

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 591 230**

51 Int. Cl.:

A61K 35/15 (2015.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2013** **E 15161369 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016** **EP 2913394**

54 Título: **Co-diferenciación y activación de monocitos procedentes de donantes alogénicos para producir células dendríticas pro-inflamatorias**

30 Prioridad:

18.12.2012 EP 12197687

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

25.11.2016

73 Titular/es:

**IMMUNICUM AB (100.0%)
Grafiska Vägen 2
412 63 Göteborg, SE**

72 Inventor/es:

**KARLSSON-PARRA, ALEX y
ANDERSSON, BENGT**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 591 230 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

Co-diferenciación y activación de monocitos procedentes de donantes alogénicos para producir células dendríticas pro-inflamatorias

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un método para producir células dendríticas (CD) humanas inmaduras y no agotadas derivadas de monocitos.

Antecedentes

- 10 Con frecuencia, las terapias tradicionales contra el cáncer tales como cirugía, radiación y quimioterapia, son insuficientes para tratar al paciente y, a menudo, provocan importantes efectos adversos. La inmunoterapia ha demostrado ser prometedora como método alternativo de tratamiento, con menos efectos secundarios negativos.

- 15 En la actualidad, está bien establecido que el sistema inmune posee células, en particular los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (CTLs), capaces de reconocer y, potencialmente, destruir las células tumorales. Sin embargo, un problema importante es la ausencia de inducción, o una inducción escasa de la capacidad de destrucción de estas células T en el paciente oncológico. Una posibilidad es que haya una presentación y co-estimulación inadecuadas del antígeno tumoral por parte de las células dendríticas (CD), los "adyuvantes de la naturaleza", para desencadenar una inmunidad funcional y específica contra el tumor de las células T en el paciente con cáncer.

- 20 Las estrategias inmunoterapéuticas existentes contra el cáncer se centran principalmente en CD autólogas, derivadas del paciente, cargadas de antígeno, que han sido diferenciadas y cargadas con antígeno ex vivo. La idea sobre la que se basa este abordaje es que la eficiencia y control que ofrece la manipulación ex vivo de las CD genera CD con una fuerte capacidad de presentación de antígeno y de co-estimulación. La calidad de la respuesta de las células T depende de la capacidad de estas CD autólogas para presentar los antígenos tumorales a las células T de forma restringida por el MHC (complejo principal de histocompatibilidad) (CD y células T deben proceder del mismo individuo) en los ganglios linfáticos de drenaje y crear, de este modo, una respuesta específica para el tumor de la célula T.

- 25 Las CD autólogas, derivadas de monocitos, son las CD más frecuentemente utilizadas en estudios piloto, dado que es posible obtener miles de millones de monocitos a partir de los leucocitos de la sangre periférica por leucoféresis, un procedimiento laborioso y que requiere mucho tiempo, en el que se separan leucocitos de la sangre circulante. Existen numerosos métodos para enriquecer monocitos subsiguientemente, dos de cuales, la elutriación y el aislamiento de anticuerpos/perlas, también se pueden llevar a cabo en conformidad con las directrices de las Buenas Prácticas de Fabricación (GMP).

- 30 Posteriormente, los monocitos se cultivan en medios suplementados con GM-CSF e IL-4 durante 4 a 7 días, lo que da lugar a su diferenciación en CD inmaduras que se distinguen por su extraordinaria capacidad para producir grandes cantidades de quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias tras la subsiguiente estimulación con determinados tipos de factores de activación (Sallusto et al., Eur J Immunol, 1999, 29:1617; Napolitani et al., Nature Immunology, 2005, 6:769). Las CD estimuladas se someten habitualmente a una pre-pulsación con antígeno(s) tumoral(es) relevante(s) y se activan durante 1 a 2 días antes de la vacunación. No obstante, las respuestas inmunitarias a estas vacunas basadas en CD a menudo son débiles y las respuestas clínicas rara vez son completas y de larga duración.

- 35 Es poco lo que se conoce acerca del destino y función de las CD autólogas generadas ex vivo después de haberlas inyectado. En el ámbito humano, se ha monitorizado recientemente in vivo el patrón de migración de las CD de vacuna inyectadas y es de destacar que menos de 5% de las CD inyectadas alcanzó los ganglios linfáticos de drenaje, en tanto que la mayoría de las CD permaneció en el punto de inyección. Estas CD de vacuna atrapadas localmente perdieron rápidamente su viabilidad y fueron eliminadas más tarde por células reclutadas que presentan antígenos.

- 40 Ahora, se han ofrecido datos de que las CD de vacuna inyectadas que han sido activadas ex vivo durante un periodo de tiempo limitado (es decir, 6 a 18 h) se convierten en CD pro-inflamatorias, que son capaces de cebar de manera indirecta células T CD8⁺ nativas in vivo, actuando como un adyuvante inmunitario local puro. Esta función adyuvante de las CD PI (pro-inflamatorias) inyectadas depende estrictamente de su secreción subsiguiente de ciertas quimiocinas que reclutan CD y células NK en el momento de la administración (tras la retirada de los factores de activación). Estas CD PI expresan/secretan también factores que inducen la activación de células NK endógenas y CD reclutadas en el punto de vacunación. En contraste con las CD PI, las CD activadas por tiempo prolongado (es decir, >24 h), que se han usado a menudo en ensayos clínicos, se distinguen por su estado "agotado" (Langenkamp et al., 2000) y, por lo tanto, su incapacidad para secretar quimiocinas y factores de activación de CD deseables en el momento de la administración.

- 45 Como conclusión, las CD PI no sólo pueden actuar como estimuladores directos de células T autólogas compatibles con el MHC, sino también como adyuvantes, produciendo grandes cantidades de quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias en el momento de la administración. La inyección local de CD PI dará lugar al reclutamiento y

activación de otras células inmunitarias, incluidas células NK circulantes y precursores de CD. Si las CD PI que se inyectan han sido cargadas previamente con antígenos tumorales relevantes, o se inyectan directamente en una lesión tumoral existente, las CD endógenas reclutadas absorberán las células de vacuna moribundas que expresan antígenos tumorales relevantes o células moribundas que expresan antígenos, respectivamente. Después de la
 5 activación, estas CD endógenas reclutadas y, subsiguientemente, cargadas con antígenos, migrarán hacia los ganglios linfáticos de drenaje en donde ceban células T específicas para el tumor de manera restringida para el MHC (Liu et al., 2008). Esta conclusión está avalada por datos de varios estudios preclínicos recientes en los que se redujo significativamente el crecimiento del tumor por medio de vacunaciones terapéuticas con CD PI alogénicas, incompatibles con el MHC y no agotadas (Alder et al., 2008, Siders et al., 2009, Edlich et al., 2010).

10 Por lo tanto, la intensa función adyuvante de las CD PI que, de manera importante, no requieren compatibilidad de MHC entre las CD PI y las células T del paciente, introduce la posibilidad de utilizar CD PI alogénicas, incompatibles con el MHC, producidas previamente y conservadas bajo congelación, como vacunas "prefabricadas", lo cual representa una alternativa práctica y viable a las vacunas de CD específicas para el paciente, hechas a medida. El uso de estas CD PI alogénicas, incompatibles con el MHC, aparece descrito en los documentos EP 1.509.244 B1 y
 15 WO 2011/098516.

Por motivos éticos, no resulta factible la provisión a gran escala, por leucoféresis, de monocitos procedentes de donantes normales de sangre, con el único propósito de producir comercialmente vacunas a gran escala para uso clínico. Por lo tanto, en la práctica, la materia prima, es decir, los monocitos, para la producción de CD PI está limitada a monocitos obtenidos de productos de desecho (capas leuco-plaquetarias y/o filtros de depleción
 20 leucocitaria usados) en el transcurso de la separación de leucocitos no deseados de diferentes componentes de la sangre entera, o monocitos obtenidos de capas leuco-plaquetarias en bancos de sangre.

Sin embargo, el número total de monocitos que se puede aislar de cada capa leuco-plaquetaria o de cada filtro de depleción leucocitaria de bolsas de sangre es, por lo general, menor a 200 millones (Ebner S. et al., "Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative
 25 to standard buffy coats", J Immunol Methods, 252 (2001)), lo que da lugar a costos inaceptablemente elevados para el enriquecimiento y posterior diferenciación de CD de lotes separados de monocitos (cada lote derivado de un único donante), con métodos que están en conformidad con las directrices de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP) según la técnica.

30 Existe, por consiguiente, la necesidad en la técnica de un método para la producción a gran escala, económica y de calidad clínica, de células dendríticas inmaduras no agotadas a partir de productos de desecho que contienen monocitos, procedentes de bancos de sangre.

Resumen

En consecuencia, la presente invención intenta paliar, aliviar, eliminar o sortear una o más de las deficiencias e inconvenientes anteriormente mencionados de la técnica, de manera separada o combinada de cualquier forma,
 35 proporcionando un método de producción de células dendríticas (CD) inmaduras, no agotadas, procedentes de al menos dos donantes alogénicos diferentes. En el método, se proporciona una mezcla de leucocitos alogénicos, los cuales han sido obtenidos de al menos dos donantes alogénicos diferentes. A continuación, se aíslan monocitos alogénicos de la mezcla de leucocitos alogénicos para dar leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos. Seguidamente, se generan CD inmaduras, no agotadas, a partir de los leucocitos alogénicos enriquecidos con
 40 monocitos por medio del co-cultivo de los leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos durante 2 a 7 días en un medio de cultivo celular acuoso, libre de suero no humano. El medio se suplementa con interleuquina-4 (IL-4) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

En contraste con la opinión predominante, las células dendríticas inmaduras generadas, derivadas de monocitos, no están agotadas y, por lo tanto, son capaces de producir cantidades sustanciales de quimiocinas pro-inflamatorias y citoquinas pro-inflamatorias de manera sostenida tras la activación en CD pro-inflamatorias. De este modo, el
 45 método representa un método de producción a gran escala, económica y de calidad clínica de células dendríticas inmaduras, no agotadas.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una mezcla de células dendríticas (CD) alogénicas, inmaduras y no agotadas, derivadas de al menos dos donantes alogénicos diferentes. Por medio del método descrito es posible
 50 obtener una mezcla de este tipo.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para producir CD pro-inflamatorias. A través de la activación de las CD inmaduras, no agotadas, se obtienen CD pro-inflamatorias. Por este método, se puede obtener una mezcla de células dendríticas alogénicas, pro-inflamatorias, que tienen su origen en al menos dos donantes alogénicos diferentes. La mezcla se puede formular como una composición farmacéutica que comprende,
 55 adicionalmente, al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. La mezcla y la composición farmacéutica se pueden usar, respectivamente, en el tratamiento del cáncer.

En las reivindicaciones dependientes se definen otras características ventajosas de la invención. Adicionalmente, en realizaciones descritas en este documento se ofrecen características ventajosas de la invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Los presentes inventores previeron que las poblaciones de leucocitos que contienen monocitos, que están presentes en capas leuco-plaquetarias o atrapadas en filtros para eliminar leucocitos, usados para retirar leucocitos de la sangre entera (usados para enriquecimiento de eritrocitos), o filtros para eliminar leucocitos, usados para retirar los leucocitos de capas leuco-plaquetarias combinadas (usados para el enriquecimiento de plaquetas), se podrían utilizar potencialmente para la producción económica y a gran escala de células dendríticas inmaduras, no agotadas.

Tal como se ha demostrado anteriormente, los leucocitos retenidos por diferentes tipos de filtros para la eliminación de leucocitos, pueden ser recuperados mediante el retrolavado con un medio apropiado, seguido de enriquecimiento con monocitos (Ebner S. et al., "Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative to standard buffy coats", J Immunol Methods, 252 (2001), 93-104; y Meyer T.P.H. et al., "Filter Buffy Coats (FBC): A source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters", J Immunol Methods, 307 (2005), 150-166).

La capa leuco-plaquetaria es la fracción de una muestra de sangre anti-coagulada que contiene la mayor parte de los leucocitos, incluidos neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, linfocitos y plaquetas tras la centrifugación por gradiente de densidad de la sangre entera. Normalmente, las capas leuco-plaquetarias se usan como materia prima para la producción de plaquetas. Durante este proceso, se lleva a cabo una reducción de leucocitos mediante un filtro de depleción leucocitaria, después de combinar 4 a 8 capas leuco-plaquetarias. Típicamente, para aislar las plaquetas de las capas leuco-plaquetarias se utilizan el equipo TACSI o el sistema OrbiSac.

El equipo TACSI para la preparación de plaquetas a partir de capas leuco-plaquetarias combinadas contiene una caja de sistema (fijada al rotor) y un inserto que se puede extraer para ensamblar el kit TACSI. Cada caja de sistema está equipada con un sistema de prensa, controlado y monitorizado por un microprocesador individual. En una primera secuencia, las capas leuco-plaquetarias combinadas, dispuestas en el interior del recipiente de combinación, sedimentan por centrifugación en posición vertical. En la etapa siguiente, la capa rica en plaquetas (que contiene también una cantidad sustancial de leucocitos, incluidos monocitos y linfocitos) del sobrenadante de las capas leuco-plaquetarias combinadas se transfiere a un recipiente de almacenamiento por medio de la activación del sistema de prensa de cada caja. Además, en el kit TACSI hay integrado un filtro de depleción leucocitaria entre la bolsa de procesamiento y el recipiente de almacenamiento final. Se retiran el filtro de depleción leucocitaria y el resto de la capa leuco-plaquetaria presente en el recipiente de capas leuco-plaquetarias combinadas, los cuales contienen cantidades sustanciales de monocitos.

En el sistema alternativo OrbiSac para enriquecimiento automatizado de plaquetas, el recipiente de capas leuco-plaquetarias combinadas tiene forma de anillo. Tras la centrifugación, la parte central del sobrenadante, rica en plaquetas, se transfiere a un recipiente situado en el centro de la centrifugadora y la transferencia se lleva a cabo a través de un filtro integrado de depleción leucocitaria. A continuación, se retiran el filtro de depleción leucocitaria y el resto de la capa leuco-plaquetaria presente en el recipiente de capas leuco-plaquetarias combinadas, los cuales contienen cantidades sustanciales de monocitos.

En resumen, los métodos de la técnica actual para enriquecimiento de plaquetas a partir de capas leuco-plaquetarias ofrecen dos posibles fuentes de monocitos, a saber, el resto de la capa leuco-plaquetaria de la que se están eliminando las plaquetas, también denominada capa leuco-plaquetaria vaciada de plaquetas, y el filtro de depleción leucocitaria. Tanto la capa leuco-plaquetaria vaciada de plaquetas como el filtro de depleción leucocitaria contienen, cada uno, una mezcla de leucocitos, incluyendo hasta un millardo de monocitos. Sin embargo, estos monocitos son alogénicos con respecto a los demás, puesto que se han originado a partir de diferentes donantes alogénicos, a causa de la combinación de las capas leuco-plaquetarias previa a la depleción de las plaquetas.

Las capas leuco-plaquetarias no combinadas, que contienen plaquetas, o los filtros obtenidos tras la eliminación de leucocitos de la sangre entera proporcionarán, como máximo, aproximadamente 100 a 200 millones de monocitos por capa leuco-plaquetaria o filtro. Por lo tanto, es necesario combinarlos para obtener un número suficiente para una producción económica y acorde con las GMP de CD inmaduras no agotadas.

De forma similar, los leucocitos obtenidos de leucocitos de capas leuco-plaquetarias para la producción de plaquetas, que contienen plaquetas, o los obtenidos de filtros usados para retirar leucocitos de la sangre entera, consisten también en una población mixta procedente de diferentes donantes alogénicos.

La combinación de leucocitos de al menos 5 a 10 capas leuco-plaquetarias, o la combinación de leucocitos de al menos 5 a 10 filtros de sangre entera resolvería, al menos en teoría, el problema de proporcionar un número suficiente de leucocitos para la producción a gran escala y económica de CD inmaduras, no agotadas, de calidad clínica.

De manera similar, potencialmente se pueden utilizar capas leuco-plaquetarias combinadas, vaciadas de plaquetas y/o filtros de depleción leucocitaria, empleados para el enriquecimiento de plaquetas a partir de capas leuco-plaquetarias, para suministrar un número suficiente de leucocitos para la producción a gran escala y económica de CD inmaduras, no agotadas, de calidad clínica.

Como se ha demostrado anteriormente, es posible recuperar los leucocitos retenidos por los filtros de depleción leucocitaria mediante retrolavado con un medio adecuado, seguido de enriquecimiento con monocitos (Ebner S. et al., "Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative to standard buffy coats", *J Immunol Methods*, 252 (2001), 93-104; y Meyer T.P.H. et al., "Filter Buffy Coats (FBC): A source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocyte depletion filters", *J Immunol Methods*, 307 (2005), 150-166).

Sin embargo, un problema previsto, asociado con el posterior co-cultivo de leucocitos enriquecidos con monocitos que derivan de diferentes donantes alogénicos, es que se considera que su incompatibilidad con respecto a los antígenos de clase I y clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) da lugar a una activación prematura de monocitos/CD inmaduras procedentes de un donante, debido a la contaminación provocada por células T y/o células asesinas naturales alorreactivas, procedentes de otro donante.

Es sabido que el co-cultivo de células mononucleadas, incluidos los monocitos, linfocitos y células NK de dos donantes alogénicos, en un medio de cultivo celular estándar tal como RPMI-1640 (RPMI = Instituto Roswell Park Memorial, instituto en el que Moore et al. desarrollaron el medio original) con suero bovino fetal, o en un medio de cultivo celular libre de suero tal como X-VIVO 15, induce la producción de factores activadores de las CD bien conocidos, que incluyen el TNF-alfa (Laurin et al., *Transplantation*, 2004; 77:267; Wallgren et al., *Scand J Immunol*, 2005; 62:234). Se ha demostrado repetidamente, además, que la adición de sobrenadantes de cultivo, procedentes de co-cultivos en medio RPMI-1640 estándar con suero bovino fetal, o en medio estándar libre de suero, de células mononucleadas alogénicas induce la activación/maduración de las CD inmaduras derivadas de monocitos (Laurin et al., *Transplantation*, 2004; 77:267; Wallgren et al., *Scand J Immunol*, 2005; 62:234).

Asimismo, se ha demostrado que la adición de TNF-alfa a medios RPMI-1640 estándar suplementados con GM-CSF e IL-4, usados para la diferenciación de monocitos en CD inmaduras, induce una activación prematura y subsiguiente agotamiento (tolerancia) de las CD diferenciadas (Rieser C. et al., "Differential Deactivation of Human Dendritic Cells by Endotoxin Desensitization: Role of Tumor Necrosis Factor- α and Prostaglandin E2", *Blood*, 91 (1998), 3112-3117).

El problema con las células T y células NK contaminantes es importante incluso después del enriquecimiento según las GMP (elutriación y aislamiento de anticuerpos/perlas) de monocitos procedentes de capas leuco-plaquetarias combinadas o de filtros de depleción leucocitaria (Schwanke et al., *Journal of Clinical Apheresis*, 21:153-157 (2006); Meyer et al., *Journal of Immunological Methods*, 307 (2005), 150-166), debido a la dificultad de preparar poblaciones de células monocitarias esencialmente libres de células T y células NK contaminantes.

De manera importante, además, no solamente el co-cultivo con linfocitos alogénicos en medio estándar, sino también el co-cultivo de monocitos con neutrófilos alogénicos en medios RPMI-1640 suplementados con suero bovino fetal, da como resultado un incremento regulado de CD40, CD86 de membrana y del antígeno leucocitario humano (HLA)-DR en las CD, es decir, una activación prematura, tal como han demostrado Meggiovanni et al. (véase *Journal of Leukocyte Biology*, 2006;79:977-988). Se ha demostrado que es muy difícil llevar a cabo una retirada sustancial de neutrófilos de los monocitos en las capas leuco-plaquetarias combinadas o los filtros leucocitarios eluidos empleando la elutriación (Schwanke et al., *Journal of Clinical Apheresis*, 21:153-157 (2006)) o el aislamiento de anticuerpos/perlas (Meyer et al., *Journal of Immunological Methods*, 307 (2005), 150-166). Normalmente, un producto enriquecido en monocitos de este tipo contiene una cantidad importante de neutrófilos (es decir, 25 a 40%, basado en el número total de células presentes). No obstante, desde el punto de vista de la seguridad, esta contaminación con neutrófilos no representa un problema.

Es más, incluso si fuera posible preparar poblaciones de monocitos 100% puras, no se eliminaría el riesgo de una activación prematura debida a interacciones activas entre monocitos de diferentes donantes alogénicos. En un reciente estudio de revisión titulado "Origen y biología de la respuesta alogénica", de los conocidos inmunólogos Fadi G. Lakkis y Robert I. Lechter (véase *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, Vol. 3, Nº 8, 2013), los autores llegaron a la conclusión de que realmente existe un mecanismo innato de alorreconocimiento. Los autores afirman que: "el rechazo de aloinjertos no está limitado a animales vertebrados, dotados de sistemas inmunitarios adaptativos, sino que es común en muchos organismos invertebrados que son anteriores a la evolución de la inmunidad adaptativa (animales que carecen de linfocitos T y B, células NK, enzimas de reordenación de genes somáticos y de MHC)".

Adicionalmente y, tal vez de manera más directa, se registran respuestas alogénicas también en ratones que carecen de células linfoides. La activación de monocitos depende de diferencias en los antígenos no-MHC entre los monocitos receptores y los leucocitos de donantes alogénicos inyectados, incluidos los monocitos alogénicos (Zecher D. et al., "An Innate Response to Allogeneic Nonself Mediated by Monocytes", *J Immunol*, 83 (2009), 7810-7816). Zecher et al. demostraron que la inyección de leucocitos alogénicos en las orejas de ratones RAG2/2, que carecen de linfocitos T y B, desencadena una tumefacción e infiltración de la piel con células mieloides hospedadoras significativamente más importantes que la inyección de leucocitos singénicos. La respuesta a los leucocitos alogénicos se produjo de manera independiente de las células NK y estuvo mediada por monocitos. Además, la respuesta monocitaria estuvo dirigida contra alodeterminantes no asociados con el MHC.

En un estudio todavía más reciente (Zeng Q. Et al., "Innate recognition of allogeneic non-self induces monocyte differentiation to mature dendritic cells in vivo", *Am J Transplant*, 12:148-148, 2012), los autores demostraron que los aloinjertos de corazón trasplantados a ratones gc2/2RAG2/2, que carecen de células T, B y NK, resultan rápidamente infiltrados por monocitos hospedadores que se diferencian en células dendríticas (CD) maduras que expresan IL-12. Sin embargo, aún no se conocen los determinantes en las células alogénicas que desencadenan la maduración de monocitos hospedadores ni los supuestos receptores monocitarios que los reconocen.

Existen, por consiguiente, pruebas evidentes de que los monocitos de mamíferos responden directamente a determinantes no-MHC presentes en las células alogénicas, independientemente de las células T, B y NK. En consecuencia, de acuerdo con la opinión generalmente predominante, se considera que la alorreactividad es una propiedad general de los monocitos.

Considerados de manera conjunta, esto implica que el co-cultivo de poblaciones celulares enriquecidas con monocitos, derivadas de diferentes donantes alogénicos, conduce claramente a la pre-activación y posterior agotamiento de los monocitos durante su diferenciación en CD derivadas de monocitos. De esta forma, las CD serán incapaces de convertirse en CD PI que produzcan de manera sostenida los factores adyuvantes necesarios tras la re-estimulación con factores de activación pertinentes.

Este agotamiento inducido por la activación previsto es similar al conocido agotamiento de los monocitos, macrófagos y CD inducido por una activación prematura con agentes inflamatorios tales como el TNF- α (Park et al., *Nat Immunol*, 2012; 12:607-615) o lipopolisacáridos (LPS) microbianos (Rieser C. et al., "Differential Deactivation of Human Dendritic Cells by Endotoxin Desensitization: Role of Tumor Necrosis Factor- α and Prostaglandin E2", *Blood*, 91 (1998), 3112-3117; Langenkamp A. et al., "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming TH1, TH2 and nonpolarized T cells", *Nature Immunol.* 1 (2000), 311-316).

Sin embargo, y de forma sorprendente, los presentes inventores han encontrado que es posible propagar CD inmaduras y no agotadas a partir de una población celular inicial, que consiste en una mezcla de leucocitos alogénicos, enriquecidos con monocitos, procedentes de diferentes donantes alogénicos, de manera similar a la que se usa para propagar CD inmaduras y no agotadas procedentes de monocitos enriquecidos derivados de un único donante (véase el documento WO 2011/098516), es decir, empleando un medio de cultivo celular acuoso, libre de suero no humano, pero suplementado con interleuquina-4 (IL-4) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).

En contraste con la opinión generalizada, se ha demostrado sorprendentemente que la propagación en CD inmaduras de una mezcla de monocitos enriquecidos procedentes de diferentes donantes alogénicos, bajo determinadas condiciones, no da como resultado una activación prematura y subsiguiente agotamiento de las CD. Estas condiciones incluyen el co-cultivo en un medio de cultivo celular acuoso libre de suero no humano y suplementado con GM-CSF e IL-4.

No obstante, el co-cultivo en un medio de cultivo celular acuoso, libre de suero no humano y que no está suplementado con interleuquina-4 (IL-4) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, así como el co-cultivo en un medio de cultivo celular acuoso, que comprende suero no humano, por ejemplo, suero bovino fetal, y suplementado con interleuquina-4 (IL-4) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, da como resultado, tal como era de esperar y se reconoce en la técnica, una activación prematura y el posterior agotamiento de las CD.

De esta forma, entonces, se pueden aislar monocitos a partir de poblaciones combinadas de leucocitos, procedentes de diferentes donantes alogénicos, permitiendo llevar a cabo un enriquecimiento acorde con las GMP económico y a gran escala tal como una elutriación (Elutra) o aislamiento de anticuerpos/perlas (CliniMacs). A continuación, a partir de los leucocitos alogénicos aislados, enriquecidos con monocitos, se pueden generar CD inmaduras no agotadas sin una activación prematura.

Estas CD inmaduras no agotadas pueden ser usadas para propagar CD pro-inflamatorias, cuya finalidad es actuar como una vacuna antitumoral cuando se inyecta en el interior del tumor (véase el documento WO 2011/098516). Adicionalmente, las CD inmaduras no agotadas, procedentes de diferentes donantes alogénicos, se pueden cargar, antes de la activación, con antígeno(s) tumoral(es) con el fin de producir una vacuna celular alogénica anti-cáncer "completa" (véase el documento EP 1.509.244 B1), que se puede inyectar en diferentes sitios, incluidos sitios intratumorales, subcutáneos, epicutáneos, intramusculares y/o intravenosos.

Por lo tanto, una realización hace referencia a un método para producir CD inmaduras no agotadas a partir de una mezcla de leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos. En este método, se proporciona una mezcla de leucocitos alogénicos obtenida de al menos dos donantes alogénicos diferentes. Según una realización, la expresión "dos donantes alogénicos diferentes" significa que los dos individuos que donan leucocitos son de la misma especie, pero de diferente constitución genética, es decir, son diferentes desde el punto de vista antigénico. Tal como se ha descrito anteriormente, se pueden obtener leucocitos alogénicos de capas leuco-plaquetarias combinadas o eluyendo leucocitos a partir de filtros de depleción leucocitaria ya usados. A continuación, desde la mezcla de

leucocitos alogénicos proporcionada se aíslan monocitos alogénicos. Subsiguientemente, se generan CD inmaduras no agotadas de los leucocitos alogénicos aislados, enriquecidos con monocitos.

Además de la capacidad para llevar a cabo un enriquecimiento acorde con las GMP económico y a gran escala de monocitos, otra ventaja de las CD inmaduras no agotadas procedentes de una mezcla de monocitos alogénicos derivada de al menos dos donantes alogénicos diferentes, es que se reducirá la variación biológica normal referida a la producción de diferentes factores pro-inflamatorios tras la activación, cuya existencia es conocida entre las CD PI derivadas de diferentes donantes.

En una realización preferida, los leucocitos alogénicos se proporcionan combinando al menos dos capas leuco-plaquetarias que comprenden leucocitos. Las capas leuco-plaquetarias a combinar se obtienen de al menos dos donantes alogénicos diferentes. Las capas leuco-plaquetarias combinadas pueden contener plaquetas o éstas pueden haber sido retiradas.

Asimismo, se pueden obtener leucocitos alogénicos por elusión de los leucocitos de al menos dos filtros de depleción leucocitaria, los cuales han sido usados previamente para retirar leucocitos de la sangre entera de al menos dos donantes alogénicos diferentes. Después de la elusión, se combinan los leucocitos obtenidos para obtener una mezcla de leucocitos alogénicos. Evidentemente, pero menos preferiblemente, se puede combinar también la sangre entera antes de la eliminación de leucocitos. Ebner et al. (véase *Journal of Immunological Methods*, 252 (2001), 93-104) han descrito un procedimiento para eluir leucocitos de un filtro de depleción que ha sido usado previamente para eliminar leucocitos de la sangre entera.

De manera similar, se pueden obtener leucocitos alogénicos por elusión de los leucocitos de un filtro de depleción leucocitaria que ha sido usado previamente para retirar leucocitos de capas leuco-plaquetarias, en donde las citadas capas leuco-plaquetarias proceden de al menos dos donantes alogénicos diferentes. Meyer et al. (véase *Journal of Immunological Methods*, 307 (2005), 150-166) han descrito un procedimiento para eluir leucocitos de un filtro de depleción que ha sido usado previamente para eliminar leucocitos de una capa leuco-plaquetaria.

Aunque estos leucocitos alogénicos obtenidos de filtros de depleción leucocitaria se pueden usar también para producir CD inmaduras no agotadas, parece ser preferible utilizar leucocitos alogénicos producidos por la combinación de al menos dos capas leuco-plaquetarias, obtenidas de al menos dos donantes alogénicos diferentes. Los leucocitos alogénicos eluidos de filtros de depleción leucocitaria pueden producir cantidades algo menores de quimiocinas, con la excepción de MIG, y citoquinas después de la maduración, en comparación con los monocitos alogénicos derivados directamente de muestras combinadas de sangre periférica o de capas leuco-plaquetarias combinadas.

Es bien conocido en la técnica el aislamiento de monocitos a partir de una mezcla de diferentes leucocitos. Según una realización, los monocitos se aíslan de la mezcla de leucocitos alogénicos suministrada mediante métodos de producción acordes con las GMP establecidos. De este modo, se pueden aislar monocitos de la mezcla de leucocitos alogénicos proporcionada mediante elutriación o por aislamiento de anticuerpos/perlas.

La elutriación es una técnica en la que una elutriación continua a contracorriente separa las células en múltiples fracciones. En pocas palabras, una fuerza centrífuga constante que separa las células por densidad se opone a una corriente de flujo del medio en aumento continuo que atraviesa el sedimento, dispersando las células por tamaño. Por lo tanto, con las células más pequeñas/más ligeras en primer lugar y las más grandes/más pesadas en segundo término, el flujo del medio separa las células en diversos productos.

El aislamiento de anticuerpos/perlas de monocitos se lleva a cabo por clasificación celular activada por (inmuno)-magnetismo (MACS). MACS es una técnica ampliamente utilizada para el aislamiento selectivo de células desde la sangre entera, capas leuco-plaquetarias o de glóbulos blancos recuperados por aféresis. En pocas palabras, se acoplan anticuerpos específicos para CD que portan perlas ferromagnéticas en su extremo terminal Fc con células deseadas (selección positiva) o no deseadas (selección negativa). Las células tratadas de esta forma pueden quedar retenidas en una columna porosa con recubrimiento metálico cuando son expuestas a un campo magnético potente.

Después del aislamiento, los monocitos se diferencian en CD inmaduras, es decir, se generan CD inmaduras. Las CD inmaduras se generan por co-cultivo de los monocitos alogénicos en un medio de cultivo celular acuoso libre de suero no humano y suplementado con factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) en combinación con interleuquina-4 (IL-4) durante 2 a 7 días, por ejemplo, aproximadamente 5 días, con lo que los monocitos se diferencian en CD inmaduras.

Puesto que se ha demostrado que los medios de cultivo celular que comprenden suero bovino fetal inducen la activación prematura, a pesar de estar suplementados con GM-CSF e IL-4, es importante que el medio usado esté exento de suero no humano.

Igualmente, se pueden generar CD inmaduras cultivando los monocitos alogénicos en un medio acuoso que comprende GM-CSF combinado con interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-15 (IL-15) o interferón alfa durante 2 a 7 días, por ejemplo 5 días, diferenciando así los monocitos en CD inmaduras. Sin embargo, se prefiere el uso de GM-

CSF en combinación con IL-4, dado que ha demostrado prevenir la alorreactividad y la activación prematura cuando se utiliza en combinación con un medio libre de suero no humano.

Los expertos en la técnica están familiarizados con medios de cultivo celular y sus componentes. Típicamente, el medio de cultivo celular usado comprende:

- 5 al menos una sal tal como NaCl, KCl, MgSO₄ y/o Ca(NO₃)₂;
- al menos un azúcar tal como glucosa;
- uno o múltiples aminoácidos tales como L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-cistina, L-glutamina, ácido L-glutámico, glicina, L-histidina, L-hidroxiprolina, L-isoleucina y/o L-lisina;
- 10 una o múltiples vitaminas y otros nutrientes vitales tales como glutatión, biotina, vitamina B12, D-pantotenato de Ca, cloruro de colina, ácido fólico, mioinositol, nicotinamida, ácido p-amino-benzoico, piridoxina, riboflavina y/o tiamina; y
- al menos una sustancia tampón tal como sal de fosfato (por ejemplo, Na₂HPO₄) y/o una sal de carbonato (por ejemplo, NaHCO₃).

- 15 Según una realización, el medio de cultivo comprende al menos una sal tal como NaCl, al menos un azúcar tal como glucosa, uno o múltiples aminoácidos, una o múltiples vitaminas, y una sustancia tampón tal como una sal de fosfato (por ejemplo, Na₂HPO₄) y/o una sal de carbonato (por ejemplo, NaHCO₃).

- Adicionalmente, aunque el medio de cultivo celular está además libre de un suero no humano, típicamente comprende al menos un polipéptido humano. Según una realización, el medio de cultivo celular comprende al menos un polipéptido humano seleccionado del grupo que consiste en transferrina, albúmina e insulina; preferiblemente, el medio de cultivo celular comprende los tres. El polipéptido humano se puede obtener de plasma humano. Además, pueden ser producidos de manera recombinante. Por ejemplo, la insulina se puede producir de forma recombinante en células de levadura.
- 20

- Por ejemplo, el medio de cultivo celular libre de suero no humano puede ser CellGro®, que es un medio acorde con las GMP, libre de suero, para cultivo de células dendríticas (CD) comercializado por CellGenix GmbH. En los EE.UU. el medio está disponible en el comercio bajo la marca registrada CellGenix®.
- 25

- Tal como podrán reconocer los expertos en la técnica y como se explica en este documento, el término “aislado” no necesariamente se refiere a una pureza de 100%, sino a monocitos obtenidos por un proceso de aislamiento que muestra preferencia por los monocitos. Los monocitos obtenidos por un proceso de este tipo se pueden designar como leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos, puesto que, además de los monocitos, estarán presentes otros leucocitos.
- 30

Según una realización, los monocitos alogénicos se enriquecen a partir de la mezcla de leucocitos alogénicos. Los leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos comprenden, además de los monocitos, también típicamente neutrófilos alogénicos. Adicionalmente, pueden comprender otros granulocitos.

- 35 Al contrario que la opinión predominante, no se observaron signos de activación prematura cuando los monocitos alogénicos se co-cultivaron en medio de cultivo celular acuoso, libre de suero no humano y suplementado con GM-CSF/IL-4, a pesar del hecho de que se obtuvieron CD inmaduras de una mezcla de leucocitos alogénicos. En consecuencia, estas CD inmaduras no están agotadas y, por lo tanto, son capaces de producir de manera sostenida, tras la retirada de los factores de activación, cantidades sustanciales tales como más de 2.000, 5.000 o 7.000 pg/mL de quimiocinas pro-inflamatorias que incluyen MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES y MIG, y cantidades sustanciales tales como más que 500, 1.500 o 3.000 pg/mL de citoquinas pro-inflamatorias que incluyen IL-12p70 y TNF-alfa.
- 40

- Según una realización, por “inmadura” se dan a entender CD que expresan solamente niveles bajos de los marcadores de maduración de CD, CD83 y CD86, y que son capaces de producir grandes cantidades de quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias tras su activación. Según la invención, por “niveles bajos” se debe interpretar un incremento de al menos 3 veces, por ejemplo de al menos 5 veces, de la expresión de CD83 registrada tras la activación, y un aumento de al menos 5 veces, por ejemplo de al menos 8 veces, de la expresión de CD86 registrada tras la activación.
- 45

- Puesto que se había previsto que se registraría una activación prematura, en algunos experimentos se agregó el inhibidor de ciclooxigenasa-2, NS-398, un factor conocido por impedir el agotamiento mediado por la prostaglandina E2 (PGE2) de las CD activadas. Sin embargo, durante la propagación de monocitos en CD, la presencia de NS-398 no aumentó, sino más bien redujo la producción inducida por la activación de MIG e IL-12p70. Por consiguiente, no hay signos de agotamiento mediado por PGE2 de las CD inmaduras diferenciadas a partir de co-cultivos de monocitos alogénicos mezclados.
- 50

Tal como podrán reconocer los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos EP 1.509.244 B1 y WO 2011/098516), las células dendríticas (CD) inmaduras no agotadas son de utilidad en la producción de composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer. De este modo, una realización se refiere a una mezcla de células dendríticas (CD) alogénicas, inmaduras y no agotadas, procedentes de al menos dos donantes alogénicos diferentes. Estas células dendríticas (CD) se pueden obtener por algún método como los que se han descrito en este documento. Después de la diferenciación en CD inmaduras, las CD inmaduras pueden ser activadas para transformarse en CD pro-inflamatorias. La activación se puede inducir de muchas formas. Numerosas señales han demostrado inducir al menos algunos aspectos de la activación de las CD. Entre las más potentes se encuentran los productos microbianos y virales (patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) que son reconocidos directamente por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), incluidos miembros de la familia de receptores tipo Toll (TLR)). Los PRR controlan la expresión de muchos genes de respuesta innata y pueden señalar directamente una activación de CD. Además la señalización de PRR tanto en células inmunitarias como no inmunitarias da lugar, con frecuencia, a la síntesis de citoquinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina-1 (IL-1), las cuales pueden estimular también la activación de CD. De esta forma, la adición de citoquinas inflamatorias puede contribuir también a la activación de las CD inmaduras.

Según una realización, las CD inmaduras se cargan con antígenos antes de la activación o simultáneamente con ella, con el fin de proporcionar una vacuna celular alogénica contra el cáncer. En la técnica son bien conocidos los procedimientos para cargar antígenos (véase, por ejemplo, el documento EP 1.509.244 B1) y se pueden llevar a cabo con métodos tales como pulsación, transfección, infección o fusión. Por ejemplo, el antígeno se puede obtener típicamente de un tumor; típicamente, del tipo de tumor contra el que irá dirigida la vacuna. Típicamente, en la obtención de antígenos se utiliza una muestra representativa del tipo de tumor que interesa.

De acuerdo con una realización preferida, la activación de las CD inmaduras se lleva a efecto según el método descrito en el documento WO 2011/098516. Así, se puede inducir la maduración agregando el ligando Poli-I:C del receptor tipo Toll 3 (TLR3), un ligando de TLR 7/8 tal como R848 (Resiquimod) y la citoquina interferón gamma (IFN- γ). El ligando Poli-I:C del receptor tipo Toll 3 (TLR3) es un análogo sintético de ARN de doble cadena que comprende una cadena de poli(I) hibridada con una cadena de poli(C). El tamaño de la cadena puede variar. El tamaño puede ser de 200 pares de bases hasta 8.000 pares de bases, por ejemplo 200 a 1.500 o 1.500 a 8.000 pares de bases. El ligando de TLR7/8 R848 también se denomina Resiquimod en la técnica. Como alternativa a Resiquimod, se pueden utilizar Gardiquimod o Imiquimod como ligandos de TLR7/8. Típicamente, las CD inmaduras permanecen expuestas a los factores de activación durante 8 a 24 horas, por ejemplo, 18 horas.

La activación puede incluir, además, la adición de al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en ligandos de TLR2, ligandos de TLR4 tales como lipopolisacáridos bacterianos y monofosforil lípido A, ligandos de TLR9 tales como secuencias de oligonucleótidos (ODN) CpG, que distinguen el ADN microbiano del ADN de mamíferos, interferón alfa (IFN- α), interleuquina 1 β (IL-1 β) y factores de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Adicionalmente, la activación preferiblemente no comprende la adición de prostaglandina E2 (PGE2) con el fin de evitar que las CD maduras se conviertan en CD migratorias que abandonarán rápidamente el sitio de inyección (tumor), lo que sería un inconveniente en el contexto de esta invención.

Después de la activación, las CD pro-inflamatorias resultantes se pueden lavar para eliminar esencialmente todos los factores de activación. Por lo tanto, los factores de activación se eliminan típicamente por lavado antes del uso de las CD pro-inflamatorias como vacuna. La retirada de los factores de activación evita la co-administración de factores de activación (dirigidos a la inducción de CD pro-inflamatorias ex vivo). La co-administración de factores de activación dará lugar, con mucha probabilidad, a una activación potente y persistente también de las CD inmaduras reclutadas de forma intratumoral, lo cual conduce a su diferenciación en CD maduras pro-inflamatorias en lugar de la diferenciación deseada en CD maduras migratorias.

Tal como se ha descrito anteriormente (véase el documento WO 2011/098516), las células dendríticas pro-inflamatorias son útiles en el tratamiento del cáncer dado que pueden activar las CD del propio paciente para desarrollar CD migratorias cargadas con el tumor. De este modo, una realización se refiere a la mezcla de células dendríticas pro-inflamatorias alogénicas procedentes de al menos dos donantes alogénicos diferentes. Estas células dendríticas pro-inflamatorias alogénicas se pueden obtener por los métodos descritos en este documento. La congelación de las células dendríticas pro-inflamatorias tras la activación permite su almacenamiento. Típicamente, las células dendríticas pro-inflamatorias se congelan en un medio que contiene dimetilsulfóxido (DMSO) y suero o plasma. Antes de usarlas, las células congeladas se descongelan y se retira el DMSO por lavado.

Para el uso en el tratamiento del cáncer, estas células dendríticas pro-inflamatorias alogénicas se pueden formular en una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como solución salina tamponada con fosfato, agua, y emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o de agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. Además, puede comprender adyuvantes, excipientes, estabilizadores, conservantes y/u otros componentes farmacéuticamente aceptables, conocidos en la técnica. Por ejemplo, el vehículo puede ser una solución salina que comprende albúmina de suero humano.

Una realización adicional se refiere a una mezcla de estas células dendríticas pro-inflamatorias alogénicas, o a una composición de este tipo que comprende dichas células dendríticas pro-inflamatorias alogénicas, para usar en el tratamiento del cáncer. De manera similar, una realización se refiere a una mezcla de este tipo de células dendríticas pro-inflamatorias alogénicas para usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. Otra realización adicional hace referencia a un método para tratar el cáncer, en el que se administra una mezcla de células dendríticas pro-inflamatorias alogénicas a un paciente que requiere dicho tratamiento, en una dosis suficiente para activar las CD del propio paciente para el desarrollo de CD migratorias cargadas con el tumor.

A continuación, se describen otras realizaciones numeradas adicionales.

1. Un método de producción de células dendríticas (CD) inmaduras, no agotadas, que comprende las etapas de:
 - 10 proporcionar una mezcla de leucocitos alogénicos, los cuales han sido obtenidos de al menos dos donantes alogénicos diferentes;

a partir de dicha mezcla de leucocitos alogénicos, aislar monocitos alogénicos, para ofrecer leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos; y

generar CD inmaduras, no agotadas, procedentes de dichos leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos, en donde la generación de células dendríticas (CD) inmaduras, no agotadas, se lleva a cabo por el co-cultivo de dichos leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos durante 2 a 7 días en un medio de cultivo celular acuoso, libre de suero no humano, en donde dicho medio se suplementa con interleuquina-4 (IL-4) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).
 - 15 2. El método según la realización 1, en el que dicho medio de cultivo celular comprende al menos un polipéptido humano.
 - 20 3. El método según la realización 2, en el que dicho polipéptido humano se selecciona del grupo que consiste en transferrina, albúmina e insulina.
 4. El método según una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en el que dichos leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos comprenden neutrófilos alogénicos.
 - 25 5. La realización según una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en la que dicha mezcla de leucocitos alogénicos se consigue combinando al menos dos capas leuco-plaquetarias que comprenden leucocitos, en donde dichas capas leuco-plaquetarias que se deben combinar se han obtenido de al menos dos donantes alogénicos diferentes.
 6. El método según la realización 5, en el que dichas capas leuco-plaquetarias combinadas contienen plaquetas o éstas han sido retiradas.
 - 30 7. El método según una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en el que dicha mezcla de leucocitos alogénicos se obtiene por:

elusión de leucocitos a partir de al menos dos filtros de depleción leucocitaria, los cuales han sido utilizados, previamente, para retirar leucocitos desde la sangre entera, en donde dicha sangre entera se ha obtenido de al menos dos donantes alogénicos diferentes; y
 - 35 combinación de los leucocitos obtenidos para conseguir dicha mezcla de leucocitos alogénicos;

o por:

elusión de leucocitos a partir de un filtro de depleción leucocitaria, el cual se ha utilizado para retirar leucocitos de capas leuco-plaquetarias combinadas, en donde las capas leuco-plaquetarias proceden de al menos dos donantes alogénicos diferentes.
 - 40 8. El método según una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que dichos monocitos alogénicos se aíslan por elutriación o por aislamiento de anticuerpos/perlas.
 9. El método según una cualquiera de las realizaciones anteriores, en el que dicho co-cultivo se lleva a cabo durante aproximadamente 5 días.
 - 45 10. El método según una cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende, además, la etapa de cargar las CD inmaduras, no agotadas, con un antígeno.
 11. Una mezcla de células dendríticas (CD) alogénicas, no agotadas e inmaduras, procedentes de al menos dos donantes alogénicos diferentes, en donde dichas células dendríticas (CD) se pueden obtener por un método según una cualquiera de las realizaciones 1 a 10.
 12. Un método para producir CD pro-inflamatorias, que comprende las etapas de:

obtener CD inmaduras, no agotadas, según una cualquiera de las realizaciones 1 a 11; y

activar las CD inmaduras, no agotadas, para obtener CD pro-inflamatorias.

5 13. El método según la realización 12, en el que dicha activación se lleva a cabo por la adición del ligando Poli-I:C del receptor tipo Toll 3 (TLR3), un ligando de TLR 7/8 tal como Resiquimod y el interferón gamma (IFN- γ) para inducir la activación.

14. El método según la realización 13, en el que dicha activación comprende además la adición de al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en ligandos de TLR2, ligandos de TLR4, ligandos de TLR9, interferón alfa (IFN- α), interleuquina 1 β (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) para inducir la activación.

10 15. El método según una cualquiera de las realizaciones 13 o 14, en el que dicha activación no comprende la adición de prostaglandina E2 (PGE2).

16. El método según una cualquiera de las realizaciones 13 a 15, en el que las CD inmaduras se exponen a los factores de activación durante 8 a 24 horas, tras lo cual esencialmente todos los factores de activación se eliminan por lavado.

15 17. Una mezcla de células dendríticas, alogénicas y pro-inflamatorias, derivadas de al menos dos donantes alogénicos diferentes, en donde dichas células dendríticas se pueden obtener por un método según una cualquiera de las realizaciones 12 a 16.

18. Una composición farmacéutica que comprende la mezcla de células dendríticas, alogénicas y pro-inflamatorias según la realización 16 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 19. La mezcla de células dendríticas, alogénicas y pro-inflamatorias según la realización 17, o la composición según la realización 18, para usar en el tratamiento del cáncer.

25 Sin entrar en más detalles, se cree que el experto en la técnica, basándose en la descripción anterior y la parte experimental siguiente, puede usar la presente invención en su máxima expresión. Por lo tanto, se considera que las realizaciones específicas preferidas que se describen en este documento solamente ilustran, pero no limitan de forma alguna el resto de la descripción. Además, aun cuando la presente invención se ha descrito en el texto precedente haciendo referencia a realizaciones específicas, ésta no se halla limitada a las formas concretas expuestas en este documento. Por el contrario, la invención está limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas, por lo que, dentro del alcance de estas reivindicaciones adjuntas, resultan igualmente posibles otras realizaciones, por ejemplo diferentes de las mencionadas anteriormente.

30 En las reivindicaciones, el término "comprende/que comprende" no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Adicionalmente, aunque pueden incluirse características individuales en diferentes reivindicaciones, existe la posibilidad de combinarlas de manera ventajosa, y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea factible y/o conveniente.

Además, las referencias en singular no excluyen una pluralidad. Las expresiones "un", "una", "primero", "segundo", etc. no descartan la pluralidad.

35 **Breve descripción de los dibujos**

Fig. 1 ilustra la expresión de los marcadores de activación/maduración CD86 y CD83 en CD inmaduras y CD PI derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de sangre periférica.

40 Fig. 2 ilustra la producción de quimiocinas pro-inflamatorias por parte de CD inmaduras (derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de sangre periférica) durante 18 horas de estimulación persistente con factores de activación ("producción activa").

Fig. 3 ilustra la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de CD inmaduras (derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de sangre periférica) durante 18 horas de estimulación persistente con factores de activación ("producción activa").

45 Fig. 4 ilustra la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de CD inmaduras (derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de sangre periférica) durante 18 horas de estimulación persistente con factores de activación +/- la adición del inhibidor de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), NS-398.

Fig. 5 ilustra la producción de quimiocinas pro-inflamatorias por parte de CD inmaduras (derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de capas leuco-plaquetarias) durante 18 horas de estimulación persistente con factores de activación ("producción activa").

Fig. 6 ilustra la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de CD inmaduras (derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de capas leuco-plaquetarias) durante 18 horas de estimulación persistente con factores de activación ("producción activa").

5 Fig. 7 ilustra la producción de quimiocinas pro-inflamatorias por parte de CD PI (derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de sangre periférica). Estas CD PI han sido lavadas tras la estimulación con factores de activación durante 18 horas y, subsiguientemente, se han cultivado nuevamente durante 24 horas, sin agregar factores de activación ("producción pasiva").

10 Fig. 8 ilustra la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de CD PI (derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de sangre periférica). Estas CD PI han sido lavadas tras la estimulación con factores de activación durante 18 horas y, subsiguientemente, se han cultivado nuevamente durante 24 horas, sin agregar factores de activación ("producción pasiva").

15 Fig. 9 ilustra la producción de quimiocinas pro-inflamatorias por parte de CD PI (derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de capas leuco-plaquetarias). Estas CD PI han sido lavadas tras la estimulación con factores de activación durante 18 horas y, subsiguientemente, se han cultivado nuevamente durante 24 horas, sin agregar factores de activación ("producción pasiva").

Fig. 10 ilustra la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de CD PI (derivadas de cultivos únicos o mixtos de monocitos de capas leuco-plaquetarias). Estas CD PI han sido lavadas tras la estimulación con factores de activación durante 18 horas y, subsiguientemente, se han cultivado nuevamente durante 24 horas, sin agregar factores de activación ("producción pasiva").

20 Fig. 11 demuestra que las CD inmaduras mixtas, derivadas de monocitos de los filtros, producen cantidades sustanciales de quimiocinas pro-inflamatorias durante 18 horas de estimulación persistente con factores de activación ("producción activa").

25 Fig. 12 demuestra que las CD inmaduras mixtas, derivadas de monocitos de los filtros, producen cantidades sustanciales de citoquinas pro-inflamatorias durante 18 horas de estimulación persistente con factores de activación ("producción activa").

Fig. 13 demuestra que las CD PI mixtas, derivadas de monocitos de filtros, exhiben una producción sustancial de quimiocinas pro-inflamatorias tras la retirada de los factores de activación. Estas CD PI han sido lavadas tras la estimulación con factores de activación durante 18 horas y, subsiguientemente, se han cultivado nuevamente durante 24 horas, sin agregar factores de activación ("producción pasiva").

30 Fig. 14 demuestra que las CD PI mixtas, derivadas de monocitos de filtros, exhiben una producción sustancial de citoquinas pro-inflamatorias tras la retirada de los factores de activación. Estas CD PI han sido lavadas tras la estimulación con factores de activación durante 18 horas y, subsiguientemente, se han cultivado nuevamente durante 24 horas, sin agregar factores de activación ("producción pasiva").

Sección experimental

35 Los siguientes son solamente ejemplos y no se debe interpretar que limitan el alcance de la invención. Por el contrario, la invención está limitada solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Leucocitos de diverso origen

Aislamiento de leucocitos a partir de filtros de depleción leucocitaria (filtros TACSI)

40 En el Laboratorio de Componentes del Departamento de Medicina de Transfusión del Hospital Universitario de Sahlgrenska, Goteburgo, se recolectaron los filtros de leucocitos (filtros TACSI de depleción leucocitaria, usados para la eliminación rutinaria de leucocitos de 4 capas leuco-plaquetarias durante la producción de plaquetas) que se llevaron, conservados en hielo, al laboratorio (Departamento de Inmunología Clínica, Hospital Universitario de Sahlgrenska).

45 En el laboratorio, una jeringuilla (Terumo) se cargó con 50 mL de tampón PBS/EDTA (CliniMACS) y se acopló al filtro TACSI mediante un conector luer-lock. El filtro se sometió tres veces a un retrolavado en un matraz de vidrio estéril (en total, 150 mL de tampón PBS/EDTA). Por último, la suspensión celular eluida se diluyó con PBS (PAA, Fisher Scientific) en una concentración de 1:2 en un tubo tipo Falcon (marca Fisher, Fisher Scientific).

Capas leuco-plaquetarias

50 En el Departamento de Medicina de Transfusión se recolectaron capas leuco-plaquetarias de donantes de sangre sanos y se llevaron al laboratorio a temperatura ambiente.

Sangre periférica

En el Departamento de Medicina de Transfusión se recolectó sangre periférica de donantes de sangre sanos y se llevó al laboratorio a temperatura ambiente. En el laboratorio, la sangre se mezcló con PBS a temperatura ambiente, a una concentración de 1:2 en un tubo tipo Falcon.

Aislamiento de células mononucleadas de sangre periférica (PBMC)

- 5 En el Departamento de Medicina de Transfusión se recolectó sangre periférica de donantes de sangre sanos y se llevó al laboratorio a temperatura ambiente. En el laboratorio, la sangre se mezcló con PBS a temperatura ambiente, a una concentración de 1:2 en un tubo tipo Falcon. La suspensión celular se transfirió con cuidado a tubos de centrifugación de 10 mL (Nunc) que contenían 3 mL de Lymphoprep (Axis-Shield). Se transfirieron 5 a 6 mL a cada tubo y se centrifugó a 2.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente, en ausencia de freno. Las PBMC aisladas se transfirieron a tubos de 10 mL pre-enfriados. Las células se lavaron dos veces llenando los tubos con PBS frío, seguido de centrifugación a 1.450 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y los granulados se resuspendieron en 1 mL de PBS frío. Se agregaron otros 9 mL adicionales a cada tubo.

Aislamiento de monocitos

- 15 Fracciones de 5 mL de los leucocitos de filtro/leucocitos de capa leuco-plaquetaria eluidos, o de PBMC aisladas de 10 a 20 mL de sangre periférica entera, se centrifugaron en tubos a 1.450 rpm durante 10 min a 4°C. Se retiraron los sobrenadantes en su totalidad y los granulados celulares se resuspendieron en 80 µL de PBS/EDTA (Miltenyi) por 107 células. Se agregaron 20 µL de micropelotas CD14 (Miltenyi) por 107 células. Las células se mezclaron e incubaron durante 15 min a 4°C y, a continuación, se lavaron agregando 1 a 2 mL de PBS/EDTA, seguido de centrifugación a 300xg durante 10 min. Se eliminaron por completo los sobrenadantes y las células remanentes se resuspendieron en 500 µL de PBS/EDTA.

- 20 En un multisoporte magnético (Miltenyi) se depositaron separadores MidiMACS (Miltenyi) y se lavaron con 3 mL de PBS/EDTA. Las suspensiones celulares se situaron sobre los separadores MidiMACS, permitiendo el paso de las células. Los separadores MidiMACS se lavaron tres veces con 3 mL de PBS/EDTA. Se descartaron las fracciones efluentes que contuvieron células no marcadas. Se retiraron los separadores MidiMACS del multisoporte magnético y se depositaron en un tubo tipo Falcon. Se pipetearon 5 mL de tampón PBS/EDTA en la columna e, inmediatamente después, se hicieron pasar las células empujando con un émbolo.

- 25 La concentración celular se determinó en una cámara Bürker. Las suspensiones celulares que contuvieron monocitos se centrifugaron a 1.450 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en medio para CD CellGro (CellGenix). La pureza de los monocitos CD14+ en todos los cultivos celulares de monocitos aislados fue >80%, según se determinó en el análisis FACS, véase más adelante.

Generación de CD inmaduras

- 35 Los leucocitos procedentes de los filtros TACSI se resuspendieron a una concentración de 300.000 células/mL en medio para CD CellGro, es decir, un medio libre de suero no humano, y se sembraron en placas de 24 pocillos (1 mL por pocillo). Los leucocitos enriquecidos con monocitos, procedentes de capas leuco-plaquetarias y sangre periférica, se resuspendieron en primer lugar a una concentración de 5 x 10⁵ monocitos/mL en medio CellGro. Inicialmente, se agregaron 400 µL de medio CellGro (sin células) a 12 pocillos (A1-6, B1-3, C1-3) en una placa de 24 pocillos. Se transfirieron 600 µL de la suspensión celular enriquecida con monocitos del donante A (capa leuco-plaquetaria o sangre periférica, respectivamente) a los pocillos A1-3. Se transfirieron 600 µL de la suspensión celular enriquecida con monocitos del donante B (capa leuco-plaquetaria o sangre periférica) a los pocillos B1-3. Se transfirieron 600 µL de la suspensión celular enriquecida con monocitos del donante C a los pocillos C1-3 (capa leuco-plaquetaria o sangre periférica). En los pocillos A4-6 se transfirieron 200 µL de la suspensión celular enriquecida con monocitos de los tres donantes (capa leuco-plaquetaria o sangre periférica). La cantidad final de células en todos los pocillos fue de 300.000 células (en un volumen de 1 mL de medio CellGro por pocillo).

- 40 Con el fin de diferenciar los monocitos en CD inmaduras, el medio de cultivo se suplementó con 1.000 U/mL de IL-4 humana recombinante y 1.000 U/mL de GM-CSF humano recombinante (ambos de CellGeniX, Friburgo, Alemania) y, subsiguientemente, las células se cultivaron durante 5 días.

Activación/maduración de CD inmaduras

- 45 Después de 5 días de cultivo en medio CellGro suplementado con IL-4 y GM-CSF, se indujo la activación/maduración de las CD inmaduras mediante la adición de 20 µg/mL de Poli-I:C (Sigma, Steinheim, Alemania), un inmunoestimulador específico para el receptor TLR-3, conocido también como ácido poliinosínico:policitidílico o sal sódica del ácido poliinosínico:policitidílico, 2,5 µg/mL de R848 (Sigma, Steinheim, Alemania), un ligando del receptor tipo Toll 7/8, conocido también como resiquimod, y 1.000 U/mL de interferón gamma (IFN-γ, R&D Systems, Minneapolis, EE.UU.). Después de 18 h de incubación, se lavaron las células tres veces y se incubaron adicionalmente con medio AIM-V recién preparado (sin agregar factores de activación exógenos) durante 24 h. Se cosecharon los sobrenadantes de cultivo, según protocolos bien conocidos por el experto en la técnica.

En los sobrenadantes se llevó a cabo un análisis ELISA, según se describe más adelante, con el objetivo de estudiar los niveles de quimiocinas pro-inflamatorias y de citoquinas pro-inflamatorias.

Evaluación por ELISA de los niveles de quimiocinas pro-inflamatorias y citoquinas pro-inflamatorias

5 Con el uso de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), empleando el Sistema de Desarrollo de ELISA Duo Set de R&D Systems, Minneapolis, EE.UU. se midieron las quimiocinas pro-inflamatorias CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES y CXCL9/MIG, así como las citoquinas pro-inflamatorias IL-12p70 y TNF- α , siguiendo las instrucciones del fabricante.

Examen fenotípico por citometría de flujo

10 Los monocitos y las CD derivadas de monocitos se generaron de la forma descrita anteriormente. La frecuencia de monocitos CD14+ tras el aislamiento de monocitos se determinó mediante la tinción de las células con el anticuerpo CD14-FITC antihumano. Después de 5 días de incubación en CellGro suplementado con IL-4 y GM-CSF, se lavaron las CD inmaduras y se tiñeron a continuación con CD86 antihumano acoplado a PE combinado con CD83 antihumano acoplado a FITC. Asimismo, las CD inmaduras que se activaron subsiguientemente durante 18 h con factores de activación, se tiñeron con CD86 antihumano acoplado a PE combinado con CD83 antihumano acoplado a FITC. Se usaron IgG1 e IgG2 de ratón, teñidas con FITC y PE, como controles de isotipo (todas de BD Biosciences, California, EE.UU.). Las muestras se analizaron por citometría de flujo (FACS) usando el software Cell Quest (BD Biosciences, California, EE.UU.).

Resultados

A continuación, se comentan los resultados de la parte experimental.

20 Las CD derivadas de co-cultivos de leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos no se activan/maduran fenotípicamente cuando se co-cultivan en medio de cultivo celular acuoso libre de suero no humano y suplementado con GM-CSF e IL-4.

25 La propagación de monocitos procedentes de donantes individuales de sangre en medio de cultivo celular acuoso libre de suero no humano y suplementado con GM-CSF e IL-4 durante 4 a 7 días da lugar a CD no agotadas con un fenotipo típicamente "inmaduro", incluida una baja expresión del marcador de maduración CD83 y baja expresión de la molécula co-estimuladora CD86. Como se ve en las Figuras 1a y b, la expresión media tanto de CD83 como de CD86 para tres diferentes CD "individuales" fue similar, en comparación con la expresión de CD83 (Fig. 1a) y CD86 (Fig. 1b) de CD derivadas de una mezcla de los tres donantes. Como se ve en las Figuras 1c y d, la expresión media, fuertemente incrementada, de los marcadores de activación/maduración CD83 y CD86 para CD 30 "individuales" (CD de 3 donantes diferentes de sangre periférica analizados), tras la propagación en un medio de cultivo celular acuoso, libre de suero no humano y suplementado con GM-CSF e IL-4 durante 4 días y posterior activación persistente con factores de estimulación durante 18 horas, fue similar en comparación con la expresión de CD83 (Fig. 1c) y CD86 (Fig. 1d) en CD activadas, derivadas de una mezcla de leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos de los tres donantes.

35 Considerados de manera conjunta, estos hallazgos indican que las CD derivadas de monocitos de la población monocitaria alogénica mixta son inmaduras después del cultivo en GM-CSF e IL-4 durante 5 días y, por consiguiente, no han experimentado ninguna señal de activación/maduración durante su diferenciación desde monocitos en CD inmaduras. Es más, las CD inmaduras procedentes de la población monocitaria alogénica mixta, fenotípicamente al menos no están agotadas, puesto que responden de forma intensa con maduración fenotípica 40 cuando son estimuladas con factores de activación.

Datos obtenidos con citometría de flujo. El correspondiente eje Y muestra la intensidad de fluorescencia media (MFI) para CD83 y CD86 antes y después de la estimulación persistente con factores de activación durante 18 horas. El eje X muestra las diferentes combinaciones medidas.

45 Las CD inmaduras derivadas de co-cultivos de monocitos de sangre periférica alogénicos mixtos no están funcionalmente agotadas.

Es sabido que la propagación de monocitos (de un único donante de sangre) en medio de cultivo suplementado con GM-CSF e IL-4 durante 4 a 7 días da lugar a CD no agotadas que responden con una vigorosa producción de quimiocinas pro-inflamatorias (MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES y MIG) y de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12p70 y TNF-alfa) tras la estimulación con ciertos factores de activación.

50 Como se ve en la Figura 2, los elevados niveles medios de MIP-1 alfa (Fig. 2a), MIP-1 beta (Fig. 2b), RANTES (Fig. 2c) y MIG (Fig. 2d) producidos por CD "individuales" (CD de los tres donantes diferentes de sangre periférica analizados) durante la activación persistente con factores de estimulación durante 18 horas fueron similares, en comparación con las CD derivadas de una mezcla de monocitos de los tres donantes. De manera notable, se observa una variación sustancial en la producción de quimiocinas, inducida por la activación, entre las diferentes CD 55 de donantes individuales. Como se ve en la Figura 4, los elevados niveles medios de IL-12p70 (Fig. 3a) y TNF-alfa

(Fig. 3b) producidos por CD "individuales" activadas fueron similares, en comparación con las CD derivadas de una mezcla de monocitos de los tres donantes. En especial, se observa una variación sustancial en la producción de IL-12p70 y TNF-alfa entre las diferentes CD de donantes individuales.

5 Los datos se obtuvieron de un análisis con ELISA. Los resultados que se muestran son valores medios \pm DT (desviación típica) de tres individuos y el valor obtenido de la mezcla de los tres donantes. El correspondiente eje Y muestra la cantidad de la sustancia correspondiente producida en pg/mL/1 x 10⁶ células durante 18 horas de estimulación/activación persistentes. El eje X muestra las diferentes combinaciones medidas.

10 Se ha indicado que la prostaglandina E2 (PGE2) podría desempeñar una función importante en el agotamiento, inducido por la activación, de las CD inmaduras (Rieser C. et al., "Differential Deactivation of Human Dendritic Cells by Endotoxin Desensitization: Role of Tumor Necrosis Factor- α and Prostaglandin E2", Blood, 91 (1998), 3112-3117). Por lo tanto, los autores investigaron si la adición del inhibidor de Cox-2, NS-398 (dirigido a inhibir la producción potencial de PGE2), durante el co-cultivo de monocitos alogénicos incrementaría la producción de quimiocinas pro-inflamatorias (representadas por la producción de MIG) o de citoquinas pro-inflamatorias (representadas por la producción de IL-12p70) tras la subsiguiente activación. Como se ve en la Figura 4, la presencia del inhibidor de Cox-2, NS-398, durante la propagación de monocitos en CD no aumentó, sino más bien redujo la producción de MIG e IL-12p70 inducida por la activación. Por consiguiente, no hubo señales de agotamiento mediado por PGE2 de las CD inmaduras diferenciadas de los co-cultivos de monocitos alogénicos mixtos.

20 Los datos se obtuvieron de un análisis con ELISA. Los resultados que se muestran corresponden a un experimento con la mezcla de los tres donantes. El correspondiente eje Y muestra la cantidad de la sustancia correspondiente producida en pg/mL/1 x 10⁶ células durante 18 horas de estimulación/activación persistentes. El eje X muestra las diferentes combinaciones medidas.

Las CD derivadas de co-cultivos de leucocitos alogénicos mixtos de capas leuco-plaquetarias, enriquecidos con monocitos, no están funcionalmente agotadas.

25 Como se ve en la Figura 5, los elevados niveles medios de las quimiocinas pro-inflamatorias inducidas por la activación, MIP-1 alfa (Fig. 5a), MIP-1 beta (Fig. 5b), RANTES (Fig. 5c) y MIG (Fig. 5d), producidas por las CD "individuales" (CD de los tres diferentes donantes de capas leuco-plaquetarias analizados) durante la activación persistente con factores de estimulación durante 18 horas fueron similares, en comparación con las CD derivadas de una mezcla de monocitos de los tres donantes. En particular, se aprecia una variación sustancial en la producción de quimiocinas entre las CD de los diferentes donantes individuales.

30 Como se ve en la Figura 6, los elevados niveles medios, inducidos por la activación, de IL-12p70 (Fig. 6a) y TNF-alfa (Fig. 6b) producidos por CD "individuales" fueron similares, en comparación con las CD derivadas de una mezcla de leucocitos enriquecidos con monocitos procedente de los tres donantes. En particular, se observa una variación sustancial en la producción de IL-12p70 y TNF-alfa entre las CD de diferentes donantes individuales.

35 Los datos se obtuvieron por análisis con ELISA. Los resultados se muestran como valores medios \pm DT de tres individuos y el valor obtenido de la mezcla de los tres donantes. El correspondiente eje Y muestra la cantidad de la correspondiente sustancia producida, en pg/mL/1 x 10⁶ células, durante 18 horas de estimulación/activación persistentes. El eje X muestra las diferentes combinaciones medidas.

40 Las CD PI derivadas de co-cultivos de monocitos alogénicos mixtos procedentes de sangre periférica exhiben una producción sostenida de quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias.

45 Al objeto de inyectar CD pro-inflamatorias (CD PI) activadas en el paciente, habitualmente es necesario lavarlas antes de la administración. De lo contrario, pueden surgir efectos adversos inducidos por la administración simultánea de agentes de estimulación (dirigidos a inducir CD PI ex vivo). Por lo tanto, las CD inmaduras deben ser activadas en CD PI con una producción sostenida de factores deseables también después del cese de los factores inductores de la activación. Como se ve en la Figura 7, los niveles medios de MIP-1 alfa (Fig. 7a), MIP-1 beta (Fig. 7b), RANTES (Fig. 7c) y MIG (Fig. 7d), producidas por las CD PI "individuales" tras la retirada de los factores de activación (CD PI de monocitos de sangre periférica de los tres donantes diferentes analizados) fueron similares, en comparación con las CD PI derivadas de una mezcla de monocitos procedentes de los tres donantes de sangre periférica. En particular, se observa una variación sustancial en la producción de quimiocinas entre las diferentes CD PI de donantes individuales. La producción media de IL-12p70 (Fig. 8a) y TNF-alfa (Fig. 8b) suministrada por CD PI "individuales" tras la retirada de los factores de activación también fue similar, en comparación con CD PI lavadas derivadas de una mezcla de monocitos de los tres donantes. En particular, se observa una variación sustancial en la producción de citoquinas entre diferentes CD PI de donantes individuales tras la retirada de los factores de activación.

55 Los datos se obtuvieron por análisis con ELISA. Los resultados se muestran como valores medios \pm DT de tres individuos y el valor obtenido de la mezcla de los tres donantes. El correspondiente eje Y muestra la cantidad de la correspondiente sustancia producida, en pg/mL/1 x 10⁶ células, durante 24 horas después de la retirada de los factores de activación. El eje X muestra las diferentes combinaciones medidas.

Las CD PI derivadas de co-cultivos de leucocitos alogénicos mixtos, enriquecidos con monocitos, de capas leuco-plaquetarias de sangre periférica exhiben una intensa producción sostenida de quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias.

5 Como se ve en la Figura 9, el nivel medio de MIP-1 alfa (Fig. 9a), MIP-1 beta (Fig. 9b), RANTES (Fig. 9c) y MIG (Fig. 9d) producidas por CD PI "individuales" tras la retirada de los factores de activación (CD PI procedentes de monocitos de capas leuco-plaquetarias de los tres donantes diferentes analizados) fueron similares, en comparación con las CD PI derivadas de una mezcla de monocitos de los tres donantes de capas leuco-plaquetarias. En particular, se observa una variación sustancial en la producción de quimiocinas entre las diferentes CD PI de donantes individuales. La producción media de IL-12p70 (Fig. 10a) y TNF-alfa (Fig. 10b) suministrada por CD PI "individuales" tras la retirada de los factores de activación también fue similar, en comparación con CD PI lavadas derivadas de una mezcla de monocitos de los tres donantes de capas leuco-plaquetarias. En particular, se observa una variación sustancial en la producción de citoquinas entre diferentes CD PI de donantes individuales.

15 Los datos se obtuvieron por análisis con ELISA. Los resultados se muestran como valores medios \pm DT de tres individuos y el valor obtenido de la mezcla de los tres donantes. El correspondiente eje Y muestra la cantidad de la correspondiente sustancia producida, en pg/mL/1 x 10⁶ células, durante 24 horas después de la retirada de los factores de activación. El eje X muestra las diferentes combinaciones medidas.

Las CD inmaduras mixtas derivadas de leucocitos enriquecidos con monocitos producen cantidades sustanciales de quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias tras su activación.

20 Como se ve en la Figura 11, las CD mixtas activadas, derivadas de leucocitos de filtro, enriquecidos con monocitos (la población inicial de leucocitos se eluyó a partir de un filtro de depleción leucocitaria de 4 capas leuco-plaquetarias), produjeron cantidades sustanciales de MIP-1 alfa (Fig. 11a), MIP-1 beta (Fig. 11b), RANTES (Fig. 11c) y MIG (Fig. 11d). Tal como se ve en la Figura 12, se produjeron también cantidades sustanciales de IL-12p70 (Fig. 12a) y TNF-alfa (Fig. 12b).

25 Los datos se obtuvieron de un análisis con ELISA. Los resultados que se muestran son valores de un experimento. El correspondiente eje Y muestra la cantidad de la sustancia producida correspondiente, en pg/mL/1 x 10⁶ células, durante 18 horas de estimulación/activación persistentes.

Las CD PI mixtas derivadas de leucocitos de filtro enriquecidos con monocitos exhiben una producción sustancial de quimiocinas y citoquinas pro-inflamatorias tras la retirada de los factores de activación.

30 Tal como se ve en la Figura 13, las CD mixtas activadas, derivadas de monocitos de filtro (la población inicial de leucocitos se eluyó a partir de un filtro de depleción leucocitaria de 4 capas leuco-plaquetarias), produjeron cantidades sustanciales de MIP-1 alfa (Fig. 13a), MIP-1 beta (Fig. 13b), RANTES (Fig. 13c) y MIG (Fig. 13d) tras la retirada de los factores de activación. Como se ve en la Figura 14, se produjeron también cantidades sustanciales de IL-12p70 (Fig. 14a) y TNF-alfa (Fig. 14b). Los datos se obtuvieron de un análisis con ELISA. Los resultados que se muestran son valores de un experimento. El correspondiente eje Y muestra la cantidad de la sustancia producida correspondiente, en pg/mL/1 x 10⁶ células, durante 24 horas después de la retirada de los factores de activación.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir células dendríticas (CD) pro-inflamatorias, que comprende las etapas de:
 - 5 - proporcionar una mezcla de leucocitos alogénicos, dichos leucocitos alogénicos han sido obtenidos de al menos dos donantes alogénicos diferentes;
 - a partir de dicha mezcla de leucocitos alogénicos, aislar monocitos alogénicos, para ofrecer leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos;
 - 10 - generar CD inmaduras, no agotadas, procedentes de dichos leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos, en donde la generación de CD inmaduras, no agotadas, se lleva a cabo por co-cultivo de dichos leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos durante 2 a 7 días en un medio de cultivo celular acuoso, libre de suero no humano, en donde dicho medio se suplementa con interleuquina-4 (IL-4) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y
 - activar las CD inmaduras, no agotadas para obtener CD pro-inflamatorias.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho medio de cultivo celular comprende al menos un polipéptido humano seleccionado del grupo que consiste en transferrina, albúmina e insulina.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dichos leucocitos alogénicos enriquecidos con monocitos comprenden neutrófilos alogénicos.
- 20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha mezcla de leucocitos alogénicos se provee combinando al menos dos capas leuco-plaquetarias que comprenden leucocitos, en donde dichas capas leuco-plaquetarias que se van a combinar se obtienen de al menos dos donantes alogénicos diferentes.
- 25 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha mezcla de leucocitos alogénicos se provee:
 - eluyendo leucocitos de al menos dos filtros de depleción leucocitaria, dichos filtros han sido usados respectivamente previamente para retirar leucocitos de la sangre entera, en donde dicha sangre entera se ha obtenido de al menos dos donantes alogénicos diferentes; y
 - combinando los leucocitos obtenidos para conseguir dicha mezcla de leucocitos alogénicos;
- 30 o:
 - eluyendo leucocitos de un filtro de depleción leucocitaria, dicho filtro se ha utilizado para retirar leucocitos de capas leuco-plaquetarias combinadas, en donde las capas leuco-plaquetarias proceden de al menos dos donantes alogénicos diferentes.
- 35 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos monocitos alogénicos se aíslan por elutriación o por aislamiento de anticuerpos/perlas.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho co-cultivo se lleva a cabo durante aproximadamente 5 días.
- 35 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende, adicionalmente, la etapa de cargar las CD inmaduras, no agotadas, con un antígeno.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha activación se lleva a efecto por la adición del ligando Poli-I:C del receptor tipo Toll 3 (TLR3), un ligando de TLR 7/8, el ligando de TLR 7/8 se selecciona del grupo que consiste en Resiquimod, Gardiquimod e Imiquimod, e interferón gamma (IFN-γ) para inducir la activación.
- 40 10. El método según la reivindicación 9, en el que dicha activación comprende, además, la adición de al menos una sustancia seleccionada del grupo que consiste en ligandos de TLR4 seleccionados del grupo que consiste en lipopolisacáridos y monofosforil lípido A, secuencias de oligonucleótidos CpG (ODN) que distinguen el ADN microbiano del ADN de mamíferos, interferón alfa (IFN-α), interleuquina 1β (IL-1β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α).
- 45 11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que dicha activación no comprende la adición de prostaglandina E2 (PGE2).

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que las CD inmaduras se exponen a los factores de activación durante 8 a 24 horas, tras lo cual se eliminan esencialmente todos los factores de activación por lavado.
- 5 13. Una composición farmacéutica que comprende una mezcla de células dendríticas alogénicas, pro-inflamatorias, procedentes de al menos dos donantes alogénicos diferentes, en donde dichas células dendríticas se pueden obtener por un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. La composición según la reivindicación 13, para usar en el tratamiento del cáncer.

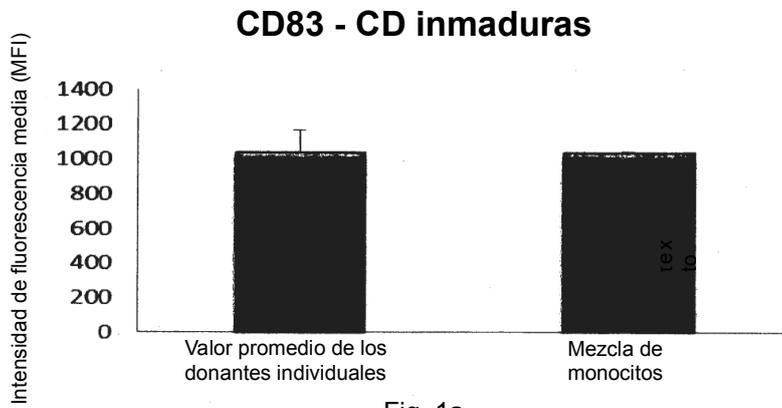


Fig. 1a

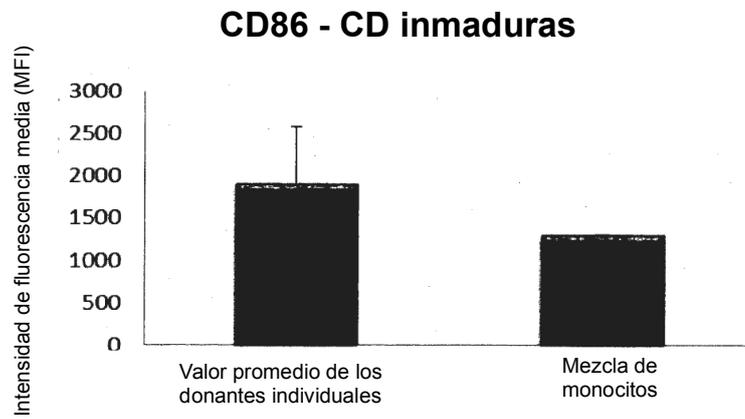


Fig. 1b

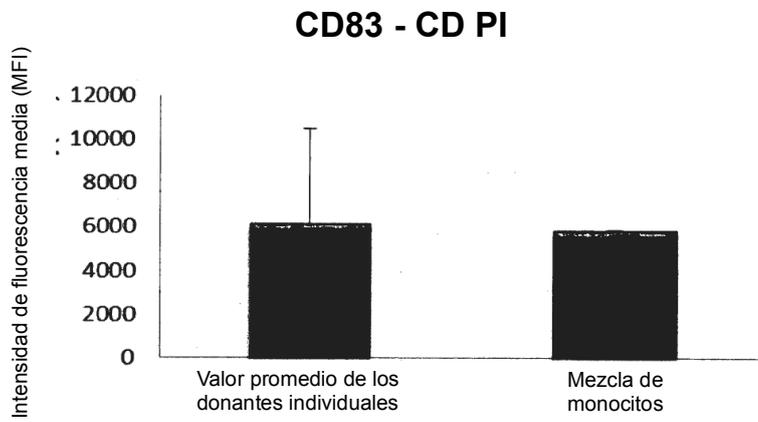


Fig. 1c

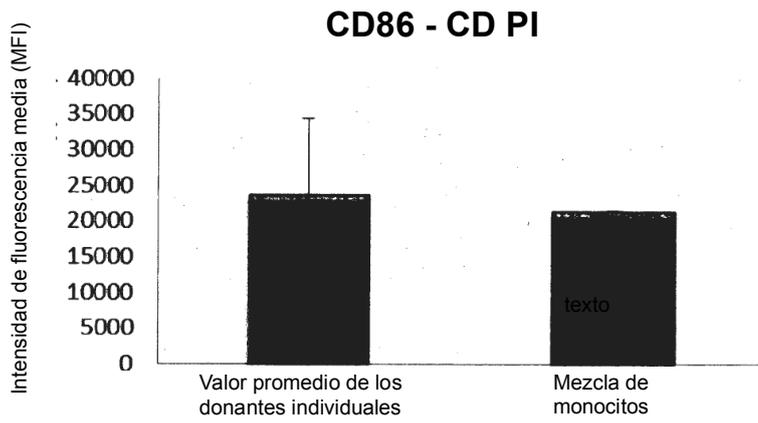


Fig. 1d

Producción activa de MIP-1 alfa

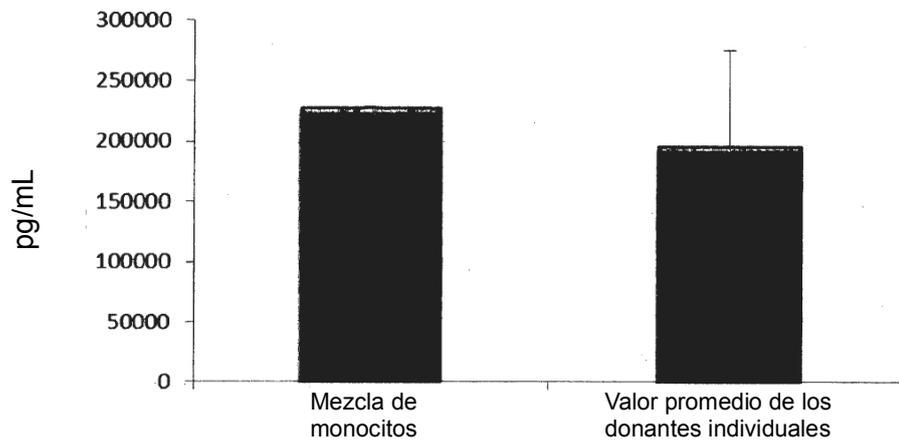


Fig. 2a

Producción activa de MIP-1 beta

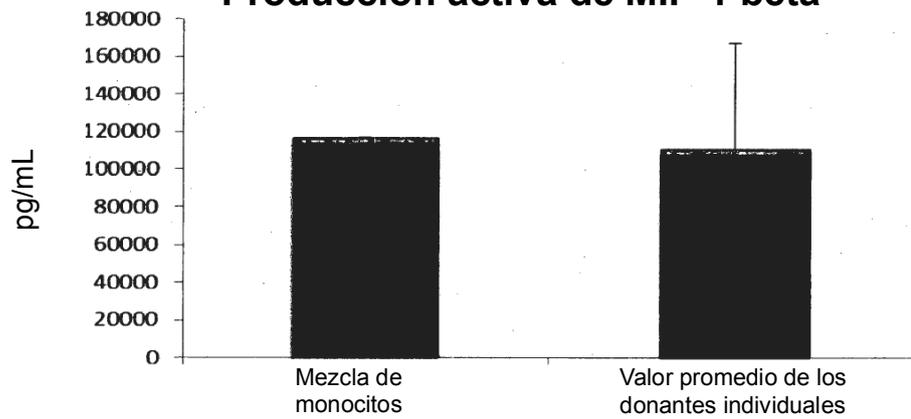


Fig. 2b

Producción activa de RANTES

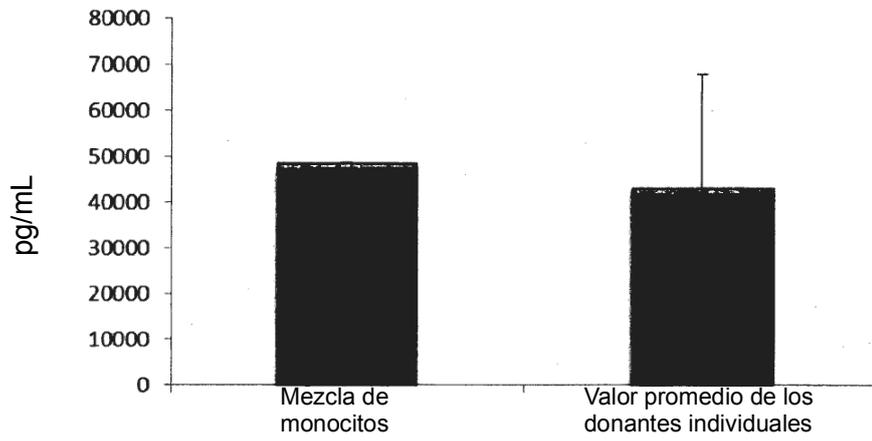


Fig. 2c

Producción activa de MIG

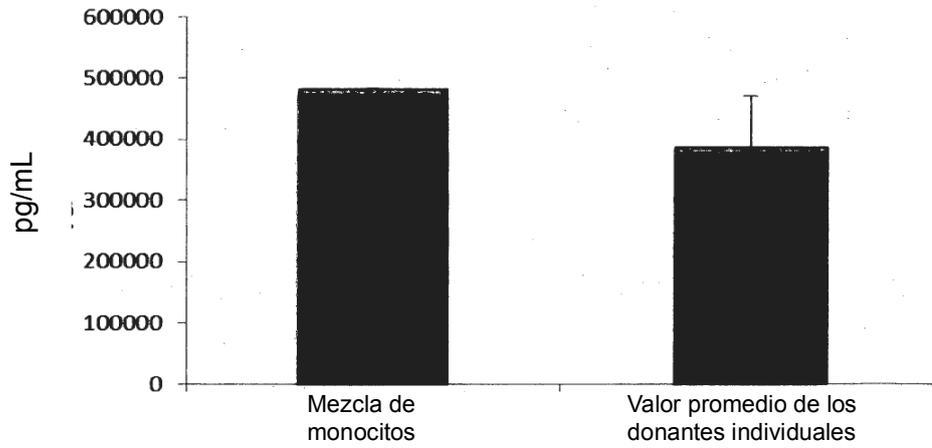


Fig. 2d

Producción activa de IL-12

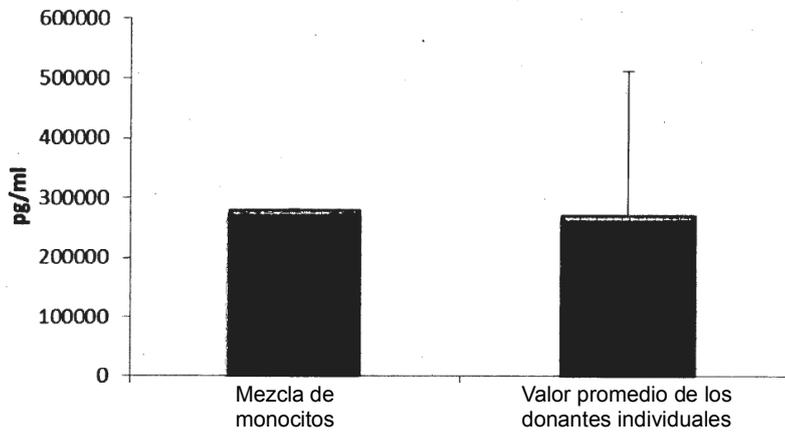


Fig. 3a

Producción activa de TNF-alfa

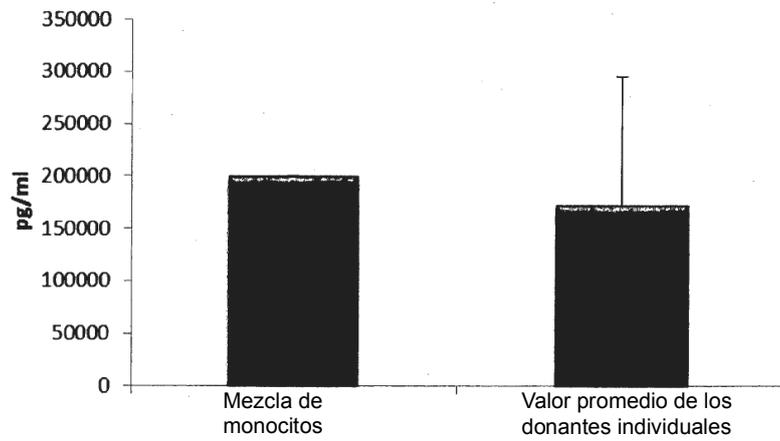


Fig. 3b

Producción activa de IL-12p70

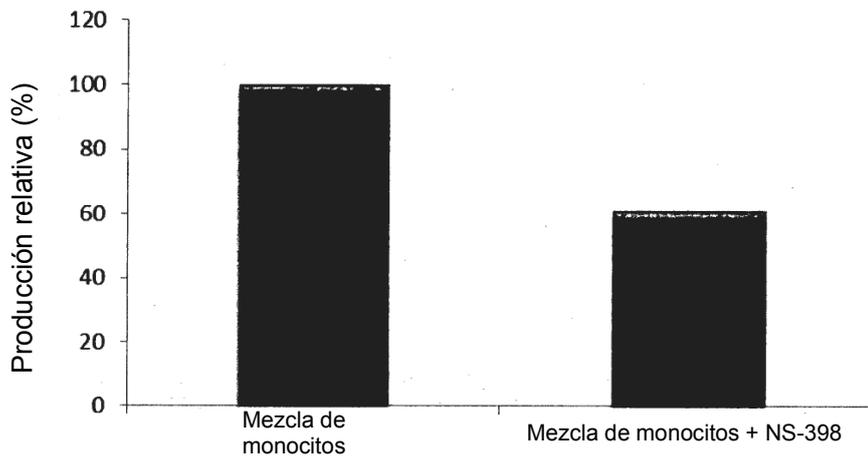


Fig. 4a

Producción activa de MIG

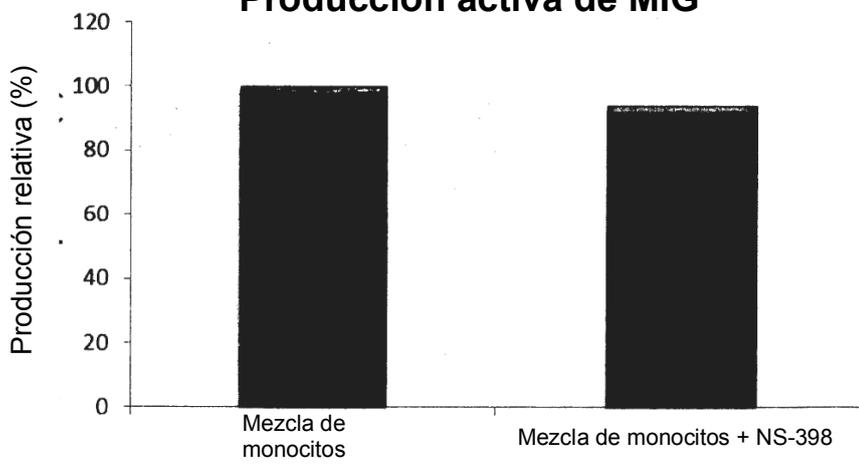


Fig. 4b

Producción activa de MIP-1 alfa

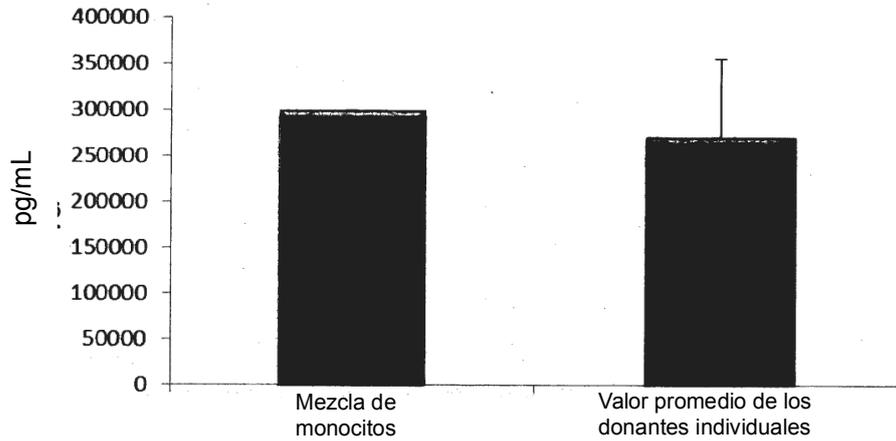


Fig. 5a

Producción activa de MIP-1 beta

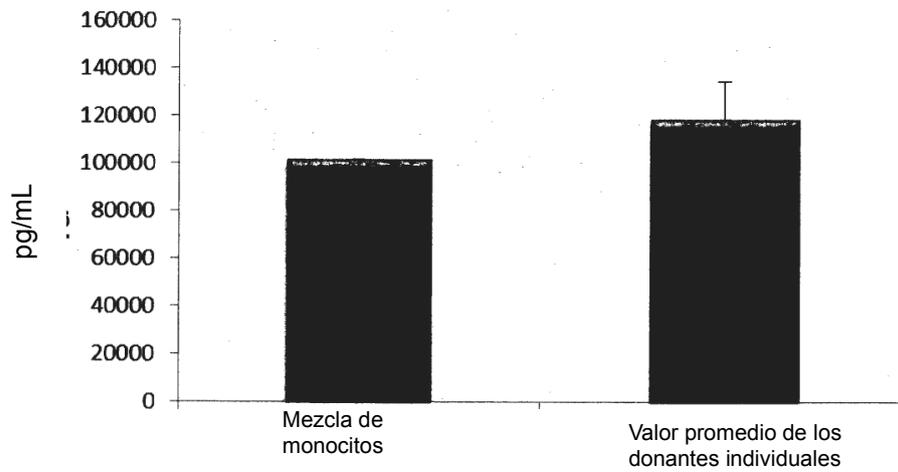


Fig. 5b

Producción activa de RANTES

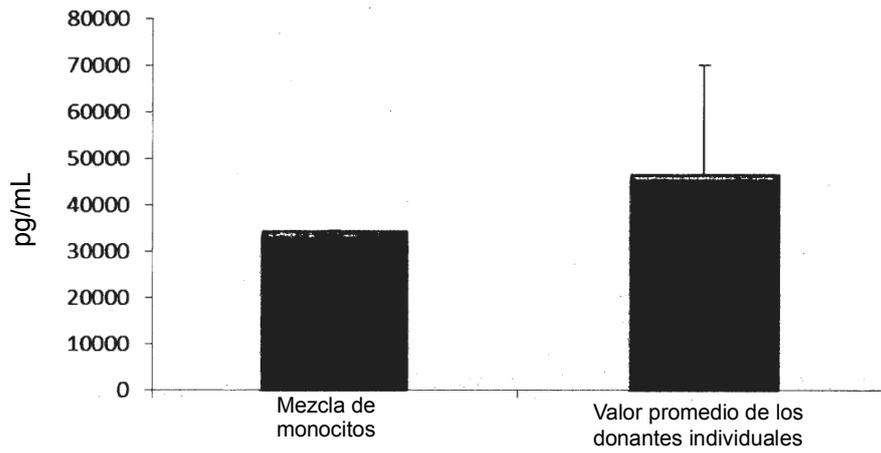


Fig. 5c

Producción activa de MIG

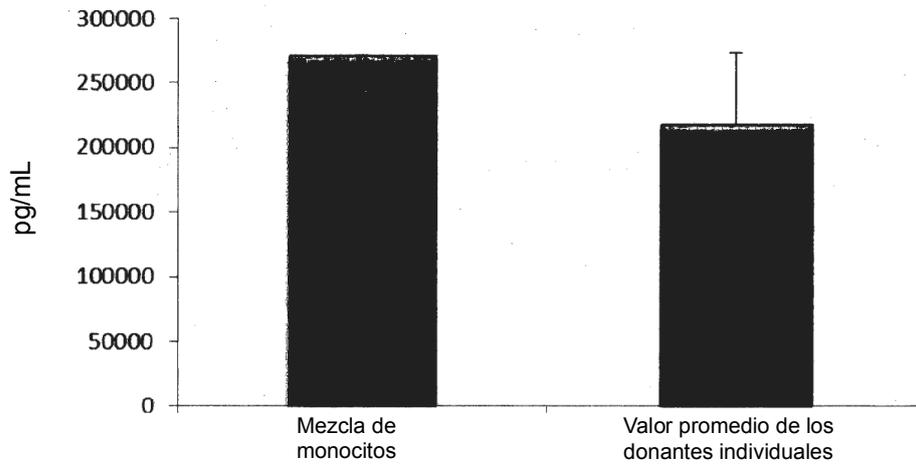


Fig. 5d

Producción activa de IL-12

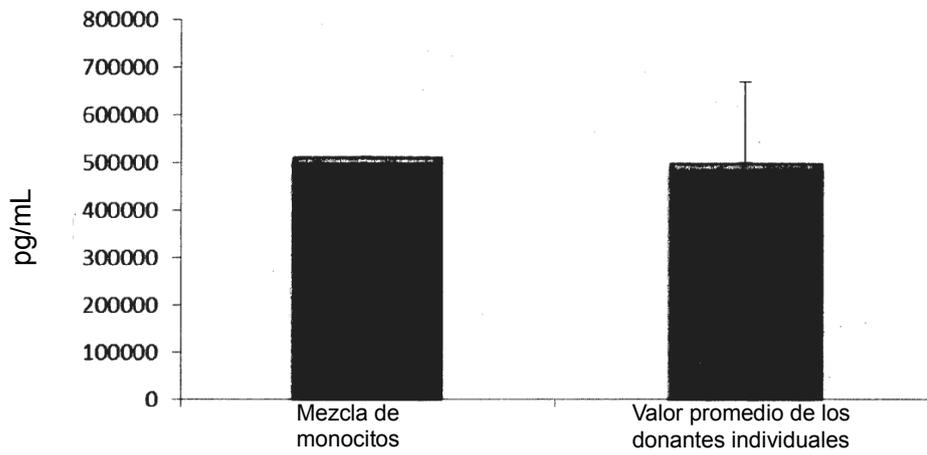


Fig. 6a

Producción activa de TNF-alfa

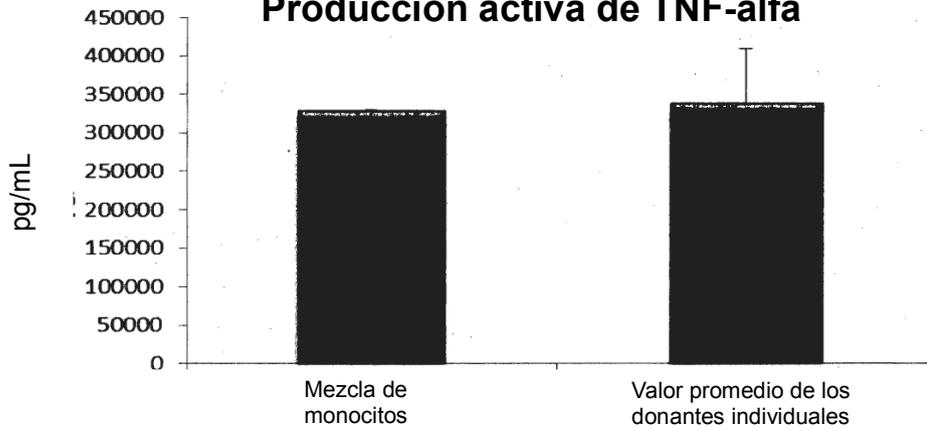


Fig. 6b

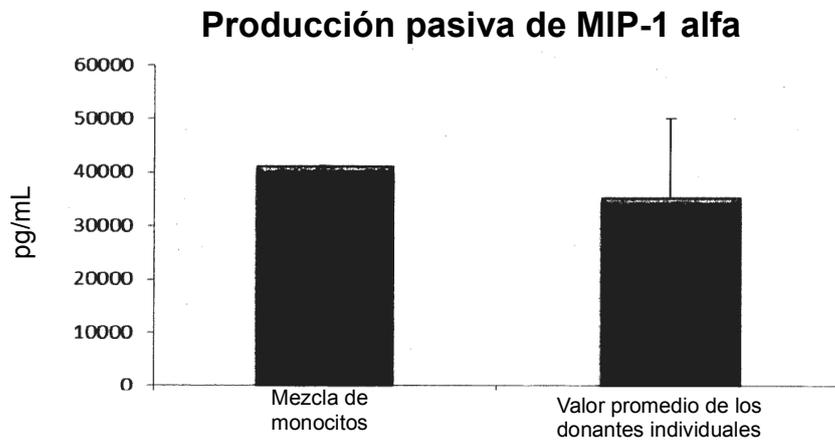


Fig. 7a

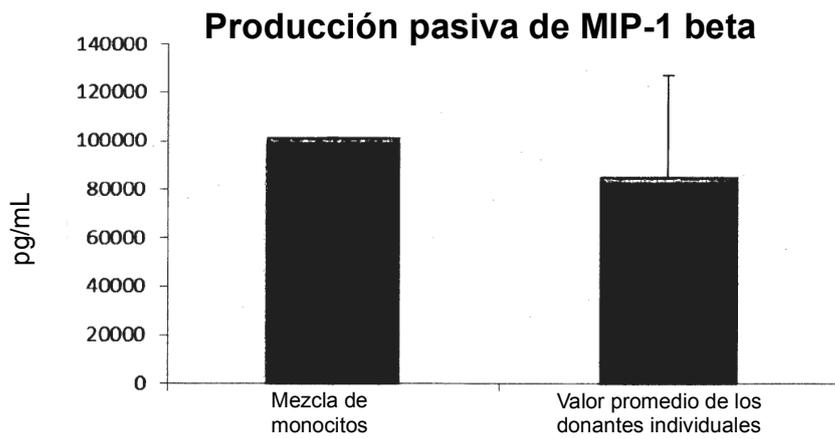


Fig. 7b

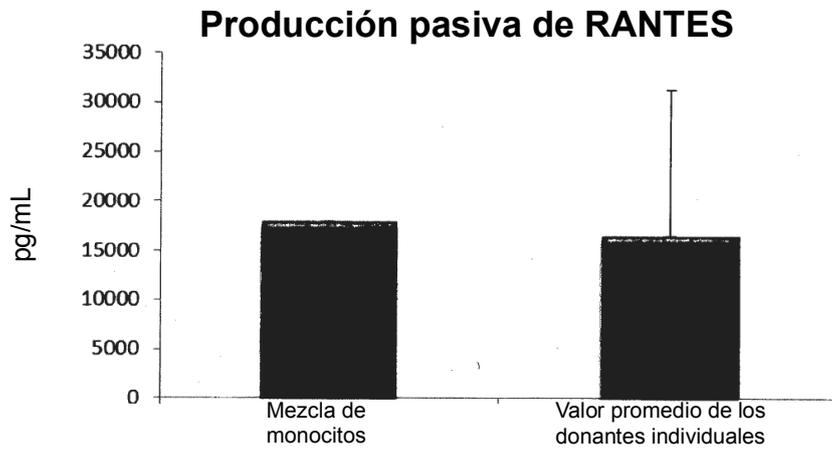


Fig. 7c

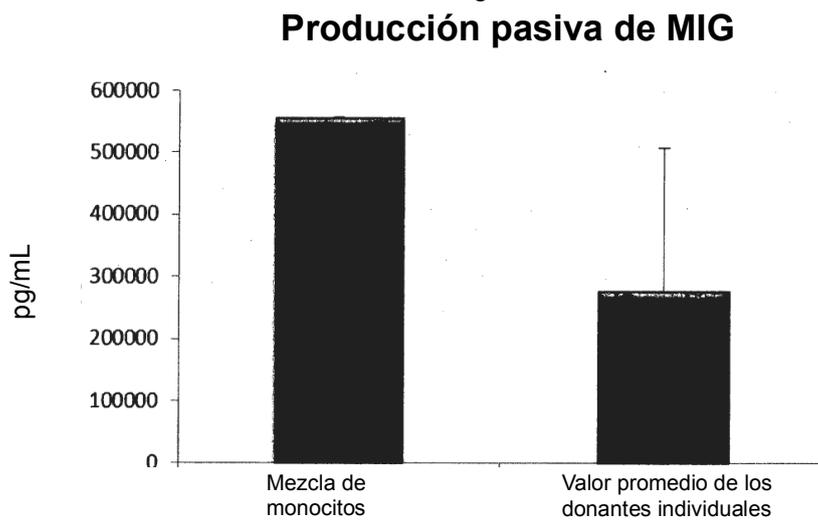


Fig. 7d

Producción pasiva de IL-12

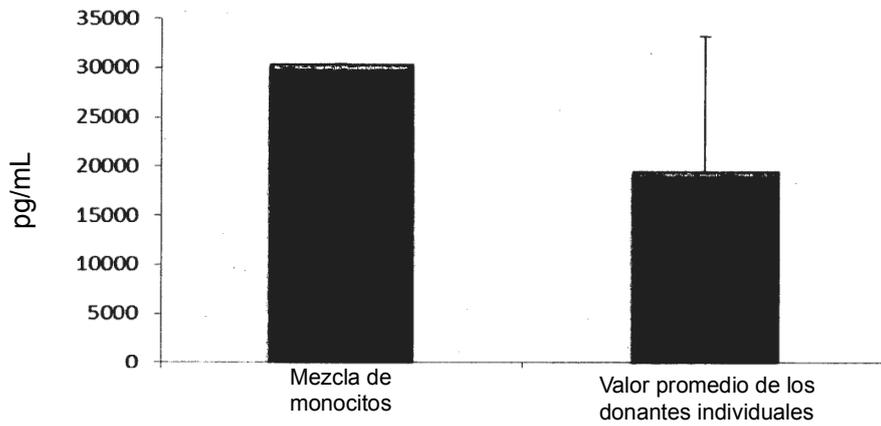


Fig. 8a

Producción pasiva de TNF-alfa

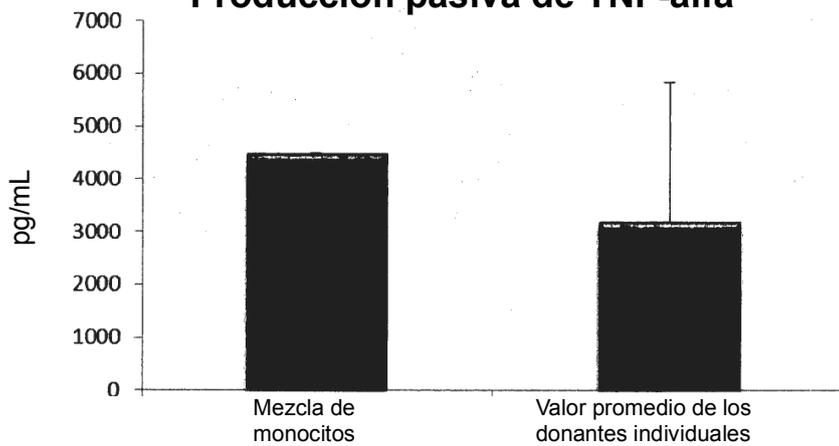


Fig. 8b

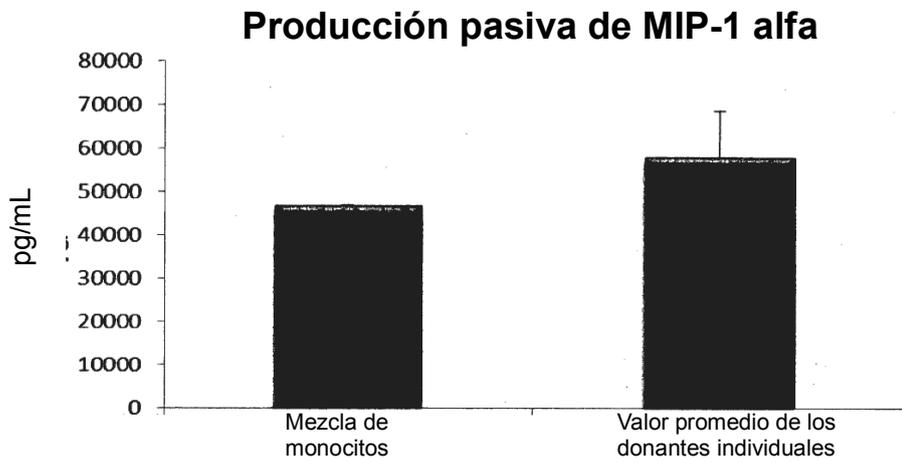


Fig. 9a

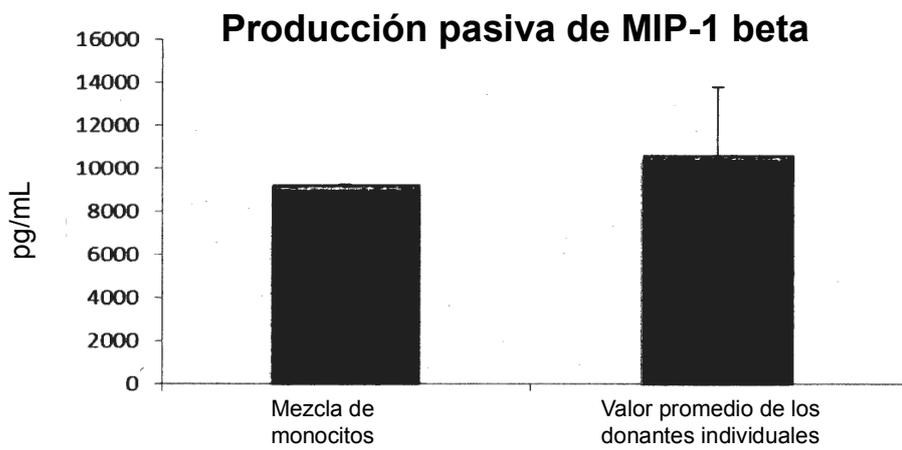


Fig. 9b

Producción pasiva de RANTES

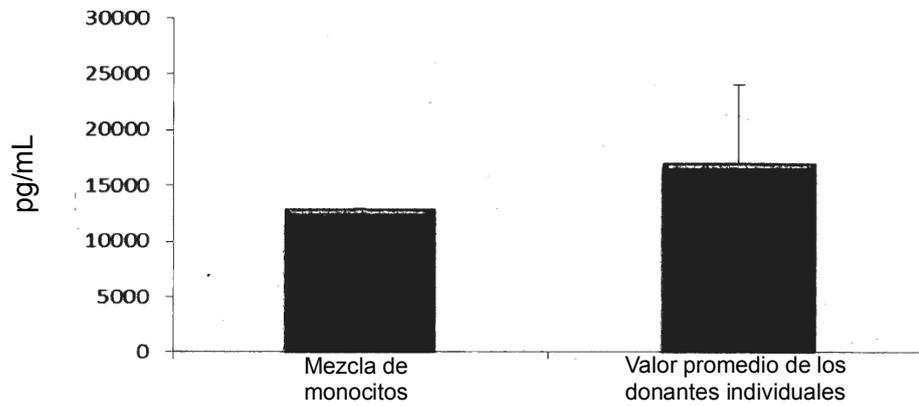


Fig. 9c

Producción pasiva de MIG

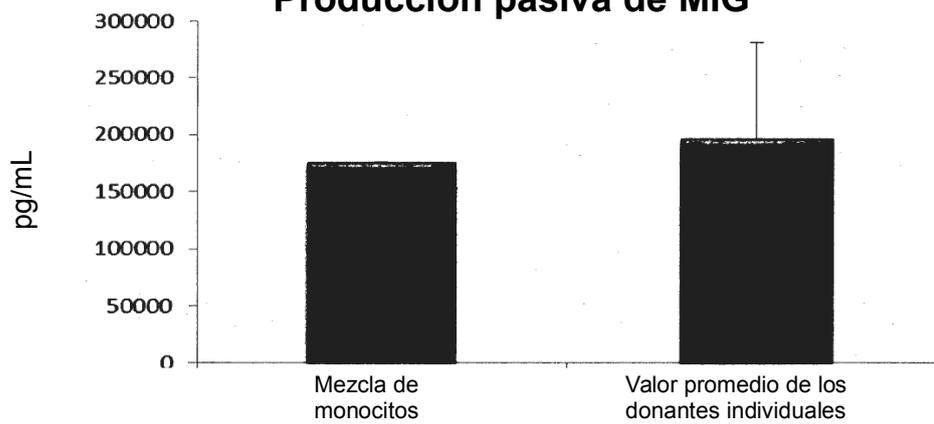


Fig. 9d

Producción pasiva de IL-12

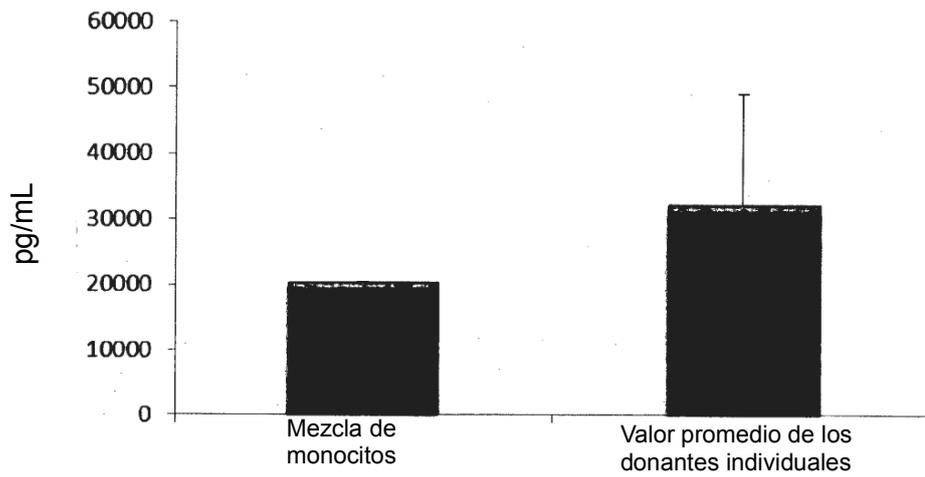


Fig. 10a

Producción pasiva de TNF-alfa

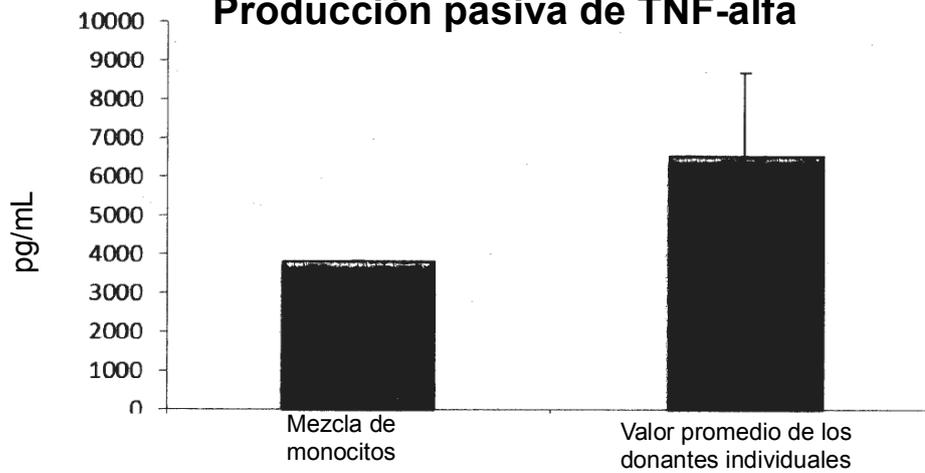


Fig. 10b

Producción activa de MIP-1 alfa

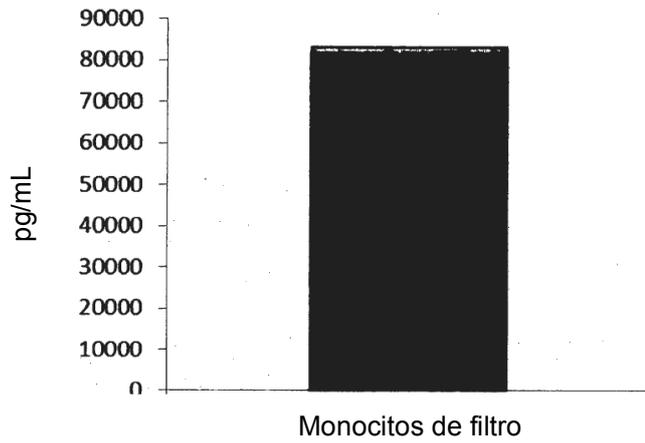


Fig. 11a

Producción activa de MIP-1 beta

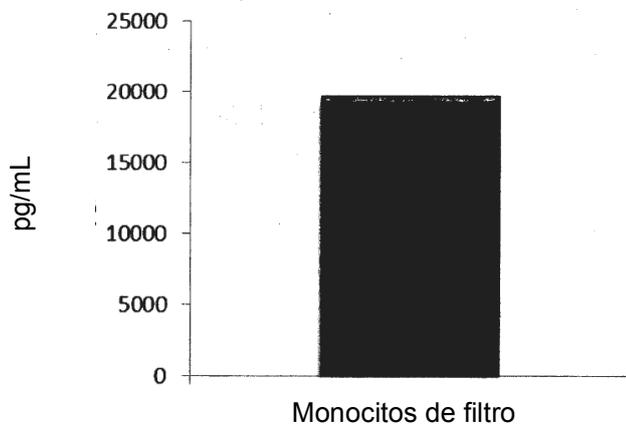


Fig. 11b

Producción activa de RANTES

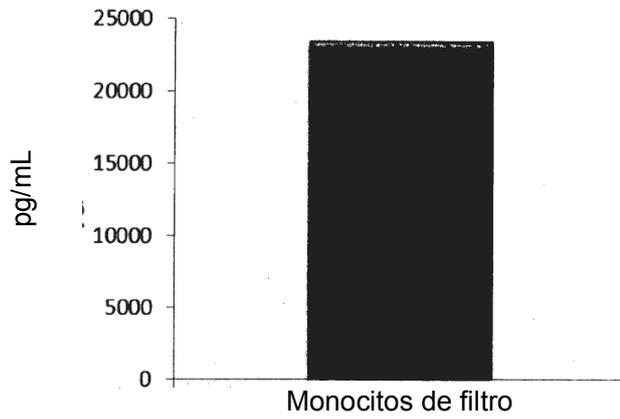


Fig. 11c

Producción activa de MIG

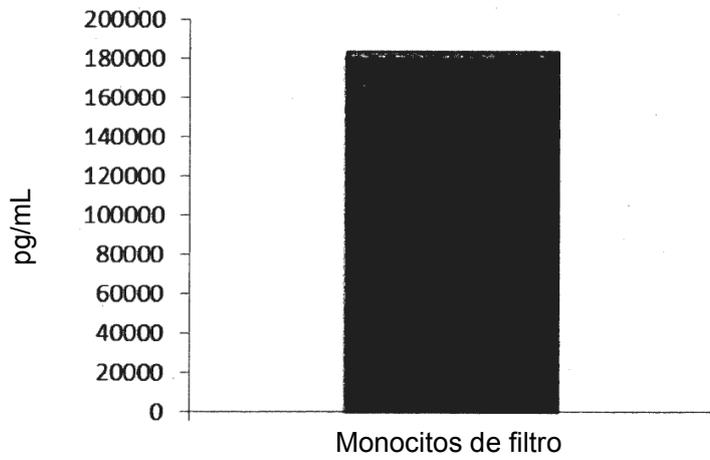


Fig. 11d

Producción activa de IL-12p70

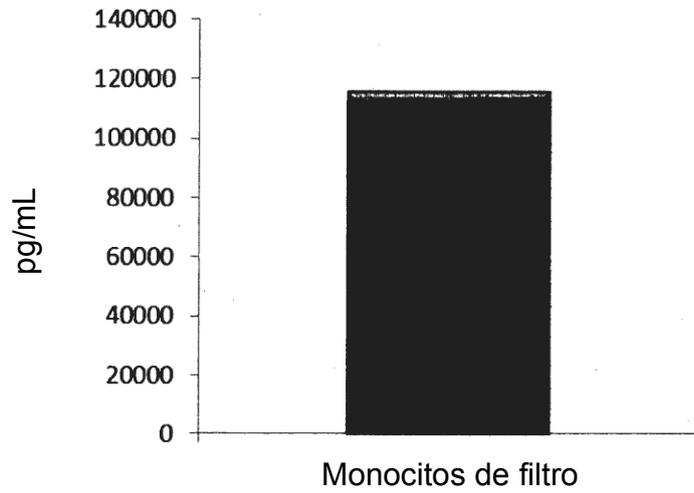


Fig. 12a

Producción activa de TNF-alfa

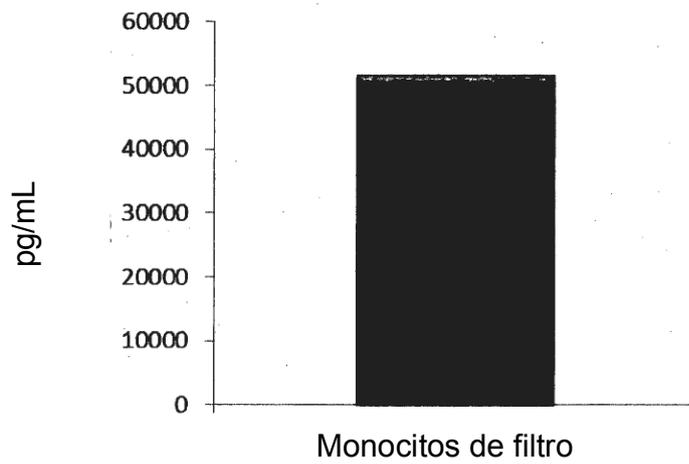


Fig. 12b

Producción pasiva de MIP-1 alfa

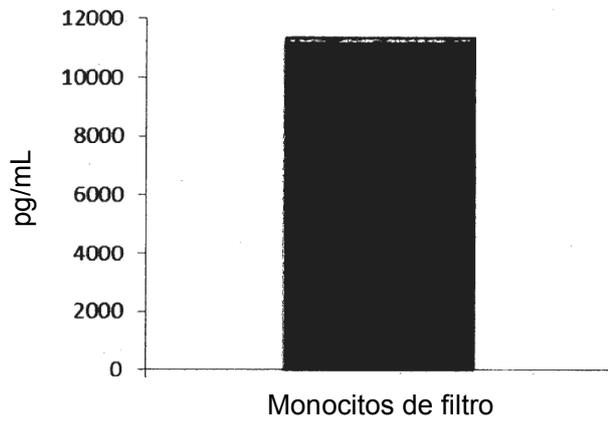


Fig. 13a

Producción pasiva de MIP-1 beta

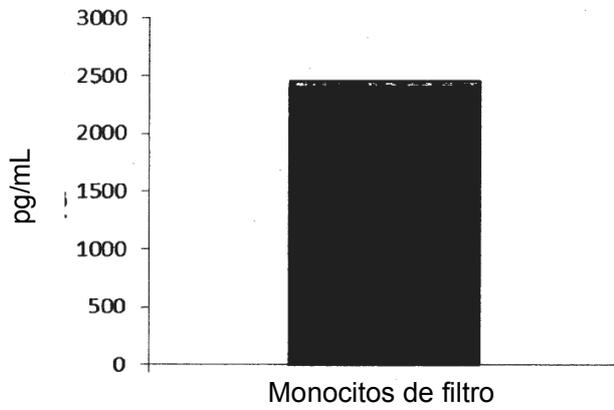


Fig. 13b

Producción pasiva de RANTES

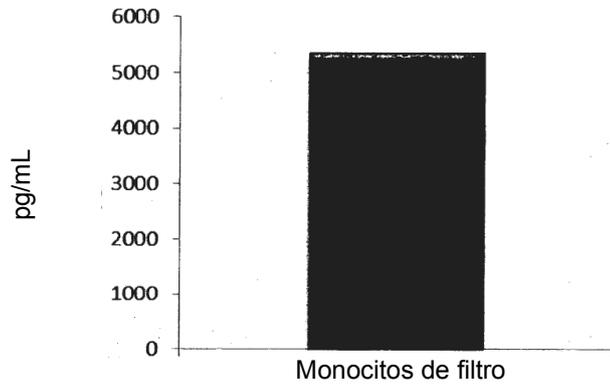


Fig. 13c

Producción pasiva de MIG

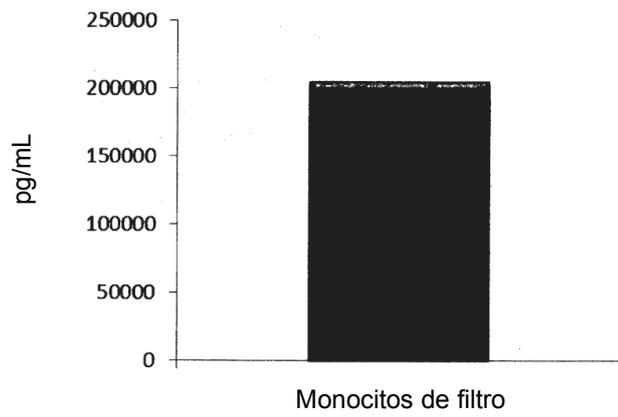


Fig. 13d

Producción pasiva de IL-12p70

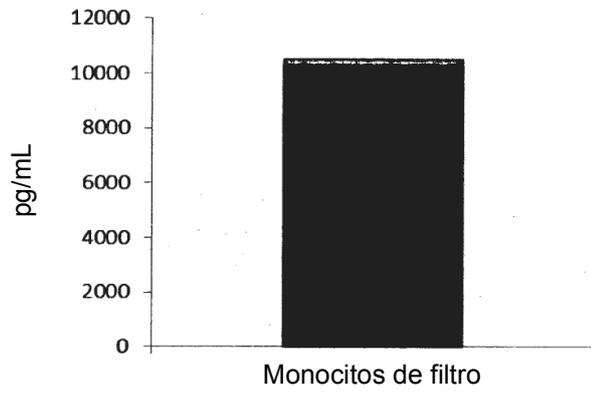


Fig. 14a

Producción pasiva de TNF-alfa

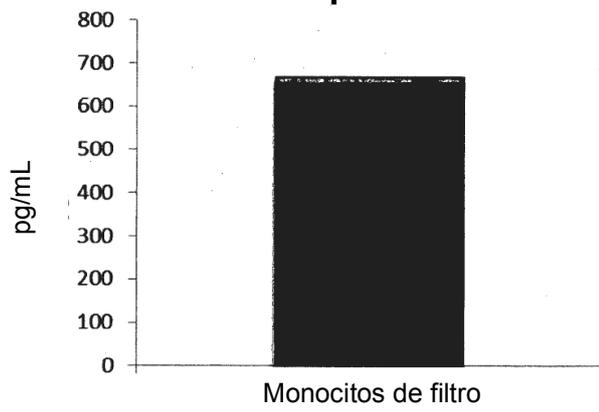


Fig. 14b