(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 598 109**

(51) Int. CI.:

C07K 14/54 (2006.01)
C12N 5/0784 (2010.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2002 PCT/US2002/28620**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.03.2003 WO03022215**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2002 E 02761594 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 1441591**

(54) Título: **Composiciones y métodos para la activación linfocitaria de células dendríticas monocíticas y células T para generar una respuesta Th-1**

(30) Prioridad:

06.09.2001 US 317592 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.01.2017

(73) Titular/es:

NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4800 Montgomery Lane, Suite 800
Bethesda. MD 20814, US

(72) Inventor/es:

BOSCH, MARNIX L.

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la activación linfocitaria de células dendríticas monocíticas y células T para generar una respuesta Th-1

Antecedentes de la invención

Las células presentadoras de antígeno (CPA) son importantes para provocar una respuesta inmunitaria efectiva. No solamente presentan antígenos de células T con receptores de linfocitos T de antígeno específico, sino que también proporcionan las señales necesarias para la activación de las células T. Estas señales todavía no se han definido por completo, pero implican a diversas moléculas de superficie celular, así como citoquinas y factores de crecimiento. Los factores necesarios para la activación de células T vírgenes (que todavía no han sido expuestas al antígeno) o no polarizadas pueden ser diferentes de los necesarios para la reactivación de las células T con memoria. La capacidad de las CPA tanto de presentar los antígenos como de proporcionar señales para la activación de las células T se denomina generalmente función celular accesoria. A pesar de que se ha demostrado que los monocitos y las células B son CPA competentes, sus capacidades de presentación de antígeno *in vitro* parecen limitarse a la reactivación de células T previamente sensibilizadas. Por tanto, no son capaces de activar directamente poblaciones de células T no activadas o funcionalmente vírgenes.

Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígeno profesionales del sistema inmunitario que se consideran capaces de activar tanto células T vírgenes como células T con memoria. Las células dendríticas se preparan *ex vivo* cada vez con mayor frecuencia para su uso en inmunoterapias, particularmente la inmunoterapia del cáncer. La preparación de células dendríticas con propiedades inmunoestimuladoras ópticas exige conocer y explotar la biología de estas células para el cultivo *ex vivo*. Se han descrito diversos protocolos para el cultivo de estas células, con diversas ventajas atribuidas a cada uno de ellos. Los protocolos recientes incluyen el uso de medios sin suero y el empleo de condiciones de maduración que imparten las propiedades inmunoestimuladoras deseadas a las células cultivadas.

La maduración de células dendríticas es el proceso que convierte las CD inmaduras, que son similares fenotípicamente a las células de Langerhans de la piel, en células presentadoras de antígeno maduras que pueden migrar a los nódulos linfáticos. Este proceso provoca la pérdida de la potente capacidad de absorción de antígeno que caracteriza a las células dendríticas inmaduras y la regulación al alza de la expresión de moléculas de superficie celular coestimuladoras y diversas citoquinas. Los protocolos de maduración conocidos se basan en el entorno *in vivo* que se cree que las CD se encuentran durante o después de la exposición a antígenos. El mejor ejemplo de este planteamiento es el uso de medios condicionados por monocitos (MCM) como medio de cultivo celular. El MCM se genera *in vitro* mediante el cultivo de monocitos y se utiliza como fuente de factores de maduración. Los principales componentes del MCM responsable de la maduración documentados son las citoquinas pro(inflamatorias) interleuquina 1 beta (IL-1β), interleuquina 6 (IL-6) y el factor alfa de necrosis tumoral (TNFα). Otros factores de maduración incluyen la prostaglandina E2 (PGE2), poli-dldC, péptido intestinal vasoactivo (VIP), lipopolisacárido bacteriano (LPS), así como micobacterias o componentes de micobacterias, como componentes específicos de la pared celular.

Las células dendríticas totalmente maduras difieren cualitativa y cuantitativamente de las CD inmaduras. Las CD totalmente maduras expresan unos niveles más elevados de antígenos de MHC clase I y clase II, así como de moléculas coestimuladoras de células T, es decir, CD80 y CD86. Estos cambios aumentan la capacidad de las células dendríticas para activar las células T porque incrementan la densidad de antígeno sobre la superficie celular, así como la magnitud de la señal de activación de células T a través de las contrapartes de las moléculas coestimuladoras de las células T, por ejemplo CD28. Por otra parte, las CD maduras producen grandes cantidades de citoquinas, que estimulan y dirigen la respuesta de las células T. Dos de estas citoquinas son la interleuquina 10 (IL-10) y la interleuquina 12 (IL-12). Estas citoquinas tienen efectos opuestos sobre la dirección de la respuesta de células T inducida. La producción de IL-10 produce la inducción de una respuesta de tipo Th-2, mientras que la producción de IL-12 produce una respuesta de tipo Th-1. Esta última respuesta resulta particularmente deseable cuando se pretende obtener una respuesta inmunitaria celular, como por ejemplo en la inmunoterapia del cáncer. Una respuesta de tipo Th-1 produce la inducción y diferenciación de linfocitos T citotóxicos (CTL), que son el brazo efector del sistema inmune celular. El brazo efector es sumamente efectivo para combatir el crecimiento tumoral. La IL-12 también induce el crecimiento de células asesinas naturales (NK) y presenta actividad antiangiogénica, dos armas antitumorales efectivas. Por tanto, el uso de células dendríticas que producen IL-12 resulta en teoría sumamente adecuado para la inmunoestimulación.

Se ha documentado que determinados agentes de maduración de las células dendríticas, como el lipopolisacárido bacteriano, CpG de ADN bacteriano, ARN de cadena doble y ligando CD40, provocan que las CD inmaduras produzcan IL-12 y activan CD inmaduras para generar una respuesta Th-1. Por el contrario, las moléculas antiinflamatorias como IL-10, TGF-(5, PGE-2 y corticosteroides inhiben la producción de IL-12, y pueden activar las células para generar una respuesta Th-2.

Recientemente, se ha documentado una intensificación de la producción de IL-12 mediante células dendríticas, combinando interferón gamma con determinados factores de maduración de células

dendríticas, como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y CD40. Sin embargo, tanto LPS como CD40 tienen la capacidad conocida de inducir pequeñas cantidades de IL-12 durante la maduración. Por tanto, es posible que la adición de IFNγ simplemente intensifique dicha producción. Las señales del interferón gamma utilizan la vía Jak2-StatI, que incluye fosforilación de tirosina del residuo de tirosina de la posición 701 de StatI antes de su migración al núcleo con la consiguiente intensificación de la transcripción de los genes que reaccionan al interferón gamma. No obstante, se sabe muy poco acerca de las vías de transducción de la señal en células dendríticas obtenidas de monocitos humanos. No se ha determinado el mecanismo de acción del interferón gamma en estas células.

La cepa bovina atenuada *(Mycobacterium bovis*) de *Mycobacterium tuberculosis,* conocida como bacilo de Calmette-Guerin (BCG), se ha utilizado en la inmunoterapia del cáncer. En un ejemplo, la administración intravesical de BCG vivo ha demostrado ser efectiva para el tratamiento del cáncer de vejiga, aunque se desconoce el mecanismo para este tratamiento. Se ha postulado que los efectos de la administración de BCG están mediados por la inducción de una respuesta inmunitaria que ataca, por ejemplo, a las células cancerígenas. Se cree que el papel específico del BCG en esta respuesta es la de un inductor generalizado de la reactividad inmune, además de tener una función adyuvante en la presentación de antígenos tumorales al sistema inmune.

También se ha descubierto que el BCG es un potente agente de maduración para las células dendríticas, con la capacidad de regular al alza el marcador de maduración CD83. El BCG también puede regular al alza las moléculas de MHC y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, de forma concomitante con una reducción de la capacidad endocítica. Por otra parte, se ha documentado que el BCG, o los lipoarabidomananos obtenidos de BCG aumentan la producción de citoquina, aunque a diferencia de los resultados obtenidos con otros agentes de maduración de CD se concluyó que la producción de IL-12 se inhibe de forma específica. Esta última propiedad, la inhibición de la producción de IL-12, reduce el atractivo del uso de BCG para la maduración de células dendríticas para la inmunoterapia en la que se desea una fuerte respuesta citotóxica mediada por células (respuesta Th-1).

Por tanto, el uso de BCG en la inmunoterapia activa tiene el potencial de inducir la maduración de las células dendríticas. Sin embargo, se necesitan composiciones y métodos de uso de estas composiciones que induzcan dicha maduración de las células dendríticas y que ofrezcan simultáneamente una amplia estimulación inmune, y que activen estas células dendríticas para una respuesta inmunitaria de tipo 1 (Th-1) con una fuerte respuesta de las células T citotóxicas.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos *ex vivo* o *in vitro* para inducir la maduración de células dendríticas (CD) inmaduras, con un agente que proporcione simultáneamente una amplia estimulación inmunitaria (es decir, BCG) y la activación linfocitaria de estas células para una respuesta de las células T citotóxicas de antígeno específico de acuerdo con las reivindicaciones. En un aspecto, se proporciona un método para producir una población de células dendríticas maduras, incluyendo células dendríticas inmaduras; y poner en contacto las células dendríticas inmaduras con una concentración efectiva de BCG e interferón gamma (IFNγ) en condiciones de cultivo adecuadas para la maduración de las células dendríticas inmaduras a fin de formar una población de células dendríticas maduras. La población de células dendríticas maduras produce una mayor relación de interleuquina 12 a interleuquina 10 que una población de células dendríticas inmaduras que no ha estado en contacto con BCG e IFNγ solo durante la maduración. Las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto con un antígeno predeterminado antes del contacto con el BCG y el IFNγ o durante dicho contacto. El antígeno predeterminado puede ser, por ejemplo, un antígeno de tumor específico, un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, células tumorales, células bacterianas, células recombinantes que expresan un antígeno, un lisado celular, una preparación de membrana, un antígeno producido mediante técnicas de recombinación, un antígeno peptídico (por ejemplo, antígeno de un péptido sintético) o un antígeno aislado.

En determinadas realizaciones, el método puede incluir también de forma opcional el aislamiento de precursores de células dendríticas monocíticas y el cultivo de los precursores en presencia de un agente de diferenciación para formar una población de células dendríticas inmaduras. Entre los agentes de diferenciación adecuados se incluyen, por ejemplo, GM-SCF, interleuquina 4, una combinación de GM-CSF e interleuquina 4, o interleuquina 13. Los precursores de células dendríticas monocíticas se pueden aislar de un sujeto humano. En una realización concreta, las células dendríticas maduras producen una relación de Il-12 a IL-10 de al menos 1:1.

En otro aspecto, se proporciona un método *ex vivo* o *in vitro* para producir una población de células dendríticas maduras de acuerdo con las reivindicaciones. En términos generales, el método incluye proporcionar células dendríticas inmaduras; y poner en contacto las células dendríticas inmaduras con una cantidad efectiva de BCG e interferón gamma (IFNγ) en condiciones de cultivo adecuadas para la maduración de las células dendríticas inmaduras a fin de formar una población de células dendríticas maduras. La población de células dendríticas maduras resultante produce un tipo de respuesta inmunitaria de tipo 1. Las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto con un antígeno predeterminado antes del contacto con el BCG y el IFNγ o durante dicho contacto.

El antígeno predeterminado puede ser, por ejemplo, un antígeno de tumor específico, un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, células tumorales, células bacterianas, células recombinantes que expresan un antígeno, un lisado celular, una preparación de membrana, un antígeno producido mediante técnicas de recombinación, un antígeno peptídico (por ejemplo, un péptido sintético) o un antígeno aislado.

En determinas realizaciones, el método también puede incluir opcionalmente el aislamiento de precursores de células dendríticas monocíticas y el cultivo de los precursores en presencia de un agente de diferenciación para formar las células dendríticas inmaduras. Entre los agentes de diferenciación adecuados se incluyen, por ejemplo, GM-CSF, interleuquina 4, una combinación de GM-CSF e interleuquina 4, o interleuquina 13. Los precursores de células dendríticas monocíticas se aíslan de un sujeto humano. En una realización concreta, las células dendríticas maduras producen una relación de IL-12 a IL-I0 de al menos 1:1.

En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan composiciones para activar las células T. Las composiciones pueden incluir poblaciones de células dendríticas maduradas con una concentración efectiva de BCG e IFNγ en condiciones adecuadas para la maduración; y un antígeno predeterminado. La población de células dendríticas puede producir una relación mayor de interleuquina 12 (IL-12) a interleuquina 10 (IL-10) que una población de células dendríticas maduras que no ha estado en contacto con BCG e IFNγ durante la maduración. En determinadas realizaciones, la población de células dendríticas puede producir una relación de IL-12 a IL-10 de al menos 10:1. En otras realizaciones, la población de células dendríticas puede producir una relación mayor de IL-12 a IL-10 (de al menos 100:1) que una población de células dendríticas inmadura similar cultivada en presencia de BCG sin IFNγ durante la maduración.

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona una población de células dendríticas inmaduras aisladas. La población de células incluye células dendríticas monocíticas inmaduras y una concentración efectiva de BCG e IFNγ para inducir la maduración de las células dendríticas inmaduras. Las células dendríticas maduras resultantes producen más interleuquina 12 (IL-12) a interleuquina 10 (IL-10) que una población de células dendríticas inmaduras similar cultivada en presencia de BCG sin IFNγ durante la maduración. La población de células puede incluir opcionalmente un antígeno predeterminado y/o células T aisladas, como células T vírgenes. La célula T puede opcionalmente estar presente en una preparación de linfocitos aislados.

También se proporciona un método para producir células T activadas. En términos generales, el método incluye proporcionar células dendríticas inmaduras; poner en contacto las células dendríticas inmaduras con un antígeno predeterminado; y poner en contacto las células dendríticas inmaduras con una concentración efectiva de BCG e IFNγ en condiciones de cultivo adecuadas para la maduración de las células dendríticas inmaduras a fin de formar células dendríticas maduras.

Las células dendríticas maduras se pueden poner en contacto con células T vírgenes para formar células T activadas que producen IFNγ y/o polarizado para generar una respuesta de tipo 1 (Th-1). Entre los antígenos adecuados se incluyen, por ejemplo, un antígeno de tumor específico, un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, células tumorales, células bacterianas, células recombinantes que expresan un antígeno, un lisado celular, una preparación de membrana, un antígeno producido mediante técnicas de recombinación, un antígeno peptídico (por ejemplo, antígeno de un péptido sintético) o un antígeno aislado.

Las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto simultáneamente con el antígeno predeterminado, BCG e IFNγ, o las células se pueden poner en contacto con el antígeno predeterminado antes de ponerse en contacto con BCG e IFNγ. En determinadas realizaciones de la divulgación, el método también puede incluir el aislamiento de precursores de células dendríticas monocíticas y el cultivo de precursores en presencia de un agente de diferenciación para inducir la formación de las células dendríticas inmaduras. Entre los agentes de diferenciación adecuados se incluyen, por ejemplo, GM-CSF, interleuquina 4, una combinación de GM-CSF e interleuquina 4, o interleuquina 13. Los precursores de células dendríticas monocíticas se pueden aislar opcionalmente de un sujeto humano. En una realización concreta de la divulgación, las células dendríticas inmaduras y las células T son autólogas entre sí.

En otro aspecto de la divulgación también se proporcionan células dendríticas maduras aisladas que producen una mayor relación de interleuquina 12 (IL-12) a interleuquina 10 (IL-10). Las células dendríticas maduras se pueden proporcionar mediante la maduración de células dendríticas inmaduras con una composición que comprende concentraciones efectivas de BCG e IFNγ en condiciones adecuadas para la maduración de las células dendríticas. Opcionalmente se puede incluir un antígeno predeterminado con las células dendríticas maduras aisladas. También se proporcionan células dendríticas maduras aisladas cargadas con un antígeno predeterminado. Las células dendríticas pueden producir más interleuquina 10 (IL-12) que interleuquina 10 (IL-10), por ejemplo, al menos 10 veces más IL-12 que IL-10 que una población de células dendríticas inmaduras similar cultivada en presencia de BCG sin IFNγ durante la maduración.

La divulgación proporciona asimismo un método para producir una respuesta inmunitaria de tipo 1 (Th-1) en un animal. En términos generales, el método consiste en proporcionar células dendríticas inmaduras;

poner en contacto las células dendríticas inmaduras con cantidades efectivas de BCG e interferón gamma (IFNγ), y un antígeno predeterminado, en condiciones de cultivo adecuadas para la maduración de las células dendríticas inmaduras a fin de formar células dendríticas maduras. Las células dendríticas maduras se pueden administrar a un animal o se pueden poner en contacto con células T vírgenes para formar células T activadas, que se caracterizan por la producción de interferón gamma (IFNγ) y/o factor de necrosis tumoral alfa (TNFα). Las células T activadas se pueden administrar al animal que precisa la estimulación de una respuesta de células T citotóxicas al antígeno específico.

Entre los antígenos adecuados se incluyen, por ejemplo, un antígeno de tumor específico, un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, células tumorales, células bacterianas, células recombinantes que expresan un antígeno, un lisado celular, una preparación de membrana, un antígeno producido mediante técnicas de recombinación, un antígeno peptídico (por ejemplo, antígeno de un péptido sintético) o un antígeno aislado. Opcionalmente, las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto de forma simultánea con el antígeno predeterminado, BCG e IFNγ, o las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto con el antígeno predeterminado antes de ponerse en contacto con BCG e IFNγ.

En determinas realizaciones de la divulgación, el método también puede incluir el aislamiento de precursores de células dendríticas monocíticas del animal y el cultivo de precursores en presencia de un agente de diferenciación para formar las células dendríticas inmaduras. El agente de diferenciación puede ser, por ejemplo, GM-CSF, interleuquina 4, una combinación de GM-CSF e interleuquina 4, o interleuquina 13.

Las células dendríticas inmaduras y las células T pueden ser autólogas del animal o alogénicas. Alternativamente, las células dendríticas inmaduras y las células T pueden tener el mismo haplotipo del MHC que el animal o compartir un marcador MHC. En determinadas realizaciones, el animal puede ser humano o puede ser un animal no humano.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos *ex vivo* o *in vitro* para inducir la maduración de células dendríticas (CD) inmaduras y para activar esas células para una respuesta de células T citotóxicas de antígeno específico (respuesta Th-1). La presente divulgación también proporciona poblaciones de células dendríticas útiles para activar y para preparar poblaciones de células T polarizadas para la producción de citoquinas de tipo 1 (por ejemplo, IFNγ, TNFα, y/o IL-2). Estas poblaciones de células dendríticas incluyen células dendríticas monocíticas inmaduras que se han puesto en contacto con BCG, IFNγ y un antígeno predeterminado en condiciones de maduración adecuadas. Las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto con el antígeno durante o antes de la maduración. Alternativamente, las células dendríticas monocíticas inmaduras, ya expuestas a antígeno (por ejemplo, *in vivo*) se pueden poner en contacto con BCG e IFNγ en condiciones de maduración adecuadas. Las células dendríticas maduras resultantes son activadas para activar y polarizar células T para una respuesta de tipo 1. Una respuesta de tipo 1 incluye la producción de citoquinas de tipo 1 (por ejemplo, IFNγ y/o IL-2), la producción de más IL-12 que IL-10, una respuesta de células T citotóxicas, la producción de células Th-1 y la producción de determinados tipos de anticuerpos. También se puede producir una regulación al alza del factor de necrosis tumoral (TNFα). Por el contrario, una respuesta de tipo 2 se caracteriza por la producción de IL-4, IL-5 e IL-10, la producción de más IL-10 que IL-12, la producción de células Th-2 y la ausencia de inducción de respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL).

En un aspecto relacionado de la divulgación, se proporcionan composiciones que comprenden un agente de maduración para células dendríticas inmaduras, como precursores de células dendríticas monocíticas, que también pueden activar esas células dendríticas para una respuesta de tipo 1. Estas células dendríticas monocíticas activadas maduras pueden aumentar la presentación de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I de un antígeno predeterminado, es decir un antígeno exógeno predeterminado. La presentación de MHC de clase I del antígeno es recomendable para inducir la diferenciación de linfocitos T citotóxicos (CTL) y la estimulación de lisis mediada por CTL de antígeno específico de las células diana. Estas composiciones incluyen BCG e IFNγ que se pueden mezclar con una población de células que comprende células dendríticas inmaduras, para madurar las células dendríticas inmaduras y para convertir o superar la inhibición de IL-12 inducida por el contacto de las células dendríticas inmaduras con BCG. Las células dendríticas inmaduras que se ponen en contacto con estas composiciones se someten a maduración y producen típicamente mayores cantidades de IL-12 que de IL-10, en comparación con una población de células dendríticas inmaduras que ha estado en contacto solo con BCG.

En otro aspecto de la divulgación, los precursores de las células dendríticas monocíticas obtenidas de sujetos o donantes se pueden poner en contacto con citoquinas (por ejemplo, GM-CSF e IL-4) para obtener células dendríticas inmaduras. A continuación, las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto con un antígeno predeterminado, sea en combinación con BCG e IFNγ solo, o en combinación con una citoquina, para madurar las células dendríticas y activar linfocitariamente las células para inducir una respuesta inmunitaria de tipo 1 en las células T. En determinadas realizaciones, se estimula el procesamiento del complejo MHC de clase 1-antígeno, lo que resulta útil para provocar una

respuesta de CTL contra células que presentan el antígeno predeterminado.

Las células dendríticas son una población diversa de células presentadoras de antígeno que se encuentran en diversos tejidos linfoides y no linfoides. *(Véase* Liu, *Cell* 106:259-62 (2001); Steinman, *Ann. Rev. Immunol.* 9:271-96 (1991)). Las células dendríticas incluyen células dendríticas linfoides del bazo, células de Langerhans de la epidermis y células veliformes de la circulación sanguínea. Colectivamente, las células dendríticas se clasifican como un grupo en función de su morfología, elevados niveles de expresión de MHC de clase II en superficie y ausencia de determinados marcadores de superficie expresados en células T, células B, monocitos y células asesinas naturales. En particular, las células dendríticas obtenidas de monocitos (también denominadas células dendríticas monocíticas) normalmente expresan CD11c, CD80, CD86, y son HLA-DR$^+$, pero son CD 14$^-$.

En contraste, los precursores de células dendríticas monocíticas (monocitos típicos) son normalmente CD14$^+$. Los precursores de células dendríticas monocíticas se pueden obtener de cualquier tejido en el que residen, en particular tejidos linfoides como el bazo, la médula ósea, los nódulos linfáticos y el timo. Los precursores de células dendríticas monocíticas también se pueden aislar del sistema circulatorio. La sangre periférica es una fuente de precursores de células dendríticas monocíticas de fácil acceso. La sangre del cordón umbilical es otra fuente de precursores de células dendríticas monocíticas. Los precursores de células dendríticas monocíticas se pueden aislar de diversos organismos en los que se puede provocar una respuesta inmunitaria. Estos organismos incluyen animales, por ejemplo, incluyendo seres humanos y animales no humanos, tales como primates, mamíferos (incluyendo perros, gatos, ratones y ratas), aves (incluyendo pollos), así como especies transgénicas de estos.

En determinadas realizaciones, los precursores de células dendríticas monocíticas y/o células dendríticas inmaduras se pueden aislar de un sujeto sano o de un sujeto que necesita inmunoestimulación, como, por ejemplo, un paciente con cáncer de próstata u otro sujeto para el que la inmunoestimulación celular puede resultar beneficiosa o recomendable (es decir, un sujeto que tiene una infección bacteriana o viral o similares). Los precursores de células dendríticas o las células dendríticas inmaduras también se pueden obtener de un individuo sano con un antígeno leucocitario humano (HLA) compatible para su administración al sujeto que necesita la inmunoestimulación.

Precursores de células dendríticas y células dendríticas inmaduras

Los métodos para aislar poblaciones de células enriquecidas para obtener precursores de células dendríticas y células dendríticas inmaduras de diversas fuentes, incluyendo la sangre y la médula ósea, son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los precursores de células dendríticas y las células dendríticas inmaduras se pueden aislar recogiendo sangre heparinizada, mediante aféresis o leucaféresis, a través de la preparación de la capas leucocitarias, recomposición, centrifugación, centrifugación por gradiente de densidad *(por ejemplo,* utilizando Ficoll (como FICOLL-PAQUE®), PERCOLL® (partículas de sílice coloidal (15-30 mm de diámetro) recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP) no dializable), sacarosa y similares), lisis diferencial de las células, filtración y similares. En determinadas realizaciones, se puede preparar una población de leucocitos, como, por ejemplo, recogiendo sangre de un sujeto, sometiéndola a defibrinación para eliminar las plaquetas y lisando los eritrocitos. Los precursores de células dendríticas y células dendríticas inmaduras se pueden enriquecer opcionalmente para obtener precursores de células dendríticas monocíticas, por ejemplo, mediante centrifugación por gradiente de PERCOLL®

Opcionalmente los precursores de células dendríticas y células dendríticas inmaduras se pueden preparar en un sistema aséptico cerrado. A efectos del presente, los términos "sistema aséptico cerrado" o "sistema cerrado" se refieren a un sistema en el que se minimiza o elimina la exposición al aire en circulación o ambiental no esterilizado o a otras condiciones no estériles. Por lo general, los sistemas cerrados para el aislamiento de precursores de células dendríticas y células dendríticas inmaduras excluyen la centrifugación por gradiente de densidad en tubos abiertos, transferencia de células al aire, cultivo de células en placas de cultivo tisular o matraces no sellados y similares. En una realización típica, el sistema cerrado permite la transferencia aséptica de los precursores de células dendríticas y células dendríticas inmaduras desde un recipiente de recogida inicial a un recipiente de cultivo tisular sellable sin exposición al aire no estéril.

En determinadas realizaciones, los precursores de células dendríticas monocíticas son aislados mediante adherencia a un sustrato de unión monocítica, tal y como se divulga en la Solicitud de Patente USA Nº. 60/307 978, presentada el 25 de julio de 2001 (Nº Registro Legal 020093-002600US); por ejemplo, una población de leucocitos (por ejemplo, aislados por leucaféresis) se puede poner en contacto con un sustrato para la adherencia de precursores de células dendríticas monocíticas. Cuando la población de leucocitos se pone en contacto con el sustrato, los precursores de células dendríticas monocíticas de la población de leucocitos se adhieren de forma preferente al sustrato. Otros leucocitos (incluyendo otros precursores de células dendríticas potenciales) presentan una afinidad de unión reducida al sustrato, permitiendo así que los precursores de células dendríticas monocíticas se enriquezcan de forma preferente sobre la superficie del sustrato.

Los sustratos adecuados incluyen, por ejemplo, aquellos que tienen una elevada relación entre volumen y área superficial. Estos sustratos pueden ser, por ejemplo, un sustrato de partículas o fibras. Entre los sustratos de partículas adecuados se incluyen, por ejemplo, partículas de vidrio, partículas de plástico,

partículas de plástico recubiertas de vidrio, partículas de poliestireno recubiertas de vidrio y otros gránulos adecuados para la absorción de proteínas. Entre los sustratos de fibras adecuados se incluyen tubos microcapilares y membranas de microvellosidades. El sustrato de partículas o fibras normalmente permite que los precursores de células dendríticas monocíticas adheridos sean retirados sin reducir de forma notable la viabilidad de las células adheridas. Un sustrato de partículas o fibras puede ser sustancialmente no poroso para facilitar la elución de precursores de células dendríticas monocíticas o células dendríticas del sustrato. Un sustrato "sustancialmente no poroso" es un sustrato en el que al menos una mayoría de los poros presentes en el sustrato son más pequeños que las células para minimizar el número de células que quedan atrapadas en el sustrato.

La adherencia de los precursores de células dendríticas monocíticas al sustrato se puede mejorar opcionalmente mediante la adición de medios aglutinantes. Entre los medios aglutinantes adecuados se incluyen medios de cultivo de precursores de células dendríticas monocíticas *(por ejemplo,* AIM-V®, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15® y similares) suplementados, individualmente o en cualquier combinación con, por ejemplo, citoquinas *(por ejemplo,* Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), interleuquina 4 (IL-4) o interleuquina 13 (IL-13)), plasma sanguíneo, suero *(por ejemplo,* suero humano, como suero autólogo o suero alogénico), proteínas purificadas, como albúmina de suero, cationes divalentes *(por ejemplo,* iones de magnesio y/o calcio) y otras moléculas que contribuyen a la adherencia específica de precursores de células dendríticas monocíticas al sustrato o que evitan la adherencia de precursores de células dendríticas no monocíticas al sustrato. En determinadas realizaciones, el plasma sanguíneo o suero se puede inactivar por calor. El plasma inactivado por calor puede ser autólogo o heterólogo a los leucocitos.

Tras la adherencia de precursores de células dendríticas monocíticas al sustrato, los leucocitos no adheridos se separan de los complejos de precursor de célula dendrítica monocítica/sustrato. Se puede utilizar cualquier medio adecuado para separar las células no adheridas de los complejos. Por ejemplo, se puede dejar que la mezcla de leucocitos no adheridos y complejos se asiente y los leucocitos no adheridos y los medios se pueden decantar o drenar. Alternativamente, se puede centrifugar la mezcla para decantar o drenar el supernatante que contiene los leucocitos no adheridos, separándolo de los complejos adheridos a los gránulos.

Los precursores de células dendríticas aisladas pueden ser cultivados *ex vivo* para la diferenciación, maduración y/o expansión. (A efectos del presente documento, las células dendríticas inmaduras aisladas, los precursores de células dendríticas y otras células se refieren a células que, por intervención humana, existen aparte de su entorno nativo y por consiguiente no son producto de la naturaleza. Las células aisladas pueden existir en forma purificada, en forma semipurificada o en un entorno no nativo). Resumiendo, la diferenciación *ex vivo* implica típicamente el cultivo de precursores de células dendríticas o poblaciones de células con precursores de células dendríticas, en presencia de uno o más agentes de diferenciación. Entre los agentes de diferenciación adecuados se pueden incluir, por ejemplo, factores de crecimiento celular (por ejemplo, citoquinas como (GM-CSF), Interleuquina 4 (IL-4), Interleuquina 13 (IL-13) y/o combinaciones de estas). En determinadas realizaciones, los precursores de células dendríticas monocíticas se diferencian para formar células dendríticas inmaduras derivadas de monocitos.

Los precursores de células dendríticas pueden ser cultivados y diferenciados en condiciones de cultivo adecuadas. Entre los medios de cultivo tisular adecuados se incluyen AIM-V®, RPMI1640, DMEM, X-VIVO 15® y similares. Los medios de cultivo tisular pueden complementarse con suero, aminoácidos, vitaminas, citoquinas, como GM-CSF y/o IL-4, cationes divalentes y similares, para favorecer la diferenciación celular. En determinadas realizaciones, los precursores de células dendríticas pueden ser cultivados en medios sin suero. Las condiciones de cultivo pueden excluir opcionalmente cualquier producto de origen animal. Una combinación de citoquinas típica de un medio de cultivo de células dendríticas típico consta aproximadamente de 500 unidades/ml de GM-CSF y de IL-4. Los precursores de células dendríticas, cuando son diferenciados para formar células dendríticas inmaduras, son fenotípicamente similares a las células de Langerhans de la piel. Típicamente, las células dendríticas inmaduras son CD 14^- y $CD11c^+$, expresan bajos niveles de CD86 y CD83, y pueden capturar antígenos solubles por endocitosis especializada.

Las células dendríticas inmaduras se maduran para formar células dendríticas maduras.

Las CD maduras pierden la habilidad de absorber antígeno y presentan una expresión regulada al alza de moléculas de superficie celular coestimuladoras y diversas citoquinas. Concretamente, las CD maduras expresan unos niveles más elevados de antígenos con MHC de clase I y II que las células dendríticas inmaduras, y las células dendríticas maduras por lo general se identifican por ser $CD80^+$, $CDS3^+$, $CD86^+$, y $CD14^-$. Una mayor expresión de MHC provoca un aumento de la densidad del antígeno en la superficie de las CD, mientras que la regulación al alza de las moléculas coestimuladoras CD 80 y CD86 refuerza la señal de activación de células T a través de las contrapartes de las moléculas coestimuladoras, como CD28 en las células T.

Las células dendríticas maduras de la presente divulgación se pueden preparar (es decir, madurar) poniendo en contacto las células dendríticas inmaduras con cantidades o concentraciones efectivas de BCG e IFNγ. Las cantidades efectivas de BCE oscilan típicamente entre 10^5 y 10^7 cfu por milímetro de

medio de cultivo tisular. Las cantidades efectivas de IFNγ son típicamente de unas 100-1000 U por milímetro de medio de cultivo tisular. El bacilo Calmette-Guerin (BCG) es una cepa avirulenta de *M. bovis*. A efectos del presente, BCG se refiere a BCG completo, así como a componentes de la pared celular, lipoarabidomananos derivados de BCG y otros componentes de BCG asociados a la inducción de una respuesta inmunitaria de tipo 2. BCG es opcionalmente inactivado, como BCG inactivado por calor, BCG tratado con formalina y similares.

El BCG aumenta la expresión de los marcadores de maduración de superficie CD83 y CD86 en las células dendríticas, concomitante con la inhibición de la producción de IL-12 y la exclusión de antígenos de la endocitosis. Sin intención de limitación a ninguna teoría concreta, la maduración de las células dendríticas por BCG también se ha caracterizado por el hecho de que implica la agregación homotípica y la liberación de factor de necrosis tumoral alfa (TNFα). *(Véase, por ejemplo,* Thumher, *et al., Int. J. Cancer* 70:128-34 (1997)

La maduración de las células dendríticas inmaduras con IFNγ y BCG favorece la producción de CD de IL-12 y reduce o inhibe la producción de IL-10, activando así las células dendríticas maduras para una respuesta de tipo 1 (Th-1).

Las CD inmaduras se ponen típicamente en contacto con cantidades efectivas de BCG e IFNγ durante un periodo aproximado de entre una y 24 horas. Las células dendríticas inmaduras pueden ser cultivadas y maduradas en condiciones de cultivo de maduración adecuadas. Entre los medios de cultivo tisular adecuados se incluyen AIM-V®, RPMI1640, DMEM, X-VIVO 15® y similares. Los medios de cultivo tisular pueden complementarse con aminoácidos, vitaminas, citoquinas, como GM-CSF y/o IL-4, cationes divalentes y similares, para favorecer la maduración celular. Una combinación de citoquinas típica consta aproximadamente de 500 unidades/ml de GM-CSF y de IL-4.

La maduración de células dendríticas se puede controlar mediante métodos conocidos en la técnica. Los marcadores de superficie celular pueden ser detectados en ensayos conocidos en la técnica, tales como citometría de flujo, inmunohistoquímica y similares. Las células pueden ser también monitorizadas en cuanto a producción de citoquinas (por ejemplo, mediante ELISA u otro inmunoensayo). En una población de CD maduradas según la presente invención, los niveles de IL-12 son superiores a los niveles de IL-10, para promover una respuesta de tipo 1 (Th-1). Por ejemplo, las CD pueden producir relaciones de IL-12 a IL-10 desde superiores a 1:3 hasta aproximadamente 10:1 o aproximadamente 100:1. Las CD maduras también pierden la capacidad para absorber antígeno por pinocitosis, lo que se puede analizar mediante los ensayos de absorción conocidos por los expertos en la técnica. Los precursores de células dendríticas, las células dendríticas inmaduras y las células dendríticas maduras, activadas o no activadas, con antígenos pueden ser criopreservadas para ser utilizadas en una fecha posterior. Los métodos para la criopreservación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente USA 5 788 963.

Antígenos

Las células dendríticas activadas maduras según la presente invención pueden presentar antígeno a las células T. Las células dendríticas activadas maduras se pueden formar poniendo en contacto las células dendríticas inmaduras con un antígeno predeterminado antes de la maduración o durante la misma. Alternativamente, las células dendríticas inmaduras que ya se han puesto en contacto con antígeno (por ejemplo, *in vivo* antes del aislamiento) se pueden poner en contacto con una composición que comprende BCG e IFNγ para formar células dendríticas maduras activadas para una respuesta de tipo 1 (Th-1).

Los antígenos predeterminados adecuados pueden incluir cualquier antígeno para el que se desee la activación de células T. Estos antígenos pueden incluir, por ejemplo, antígenos bacterianos, antígenos de tumor específico o asociados a tumores (por ejemplo, células completas, lisado de células tumorales, antígenos aislados de tumores, proteínas de fusión, liposomas y similares), antígenos virales y cualquier otro antígeno o fragmento de un antígeno, por ejemplo un antígeno peptídico o polipeptídico. En determinadas realizaciones, el antígeno puede ser, por ejemplo, a título meramente enunciativo, antígeno de membrana específico prostático (PSMA), fosfatasa ácida prostática (PAP) o antígeno específico prostático (PSA). *(Véase, por ejemplo,* Pepsidero *et al., Cancer Res.* 40:2428-32 (1980); McCormack *et al., Urology* 45:729-44 (1995).) El antígeno también puede ser una célula bacteriana, un lisado bacteriano, un fragmento de membrana de un lisado celular o cualquier otra fuente conocida en la técnica. El antígeno se puede expresar o producir mediante técnicas de recombinación o incluso sintetizarse químicamente. El antígeno recombinante también se puede expresar sobre la superficie de una célula hospedadora (por ejemplo, bacterias, levaduras, insectos, células de vertebrados o mamíferos), puede estar presente en un lisado o puede ser purificado del lisado.

El antígeno también puede estar presente en una muestra de un sujeto. Por ejemplo, una muestra de tejido de una condición hiperproliferativa o de otro tipo en un sujeto se puede utilizar como fuente del antígeno. Esta muestra se puede obtener, por ejemplo, por biopsia o resección quirúrgica. Este antígeno se puede utilizar como un lisado o como una preparación aislada.

Alternativamente, una preparación de membrana de células de un sujeto (por ejemplo, un paciente con cáncer) o una línea celular establecida se puede utilizar como antígeno o fuente de antígeno.

En un ejemplo de realización, un lisado de células de tumor prostático recuperado de muestras quirúrgicas se puede utilizar como fuente del antígeno. Por ejemplo, una muestra del tumor del propio paciente con cáncer, obtenida por biopsia o resección quirúrgica, se puede utilizar directamente para presentar antígeno a las células dendríticas o para proporcionar un lisado celular para la presentación de antígeno. Alternativamente, se puede utilizar una preparación de membrana de células tumorales de un paciente con cáncer. La célula tumoral puede ser prostática, pulmonar, ovárica, de colon, cerebral, melanoma o cualquier otro tipo de célula tumoral. Los lisados y la preparación de membrana se pueden preparar a partir de células tumorales aisladas mediante los métodos conocidos en la técnica.

En otro ejemplo de realización, se puede utilizar como antígeno un antígeno de membrana específico prostático purificado o semipurificado (PSMA, también conocido como antígeno PSM), que reacciona específicamente con anticuerpo monoclonal 7E11-C.5. *(*Véase generalmente Horoszewicz *el at., Prog. Clin. Biol. Res.* 37:115-32 (1983), Patente USA Nº 5 162 504; Patente USA Nº 5 788 963; Feng *et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 32:(Abs, 1418)238 (1991).

En otro ejemplo más de realización, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico que tiene la secuencia de residuos aminoácidos Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val (SEC. ID. Nº: 1) (designada PSM-P1), que corresponde a los residuos aminoácidos 4-12 del PSMA. Alternativamente, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico que tiene la secuencia de residuos aminoácidos Ala Leu Phe Asp He Glu Ser Lys Val (SEC. ID. Nº: 2) (designada PSM-P2), que corresponde a los residuos aminoácidos 711-719 de PSMA.

En una realización concreta, se puede utilizar como antígeno un péptido antigénico que tiene una secuencia de residuos aminoácidos Xaa Leu (o Met) Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val (o Leu) (designada PSM-PX), donde Xaa representa cualquier residuo aminoácido. Este péptido se parece al motivo de unión HLA-A0201, es decir un motivo de unión de los residuos aminoácidos 9-10 con "residuos ancla", leucina y valina que se encuentran en los pacientes con HLA-A2. *(Véase, por ejemplo,* Grey *et al., Cancer Surveys* 22:37-49 (1995).) Este péptido se puede utilizar como antígeno para pacientes con HLA-$A2^+$ (véase, Central Data Analysis Committee “Allele Frequencies”, sección 6.3, Tsuji, K. *et al.* (eds.), Tokyo University Press, pp. 1066-1077). De forma similar, se pueden utilizar péptidos que se parecen a otros motivos de unión HLA.

Típicamente, las células dendríticas inmaduras se cultivan en presencia de BCG, IFNγ y el antígeno predeterminado en condiciones de maduración adecuadas, tal y como se ha descrito anteriormente. Opcionalmente, las células dendríticas inmaduras se pueden mezclar con el antígeno predeterminado en un medio de cultivo de células dendríticas típico sin GM-CSF e IL-4, o un agente de maduración. Después de que hayan transcurrido entre al menos 10 minutos y 2 días de cultivo con el antígeno, el antígeno se puede retirar y se puede añadir el medio de cultivo complementado con BCG e IFNγ. También se pueden añadir citoquinas (por ejemplo, GM-CSF e IL-4) al medio de maduración. Los métodos para poner en contacto células dendríticas son generalmente conocidos en la técnica. *(Véase en general* Steel y Nutman, *J. Immunol.* 160:351-60 (1998); Tao et al., *J. Immunol.* 158:4237-44 (1997); Dozmorov y Miller, *Cell Immunol.* 178:187-96 (1997); Inaba *et al.,J Exp Med.* 166:182-94 (1987); Macatonia *et al., J Exp Med.* 169:1255-64 (1989); De Bruijn *et al., Eur. J. Immunol.* 22:3013-20 (1992).

A continuación, las células dendríticas activadas maduras resultantes son co-incubadas con células T, como células T vírgenes. Las células T o un subconjunto de células T se pueden obtener de diversos tejidos linfoides para su uso como células respondedoras, Estos tejidos incluyen, a título meramente enunciativo, el bazo, los nódulos linfáticos y/o la sangre periférica. Las células se pueden cultivar conjuntamente con células dendríticas activadas maduras como una población de células T mixtas o un subconjunto de células T purificadas. La purificación de células T se puede conseguir por selección positiva o negativa, incluyendo, entre otros, el uso de anticuerpos dirigidos a CD2, CD3, CD4, CD8, y similares.

Al poner en contacto las células T con células dendríticas activadas maduras, se proporcionan linfocitos T o células T polarizadas, o activadas o reactivas a antígeno. A efectos del presente documento, el término "polarizado" se refiere a células T que producen elevados niveles de IFNγ o son de otro modo activadas para inducir una respuesta de tipo 1 (Th-1). Estos métodos típicamente incluyen poner en contacto células dendríticas inmaduras con BCG e IFNγ para preparar células dendríticas activadas maduras. Las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto con un antígeno predeterminado durante o antes de la maduración. Las células dendríticas inmaduras se pueden cultivar conjuntamente con células T (por ejemplo, células T vírgenes) durante la maduración o cultivar conjuntamente con células T (por ejemplo, células T vírgenes) tras la maduración y proceder a la activación linfocitaria de las células dendríticas para inducir una respuesta de tipo 1. Las células dendríticas inmaduras o células dendríticas maduras se pueden enriquecer antes de la maduración. Por otra parte, las células T se pueden enriquecer a partir de una población de linfocitos antes de ponerse en contacto con las células dendríticas. En una realización específica, se ponen en contacto poblaciones enriquecidas o purificadas de células T $CD4^+$ con las células dendríticas. El cultivo conjunto de células dendríticas activadas maduras con células T provoca la estimulación de células T específicas que maduran para convertirse en células T $CD4^+$ reactivas a antígeno o células $T8^+$ reactivas a antígeno.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para la reestimulación de células T *in vitro*, cultivando las células en presencia de células dendríticas maduras activadas para inducir una respuesta de células T de tipo 1 (Th-1). Esta célula T se puede cultivar opcionalmente con células alimentadoras. Opcionalmente las células dendríticas activadas maduras se pueden irradiar antes de ponerse en contacto con las células T. Las condiciones de cultivo adecuadas pueden incluir una o más citoquinas (por ejemplo, IL-2 purificada, supernatante de células de bazo estimuladas con concanavalina A o interleuquina 15 (IL-15)). La reestimulación *in vitro* de células T mediante la adición de células dendríticas inmaduras, BCG, IFNγ y el antígeno predeterminado se puede utilizar para promover la expansión de las poblaciones de células T.

Se puede mantener una línea de células T o un cultivo de células T polarizadas de antígeno específico estable *in vitro* durante periodos de tiempo prolongados por reestimulación periódica. El cultivo de células T o la línea de células T creado de esta forma se puede almacenar y si es preservado (por ejemplo, por formulación con un crioconservante y congelación) puede ser utilizado para un nuevo suministro de células T polarizadas activadas a intervalos deseados para su uso a largo plazo.

En determinadas realizaciones, las células T activadas $CD8^+$ o $CD4^+$ se pueden generar según el método de la presente divulgación. Típicamente, las células dendríticas activadas maduras utilizadas para generar las células T polarizadas reactivas a antígeno son singénicas al sujeto al que van a ser administradas (por ejemplo, son obtenidas del sujeto). Alternativamente, las células dendríticas que tienen el mismo haplotipo HLA que el sujeto receptor previsto se pueden preparar *in vitro* utilizando células no cancerosas (por ejemplo, células normales) de un donante con HLA compatible. En una realización específica, las células T reactivas a antígeno, incluyendo células CTL y Th-1, se expanden *in vitro* como fuente de células para la inmunoestimulación.

Administración *in vivo* de poblaciones de células

En otro aspecto de la divulgación se proporcionan métodos para la administración de células dendríticas activadas maduras o células T polarizadas activadas o una población de células que contiene estas células, a un sujeto que necesita inmunoestimulación. Estas poblaciones de células pueden incluir tanto poblaciones de células dendríticas activadas maduras como poblaciones de células T polarizadas activadas. En determinadas realizaciones, estos métodos se realizan obteniendo precursores de células dendríticas o células dendríticas inmaduras, diferenciando y madurando esas células en presencia de BCG, IFNγ y antígeno predeterminado para formar una población de células dendríticas maduras activadas para generar una respuesta Th-1. Las células dendríticas inmaduras se pueden poner en contacto con el antígeno antes de la maduración o durante la misma. Estas células dendríticas activadas maduras se pueden administrar directamente a un sujeto que necesita inmunoestimulación.

En una realización relacionada de la divulgación, las células dendríticas activadas maduras se pueden poner en contacto con linfocitos de un sujeto para estimular las células T dentro de la población de linfocitos. Los linfocitos polarizados activados, opcionalmente seguidos por expansión clonal en el cultivo celular de células T reactivas a antígeno $CD4^+$ y/o $CD8^+$ T, se pueden administrar a un sujeto que necesita inmunoestimulación. En determinadas realizaciones, las células T polarizadas activadas son autólogas al sujeto.

En otra realización de la divulgación, las células dendríticas, las células T y el sujeto receptor tienen el mismo haplotipo MHC (HLA). Los métodos para determinar el haplotipo HLA de un sujeto son conocidos en la técnica. En una realización relacionada, las células dendríticas y/o células T son alogénicas al sujeto receptor. Por ejemplo, las células dendríticas pueden ser alogénicas a las células T y el receptor, que tienen el mismo haplotipo MHC (HLA). Las células alogénicas tienen una coincidencia típica de al menos un alelo de MHC (por ejemplo, comparten al menos uno pero no todos los alelos MHC). En una realización menos típica, las células dendríticas, las células T y el sujeto receptor son todos alogénicos entre sí, pero todos comparten al menos un alelo MHC común.

De acuerdo con una realización de la divulgación, las células T se obtienen del mismo sujeto del que se han obtenido las células dendríticas inmaduras. Tras la maduración y polarización *in vitro*, las células T autólogas son administradas al sujeto para provocar y/o aumentar una respuesta inmunitaria existente. Por ejemplo, las células T se pueden administrar, mediante infusión intravenosa, por ejemplo, a dosis de aproximadamente 108-109 células/m2 de superficie corporal (véase, por ejemplo, Ridell et al., Sciencc 257: 238-41 (1992).

La infusión se puede repetir a intervalos deseados, por ejemplo mensualmente. Los receptores pueden ser objeto de seguimiento durante las infusiones de las células T y después de estas, para detectar cualquier signo de efectos adversos.

De acuerdo con otra realización de la divulgación, las células dendríticas maduradas con BCG e IFNγ según la presente invención pueden ser inyectadas directamente en un tumor u otro tejido que contiene un antígeno diana. Estas células maduras pueden absorber el antígeno y presentar ese antígeno a las células T *in vivo*.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan a título meramente ilustrativo de diversos aspectos de la

invención y no se interpretará que limitan la invención en modo alguno. Todos los ejemplos que no entran dentro del ámbito de aplicación de las reivindicaciones se ofrecen con fines comparativos.

EJEMPLO 1 Producción de IL-10 e IL-12 en diferentes condiciones de maduración:

En este ejemplo, la producción de citoquinas se determinó a partir de poblaciones de células dendríticas inmaduras que se pusieron en contacto con los agentes de maduración BCG y/o IFNγ. Se prepararon CD inmaduras poniendo en contacto monocitos de sangre periférica con plástico en presencia de medio OptiMEM® (Gibco-BRL) complementado con un 1% de plasma humano. Los monocitos no unidos se eliminaron por lavado. Los monocitos unidos se cultivaron en medio X-VIVO 15® en presencia de 500 U GM-CSF y 500 U IL-4 por mililitro durante 6 días.

En un primer estudio, las células dendríticas inmaduras se maduraron mediante la adición de BCG inactivado. Se determinó la producción de citoquinas de las células dendríticas maduras resultantes. Se añadió BCG inactivado a diversas concentraciones a las células dendríticas inmaduras en medio X-VIVO 15®, para posteriormente cultivar durante 24 horas a 37°C. La dilución de BCG añadido por milímetro se especifica en la tabla, partiendo de 4,1 x 10^8 cfu/ml de caldo. Se determinó la producción de citoquinas mediante ensayo ELISA utilizando anticuerpos contra la citoquina a detectar. Dicho brevemente, se utiliza un anticuerpo específico para la citoquina (por ejemplo, IL-12 o IL-10) para capturar la citoquina sobre una superficie sólida. A continuación, la superficie sólida se trata con un segundo anticuerpo etiquetado contra la citoquina para detectar la presencia de la citoquina capturada. El segundo anticuerpo está típicamente etiquetado con enzimas para facilitar la detección por ensayo colorimétrico. Los resultados de un experimento representativo se muestran a continuación en la Tabla 1. La cantidad de citoquina o producción de citoquina se indica como pg/ml.

Tabla 1

Producción de IL-10 e IL-12 por las CD maduradas con BCG

Donante	Citoquina medida	Sin adición	BCG 1:100	BCG 1:250	BCG 1:500	BCG 1:1000	TNFα + IL-1β
2	IL-12 p70	<5	393	239	335	<5	<5
	IL-12 p40	sd	sd	2852	sd	sd	sd
2	IL-10	76,5	1206	700	338	153	380
2	P70/1L-10	<0,06	0,33	0,34	1	<0,03	<0,01
3	IL-12 p70	249	318	260	74	<5	<5
	IL-12 p40	sd	sd	12 257	sd	sd	sd
3	IL-10	305	426	162	124	<5	70
	P70/IL-10	0,82	0,75	1,60	0,60	sd	<0,07

("sd" significa sin determinar).

Por lo que respecta a la tabla 1, los resultados demuestran que la adición de BCG puede aumentar la producción de citoquinas IL-12, IL-10 u otras subunidades, a pesar de que tanto los niveles relativos como absolutos de producción de citoquina dependen del donante. Los niveles más elevados de aumento se observaron para la IL-12 p40 y para la IL-10, lo que sugiere que el bajo nivel observado de IL-12 p70 (compuesto de las subunidades p34 y p40), con respecto al nivel de IL-12 p40, se debe a la ausencia de producción de IL-12 p35. En todas las condiciones salvo en una, cuando el BCG estaba presente, la relación de los niveles de IL-12 p70 a IL-10 eran inferiores o iguales a uno, lo que indica que la maduración de las células dendríticas en presencia de BCG solo es probable que polarice células T vírgenes para una respuesta Th-2.

Los efectos de introducir IFNγ en condiciones similares también se determinaron y se presentan a continuación en la Tabla 2. La producción de citoquinas se midió como se ha descrito anteriormente. Comparando las Tablas 1 y 2, resulta evidente que la adición de IFNγ en presencia de un agente de maduración (por ejemplo, BCG) aumentó la producción de IL-12 p70. En particular, la adición de IFNγ con BCG durante la maduración aumentó la producción de

IL-12 p35 y redujo la producción de IL-10. Como resultado, la relación de IL-12 p70 a IL-10 fue invariablemente superior a uno tras la adición de IFNγ con BCG. En algunos donantes, y en determinadas condiciones, la relación de producción de IL-12 p70 a IL-10 se puede incrementar hasta ser superior a 100:1 mediante la adición de IFNγ con BCG. De este modo, estos resultados demuestran sorprendentemente que la adición de IFNγ con el agente de maduración BCG puede aumentar drásticamente la producción de IL-12 p70.

Tabla 2

Producción de IL-10 e IL-12 de las CD maduradas con BCG e IFNγ

Donante	Citoquina	IFNγ solo	BCG 1:100 + IFNγ	BCG 1:250 + IFNγ	BCG 1:500 + IFNγ	BCG 1:1000 + IFNγ	TNFα+IL-1β +. IFNγ
2	IL-12 p70	<5	1223	801	848	461	521
	IL-12 p40	<5	sd	23 751	19 362	8666	sd
2	IL-10	<5	470	510	394	179	95
	P70/IL-10		2,60	1,57	2,15	2,58	5,48
3	IL-12 p70	212	6858	5380	2934	949	231
	IL-12 p40	<5	sd	48 351	sd	16164	25 645
3	IL-10	141	254	241	157	<5	163
	P70/IL-10	1,50	27	22	18	>189	1,41

("sd" significa sin determinar).

EJEMPLO 2 La regulación a la baja de IL-10 del IFNγ es dependiente de la dosis:

En este ejemplo, se demuestra la capacidad del IFNγ en combinación con BCG para regular a la baja la producción de IL-10 en una población de células dendríticas. Las células dendríticas inmaduras se prepararon como se ha descrito anteriormente. Las células dendríticas inmaduras se incubaron solas, se maduraron en presencia de una o dos concentraciones de BCG (diluciones 1:1000 o 1:250 de 4,1 x 10^8 cfu/ml de caldo), o se expusieron a IFNγ solo en concentraciones que oscilaban entre 0 U y 1000 U por mililitro. La producción de IL-10 por parte de las células dendríticas resultantes se midió mediante ensayo ELISA *(supra)* utilizando un anticuerpo disponible en el mercado *(*por ejemplo, de R&D Systems, Minneapolis, MN) y se documentó en pg/ml. En el control, las CD inmaduras cultivadas solas (sin adición de BCG o IFNγ) no produjeron ninguna cantidad detectable de IL-10. Por el contrario, las CD cultivadas en presencia de IFNγ solamente produjeron una pequeña cantidad de IL-10 (unos 20-30 pg/ml). La cantidad de IL-10 producida no fue dependiente de la dosis en el rango de 10 U a 1000 U de IFNγ por mililitro.

Por el contrario, las CD producidas mediante maduración en presencia de BCG solo produjeron cantidades significativas de IL-10: unos 150 pg/ml o >250 pg/ml de IL-10 en presencia de una dilución 1:1000 o 1:250 del caldo de BCG, respectivamente. La adición de IFNγ al BCG durante la maduración de CD produjo una regulación a la baja de la producción de IL-10 de forma dependiente de la dosis. En el caso de las CD cultivadas en presencia de la dilución 1:1000 de BCG, la producción de IL-10 descendió de 150 pg/ml de IL-10 (sin IFNγ) hasta 20-30 pg/ml de IL-10 (1000 U IFNγ). En el caso de las CD cultivadas en presencia de la dilución 1:250 de BCG, la producción de IL-10 descendió de 270 pg/ml de IL-10 (sin IFNγ) hasta 50 pg/ml de IL-10 (1000 U IFNγ). Por tanto, la maduración de CD inmaduras en presencia de BCG e IFNγ fue capaz de regular a la baja la producción de IL-10 y de superar la estimulación aparente de la producción de IL-10 inducida por el BCG solo.

EJEMPLO 3 La regulación al alza de IL-12 por parte del IFNγ es dependiente de la dosis:

En este ejemplo, se demuestra la capacidad del IFNγ para regular al alza la producción de IL-12. Las células dendríticas inmaduras se obtuvieron de monocitos cultivados durante seis días en presencia de GM-CSF e IL-4, tal y como se ha descrito anteriormente. Las CD inmaduras se trataron durante otros dos días con diversas diluciones de BCG solo, o con BCG combinado con diversas concentraciones de IFNγ. Los supernatantes del cultivo se sometieron a ensayo para determinar la presencia de IL-12 p70 mediante ELISA, tal y como se ha descrito anteriormente.

Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 1. Para cada cultivo, los resultados se determinaron por triplicado. En respuesta a las cantidades crecientes de BCG solo, las CD maduras produjeron una concentración media (1000 pg/ml) de IL-12 p70. La cantidad de producción de IL-12 disminuyó de forma dependiente de la dosis a medida que aumentó la cantidad de BCG. Por el contrario, tras la adición de IFNγ (10 U/ml) con BCG (dilución 1:1000 del caldo), la cantidad de IL-12 aumentó de forma significativa hasta aproximadamente 5000 pg/ml. Tras la adición de 100 U/ml de IFNγ con BCG (dilución 1:1000 del caldo), la cantidad de IFNγ aumentó hasta casi 20 000 pg/ml. La adición de IFNγ a 500 U/ml o 1000U/ml con BCG (dilución 1:1000 del caldo) resultó en unos niveles de IL-12 de aproximadamente 21 000 pg/ml y 22 000 pg/ml, respectivamente.

En resumen, a pesar de que el BCG solo parecía ser antagónico a la producción de IL-12, la maduración de CD inmaduras en presencia de BCG e IFNγ aumentó drásticamente la producción de IL-12.

EJEMPLO 4 Estimulación de células T de antígeno específico:

En este ejemplo, se demostró que las CD inmaduras maduradas en presencia de BCG e IFNγ estimulan la producción de IFNγ a través de células T de antígeno específico. Se generó una línea de células T

específica para Influenza A incubando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a 2 x 10^6 células/ml con 5 µg/ml de péptido MI de la influenza (GILGFVFTL; SEC. ID. Nº:3) en medio AIM-V® complementado con un 5% de suero humano. Estas condiciones de cultivo producen la expansión selectiva de las células T específicas para el péptido MI de la influenza. Después de dos días de cultivo, se añadieron 20 U/ml de IL-2 y 5 ng/ml de IL-15 a los cultivos. Después de entre 7 y 14 días de cultivo, las líneas de células T se colocaron en un medio sin citoquinas hasta el día siguiente.

Las células T de antígeno específico se cultivaron entonces conjuntamente con CD inmaduras, con CD maduradas con BCG solo o con CD maduradas con BCG e IFNγ. La relación de células T de antígeno específico/CD fue de 1:1. Las células T y las CD se incubaron a 37°C durante 24 horas. Las CD habían sido cargadas directamente o cargadas osmóticamente con el péptido MI de la influenza. En resumen, las CD inmaduras se recogieron de los matraces de cultivo y se concentraron mediante centrifugación. En el caso de la carga osmótica, las células fueron resuspendidas en un pequeño volumen de medio hiperosmótico, para después añadir un volumen igual de péptido MI de la influenza en PBS. Tras diez minutos de incubación en hielo, las células se lavaron abundantemente. En el caso de la carga directa, las células fueron resuspendidas en un volumen igual de medio X- VIVO 15® y péptido MI de la influenza en PBS, y se incubaron durante una hora a 37°C. Las células se incubaron durante dos horas a 37°C para permitir el procesamiento del antígeno.

Tras el cultivo conjunto de las células T y las CD, la respuesta de las células T se midió mediante cuantificación ELISA del IFNγ de una muestra de 100 µl del supernatante del cultivo. Los resultados indican que, con independencia del método de carga de las CD, las CD estimuladas con BCG e IFNγ tienen una capacidad de estimulación superior de las células T de antígeno específico. Las células T cultivadas conjuntamente con CD inmaduras produjeron muy poco IFNγ (<2000 pg/ml), mientras que las células T cultivadas conjuntamente con CD maduradas utilizando BCG solo fueron las productoras intermedias de IFNγ (>5000 pg/ml). Las células T cultivadas conjuntamente con CD maduradas utilizando BCG e IFNγ produjeron elevados niveles de IFNγ (>20 000 pg/ml en el caso de las CD de carga osmótica o >25 000 pg/ml en el caso de las CD cargadas directamente.)

Por tanto, las CD maduradas con BCG e IFNγ fueron mejores estimuladoras de las células T de antígeno específico, con independencia del método de carga del antígeno en las CD.

EJEMPLO 5 ***Generación de novo de respuestas de células T de antígeno específico in vitro*****:**

Las líneas de células específicas para la hemocianina de lapa californiana (KLH) se generaron estimulando el PBMC con CD maduradas utilizando BCG o bien BCG e IFNγ, y se cargaron con KLH o proteínas de control a una relación de células T/CD de 10:1. A las células T y las CD maduradas se les añadió medio nuevo (medio AIM-V® complementado con un 5% de suero humano AB, 20 U/ml de IL-2, y 5 ng/ml de IL-15) cada 3 o 4 días. Las células se expandieron a matraces más grandes cuando resultó necesario. Debido a que la frecuencia de precursor total para un determinado antígeno era baja, y dado que las células vírgenes requieren una estimulación potente para responder, la estimulación se repitió tres o cuatro veces a intervalos de entre 10 y 21 días. Se dejó que las células se recuperasen hasta el día siguiente en medio sin citoquina antes de repetir la estimulación.

Se empleó un ensayo de incorporación de timidina estándar de 3 días para determinar la proliferación de células específicas de KLH en las líneas de células T estimuladas. Las células T estimuladas se incubaron a diversas relaciones de CD/células T con células dendríticas inmaduras pulsadas con KLH. Se medió la proliferación de células T con recuentos por minuto (CPM). La proliferación celular, o la producción de citoquinas, en respuesta a la estimulación se consideraron una prueba de la respuesta de antígeno específico. Para controlar la especificidad del antígeno, se incluyó también un antígeno de control negativo (virus Influenza A) en el ensayo.

Cuando se utilizaron CD maduras con BCG solo para estimular las células T, la proliferación de células T fue constantemente baja (<5000 CPM). Este bajo nivel de proliferación fue bajo con independencia de que las CD se hubieran puesto en contacto con KLH o el virus Influenza A. También se observó un bajo nivel de proliferación en respuesta a la incubación con CD inmaduras. No se observó ninguna diferencia significativa entre los tres grupos de CD utilizados a unas relaciones de respondedor a estimulador de 50:1, 25:1, o 12.5:1 (células T/CD). Por el contrario, cuando las células dendríticas maduradas con BCG e IFNγ se utilizaron para estimular las células T, las CD pulsadas con KLH generaron una proliferación uniformemente más elevada de células T (aproximadamente 10 000-33 000 CPM) que en el caso de las CD inmaduras o las CD maduras pulsadas con influenza A. En el caso de las CD maduras pulsadas con antígeno de KLH, la proliferación de células T aumentó en proporción a un aumento de la relación de respondedor a estimulador.

La función efectora de las células T también se controló mediante la secreción de citoquina. Las líneas de células T específicas de KLH (generadas tal y como se ha descrito anteriormente) se estimularon utilizando CD maduradas con BCG solo o bien con BCG e IFNγ. Las líneas de células T estimuladas se sometieron a ensayo para determinar la producción de citoquina mediante tinción de citoquina intracelular después de que las células fuesen estimuladas de manera no específica con anticuerpo anti-CD3 (50 ng/ml) y PMA (5 ng/ml). La producción de citoquina se midió como el porcentaje de células que producen una citoquina particular. Un porcentaje entre muy bajo e indetectable (<< 5%) de las células testadas

produjo IL-2, IL-4, IL-5, o IL-10 intracelular. IL-5 e IL-10 no se detectaron en células T estimuladas con CD maduradas con BCG e IFNγ. Las células T estimuladas con CD maduradas con BCG solo produjeron bajos niveles de IFNγ (<10%) y TNF-a (<15%). Por el contrario, unas proporciones significativas de células T estimuladas con IFNγ y BCG produjeron IFNγ (aproximadamente el 35%) y TNFα (>45%). El IFNγ es un estimulador conocido de la producción de IL-12. Por tanto, al estimular las células T con CD maduradas con BCG e IFNγ, las células T son polarizadas para una respuesta de tipo 1 (Th-1).

EJEMPLO 6 Inducción del factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) de la citoquina Th-1:

En este ejemplo, se demostró la capacidad de la combinación de BCG e IFNγ para regular al alza el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) de la citoquina tipo 1. En resumen, las células dendríticas inmaduras se obtuvieron como se ha descrito anteriormente y se expusieron a la presencia de GM-CSF e IL-4. A continuación, las CD inmaduras se cultivaron con BCG solo o en combinación con IFNγ durante unas 24 horas. Posteriormente, se añadió un inhibidor de transporte de proteína (GolgiPlug™, PharMingen) para bloquear el transporte de las citoquinas producidas del complejo de Golgi y las células se incubaron hasta el día siguiente. A continuación, se recogieron las células, se permeabilizaron y se tiñeron internamente con un anticuerpo de etiqueta fluorescente específico para TNFα o un anticuerpo de control del mismo isotipo utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Se determinaron la frecuencia de CD positivas en TNFα y la intensidad de la fluorescencia de las células mediante análisis FACS (Tabla 3). Se concluyó que la maduración de las CD con BCG en presencia de IFNγ mejora la capacidad de las CD para producir el TNFα de la citoquina Th-1.

Tabla 3

Producción de TNFα por las CD maduradas en presencia de BCG con o sin INFy

Condiciones de maduración	% células positivas	Intensidad de fluorescencia media
BCG	3,9	99
BCG + IFNγ	31,5	192

EJEMPLO 7 Inducción de la respuesta contra el antígeno asociado a la célula:

En este ejemplo se demostró que las CD maduradas en presencia de BCG e IFNγ provocan una liberación de IFNγ de las células T de tumor específico significativamente superior y unos niveles similares de citotoxicidad específica de antígeno en comparación con las células maduradas con BCG solo. Las células dendríticas inmaduras se aislaron como se ha explicado anteriormente y se cultivaron en presencia de GM-SCF e IL-4. A continuación las CD se cargaron con células tumorales completas (A549) previamente infectadas con adenovirus recombinante que expresa una proteína fluorescente verde (GFP) o la proteína MI del virus Influenza A. Las CD se maduraron 24 horas más tarde con BCG o BCG en combinación con IFNγ. Las CD cargadas con el tumor o las células tumores con expresión de MI o GFP se utilizaron para estimular una línea de células T específica de MI autóloga. Veinticuatro horas más tarde se recogieron los supernatantes del cultivo y se sometieron a un ELISA estándar para determinar el IFNγ. Solo las CD cargadas con células tumorales con expresión de MI fueron capaces de estimular la liberación de IFNγ y las CD maduradas con BCG e IFNγ fueron significativamente más potentes a la hora de inducir esta respuesta que las CD inmaduras o maduradas con BCG.

Tabla 4

Inducción de respuesta contra antígenos asociados a células

Condiciones de maduración	Liberación de IFNγ
Ninguna	10 379
BCG	15 114
BCG + IFyN	75 546

Los ejemplos anteriores se ofrecen a título ilustrativo y no se interpretará que limitan el ámbito de aplicación de las invenciones reivindicadas. Otras variantes de las invenciones resultarán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica y están incluidas en las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Northwest Biotherapeutics, Inc.
BOSCH, Marnix L.

<120> Composiciones y métodos para la activación linfocitaria de células dendríticas monocíticas y células T para generar una respuesta Th-1

<130> 20093-29-1PC

<140> PCT/US02/
<141> 06-09-2002

<150> 60/317,569
<151> 06-09-2001

<160> 3

<170> Patente Int. Ver. 2.1

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1
Leu Leu His Gln Thr Asp Ser Ala Val
1 5

<210> 2
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Virus Influenza A

<400> 3
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un método *ex vivo* o *in vitro* para producir una población de células dendríticas maduras que produce una relación incrementada de interleuquina 12 a interleuquina 10, donde la relación incrementada de interleuquina 12 a interleuquina 10 es mayor en comparación con una población de células dendríticas inmaduras que no ha estado en contacto con el bacilo Calmette-Guerin (BCG) e interferón gamma (IFNγ) durante la maduración, que consiste en lo siguiente:

poner en contacto las células dendríticas inmaduras proporcionadas con una cantidad efectiva de bacilo Calmette-Guerin (BCG) que consiste en aproximadamente entre 10^5 y 10^7 cfu por ml de medio de cultivo tisular y entre 100 y 1000 unidades de interferón gamma (IFNγ) por ml de medio de cultivo tisular en condiciones de cultivo adecuadas para la maduración de las células dendríticas inmaduras, al objeto de formar una población de células dendríticas maduras.

2. Un método *ex vivo* o *in vitro* para producir una población de células dendríticas maduras, donde la población de células dendríticas maduras produce un tipo de respuesta inmunitaria tipo 1, que consiste en lo siguiente:

poner en contacto las células dendríticas inmaduras proporcionadas con una cantidad efectiva de bacilo Calmette-Guerin (BCG) que consiste en aproximadamente entre 10^5 y 10^7 cfu por ml de medio de cultivo tisular y entre 100 y 1000 unidades de interferón gamma (IFNγ) por ml de medio de cultivo tisular en condiciones de cultivo adecuadas para la maduración de las células dendríticas inmaduras, al objeto de formar una población de células dendríticas maduras.

3. Un método *ex vivo o in vitro* para producir células T activadas, que consiste en lo siguiente:

poner en contacto células dendríticas inmaduras proporcionadas con un antígeno predeterminado; y poner en contacto las células dendríticas inmaduras con una cantidad de bacilo Calmette-Guerin (BCG) que consiste en aproximadamente entre 10^5 y 10^7 cfu por ml de medio de cultivo tisular y entre 100 y 1000 unidades de interferón gamma (IFNγ) por ml de medio de cultivo tisular en condiciones de cultivo adecuadas para la maduración de las células dendríticas inmaduras, al objeto de formar una población de células dendríticas maduras o células dendríticas maduras; donde la población de células dendríticas maduras produce una relación incrementada de interleuquina 12 a interleuquina 10; y poner en contacto las células dendríticas maduras con células T vírgenes para formar células T activadas que producen IFNγ; y donde la población de células T activadas produce un tipo de respuesta inmunitaria de tipo 1.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde las células dendríticas maduras producen una relación de IL-12 a IL-10 de al menos aproximadamente 1:1, al menos aproximadamente 10:1 o al menos aproximadamente 100: 1.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que consiste asimismo en lo siguiente:

cultivar precursores de células dendríticas monocíticas aisladas en presencia de un agente de diferenciación de células dendríticas monocíticas para formar las células dendríticas inmaduras.

6. El método de la reivindicación 5, donde el agente de diferenciación es GM-CSF, interleuquina 4, una combinación de GM-CSF e interleuquina 2, o interleuquina 13.

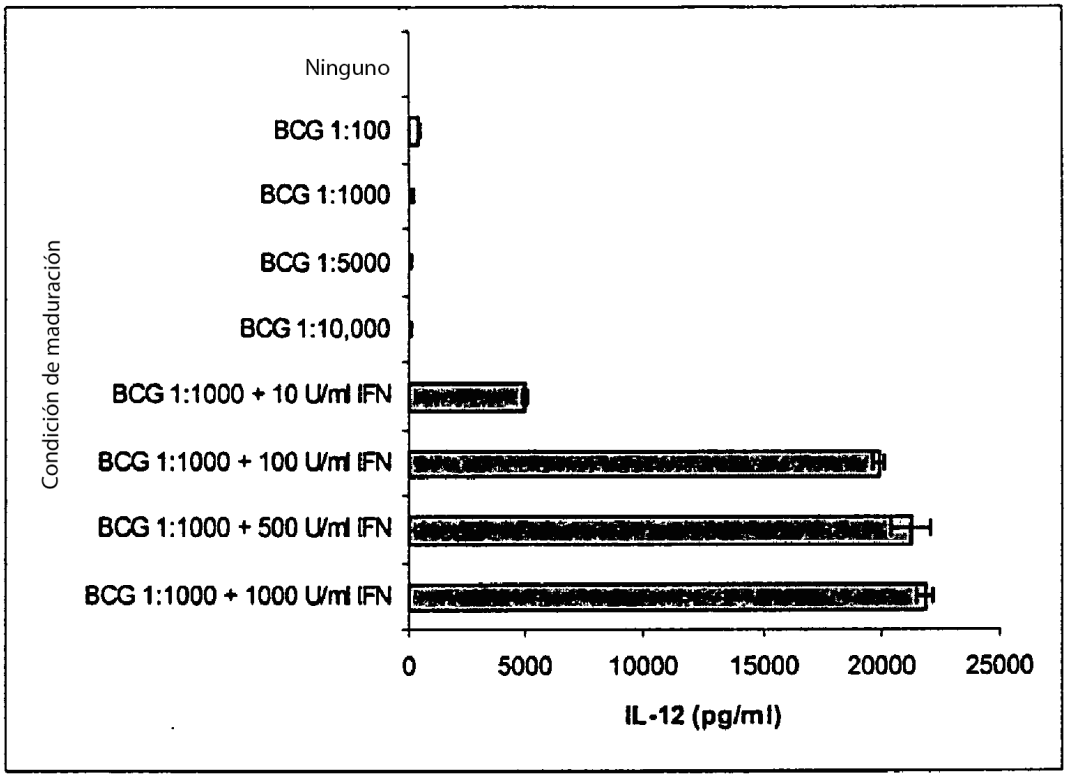
7. El método de la reivindicación 5, donde los precursores de células dendríticas monocíticas son precursores de células dendríticas monocíticas humanas.

8. El método de la reivindicación 3, donde el antígeno predeterminado es un antígeno de tumor específico, un antígeno asociado a un tumor, un antígeno viral, un antígeno bacteriano, células tumorales, células bacterianas, células recombinantes que expresan un antígeno, un lisado celular, una preparación de membrana, un antígeno producido mediante técnicas de recombinación, un antígeno peptídico o un antígeno aislado.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 y 8, donde las células dendríticas inmaduras se ponen en contacto simultáneamente con el antígeno predeterminado, BCG e IFNγ o se ponen en contacto con el antígeno predeterminado antes de ponerse en contacto con el BCG e IFNγ.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3, 8 y 9, donde las células dendríticas inmaduras y las células T son autólogas entre sí.

Figura 1


Ninguno
BCG 1:100
BCG 1:1000
BCG 1:5000
BCG 1:10,000
BCG 1:1000 + 10 U/ml IFN
BCG 1:1000 + 100 U/ml IFN
BCG 1:1000 + 500 U/ml IFN
BCG 1:1000 + 1000 U/ml IFN
Condición de maduración
0
5000
10000
15000
20000
25000
IL-12 (pg/ml)