th1 en estas células. En comparación con la maduración de las DC con el cóctel de Jonuleit, los cócteles de la invención mostraron también altas viabilidades celulares después de la recolección y congelación, altos niveles de maduración por la expresión de CD83, moléculas co-estimuladoras y potencial migratorio por la expresión de CCR7 así como estabilidad de la maduración. En contraste con el cóctel de Jonuleit, el cóctel de la invención es capaz de inducir la secreción de IL-12p70 en el cultivo primario así como después de la interacción simuladora con linfocitos T por ligamiento a CD40. Las DC maduras generaron con el nuevo cóctel de la invención una combinación de las mejores características del cóctel de Jonuleit además de aumentar las capacidades inductoras de Th1 por medio de IL-12p70. En contraste con las DC obtenidas después de la maduración con el cóctel de Kalinski, los nuevos cócteles de la invención dan como resultado DC con secreción de IL-12p70 sin el impacto negativo de la pérdida del número de células causada por prolongados procesos de muerte celular.

Los procedimientos de la presente invención para generar células dendríticas humanas son compatibles con las normas de buenas prácticas de fabricación (GMP) y por lo tanto son útiles para su aplicación clínica en la generación de vacunas, que podrían promover la polarización de Th1 de linfocitos T efectores contra las estructuras antigénicas tumorales.

Expresión de la proteína después de transferencia del RNA a las DC por electroporación

Se han considerado diversas fuentes de antígenos para usar en vacunas para tumores a base de DC. El RNA es un candidato atractivo para proporcionar proteínas enteras a las DC para tratamiento y presentación, evitando así la necesidad de conocer péptidos de unión al MHC específicos. Para analizar la capacidad de las DC para expresar la proteína después de cargarla con RNA transcrito *in vitro*, se analizó la expresión de la EGFP por citometría de flujo después de transferencia del RNA correspondiente. No se incluyeron células DC3 debido a que el cóctel 3 era idéntico al cóctel 4, excepto por cantidades menores de IFN γ y PGE2 (véase, por ejemplo la leyenda de la Fig. 1). Se encontró previamente que la expresión de la EGFP era máxima 12-24 horas después de la transfección de RNA a las células DC1 y que la expresión era estable durante 48 horas (Javorovic, M., Pohla, H., Frankenberger, B., Wolfel, T. and Schendel, D.J. (2005). *RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis. Mol. Ther.* **12**:734-743), por lo tanto, 24 y 48 horas después de la electroporación se midieron los porcentajes de células positivas a la EGFP y las intensidades de fluorescencia medias (MFI). Las células DC1 y DC4 expresaron la EGFP mientras que las células DC2 no expresaron la EGFP y las células DC5 no expresaron (Fig. 6) o sólo a niveles muy bajos la EGFP (datos no mostrados). Este mismo patrón se observó a las 48 horas (datos no mostrados). El ligando de TLR3, poli (I:C), estaba presente en el cóctel de Kalinski y el cóctel 5 (células DC2 y DC5, respectivamente), pero estaba ausente en el cóctel de Jonuleit (células DC1) y en el cóctel 4 (células DC4). El cóctel de Kalinski contenía también IFN α , que no estaba presente en ningún otro cóctel. Curiosamente, se encontró en otro lugar que las DC maduras sólo con IFN α tampoco expresaban la proteína EGFP después de la transferencia de RNA (Frankenberger, B., *et al.*, (2005). *Cell-based vaccines for metastatic renal cell carcinoma: genetically-engineered tumor cells and monocyte-derived dendritic cells. World J. Urol.* **3**: 166-174).

Inducción de la secreción de IFN γ por linfocitos T con DC pulsadas por péptidos

Debido a que las células DC5 no pudieron ser cargadas con RNA, su capacidad para presentar péptidos se analizó como una alternativa (Fig. 7). Linfocitos autólogos de la fracción 3 de ELUTRA de un donante HLA-A*0201-positivo se estimularon durante 7 días con DC pulsadas con péptidos maduras en los cócteles 3-5 en comparación con el cóctel de Jonuleit. A continuación, se volvieron a estimular las células durante 24 horas con monocitos autólogos más péptidos de CEF y se analizaron en un ensayo IFN γ -ELISPOT. Se encontraron respuestas específicas de péptidos con todas las poblaciones de DC, lo que demuestra que las células DC5 podrían presentar péptidos para la activación de linfocitos T.

Por lo tanto, los autores de la presente invención han encontrado que la presencia de poli (I:C) en los cócteles de maduración impidió que las DC pudieran expresar la proteína después de cargarla con RNA exógeno, presumiblemente por medio de la activación por TLR3 de los mecanismos para proteger las células de un RNA extraño (Kato, H. *et al.*, (2006) *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Nature* **441**:101-105). Por lo tanto, las DC maduras en el medio de Kalinski o en el cóctel 5 no se pueden utilizar para vacunas basadas en RNA, aunque ambos son adecuados para uso con péptidos, como se muestra en la presente memoria para el cóctel 5 y ha sido publicada previamente para el cóctel de Kalinski (Mailliard, R.B. *et al.*, (2004). *Alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. Cancer Res.* **64**:5934-5937). En contraste, los cócteles 3 y 4 serían muy adecuado para generar DC que produzcan IL-12p70 utilizando péptidos o RNA como fuentes de antígenos asociados a tumores para el desarrollo de una vacuna contra el cáncer.

Respuesta al interferón-gamma de linfocitos autólogos estimulados con las DC maduras.

Los linfocitos de un donante con HLA-A*0201 se estimularon con DC autólogas maduras usando el cóctel de Jonuleit, el cóctel de Kalinski y los tres nuevos cócteles descritos en la patente.

5 Los linfocitos de sangre periférica (PBL) se sometieron a elutriación y se separaron los contenidos en la fracción 3, en la que el 54,8% de las células eran linfocitos T CD3+ y el 17,7% células CD56+, lo que es característico de las células asesinas naturales (NK). Los PBL de la fracción 3 de elutriación se incubaron directamente con las diferentes poblaciones de DC maduras utilizando los diferentes cócteles y después de 24 horas se midió su secreción de interferón-gamma (IFN-gamma) en un ensayo ELISPOT estándar.

10 Para el análisis ELISPOT, los PBL de la fracción 3 de ELUTRA se cultivaron por triplicado 50 µL por pocillo sobre placas PVDF pre-revestidas de anticuerpos (Mabtech AB, Nacka, Suecia), y después se incubaron las placas durante 2 horas a 37°C en un medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina/estreptomicina (100 U/mL) y 10% de suero humano AB (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) para bloquear la unión no específica. El anticuerpo de captura fue el clon 1-D1K específico de IFNγ (Mabtech). Las poblaciones de DC se añadieron cuidadosamente a los pocillos. Para la evaluación de referencia, se cultivaron sobre
15 placas solo las DC y los linfocitos. El volumen total de cultivo fue 150 µL y las placas se incubaron en una incubadora humidificada a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. Después de la separación de las células y lavado exhaustivo con PBS/0,5% de Tween 20, se realizaron la incubación con el anticuerpo de detección biotinilado, el clon 7-B6-1 (Mabtech), y el desarrollo de los puntos como se ha descrito previamente (1,2), con la excepción de que se usaron estreptavidina-fosfatasa alcalina y una solución de sustrato más BCIP/NBT lista para su uso. Los puntos se contaron
20 usando el sistema lector ELR03 de AID con la versión del programa informático 3.2.3 (AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Alemania).

Para la activación, los linfocitos de la fracción 3 de ELUTRA se cultivaron a 1×10^6 células/pocillo con 1×10^5 DC cargadas de péptidos virales en placas de 24 pocillos, en medio RPMI 1640 con 10% de suero humano; el tercer día se añadieron 30 UI/mL de IL-2 y el séptimo día se recogieron los linfocitos. Los péptidos que se unían a HLA-A*0201
25 incluían: CNWpp65₄₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV), EBV-BMLF1₂₈₀₋₂₈₈ (GLCTLVAML), proteína₅₈₋₆₆ M1 de la gripe (GILGFVFTL) o la mezcla de CEF (PANATecs GmbH, Tubinga, Alemania) que contenía dos péptidos adicionales, EBV-LMP-2₄₂₆₋₄₃₄ (CLGGLTMV) y la RNA-polimerasa de la gripe PA₄₆₋₅₄ (FMYSDFHFI). Se incubaron linfocitos T activados *in vitro* y monocitos autólogos con o sin péptidos CEF en un medio RPMI 1640 que contenía L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina/estreptomicina (100 U/mL), 10% de suero AB humano (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) y 20 UI/mL de IL-2 a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas. Se realizó un análisis de IFNγ-
30 ELISPOT como se ha descrito (Becker, C., *et al.* (2001). *Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFNγ capture assay. Nat. Med.* 7:1159-1162; Pohla, H., *et al.* (2000). *Allogeneic vaccination for renal cell carcinoma: Development and monitoring. Bone Marrow Transplant.* 25:83-87), con la excepción de que se usaron para la detección placas PVDF recubiertas previamente de anticuerpos (Mabtech AB, Nacka, Suecia) y estreptavidina-fosfatasa alcalina y una solución de sustrato más BCIP/NBT lista para su uso (Mabtech). Se contaron los puntos utilizando un sistema lector ELR03 de AID con el programa informático 3.2.3 (AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Alemania).

Las células productoras de interferón-gamma dominantes detectadas en este momento temprano (véase la Figura 8) son células NK activadas, en contraste con los experimentos anteriores, en los que las respuestas representan las
40 de los linfocitos T específicos de péptido estimulados por las DC durante el periodo de activación de 7 días (véase la Figura 7). Este análisis demostró que la activación de las células NK se potenció aproximadamente tres veces usando DC maduras en el cóctel DC5, en comparación con los cócteles DC1, DC3 y DC4.

Combinados, estos estudios muestran que las DC, y en particular las del cóctel 5 son capaces de activar las células asesinas naturales (Figura 8), así como re-estimular eficazmente los linfocitos T efectores específicos de péptidos que reconocen epítopos derivados de citomegalovirus, virus de Epstein-Barr y virus de la gripe.
45

3. Sumario del ejemplo

Las vacunas a base de células dendríticas (DC) utilizan con frecuencia las DC derivadas de monocitos maduras con un cóctel de citoquinas (Jonuleit) de IL-1β, TNFα, IL-6 y prostaglandina E2 (PG). Para obtener las DC que dirigen los linfocitos T a respuestas de Th1, los autores de la presente invención han buscado cócteles que
50 proporcionen DC que produzcan IL-12p70 biológicamente activa. Después de elutriación de los productos de aféresis por ELUTRA, se cultivaron monocitos enriquecidos con GM-CSF e IL-4 durante 6 días en un medio con suero humano que cumplía las GMP. Se maduraron DC inmaduras durante 24 horas con varios cócteles, que contenían ligandos de TLR7/8 con o sin poli (I:C) e interferón-γ, PG, IL-1β y TNFα. Las DC maduras expresaban >80% de CD83, CD86, CD80 y HLA-DR, CD40, >60% de CD209 (datos no mostrados), <2% de CD14 y >60% de
55 receptor de quimioquinas CCR7 que se aloja en los ganglios linfáticos. Las DC retuvieron toda la madurez y expresaron marcadores de superficie típicos después de crioconservación y después de separación por lavado de las citoquinas y nuevo cultivo durante 44 horas.

- IL-12p70 e IL-10 estaban presentes en los líquidos sobrenadantes de las DC maduras con cócteles que contenían ligandos de TLR7/8. Un cóctel de IFN γ , IL-1 β , TNF α , PG y el ligando R848 de TLR7/8 proporcionó DC que segregaban IL-12p70 después de la recolección y de 24 horas de co-cultivo con fibroblastos transfectados con CD40L, simulando el encuentro con linfocitos T en los ganglios linfáticos. Se calcularon las cantidades relativas de IL-12p70 frente a IL-10 y se encontró que las DC de la presente invención sólo revelaron un cociente ligeramente menor entre IL-12 e IL-10 según lo documentado por Kalinski (IL-1 β , TNF α , IFN α , IFN β , poli (I:C)).
- 5 La funcionalidad de las DC maduras con los nuevos cócteles de la invención fue analizada por cultivo de linfocitos mixtos y análisis ELISPOT. Las DC de la invención indujeron alorrespuestas y estimularon los linfocitos T específicos de antígenos virales comparables con las DC generadas por el cóctel de Jonuleit (datos no mostrados).
- 10 En resumen, este nuevo cóctel para la maduración de DC combina las características de una buena recolección, recuperaciones razonables, estabilidad de los marcadores de maduración y capacidad inductora de Th1 con los procedimientos de buenas prácticas de fabricación (GMP) requeridos para las vacunas de DC de alta calidad.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la maduración *in vitro* de al menos una célula dendrítica inmadura, que comprende estimular dicha célula dendrítica inmadura con TNF α , IL-1 β , IFN γ , un agonista de TLR7/8 y prostaglandina E2 (PG).
- 5 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además estimular dicha célula dendrítica inmadura con un agonista de TLR3, preferiblemente poli (I:C).
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dichas sustancias son parte de una composición añadida al medio de cultivo de dicha célula dendrítica inmadura.
- 10 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho agonista de TLR7/8 es un compuesto modificador de la respuesta inmunitaria de tipo imidazoquinolina, preferiblemente en el que dicho compuesto modificador de la respuesta inmunitaria de tipo imidazoquinolina es 4-amino-2-etoximetil- α , α -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolina-1-etanol (R848).
- 15 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha célula dendrítica inmadura es una célula dendrítica inmadura derivada de monocitos, preferiblemente derivada de células mononucleares de sangre periférica humana, monocitos, otras células progenitoras mieloides, o de células progenitoras CD34+, por diferenciación *in vitro* a células CD14+, o en donde dicha célula dendrítica inmadura se obtiene directamente a partir de sangre periférica.
- 20 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula dendrítica inmadura se obtiene incubando células mononucleares de sangre periférica humana, monocitos u otras células progenitoras mieloides con GM-CSF e IL-4 o IL-13.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la célula dendrítica inmadura es de origen humano.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las siguientes etapas:
 - a) preparar células mononucleares a partir de sangre periférica, preferiblemente en donde dichas células mononucleares se obtienen por leucoféresis de sangre periférica,
 - 25 b) incubar las células mononucleares de la etapa a) con GM-CSF e IL-4 o IL-13, preferiblemente en donde dicha incubación dura de 1 a 9, preferiblemente de 2 a 9, más preferiblemente de 2 a 6 días,
 - c) incubar las células obtenidas en la etapa b) con un cóctel que comprende TNF α , IL-1 β , IFN γ , un agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) y, opcionalmente, un agonista de TLR3, preferiblemente poli (I:C), en donde dicha incubación dura 12 horas a 72 horas, preferiblemente 20 horas o 24 horas, y
 - 30 d) recolectar la célula o células dendríticas maduras.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la célula o células dendríticas maduras se cargan además *in vitro* con uno o más antígenos, preferiblemente en donde dicho antígeno o antígenos se supone que provocan la maduración de linfocitos T efectores dentro de los ganglios linfáticos, más preferiblemente en donde dicha carga se realiza incubando la célula o células dendríticas maduras con al menos un péptido de dicho antígeno o transfectando la célula o células dendríticas con RNA o DNA que codifica el antígeno.
- 35 10. Una población de células dendríticas maduras, obtenibles por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 8 o 9, en donde la célula dendrítica inmadura es de origen humano y en donde TNF α se usa a una concentración de 1 ng/mL a 50 ng/mL, IL-1 β se usa a una concentración de 1 ng/mL a 50 ng/mL, IFN γ se usa a una concentración de 500 U/mL a 10.000 U/mL, el agonista de TLR7/8 se usa a una concentración de 0,2 μ g/mL a 5 μ g/mL, PGE2 se usa a una concentración de 50 ng/mL a 5000 ng/mL y el agonista de TLR3 se usa a una concentración de 10 ng/mL a 50 ng/mL.
11. Una composición farmacéutica que comprende la población de células dendríticas maduras de la reivindicación 10.
- 45 12. La población de células dendríticas maduras de la reivindicación 10, para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedades oncogénicas y enfermedades infecciosas.
13. Un uso *in vitro* combinado de TNF α , IL-1 β , IFN γ , un agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) y, opcionalmente, un agonista de TLR3, preferiblemente poli (I:C), para la preparación de al menos una célula dendrítica madura.

14. El uso de la reivindicación 13, en donde dicho agonista de TLR7/8 es un compuesto modificador de la respuesta inmunitaria de tipo imidazoquinolina, preferiblemente 4-amino-2-etoximetil- α,α -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolina-1- etanol (R848).
- 5 15. Una composición que comprende $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, un agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) y, opcionalmente, un agonista de TLR3, preferiblemente poli (I:C), en donde preferiblemente dicho agonista de TLR7/8 es un compuesto modificador de la respuesta inmunitaria de tipo imidazoquinolina, preferiblemente 4-amino-2-etoximetil- α,α -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolina-1- etanol (R848).

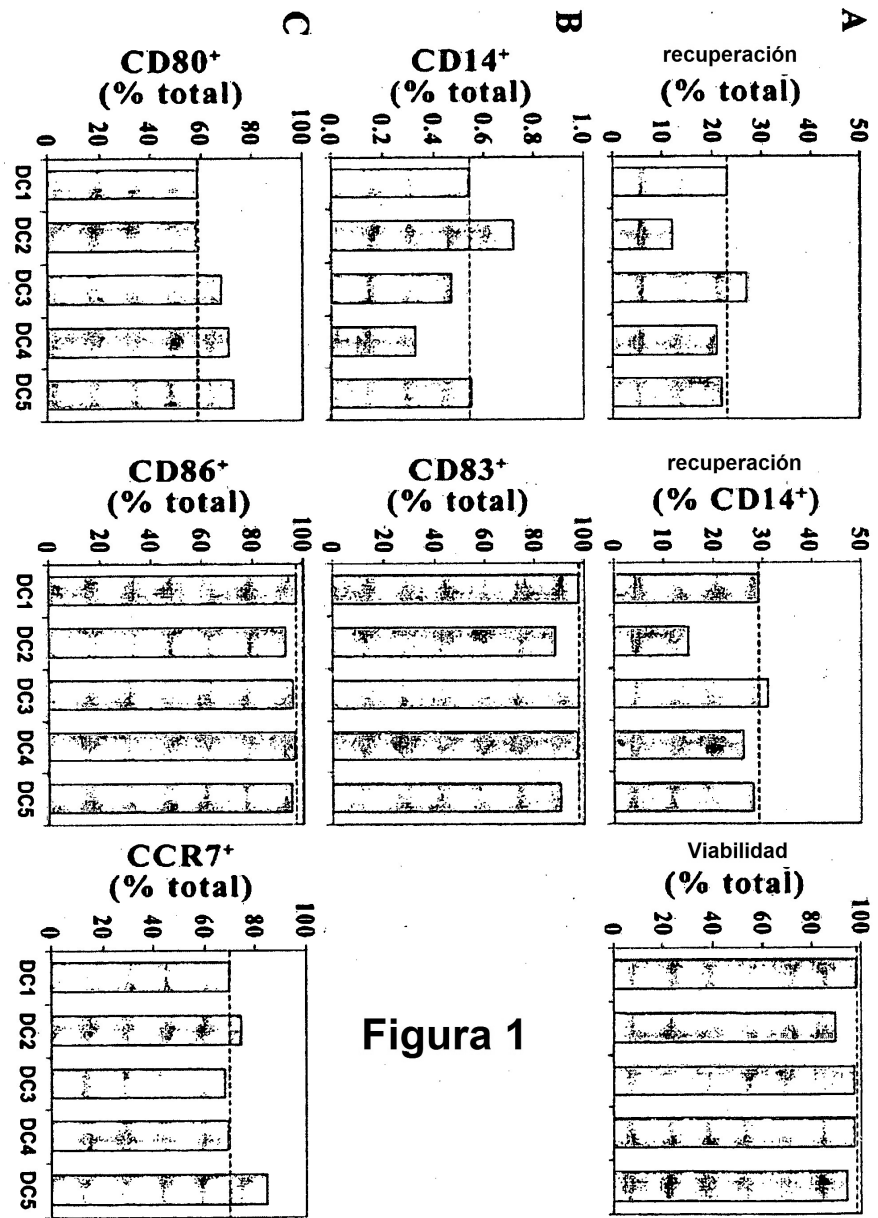


Figura 1

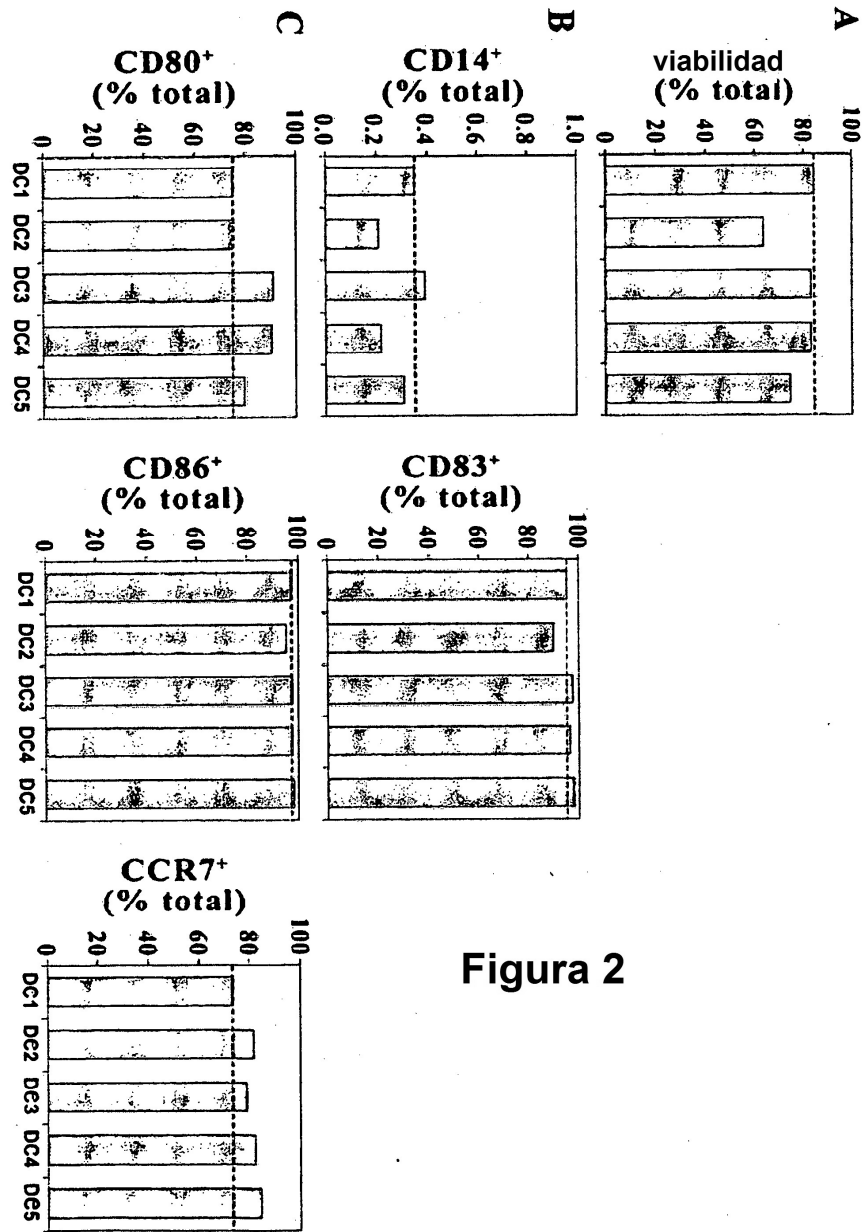


Figura 2

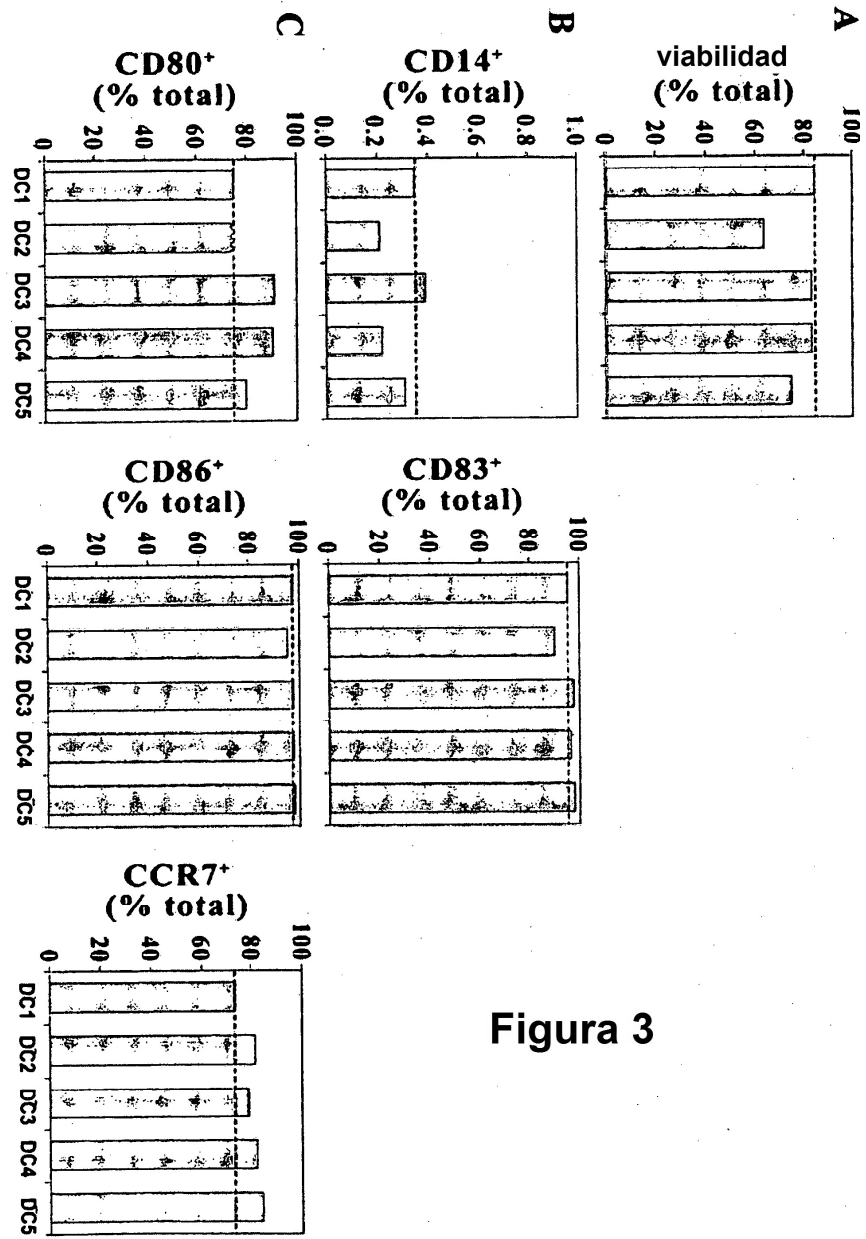


Figura 3

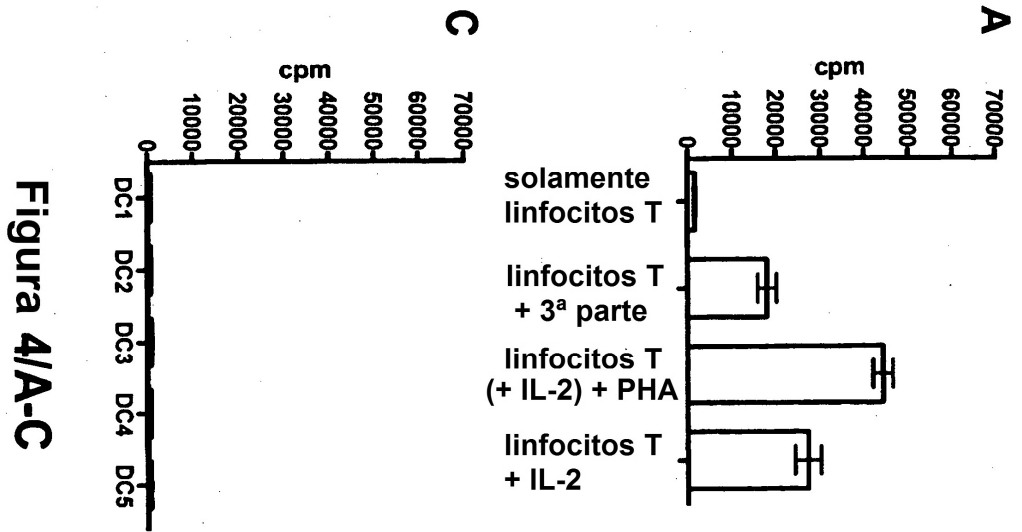


Figura 4/A-C

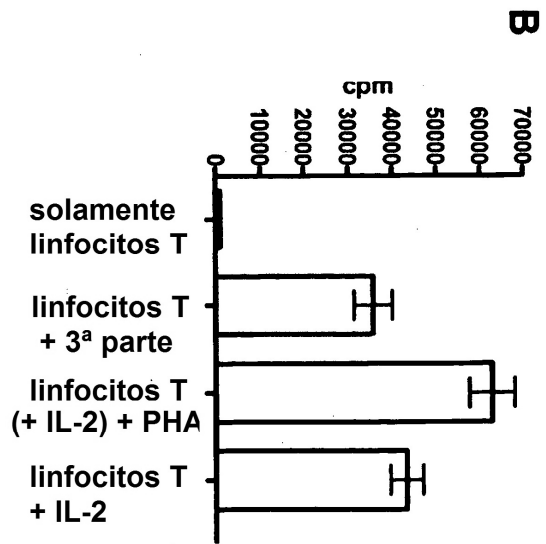


Figura 4/A-C

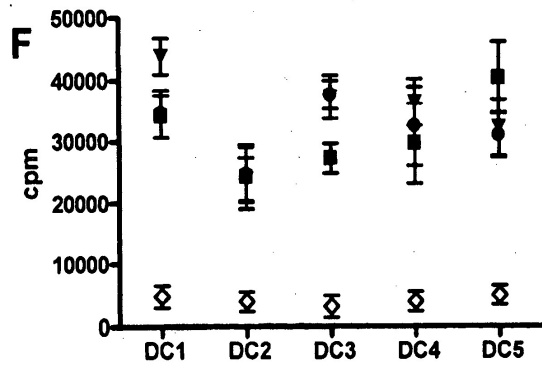
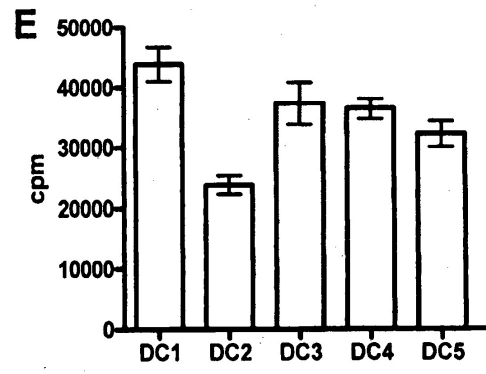
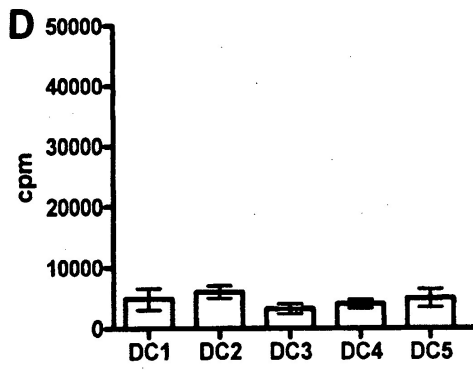


Figura 4/D-F

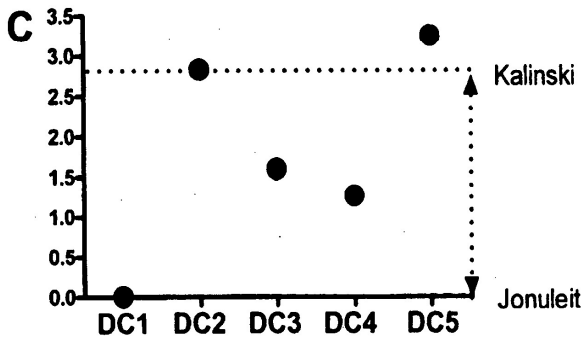
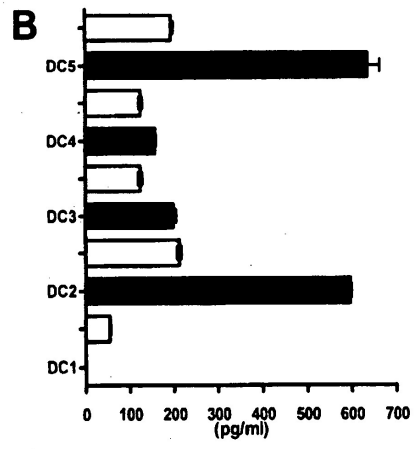
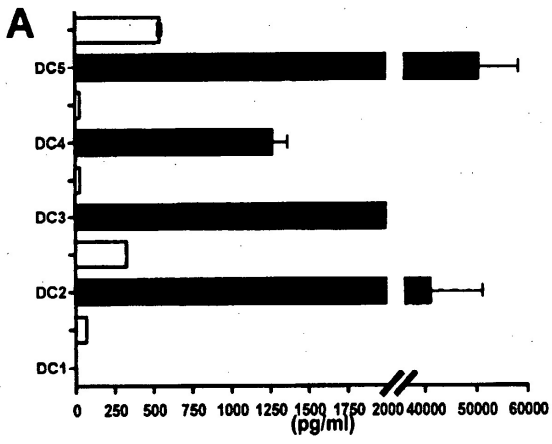


Figura 5

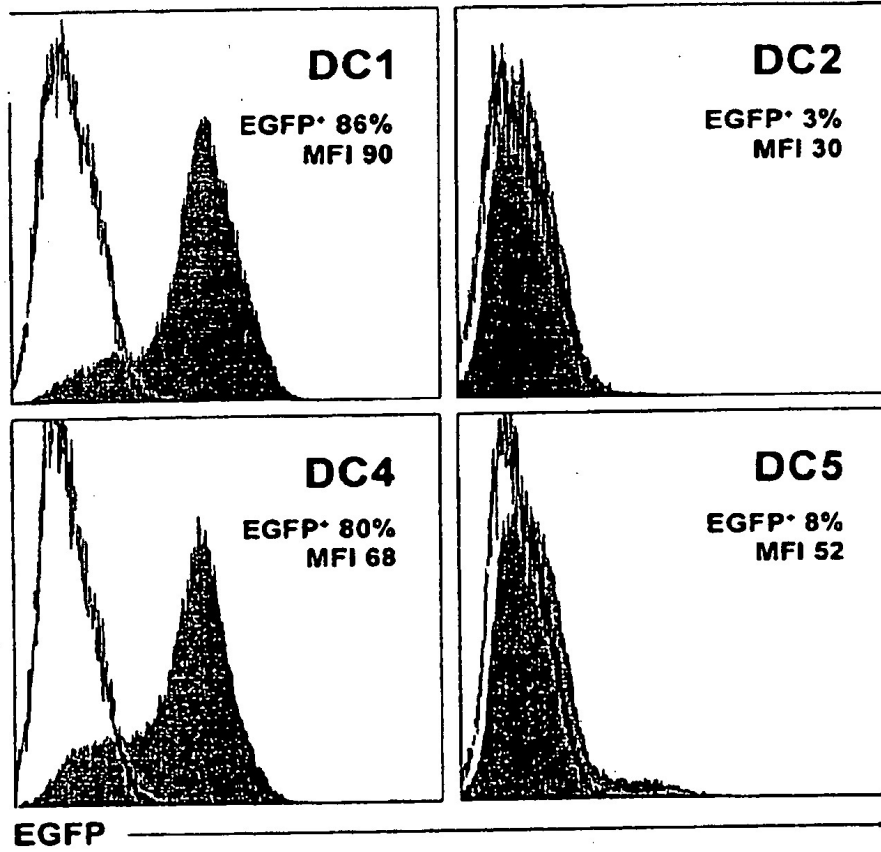
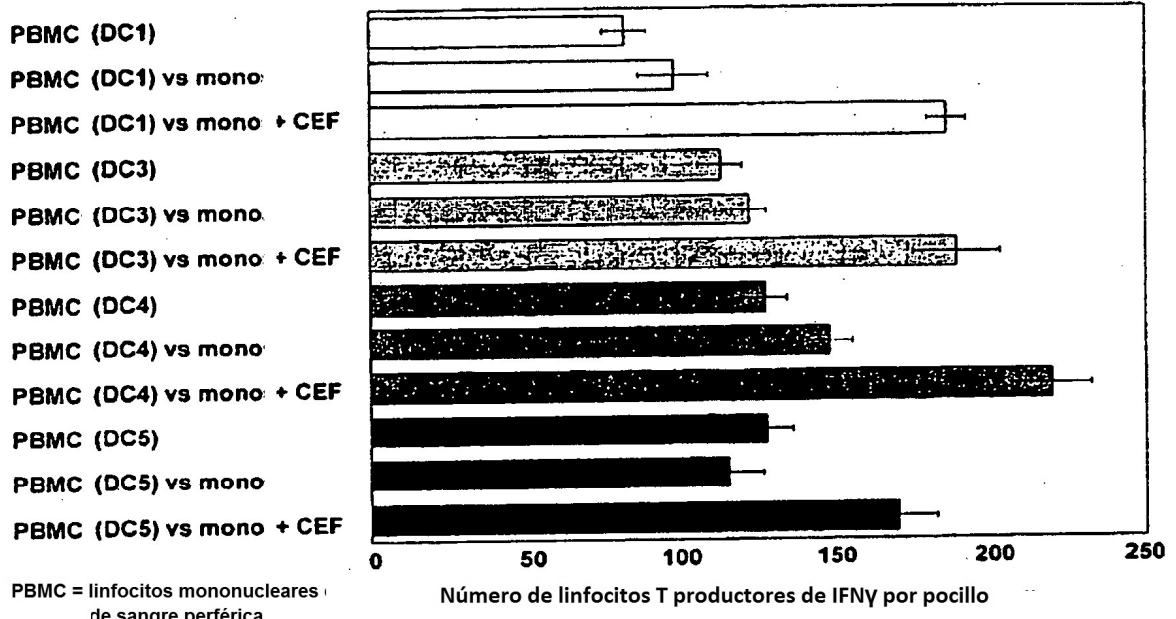


Figura 6



PBMC = linfocitos mononucleares de sangre periférica

Mono = monocitos

CEF = Fibroblastos de embrion de pollo

Figura 7

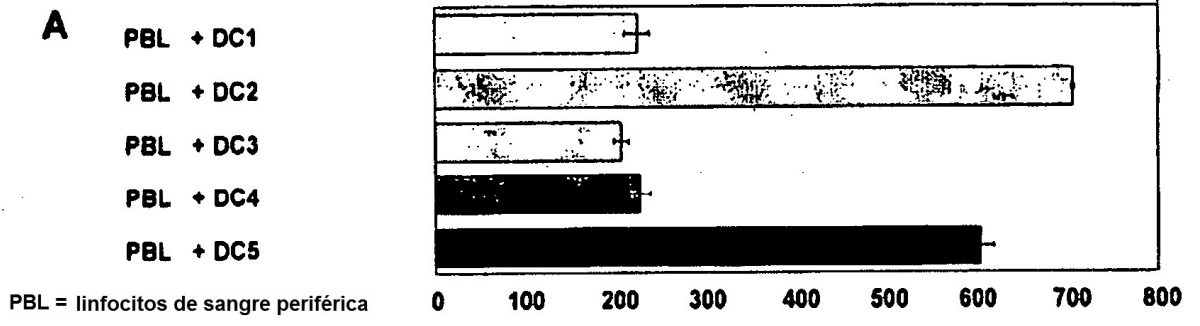


Figura 8