

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 132**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/15 (2015.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2013 PCT/EP2013/076067**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14090795**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2013 E 13815701 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2931878**

54 Título: **Vacunas terapéuticas contra el cáncer derivadas de una línea celular dendrítica novedosa**

30 Prioridad:

11.12.2012 EP 12196496

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

22.05.2017

73 Titular/es:

**DCPRIME B.V. (100.0%)
Galileiweg 8
2333 BD Leiden, NL**

72 Inventor/es:

**WETERING, VAN, SANDRA y
KRUISBEEK, ADRIANA MARIE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 613 132 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

Vacunas terapéuticas contra el cáncer derivadas de una línea celular dendrítica novedosa

Campo de la invención

5 La invención está en el campo de las ciencias médicas. Proporciona medios y métodos para el tratamiento del cáncer. Más en particular, proporciona células y líneas celulares que pueden desarrollarse en células dendríticas completamente funcionales. Estas células expresan endógenamente antígenos específicos del cáncer, que los hace particularmente aptos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

Antecedentes de la invención

10 Las células dendríticas (DC) pertenecen al linaje de las células derivadas de la médula ósea, están presentes en todo el cuerpo en múltiples tejidos y actúan como la parte central del sistema inmunitario del mamífero. Su función principal es procesar material de antígeno y presentarlo sobre su superficie a otras células del sistema inmunitario. Así, las células dendríticas funcionan como células presentadoras de antígenos (APC), y lo hacen así más eficientemente que cualquier otro tipo de APC, tal como macrófagos. Las DC también actúan de mensajeros entre inmunidad innata y adaptativa, mediante una variedad de receptores de la superficie celular que capturan microbios y desencadenan información que entonces se transmite a linfocitos y células del sistema inmunitario innato.

15 Las células dendríticas están presentes en tejidos que están en contacto directo con el entorno externo, tal como la piel (donde hay un tipo de célula dendrítica especializada llamada células de Langerhans) y el revestimiento interno de la nariz, pulmones, estómago e intestinos. También pueden encontrarse en un estado inmaduro (iDC) en la sangre. Una vez activados, migran a los ganglios linfáticos donde interactúan con linfocitos T y linfocitos B para iniciar y formar la respuesta inmunitaria adaptativa. A ciertas etapas de desarrollo, crecen proyecciones ramificadas, las dendritas, que dan a la célula su nombre (déndron que es el griego para "árbol"). Aunque de aspecto similar, éstas son estructuras que pueden distinguirse de las dendritas de neuronas.

20 Se han definido tres tipos de DC en sangre humana y éstos son las DC mieloides CD1C+, las DC mieloides CD141+ y las DC plasmacitoides CD303+. Esto representa la nomenclatura propuesta por el comité de nomenclatura de la IUIS. En las células dendríticas que pertenecen al linaje mieloides, la morfología similar produce una superficie de contacto muy grande con sus alrededores, en comparación con el volumen celular global. Las DC plasmacitoides tienen una forma más redondeada, comparable a las células plasmáticas.

25 Las células dendríticas mieloides están constituidas por al menos dos subconjuntos que pueden distinguirse por la expresión recíproca de CD141 (también conocido como BCDA3) y CD1 C (también conocido como BDCA1). Las DC que expresan CD141 representan las células mieloides más comunes, frecuentemente denominadas DC-1, y estas células representan el mayor estimulante de la respuesta de linfocitos T CD8. La DC que expresa CD1 C mieloides extremadamente rara se denomina frecuentemente DC-2, y su función continúa analizándose y definiéndose. Se ha informado que tiene una función en combatir la infección de heridas. Las células DC-1 mieloides expresan moléculas de clase I y II de MHC para la presentación de antígeno, y una gama de otras moléculas relevantes para interactuar con tanto el sistema inmunitario innato como adaptativo. También pueden secretar múltiples citocinas, que incluyen IL-12, y expresar diversos tipos de receptores de tipo Toll (TLR) tales como TLR2 y TLR4.

30 Las células dendríticas plasmacitoides se parecen a las células plasmáticas en el aspecto, pero tienen ciertas características funcionales similares a las células dendríticas mieloides. Pueden producir altas cantidades de interferón-alfa y así han llegado a conocerse como IPC (células productoras de interferón) antes de que se revelara su naturaleza de célula dendrítica. Las células dendríticas plasmacitoides expresan TLR7 y TLR9, y pueden distinguirse de las DC mieloides por la expresión de CD303, también conocida como BDCA-2.

35 Las DC linfoides y mieloides se desarrollan de precursores linfoides o mieloides, respectivamente, y así ambas son de origen hematopoyético. Las DC de sangre normalmente se identifican y enumeran mediante anticuerpos que se unen específicamente a ciertos marcadores, y la unión al anticuerpo puede detectarse por citometría de flujo mediante marcadores fluorescentes y otros marcadores unidos a los anticuerpos.

40 Las células dendríticas se derivan de células progenitoras de médula ósea hematopoyéticas, y estas células progenitoras inicialmente se transforman en células dendríticas inmaduras (iDC). Estas células inmaduras se caracterizan por alta actividad endocítica, en mantener su eficiente captura de antígenos, y en esta etapa, su capacidad para activar linfocitos T es todavía escasa. Esto coincide con la baja expresión de moléculas coestimulantes y la capacidad limitada para secretar ciertas citocinas. Las células dendríticas inmaduras muestrean constantemente el entorno circundante para patógenos tales como virus y bacterias. Esto se hace mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) tales como los TLR. Los TLR reconocen distintivos químicos específicos encontrados en subconjuntos de patógenos y tejido tumoral. Las células dendríticas inmaduras pueden también fagocitar pequeñas cantidades de membrana de células vivas, en un proceso llamado mordisqueo.

45 Una vez se ponen en contacto con antígenos presentados por el entorno (tales como microbios o células tumorales), las células dendríticas inmaduras se activan para diferenciarse en células dendríticas maduras y empiezan a migrar

5 a los ganglios linfáticos. Las células dendríticas inmaduras fagocitan patógenos y degradan sus proteínas en trozos pequeños, y tras la maduración presentan aquellos fragmentos en su superficie celular usando moléculas MHC. Simultáneamente, regulan por incremento los receptores de la superficie celular que actúan de co-receptores en la activación de linfocitos T tales como CD83, CD40 y otros, potenciando así enormemente su capacidad para activar linfocitos T. Además, regulan por incremento un receptor quimiotáctico que induce la célula dendrítica a desplazarse a través de la corriente sanguínea al bazo o mediante el sistema linfático a los ganglios linfáticos. Aquí actúan de células presentadoras de antígenos: activan linfocitos T cooperadores y linfocitos T citolíticos, además de linfocitos B, presentándolos a antígenos derivados de patógenos o tumores, junto con señales coestimulantes no específicas de antígeno.

10 Cada linfocito T es específico para un péptido antigénico particular presentado en moléculas de clase I o II de MHC, mediante receptores que son clónicamente expresados y se llaman receptores de linfocitos T (TCR). Solo las células dendríticas son capaces de activar los linfocitos T intactos en reposo cuando el complejo antígeno-MHC de correspondencia se presenta a su TCR particular. Otros tipos de células presentadoras de antígenos, tales como macrófagos y linfocitos B, no tienen la capacidad de activar linfocitos T en reposo nativos, y solo pueden activar linfocito T de memoria. Debido a que las células dendríticas pueden activar tanto linfocitos T de memoria como intactos, frecuentemente se denominan células presentadoras de antígenos profesionales, y son las más potentes de todas las células presentadoras de antígenos.

20 Las DC mieloides puede generarse a partir de monocitos, glóbulos blancos que circulan en el cuerpo y, dependiendo de la señal correcta, pueden convertirse en tanto células dendríticas como macrófagos. Los monocitos se forman a su vez a partir de células madre en la médula ósea. Las células dendríticas derivadas de monocitos pueden generarse *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). La siembra de CMSP en un matraz de cultivo de tejido permite la adherencia de monocitos. El tratamiento de estos monocitos con interleucina 4 (IL-4) y factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) conduce a la diferenciación en células dendríticas inmaduras (iDC) en aproximadamente una semana. El posterior tratamiento con factor de necrosis tumoral (TNF) diferencia además las iDC en células dendríticas maduras.

30 Las células dendríticas están constantemente en comunicación con otras células en el cuerpo. Esta comunicación puede tomar la forma de contacto directo célula a célula basado en la interacción de proteínas de la superficie de la célula. Un ejemplo de esto incluye la interacción de las proteínas de membrana de la familia B7 de células dendríticas, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), con CD28 y CTLA4 en linfocitos T. Además, la comunicación celular de DC con su entorno tiene lugar durante una distancia mediante citocinas. Por ejemplo, la estimulación de células dendríticas *in vitro* con extractos microbianos hace que las células dendríticas empiecen rápidamente a producir IL-12. La IL-12 es una señal que ayuda a enviar linfocitos T CD4 intactos hacia un fenotipo Th1. La consecuencia definitiva es la sensibilización y activación del sistema inmunitario para atacar contra los antígenos que la célula dendrítica presenta sobre su superficie. Sin embargo, hay diferencias en las citocinas producidas, dependiendo del tipo de célula dendrítica. La DC plasmacitoide tiene la capacidad de producir grandes cantidades de IFN de tipo 1 que reclutan macrófagos más activados para permitir la fagocitosis.

40 Dada su función única en iniciar las respuestas inmunitarias primarias, los productos de vacuna preparados a partir de DC cultivadas derivadas de paciente están en desarrollo en una amplia variedad de permutaciones (Galluzi et al., 2012). Tales productos pueden prepararse a partir de sangre periférica o de médula ósea, y forman parte del arsenal de vacunas que está siendo evaluado en pacientes con cáncer (Palucka et al., 2011). Tales vacunas basadas en DC han mostrado ser seguras y bien toleradas, e inducen respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ efectoras específicas de antígeno en algunos pacientes. Sin embargo, la eficacia de tales productos se ha documentado en solo números limitados de pacientes, y no han generado éxito clínico consistente. Esto es principalmente atribuible al hecho de que la potencia de tales productos basados en pacientes es imposible de normalizar. Es factible desarrollar procedimientos de operación estándar para recoger precursores de células dendríticas de sangre o médula ósea y para la posterior generación de células dendríticas funcionales, pero la variabilidad paciente a paciente con respecto a las diferencias funcionales excluirá siempre la reproducibilidad completa. Además, hay obstáculos sustanciales para la implementación a gran escala de tales productos basados en paciente, ya que la producción es laboriosa, requiere tiempo y, por tanto, es cara. Además, hay indicaciones de un fenotipo estimulante de linfocitos T inferior de DC derivadas de pacientes con cáncer avanzado, que también da razones en contra del uso de DC autólogas. Por tanto, se necesitan urgentemente novedosos enfoques para vacunas de células dendríticas.

55 Una forma de superar estos inconvenientes sería generar productos de DC de líneas celulares sostenibles que pudieran aplicarse como productos alógenos. Esto evitaría la necesidad de recoger las células dendríticas de pacientes individuales, y permitiría la producción de productos de células dendríticas caracterizadas exactamente, predecibles y coherentes. Con el fin de cumplir los requisitos para un proceso de fabricación a escala comercial, una línea celular tal necesitaría tener las siguientes características. Primera de todas, la línea celular debería ser clónica y fácil de mantener en cultivo. También debe tener tiempo de duplicación de la población reproducible, y comportamiento coherente con respecto a la sensibilidad a las señales de diferenciación y maduración para generar DC funcionales maduras.

60 Se han explorado varias líneas celulares para este fin, que incluyen KG-1, THP-1, HL-60 y MUTZ-3 (Larsson K., et al., 2006 van Helden et al., 2008 y referencias en su interior). De estas líneas celulares, solo las DC derivadas de

MUTZ-3 se parecen mucho a las DC primarias preparadas a partir de sangre (Larsson et al., 2006 van Helden et al., 2008, Santegoets et al., 2006a, 2006b, y Masterson et al., 2002). A pesar del hecho de que estas líneas celulares resumen algunas de las características de presentación de antígeno y otras inmunológicas de células dendríticas, sus limitaciones en el comportamiento biológico y reproducible prohíben su aplicación como la base para vacunas de DC.

Sigue existiendo una necesidad en la materia de células y líneas celulares que puedan emplearse en un ámbito industrial para la producción de células dendríticas eficaces.

Sumario de la invención

Las desventajas anteriormente mencionadas han sido superadas proporcionando una línea celular, llamada provisionalmente DCOne. Esta línea celular se ha depositado en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ o Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos celulares) en Inhoffenstraße 7 B, 38124 Braunschweig, Alemania, con los números de acceso DSMZ ACC3189 el 15 de noviembre de 2012.

En un aspecto, la invención se refiere, por tanto, a una línea celular como se depositó en DSMZ con el número de acceso DSMZ ACC3189.

La invención también se refiere a un método de obtención de células dendríticas maduras que comprende las etapas de proporcionar una línea celular que comprende células progenitoras como se describe en el presente documento, incubar la línea celular en condiciones que permitan la diferenciación de las células progenitoras en células dendríticas inmaduras e incubar dichas células dendríticas inmaduras en condiciones que permitan la maduración de las células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras.

La invención también se refiere, por tanto, a células dendríticas maduras obtenibles por los métodos que se describen en el presente documento.

Tales células dendríticas maduras pueden usarse en la terapia de varias enfermedades como se detalla además en el presente documento más adelante. La invención también se refiere, por tanto, a células dendríticas maduras como se describe en el presente documento para su uso como un medicamento.

Tales células dendríticas maduras también pueden usarse como vacuna terapéutica para varias enfermedades como se detalla además en el presente documento más adelante. En particular, la invención también se refiere, por tanto, a células dendríticas maduras como se describe en el presente documento para su uso como una vacuna terapéutica contra el cáncer.

Descripción detallada de la invención

DCOne es una línea celular precursora de células dendríticas también conocida como una línea de células progenitoras. La línea celular DCOne se ha derivado de la sangre periférica de un paciente con leucemia mieloide aguda (LMA) FAB M4. Las células progenitoras DCOne son CD34 positivas (CD34+) y CD1a negativas (CD1a-), además de CD83 negativas (CD83-), véase también la Figura 1. Además, son de baja expresión o incluso carecen de varios otros receptores asociados a la diferenciación y maduración de DC, que incluyen DCSign, langerina, CD40 y CD80. Y, lo que es más importante, las células progenitoras DCOne expresan la proteína WT-1 como se detalla en el Ejemplo 3 y se muestra en la Figura 2.

Las células DCOne pueden multiplicarse en sistemas de cultivo celular convencionales normalmente usados para la expansión de líneas celulares hematopoyéticas. Un ejemplo típico de un sistema de cultivo tal comprende medio MEM- α que contiene FCS, complementado con GM-CSF, L-glutamina y penicilina/estreptomicina. En más detalle, el sistema de cultivo puede comprender medio MEM- α que contiene FCS (10-20 %), complementado con GM-CSF (intervalo 20-40 UI/ml), L-glutamina (2 mM) y penicilina/estreptomicina (100 UI/ml; 100 μ g/ml). Un sistema de cultivo adecuado particular puede comprender medio MEM- α que contiene 20 % de FCS, complementado con GM-CSF (25 UI/ml), L-glutamina (2 mM) y penicilina/estreptomicina.

Las células pueden almacenarse a una concentración de $2,5 \cdot 10^6$ células/ml en 12,5 % de DMSO y 87,5 % de FCS en nitrógeno. El proceso de multiplicación de las células DCOne también se denomina en el presente documento proliferación de las células.

Para generar células dendríticas maduras funcionales a partir de células progenitoras DCOne, las células progenitoras DCOne tienen que someterse a un proceso de estimulación con las moléculas estimulantes apropiadas. El experto conocerá las medidas y límites de este proceso de estimulación también conocido como diferenciación y maduración. Un ejemplo de un proceso tal se ilustra en la Figura 3.

La invención también se refiere, por tanto, a un método de obtención de células dendríticas maduras que comprende las etapas de proporcionar células DCOne, incubar las células en condiciones que permitan la diferenciación de las células DCOne en células dendríticas inmaduras e incubar dichas células dendríticas inmaduras en condiciones que permitan la maduración de las células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras.

El experto conoce bien las condiciones que permiten la diferenciación de células progenitoras en células dendríticas inmaduras. Para ese fin, las células pueden ponerse en contacto con las moléculas estimulantes apropiadas. El término "moléculas estimulantes" se refiere a compuestos capaces de inducir la diferenciación y/o la maduración de las células. Tales compuestos, solos o en combinación específica, pueden inducir, cuando están presentes en cantidades suficientes en, por ejemplo, medio de cultivo, la diferenciación y/o la maduración de células precursoras dendríticas, como las células CD34 positivas anteriormente descritas, en o hacia células dendríticas.

Ejemplos muy conocidos de moléculas estimulantes que pueden usarse para la diferenciación de células progenitoras en células dendríticas inmaduras incluyen citocinas tales como IL-4 (interleucina 4), IL-6, PGE-2 (prostaglandina E2), TNF-alfa (factor de necrosis tumoral alfa) y TGF-beta (factor de crecimiento transformante beta). También se conocen factores de crecimiento tales como GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos). También se describen moléculas sustitutas para citocinas o factores de crecimiento que inducen un efecto biológico comparable al de las moléculas estimulantes anteriores. Tales moléculas sustitutas incluyen anticuerpos y otras moléculas biológicas tales como lipopolisacáridos (LPS) y ácido poliinosínico-policitidílico (poliIC). Para una revisión, véase Bürdek et al. *Journal of Translational Medicine* 2010, 8:90.

El experto en la materia conoce igualmente los métodos disponibles en la materia para obtener células dendríticas maduras a partir de las células dendríticas inmaduras como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las células dendríticas inmaduras pueden madurarse poniendo en contacto las células dendríticas inmaduras con las moléculas estimulantes, tales como TNF-alfa, IL-6, IL-1 beta y/o PGE2, aunque asimismo pueden emplearse otros métodos conocidos en la técnica para madurar células dendríticas inmaduras. Tal tratamiento permitirá obtener células dendríticas maduras a partir de células dendríticas inmaduras.

Se encontró que las células así obtenidas eran completamente funcionales como células dendríticas como se corrobora por el hallazgo de los presentes inventores de que las células obtenidas expresan altos niveles de clase I de MHC, clase II de MHC y CD83, siendo el último un marcador típico de DC maduras (Figura 1). Tales DC maduras tienen la capacidad de sensibilizar una respuesta inmunitaria (Palucka et al., 2011 y Ueno et al., 2010). Las células son, por tanto, adecuadas para su uso en una vacuna, más en particular una vacuna terapéutica, tal como una vacuna terapéutica contra el cáncer.

Como se usa en el presente documento, el término vacuna o vacuna terapéutica, en su forma singular o plural, se refiere a medicinas que pertenecen a una clase de sustancias conocidas como modificadores de la respuesta biológica. Los modificadores de la respuesta biológica funcionan estimulando o restaurando la capacidad del sistema inmunitario para luchar contra infecciones y enfermedad. Las vacunas terapéuticas pretenden tratar un cáncer existente reforzando las defensas naturales del cuerpo contra el cáncer.

Las células dendríticas inmaduras derivadas de DCOne (denominadas en lo sucesivo iDCOne o DCOne inmaduras) se caracterizan por la aparición de expresión de CD1a. También empiezan a expresarse otros marcadores, que incluye DCSign, langerina, CD80 y CD40. CD83, sin embargo, sigue estando ausente o a expresión muy baja, y esto es un distintivo de su estado de DC inmaduras. Además, las células iDCOne también expresan WT-1 (Figura 2).

Las células DCOne maduras (mDCOne) se caracterizan por la aparición de expresión de CD83, mientras que los otros receptores de la superficie celular tales como CD34 y CD1a (CD34+ y CD1a+) siguen estando presentes también, a pesar de que su nivel de expresión puede disminuir. La expresión de CD83 es el distintivo específico de DC maduras. La expresión de otros marcadores relevantes también se muestra en la Figura 1. Y, lo que es más importante, las mDCOne también expresan WT-1 (Figura 2), un antígeno de tumor muy conocido.

La invención también se refiere, por tanto, a células dendríticas maduras obtenibles de una célula DCOne.

Se conocen células dendríticas maduras en la técnica. Pueden derivarse convencionalmente de células progenitoras de médula ósea hematopoyéticas o de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). En una alternativa, las células dendríticas maduras también pueden derivarse de líneas celulares distintas tales como MUTZ-3, HL-60, THP-1 y KG-1 (Larsson et al., 2006, van Helden et al., 2008, Santegoets et al, 2006, y Masterson et al, 2002).

Se encontró que las células dendríticas maduras derivadas de células progenitoras DCOne eran diferentes de las células dendríticas conocidas en el estado de la técnica y tenían varias propiedades ventajosas con respecto a las células dendríticas maduras conocidas en el estado de la técnica.

Primero, en comparación con las células dendríticas derivadas de monocitos llamadas moDC en el presente documento, mDCOne expresan al menos un antígeno asociado a tumor, WT-1 (Figura 2). Una célula dendrítica derivada de sangre convencional de un sujeto sano no expresa endógenamente un antígeno tumoral tal y, por tanto, una célula dendrítica convencionalmente derivada tendría que cargarse con un antígeno tumoral específico con el fin de programar la célula dendrítica para estimular una respuesta inmunitaria contra este antígeno tumoral específico. A diferencia, las células DCOne maduras pueden activar linfocitos T específicos para WT-1 directamente, así sin la necesidad de considerar carga. WT1 se expresó en exceso en la mayoría de los cánceres, en particular en pacientes con LMA en los que el 90 % de los pacientes expresaban en exceso WT-1. La vacunación de WT-1 con vacunas de péptido puede provocar respuestas de linfocitos T específicas que se ha demostrado en estudios clínicos publicados que ejercen un efecto antitumoral (van Tendeloo et al., 2012; Krug et al., 2010; Rezvani et al., 2008; May et al., 2007;

Rezvani et al., 2005). Varios estudios clínicos en, por ejemplo, pacientes con LMA con vacunas de DC autólogas cargadas con WT-1 también han documentado respuestas inmunológicas y respuestas clínicas claras. Su expresión en células DCOne maduras es, por tanto, una característica distintiva del potencial de DCOne para funcionar como un vehículo presentador de antígeno para pacientes con tumores positivos para WT-1, tales como pacientes con LMA.

Además, se encontró que las mDCOne expresan aproximadamente 2 veces más CD1a que las DC derivadas de CMSP (Figura 4). Se sabe que CD1a se regula por incremento durante el proceso de diferenciación de DC mieloides, y las moléculas de CD1a representan un importante receptor de antígeno sobre DC, en particular para antígenos de lípidos. Estas moléculas CD1a presentan entonces componentes derivados de antígeno a linfocitos T.

Otra ventaja se refiere a una diferencia importante con células dendríticas derivadas de una línea celular llamada MUTZ-3. La línea celular MUTZ-3 puede obtenerse de DSMZ con el número de acceso DSMZ ACC295. Los presentes inventores compararon la línea celular MUTZ-3 con la línea celular DCOne tal como se depositó. Pareció que las células MUTZ-3 no podrían ser reproduciblemente propagadas, ya que el tiempo de duplicación de estas células varió dentro de límites inaceptables para un proceso industrial o comercial (Figura 5). Mientras que el tiempo de duplicación para un cultivo celular DCOne permaneció dentro de los límites de 28 - 39 horas desde el 6° pase, el tiempo de duplicación de células MUTZ-3 varió entre 31 y 65 horas. MUTZ-3 son con eso inapropiadas para un proceso industrial controlado en el que la reproducibilidad es de importancia clave y un requisito previo para las autoridades reguladoras. Los detalles experimentales exactos se proporcionan en el Ejemplo 4.

Los presentes inventores también fueron capaces de establecer que las células DCOne tal como se depositaron fueron diferentes de MUTZ-3 porque DCOne tiene una gran aberración de 11p15.5 a 11p12, que engloba aproximadamente 16 Mb de regiones genómicas (20,7 Mb - 36,6 Mb). La pérdida heterocigótica contiene cerca de 60 genes conocidos y desconocidos. Esto hace que la célula DCOne sea claramente diferente de la línea celular MUTZ-3. Los detalles experimentales de este análisis se proporcionan en el Ejemplo 9.

También se estableció que las células mDCOne expresaron coherentemente langerina a un nivel mucho más alto que MUTZ-3. La Figura 6 muestra que aproximadamente el 70 % de las células DCOne expresaron langerina mientras que menos del 25 % de las células MUTZ-3 expresaron este marcador. Detalles experimentales de este análisis se proporcionan en el Ejemplo 8. La langerina es un receptor importante para antígenos que expresan ciertas moléculas de glicano e implicadas en la captación y el procesamiento de tales antígenos.

Se encontró que las células DCOne maduras eran particularmente aptas para uso como medicamento, particularmente para el tratamiento de cánceres, más en particular LMA. Esto se basa en las siguientes observaciones.

Células DCOne maduras expresan endógenamente al menos un antígeno de tumor, seleccionado del grupo que consiste en WT-1, RHAMM y PRAME, p53 y survivina. WT-1 se expresa en un gran número de cánceres (Rezvani et al., 2005). Esto hace que las células mDCOne sean particularmente aptas para el tratamiento de diferentes tipos de cánceres, que incluyen cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, leucemia mieloide crónica, cáncer de ovario, cáncer de colon, mieloma múltiple, cáncer de próstata, cáncer de piel, síndrome mielodisplásico, cáncer cerebral y cáncer de vejiga.

DC derivadas de DCOne maduras que también expresan moléculas de HLA-A2, HLA-A3 y HLA-B44 que permiten la expresión de péptidos derivados de antígenos de tumor tales como WT-1, que van a presentarse a linfocitos T. Además, mDCOne expresa un perfil óptimo de moléculas coestimulantes que permite la sensibilización de linfocitos T intactos y la reactivación de linfocitos T de memoria efectoras existentes. Estas moléculas coestimulantes incluyen CD1a-CD40-CD80-CD83-CD86-CD209, además de otras moléculas funcionalmente relevantes tales como HLA-DR y DCSign y langerina.

Adicionalmente, los presentes inventores encontraron que el antígeno tumoral endógenamente expresado WT-1 (Figura 2) en células mDCOne puede activar los linfocitos T específicos de WT-1 para producir interferón gamma (IFN γ), como se detalló además en el Ejemplo 5 y se muestra en la Figura 7. DCOne maduras son con eso particularmente aptas para el tratamiento de pacientes con LMA, ya que el noventa por ciento de los pacientes con LMA expresan el antígeno WT-1. Esto se documentó además por la demostración de que células leucémicas pueden ser destruidas por linfocitos T específicos de WT-1 después de la estimulación con células mDCOne. Esto se ejemplifica en el Ejemplo 5 y la Figura 8.

También se encontró que mDCOne tienen la capacidad de migrar a los ganglios linfáticos, que se refleja en su expresión de CCR7 y en su capacidad de migrar *in vitro* a quimiocinas 6Ckine (también conocidas como CCL21) y MIP3b (también conocidas como CCL19). Esto se describe en el Ejemplo 6 y la Figura 9. De hecho, se demostró que mDCOne son capaces de migrar a quimiocinas en un ensayo de migración *in vitro*, que refleja la migración a áreas de ganglios linfáticos de linfocitos T para-corticales.

Y, lo que es más importante, los presentes inventores fueron capaces de demostrar que la vacunación con mDCOne en pacientes con leucemia indujo una respuesta clínica de linfocitos T. Los presentes inventores observaron que los pacientes vacunados responden con una elevada respuesta de hipersensibilidad tipo retardada a una re-exposición

a mDCOne, como se muestra en la Figura 10. El hinchamiento e induración observados van acompañados de infiltración de linfocitos T CD4 y CD8, indicativo de una respuesta inmunitaria sistémica. Esto se detalla en el Ejemplo 7.

5 Además, los presentes inventores observaron que la vacunación con mDCOne en pacientes con leucemia produjo un aumento en los linfocitos T productores de IFN- γ reactivos con PRAME, que es indicativo de respuestas de linfocitos T específicas de tumor inducidas por la vacunación como se muestra en la Figura 11. Estos datos muestran que DCOne es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica de tumor.

10 DC maduras, las células precursoras de las mismas en una etapa de diferenciación adecuada, o las células de las líneas celulares como se describe en el presente documento, pueden cargarse con al menos un antígeno. Tal carga puede llevarse a cabo usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo cargando con antígenos de tumor o antígenos de infección, sintéticos o purificados o parcialmente purificados de material biológico, con lisados celulares de células tumorales, líneas de células tumorales, células infectadas o líneas celulares, por fusión con otras células o líneas celulares, introduciendo al menos gen inmunoterapéutico, por infección con partículas infecciosas o porciones de las mismas. Opcionalmente, las células o líneas celulares cargadas se someten a diferenciación adicional por las moléculas estimulantes. En general, las DC maduras procesarán los antígenos, presentándolos a las células inmunitarias correspondientes del sistema inmunitario mediante moléculas particulares, por ejemplo mediante moléculas de MHC I o MHC II, activando así correspondientemente la respuesta inmunitaria humoral y/o celular que combate la enfermedad o forma una memoria inmunológica que previene enfermedades de un modo profiláctico. Para este fin, las DC maduras se usan como agente inmunoterapéutico en el paciente.

20 Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método de obtención de células dendríticas maduras derivadas de la línea celular DCOne con un fenotipo alterado. Tal método consiste en las etapas que se han descrito anteriormente, tales como incubar la línea celular DCOne en condiciones que permitan la diferenciación de las células progenitoras en células dendríticas inmaduras e incubar dichas células dendríticas inmaduras en condiciones que permitan la maduración de las células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras, que comprende además una etapa de alterar el fenotipo de las células dendríticas maduras introduciendo material genético en las células y/o inactivando genes endógenos de las células.

30 La introducción de genes se entiende que es transfección o infección viral o transformación de células o líneas celulares, introduciendo así material genético en la célula o líneas celulares según métodos de por sí conocidos. El material genético puede ser ADN o ARN. El material genético codifica la expresión de al menos una proteína o péptido, o/y el propio ARN puede tener un efecto inhibitorio o estimulante, por ejemplo como un ARN antisentido. Las proteínas que se expresan pueden procesarse y modificarse adicionalmente, por ejemplo por glucosilación. También pueden introducirse genes fusionando células o líneas celulares con otras células o líneas celulares.

35 En otro aspecto de la invención, los genes de agentes inmunoterapéuticos se introducen en las células según la invención. Los genes de agentes inmunoterapéuticos son genes que codifican proteínas y/o péptidos que desempeñan una función en el uso de las células dendríticas eficaces como agentes inmunoterapéuticos, por ejemplo antígenos de tumor, antígenos virales o antígenos de parásitos, bacterias u otros microorganismos.

40 Las células o líneas celulares que tienen genes de agentes inmunoterapéuticos incorporados en su interior expresarán las proteínas o péptidos de estos genes, y estos son presentados al sistema inmunitario por las células dendríticas, de manera que las células dendríticas eficaces activan, inhiben o modulan las respuestas inmunitarias correspondientes, dependiendo de la actividad y etapas efectoras de las células dendríticas eficaces. Para la presentación de los productos génicos, las proteínas expresadas o péptidos se procesan o se usan directamente; además, las proteínas expresadas o péptidos pueden modificarse, por ejemplo por glucosilación.

45 Como se usa en el presente documento, el término antígeno de tumor se refiere a péptidos, proteínas, lípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, hidratos de carbono, glicolípidos, glicopéptidos, glicoproteínas, proteínas fosforiladas, péptidos fosforilados, proteínas o péptidos de otro modo modificados tras la traducción que, en comparación con tejido normal, se expresan en exceso en las células del tumor, se expresan por defecto, se expresan de novo, mutan, se modifican diferencialmente después de la traducción, se procesan diferencialmente, se sitúan diferencialmente, se pliegan diferencialmente, o se modifican de otro modo.

Leyenda a las figuras

50 Figura 1: Representación gráfica del perfil de expresión de marcadores de diferenciación de células dendríticas y marcadores de maduración en células progenitoras DCOne, células DCOne inmaduras y células dendríticas DCOne maduras.

55 Figura 2: Expresión de WT-1 por células derivadas de DCOne. Representación fotográfica de un análisis de transferencia Western que demuestra la expresión de proteínas de WT-1 en progenitores DCOne (carril 1), células dendríticas DCOne inmaduras (carril 2) y DCOne maduras (carril 3). Se usa un anticuerpo anti-actina como control, que muestra la carga de proteína equivalente en cada carril.

- Figura 3: Representación esquemática del proceso de proliferación, diferenciación y maduración de células DCOne que conduce a células dendríticas DCOne completamente funcionales.
- Figura 4: Gráfico que representa el porcentaje de expresión de diversos marcadores celulares encontrados en células dendríticas DCOne maduras (mDCOne) frente a células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica (moDC).
- Figura 5: Gráfico que muestra el tiempo de duplicación de la población (PDT) de células progenitoras MUTZ-3 (cuadrados) frente a progenitores DCOne (círculos). El eje horizontal representa los números de pases.
- Figura 6: Gráfico que muestra la expresión de diferentes marcadores celulares en células DCOne maduras (mDCOne) y MUTZ-3.
- Figura 7: Gráfico que muestra la estimulación de linfocitos T citotóxicos específicos de WT-1 por mDCOne como se demuestra por liberación de IFN.
- Figura 8: Gráfico que muestra el porcentaje de lisis de células diana por linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de WT-1 que han sido estimulados por mDCOne. Tales CTL estimulados específicos para WT1 pueden destruir células de la línea celular de leucemia mieloide K562 cuando K562 se transfecta con HLA-A2, ya que HLA-A2 se requiere para la presentación al antígeno WT-1. Como control negativo, se usó la línea celular K562 no transfectada que carece de HLA-A2. También podrían ser destruidas células de otra línea celular de LMA, progenitores de LMA.
- Figura 9: Gráfico que muestra el porcentaje de migración de células dendríticas DCOne inmaduras, DCOne maduras y derivadas de monocitos bajo la influencia de dos citocinas recirculantes de ganglios linfáticos (6Ckine (CCL21) y MIP3beta (CCL19)). Se usa medio de cultivo como control.
- Figura 10: Gráfico y fotografía que muestran la relación entre la induración media y el potencial pre- y post-vacunación de células mDCOne para inducir una respuesta inmunitaria sistémica en pacientes, como se documenta por la respuesta de hipersensibilidad tipo retardada (DTH) (panel superior). Imagen que muestra una respuesta de hipersensibilidad tipo retardada típica como se documentó por eritema e induración (panel inferior). Como control negativo, se usa el fluido de formulación usado para criopreservar células mDCOne.
- Figura 11: Las CMSP pre- y post-vacunación se estimularon *in vitro* con la mezcla de péptidos PRAME y se cultivaron durante 10 días. Las células se re-estimularon con péptidos PRAME y se analizaron linfocitos T productores de IFN- γ reactivo con PRAME en el ensayo ELISpot de IFN- γ . El control de medio sirvió de control negativo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Proliferación, diferenciación y maduración de células DCOne.

Células progenitoras DCOne pueden diferenciarse en células con todas las características de las células dendríticas inmaduras, y posteriormente madurarse en células con todas las características de las células dendríticas maduras.

Se cultivaron (expandieron) células progenitoras DCOne en medio de mantenimiento rutinario, que consiste en MEM- α (medio esencial mínimo, Lonza, Verviers, Bélgica) que contenía 10 % de suero de ternero fetal (FCS) (Hyclone, Perbio Science, Etten-Leur, Los Países Bajos), 100 UI/ml de penicilina sódica (pen), 100 μ g/ml de estreptomina (estrep), L-glutamina 2 mM (glut), β -mercaptoetanol 50 μ M (2ME) y GM-CSF (5 ng/ml). Esta es la primera etapa, que produjo la expansión de las células progenitoras.

Se dejó que las células progenitoras se diferenciaron en DCOne inmaduras durante 6 días añadiendo 1000 UI/ml de GM-CSF, 20 ng/ml de IL-4 y 120 UI/ml de TNF- α . Se añadieron citocinas nuevas en el día 3.

A continuación, la maduración se indujo añadiendo mezcla de imitación (2400 UI/ml de TNF- α , 100 ng/ml de IL-6, 1 μ g/ml de PGE2 y 25 ng/ml de IL1- β) durante 2 días.

Ejemplo 2: Fenotipificación

Se inmunofenotipificaron células usando los siguientes mAb conjugados con FITC y/o PE reactivos contra: CD1 a (1:25), CD80 (1:25), CD86 (1:25), CD40 (1:10) (PharMingen, San Diego, CA), CD14 (1:25), DC-SIGN (1:10) (BD Biosciences, San Jose, CA), CD83 (1:10), CD34 (1:10), langerina (1:10) (Immunotech, Marsella, Francia). Se lavaron 2,5 a $5 \cdot 10^4$ células en PBS complementado con 0,1 % de BSA y 0,02 % de NaN_3 y se incubaron con mAb específicos o de control correspondientes durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo FACS-Calibur (Becton and Dickinson, San Jose, CA) equipado con software de análisis CellQuest. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas. Las células DCOne maduras presentan la

expresión prototípica del marcador de DC maduras CD83, y aumentó fuertemente la expresión de CD1a y CD40, como puede observarse en la Figura 1.

Ejemplo 3: Comparación con células dendríticas preparadas a partir de células precursoras CD34+.

5 Las características fenotípicas de células DCOne maduras son comparables a las de células dendríticas maduras preparadas a partir de células precursoras CD34+. Se aislaron células precursoras hematopoyéticas CD34⁺ de sangre de donantes sanos y se expandieron durante 2-5 semanas con 25 ng/ml de ligando de tirosina cinasa-3 similar a *fms* (Flt3-L) y 10 ng/ml de factor de células madres (SCF). A partir de aquí, se diferenciaron y se maduraron como se ha descrito anteriormente. Este proceso se ilustra en la Figura 3. Células progenitoras DCOne se expandieron, diferenciaron y maduraron como se ha descrito anteriormente usando medio complementado con citocinas específicas. Las células se probaron posteriormente usando citometría de flujo para la expresión de los marcadores CD1a, CD80, CD86, CD40 y CD83, usando anticuerpos como se describe en el Ejemplo 2. Las características fenotípicas de la población de DC maduras derivadas de monocitos y células DCOne maduras son comparables, como puede apreciarse en la Figura 4. DCOne maduras mostraron una mayor expresión de CD1a en comparación con moDC. CD1a es un marcador molecular característico en DC que se diferencian y participa en las funciones de presentación de antígeno. moDC y DCOne fueron comparables en su expresión de CD80, CD86, CD40 y CD83. CD83 es una molécula coestimulante y es el marcador más específico de DC maduras, ya que está ausente de DC inmaduras (véase también la Figura 1).

Ejemplo 3: DCOne, además de iDCOne y mDCOne, expresan WT-1

20 Se realizó transferencia Western con un sistema de electroforesis comercial de SDS-PAGE. Se lisaron células (10E6) en tampón RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0,1 % de SDS, 0,5 % de desoxicolato de sodio, 1 % de Triton X100 e inhibidor de proteinasa PMSF)

25 Se resuspendieron muestras de diez microgramos de proteína en un tampón de muestra de SDS-PAGE reducida, y luego se sometieron a electroforesis en 4 al 10 % de gel Tris con tampón de electroforesis Tris y se transfirieron a membrana de PVDF. Las transferencias se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en 10 % de leche desnatada en polvo en solución salina tamponada con Tris que contenía 0,1 % de Tween-20 (TBST). Las transferencias se sondaron con un anticuerpo policlonal anti-WT-1 diluido en TBST que contenía 0,5 % de leche desnatada en polvo en TBST. Entonces se añadió un anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante, y se detectaron anticuerpos secundarios mediante autorradiografía usando quimioluminiscencia potenciada (ECL Plus, General Electric Healthcare, Milwaukee, WI). Se usó beta-actina como control de carga de proteína y se detectó por un anticuerpo anti-beta-actina.

Ejemplo 4: Reproducibilidad de la proliferación de DCOne en comparación con MUTZ-3

35 Células progenitoras obtenidas de progenitores de líneas celulares DCOne y MUTZ-3 (obtenidas de DSMZ) se cultivaron en matraces de cultivo T175 a 0,2x10E6 células/ml en MEM-alfa, 20 % de FCS más penicilina/estreptomicina complementado con 20 % de medio acondicionado de sobrenadante 5637 (Kurtzberg et al., 1989 y Welte et al., 1985). Las células se incuban en una estufa de incubación con CO₂ a 37 grados Celsius + 5 % de CO₂ y se someten a pases cada 3 a 4 días. Se evaluaron los tiempos de duplicación de la población (PDT) por recuento de células.

40 Para obtener medio acondicionado de células 5637, las células 5637 de un cultivo en crecimiento y confluyente se sembraron a 0,9x10E6 células/25 ml/matraz de cultivo T175 y se incubaron en una estufa de incubación con CO₂ a 37 grados Celsius y 5 % de CO₂. Después de 72 horas, se recogió todo el medio acondicionado por centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm a 4 grados Celsius.

Ejemplo 5: Activación de linfocitos T específicos de WT-1

45 Pareció que las células DCOne maduras fueron capaces de activar directamente los linfocitos T específicos de WT-1, sin ninguna carga intencionada con antígeno WT-1 de origen exógeno, y tales linfocitos T específicos de WT-1 estimulados por el producto DCOne pueden destruir células tumorales leucémicas positivas para WT-1 *in vitro*.

Debido a su expresión de WT-1, el producto de DCOne maduras puede estimular linfocitos T específicos de WT1 como se demuestra por su capacidad para inducir la liberación de IFN por linfocitos T específicos para WT-1, además de inducir la destrucción de células de leucemia por tales linfocitos T específicos de WT-1 estimulados por DCOne. Una muestra de los datos se muestra en la Figura 7 y 8.

50 En estos experimentos, los clones de linfocitos T específicos de WT-1 se analizaron para citotoxicidad por citometría de flujo usando progenitores K562, K562-A2 y DCOne como dianas marcadas con éster de succinimidilo de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE; ImmunoChemistry Technologies, LLC, MA, EE.UU.). En resumen, se lavaron 1-2x10E6 células diana y se marcaron con disolución madre de CFSE diluida 1:10 durante 15 minutos a temperatura ambiente (TA). A continuación, las células diana se lavaron con 1 ml de medio de Dulbecco modificado con Iscove (IMDM, Gibco) complementado con 100 U/ml de penicilina/100 microlitro/ml de estreptomicina, L-glutamina 2 mM (Life Technologies, Grand Island, NY, EE.UU.; denominado además medio CTL). Se

resuspendieron células en 2 ml de medio CTL y se incubaron en baño de agua durante 30 minutos a 37 grados Celsius. Entonces se lavaron las células diana marcadas con CFSE y se co-cultivaron con clones de linfocitos T específicos de WT-1 a las relaciones deseadas de efector:diana (E:T) durante 4 horas a 37 grados Celsius en una atmósfera de 5 % de CO₂ completamente humidificada. Después de 4 horas, las células co-cultivadas se tiñeron con 7AAD durante 15 minutos sobre hielo en la oscuridad y entonces se analizaron en FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos se analizaron usando el software CellQuest.

Ejemplo 6: Ensayo de migración

Se mostró que DCOne maduras tenían la capacidad de migrar en respuesta a quimiocinas que determinan su recirculación a las áreas de ganglios linfáticos para-corticales. Células DCOne maduras son equivalentes o superiores a las DC derivadas de monocitos convencionales, como puede apreciarse en la Figura 9. El ser capaces de migrar es una característica esencial de DC. Para los ensayos de migración Transwell *in vitro*, se sembraron 10E5 células mDCOne o moDC en el compartimento superior de Transwell de 24 pocillos de Costar con un tamaño de poro de 6 µm. El compartimento inferior contuvo 600 µl de MEM-α libre de suero complementado con pen/estrep, y 250 ng/ml de CCL19 (Mip3beta; Peprotech, Huissen, Los Países Bajos) o CCL21 (6CKine; Invitrogen, Carlsbad, CA). Se dejó que las células migraran durante 4 horas a 37 °C. Después de la migración, se recogieron 500 µl de medio del compartimento inferior y las células migradas se cuantificaron con fluoroesferas Flow-Count (Beckman Coulter, Fullerton, CA) por citometría de flujo.

Ejemplo 7: Respuestas clínicas de linfocitos T en pacientes vacunados con mDCOne como se mide por inducción de una respuesta de DTH

Se hacen inyecciones de prueba en la piel sobre el lado anterior del brazo derecho de un voluntario humano, separadas al menos 5 cm entre sí, y reacciones de hipersensibilidad tipo retardada (DTH) (áreas de induración y de eritema) se registraron después de 48 h y se calcularon como áreas circulares basándose en el promedio de los diámetros vertical y horizontal. Los resultados se muestran en la Figura 10.

Ejemplo 8: Células DCOne maduras expresan langerina a un nivel más alto que las células dendríticas derivadas de MUTZ-3.

Se inmunofenotipificaron células usando los siguientes mAb conjugados con FITC y/o PE reactivos contra: CD1a (1:25), CD80 (1:25), CD86 (1:25), CD40 (1:10) (PharMingen, San Diego, CA), CD14 (1:25), DC-SIGN (1:10) (BD Biosciences, San Jose, CA), CD83 (1:10), CD34 (1:10), langerina (1:10) (Immunotech, Marsella, Francia). Se lavaron 2,5 a 5x10⁴ células en PBS complementado con 0,1 % de BSA y 0,02 % de NaN₃ y se incubaron con mAb específicos o de control correspondientes durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron y se analizaron en un citómetro de flujo FACS-Calibur (Becton and Dickinson, San Jose, CA) equipado con el software de análisis CellQuest. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células positivas.

Ejemplo 9: Células DCOne llevan una delección en comparación con MUTZ-3

Los presentes inventores han realizado una hibridación genómica comparativa de matrices en una matriz 180K producida por Agilent para probar elementos cromosómicos en común y diferencias en el número de copias entre células DCOne y células MUTZ-3. La matriz usada es una matriz a medida con 17 kb de espacios de sondas como se describe por Tack et al. 2010.

Se encontró que la línea celular DCOne era perfectamente diferente de MUTZ-3 ya que DCOne tiene una mayor aberración de 11p15.5 a 11p12 que engloba aproximadamente 16 Mb de regiones genómicas (20,7 Mb - 36,6 Mb). La pérdida heterocigótica contiene cerca de 60 genes conocidos y desconocidos. Esto se considera una gran pérdida y hace que la línea celular DCOne sea diferente de MUTZ-3. Los presentes inventores encontraron que el número de copias de regiones variables (CNV) indica que la línea celular DCOne es clónica, esto significa que las delecciones en 7q y 12p son las mismas en todas las células obtenidas de la línea celular.

Referencias

1. Masterson AJ, Sombroek CC, de Gruijl TD, Graus YM, van der Vliet HJ, Loughheed SM, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Scheper RJ (2002) MUTZ-3, a human cell line model for the cytokine-induced differentiation of dendritic cells from CD34+ precursors. *Blood* 100:701-703.
2. Santegoets SJAM, Schreurs MW, Masterson AJ, Liu YP, Goletz S, Baumeister H, Kueter EW, Loughheed SM, van den Eertwegh AJ, Scheper RJ, Hooijberg E, de Gruijl TD (2006) In vitro priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using allogeneic dendritic cells derived from the human MUTZ-3 cell line. *Cancer Immunol Immunother* 55:1480-1490
3. Santegoets SJAM, Masterson AJ, van der Sluis PC, Loughheed SM, Fluitsma DM, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Scheper RJ, de Gruijl TD (2006) A CD34(+) human cell line model of myeloid dendritic cell differentiation: evidence for a CD14(+)CD11b(+) Langerhans cell precursor. *J Leukoc Biol.* 80:1337-1344.

4. Tack GJ et al., Phenotypic and genomic analysis of an exceptional case of enteropathy associated T-cell lymphoma. *Leuk Res.* 2010 Aug;34(8):e183-9.
5. Cheever et al, *Clin Cancer Res* 15-5323-2009. The prioritization of cancer antigens: A national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research.
- 5 6. Vermeij et al, *Clinical and Developmental Immunology* 2010-891505-2010. Potential target antigens for a universal vaccine in epithelial ovarian cancer.
7. Narita et al, *International Journal of Medical Sciences* 7-72-2010. WT1 Peptide vaccination in combination with imatinib therapy for a patient with cml in the chronic phase.
- 10 8. Greiner et al, *Haematologica* 95-1191-2010. High-dose RHAMM-R3 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndrome and multiple myeloma.
9. Schmitt et al, *Blood* 111-1357-2008. RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses.
10. Baars et al, *Annals of Oncology* 11-965-2000. Skin tests predict survival after autologous tumor cell vaccination in metastatic melanoma: Experience in 81 patients.
- 15 11. Quintarelli et al, *Blood* 117-335-2011. High-avidity cytotoxic T lymphocytes specific for a new PRAME-derived peptide can target leukemic and leukemic-precursor cells.
12. Kohrt et al, *Blood* 118-5319-2011. Donor immunization with WT1 peptide augments antileukemic activity after MHC=matched bone marrow transplantation.
- 20 13. Greiner et al, *Blood* 106-938-2005. Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8+ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia.
14. Rezvani et al, *Clin Cancer Res* 11-8799-2005. T-Cell responses directed against multiple HLA-A *0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukaemia and healthy donors: Identification, Quantification and characterization.
- 25 15. May et al, *Clin Cancer Res* 13-4547-2007. Peptide epitopes from the Wilms tumor 1 oncoprotein stimulate CD4+ and CD8+ T Cells that recognize and kill human malignant mesothelioma tumor cells.
16. Gao et al, *Blood* 95-2198-2000. Selective elimination of leukemic CD34+ progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WT1.
- 30 17. Ochsenreiter et al, *Immunotherapy Journal* 34-85-2011. Wilms tumor protein 1 (WT1) peptide vaccination-induced complete remission in a patient with acute myeloid leukemia is accompanied by the emergence of a predominant T-cell clone both in blood and bone marrow.
18. Rezvani et al, *Blood* 111-236, 2008. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies.
- 35 19. Wadelin et al, *Molecular Cancer* 9-226, 2010. Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia.
20. Quintarelli et al, *Blood* 112-1876-2008. Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia.
21. Schmitt et al, *Exp. Hematol* 34-1709-2006. Chronic myeloid leukemia cells express tumor-associated antigens eliciting specific CD8+ T-cell responses and are lacking costimulatory molecules.
- 40 22. Amir et al, *Clin cancer Res* 2011 Sep 1;17(17):5615-25. Epub 2011 Jul 19 PRAME specific allo-HLA restricted T-cells with potent antitumor reactivity useful for therapeutic T cell receptor gene transfer.
23. Krug et al, *Cancer Immunol Immunother* 2010 Oct;59(10):1467-79. Epub 2010 Jun 8. WT1 peptide vaccinations induce CD4 and CD8 T cell immune responses in patients with mesothelioma and non-small cell lung cancer.
- 45 24. Van Tendeloo et al, *PNAS* 2010 Aug 3;107(31):13824-9. Epub 2010 Jul 14 Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination.
25. Galluzzi et al., *Oncolmmunology* 1:7, 1-24 (2012) Dendritic cell based interventions for cancer therapy,

26. Kurtzberg, J., et al., (1989) *Blood* 73, 381-390.
27. Welte, K., et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1526-1530.
28. Palucka, K., H. et al., 2011. Recent developments in cancer vaccines. *J. Immunol.* 186: 1325-1331.
29. Ueno H, et al., Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev.* 2010 Mar;234(1):199-212.
30. Bürdek et al. *Journal of Translational Medicine* 2010 8:90 doi:10.1186/1479-5876-8-90.
31. Larsson K., et al., *Immunology* 117; 156-166 (2006).
32. Van Helden S.F.G. et al., *Immunology Letters* 117; 191 - 197 (2008).

5

10

REIVINDICACIONES

1. Línea celular precursora para células dendríticas llamada DCOne como se depositó en la DSMZ con el número de acceso DSMZ ACC3189 el 15 de noviembre de 2012.
- 5 2. Método de obtención de células dendríticas maduras que comprende las etapas de incubar la línea celular según la reivindicación 1 en condiciones que permitan la diferenciación de las células progenitoras en células dendríticas inmaduras e incubar dichas células dendríticas inmaduras en condiciones que permitan la maduración de las células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras.
- 10 3. Método de obtención de células dendríticas maduras según la reivindicación 2, que comprende además una etapa de alteración del fenotipo de las células dendríticas maduras introduciendo material genético en las células y/o inactivando genes endógenos de las células.
4. Células dendríticas maduras obtenibles por el método según cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3.
5. Células dendríticas maduras según la reivindicación 4 para su uso como un medicamento.
6. Células dendríticas maduras según la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 15 7. Células dendríticas maduras para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 6, en las que el cáncer es leucemia mieloide aguda (LMA).
8. Células dendríticas maduras según la reivindicación 4 para su uso como una vacuna terapéutica contra el cáncer.

Figura 1

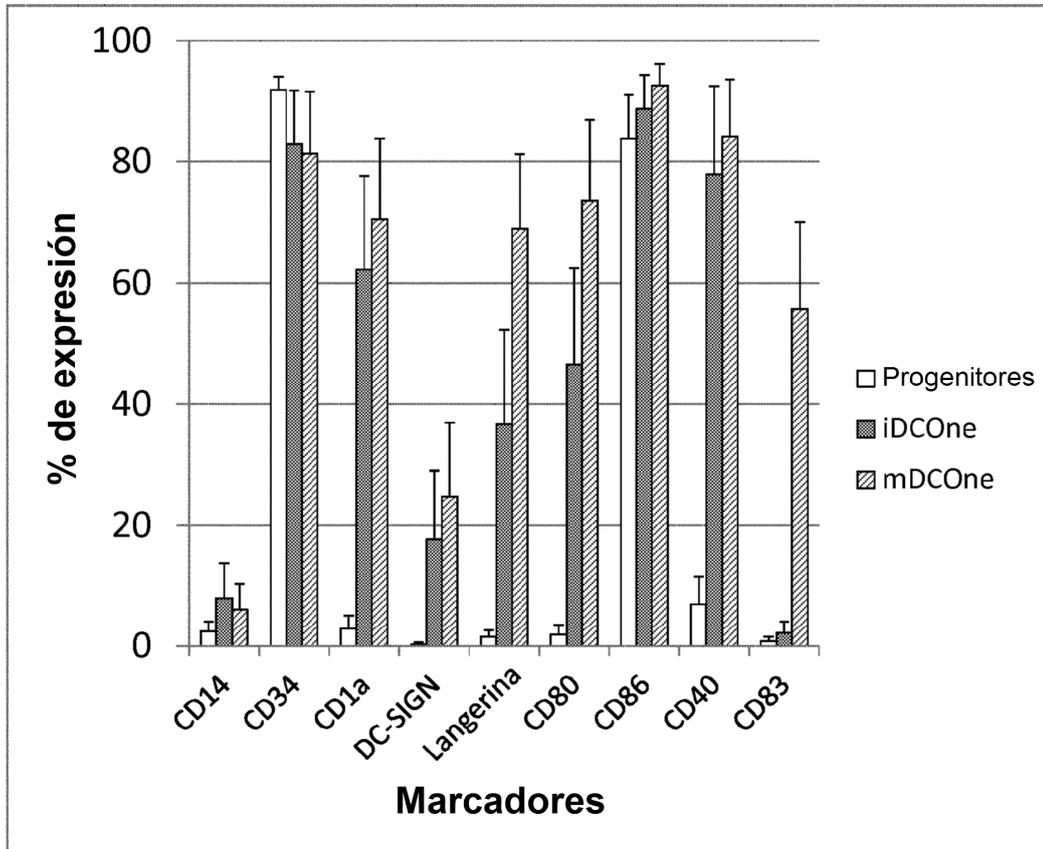


Figura 2

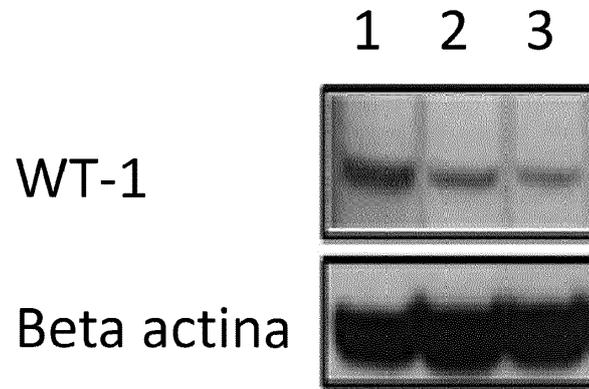


Figura 3

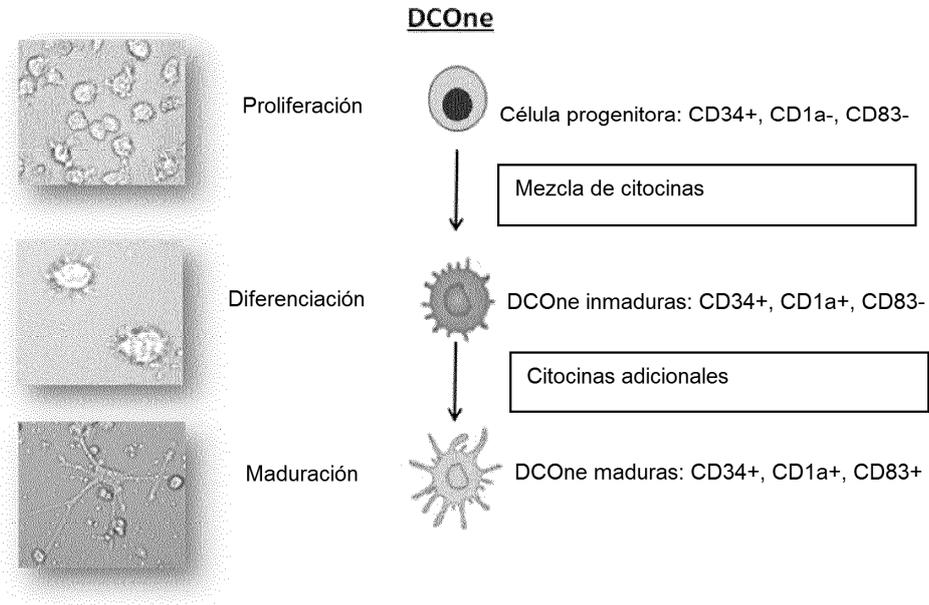


Figura 4

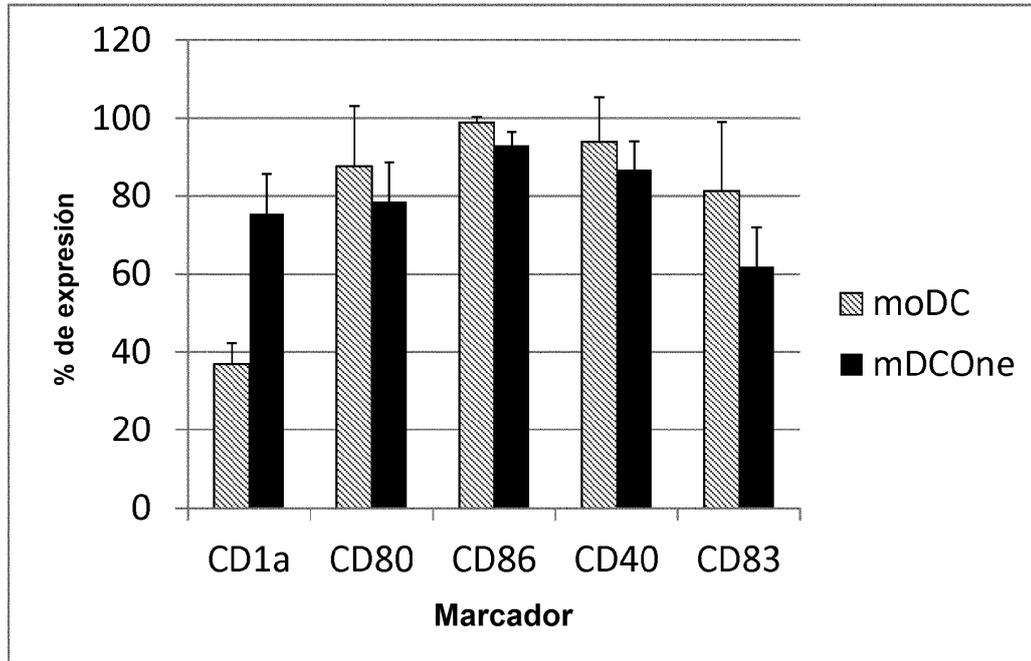


Figura 5

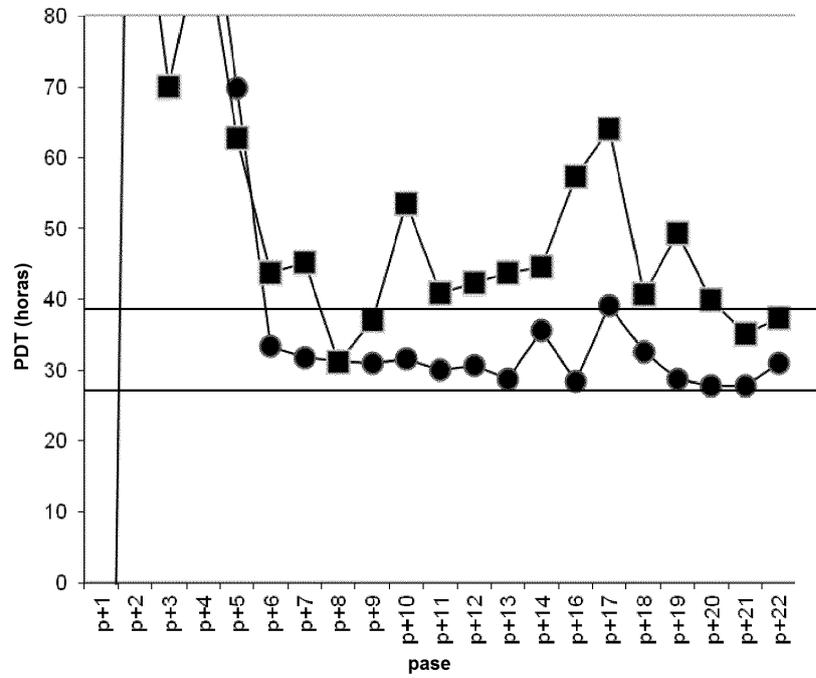


Figura 6

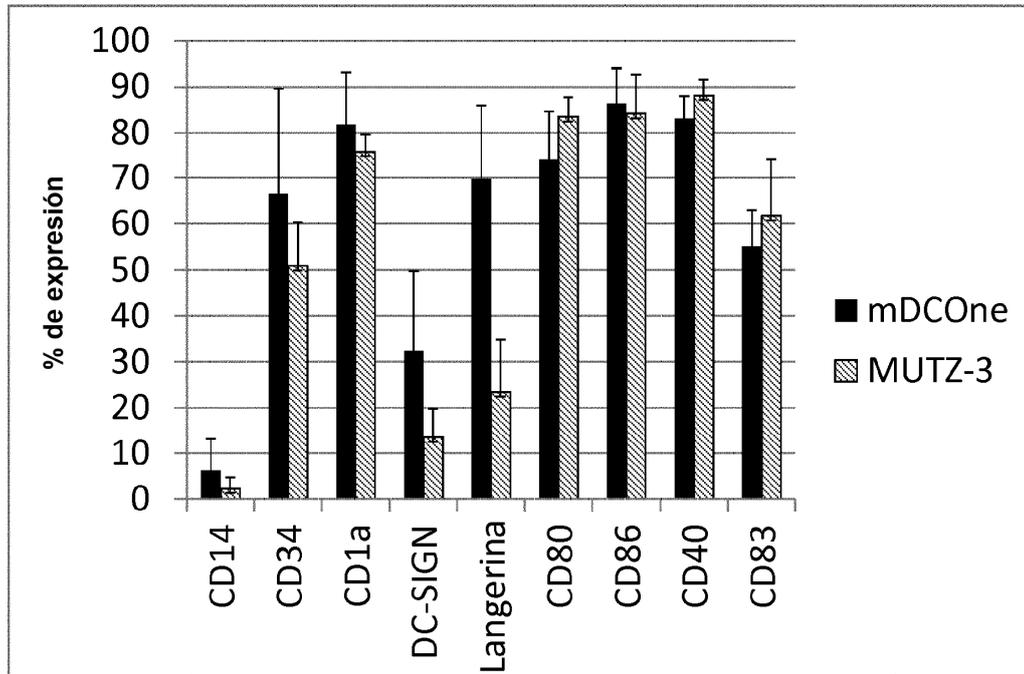


Figura 7

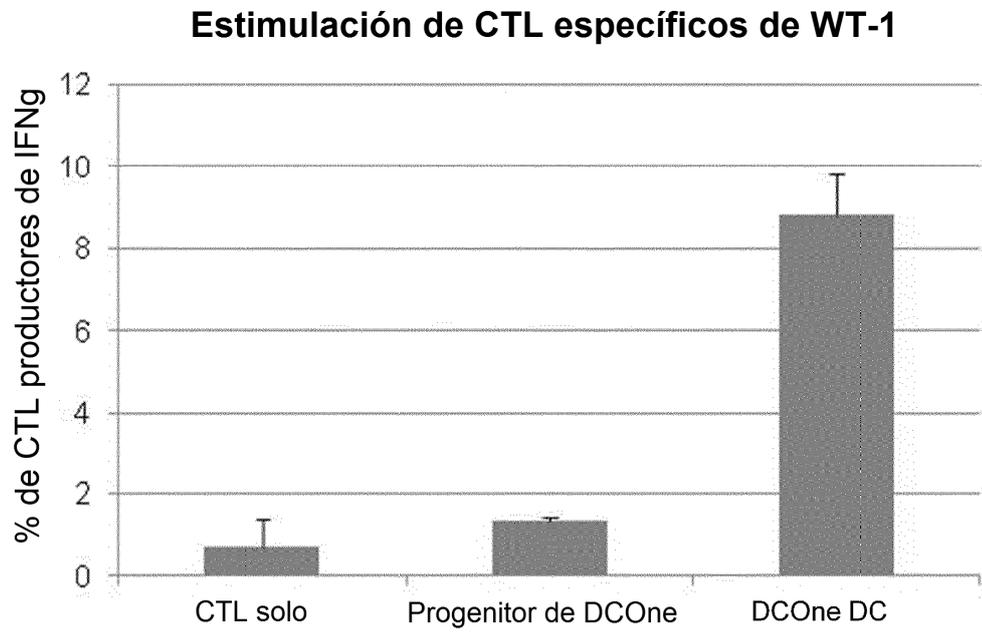


Figura 8

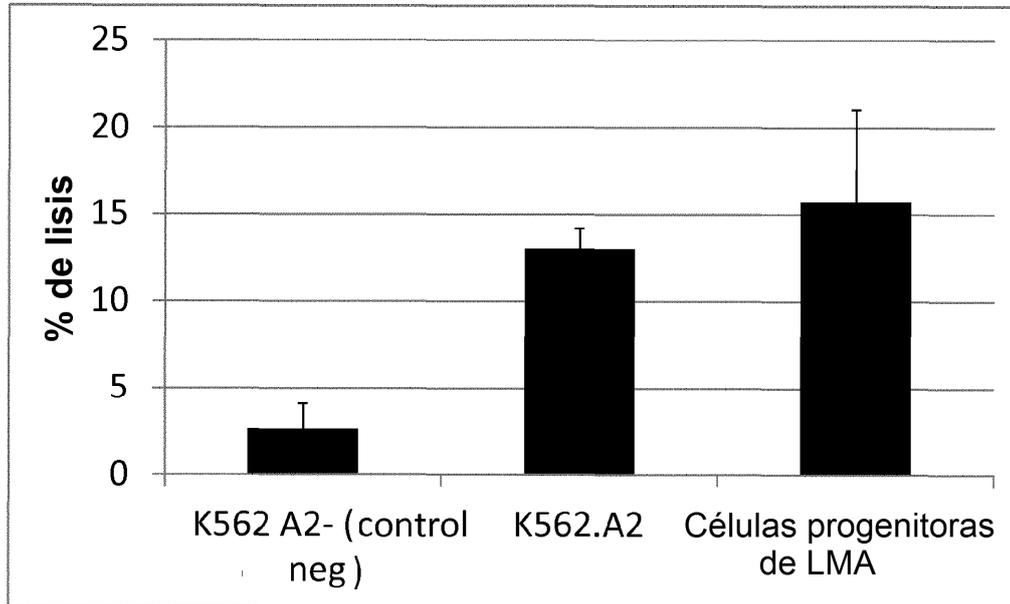


Figura 9

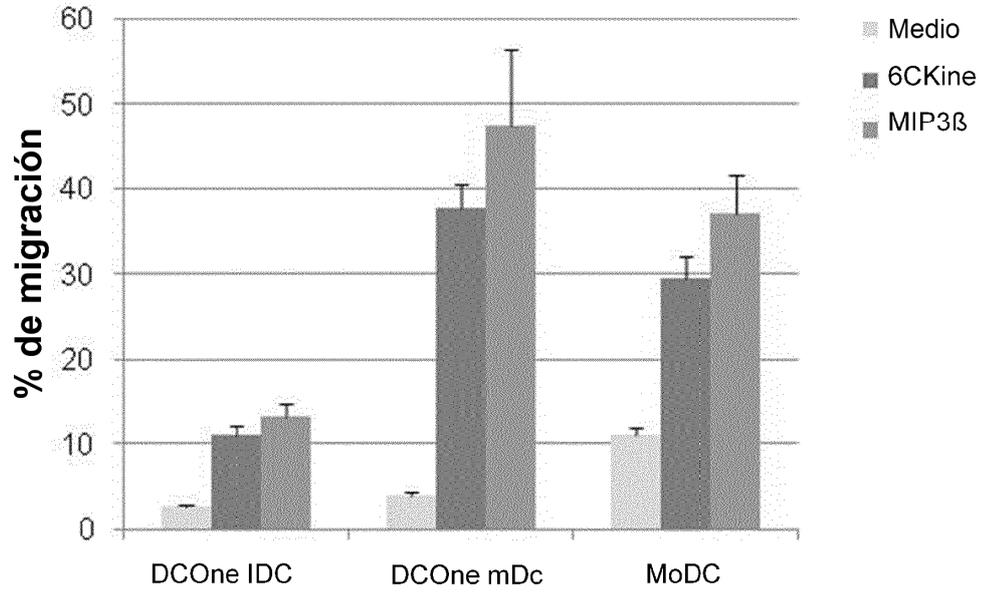


Figura 10

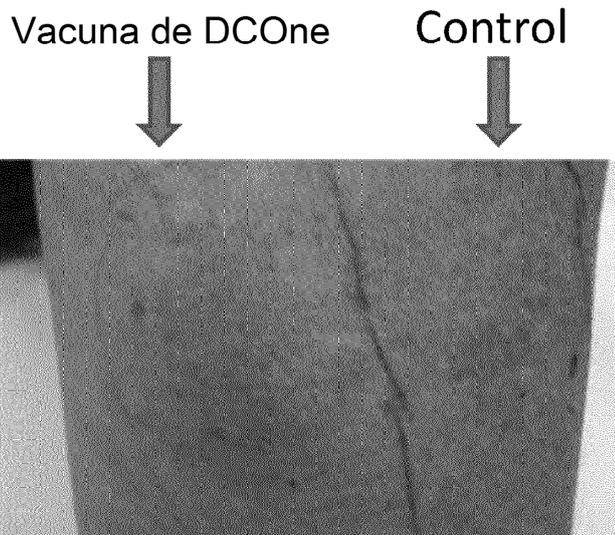
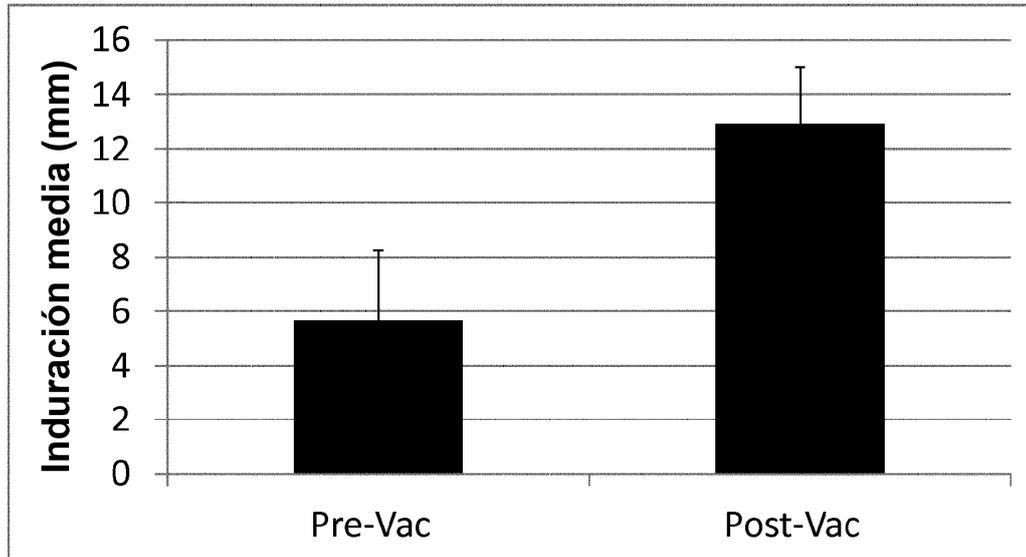


Figura 11

