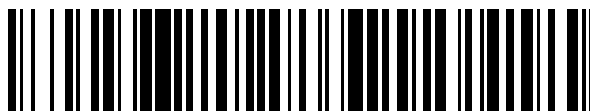


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 406**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2008 PCT/EP2008/065391**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2009 WO09019320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2008 E 08826916 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2281030**

54 Título: **Método de inducción y de aceleración de células**

30 Prioridad:

19.05.2008 EP 08075502

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

04.07.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**VAN WETERING, SANDRA;
DE GRUIJL, TANJA DENISE;
KRUISBEEK, ADRIANA MARIE;
VAN DE VEN, RIENEKE y
SCHEPER, RIEKELD JOHANNES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 621 406 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

Método de inducción y de aceleración de células

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para la producción de células dendríticas funcionales en el que células CD34 positivas se ponen en contacto con compuestos que inducen y que aceleran la diferenciación de estas células CD34 positivas en células dendríticas funcionales. Más en particular, las células CD34 positivas se ponen en contacto con antraciclinas y/o antracenodionas. En el presente documento también se desvelan células obtenibles por el método según la invención. En el presente documento también se describe el uso de compuestos tales como antraciclinas y/o antracenodionas que inducen y aceleran la diferenciación de células CD34 positivas en células dendríticas funcionales en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en seres humanos en necesidad de la misma.

Antecedentes de la invención

15 Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígenos (APC) más poderosas y desempeñan una función crucial en iniciar la respuesta inmunitaria. En vista de sus propiedades únicas, se han propuesto DC como herramienta para potenciar la inmunidad contra agentes infecciosos y en estrategias de vacunas contra el cáncer. En los últimos años se ha investigado ampliamente el desarrollo de DC.

20 Entre las células presentadoras de antígenos (APC) profesionales, las DC están especializadas en la recogida y procesamiento de antígenos en fragmentos de péptido que se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Localizadas en la mayoría de los tejidos, las DC migran desde la periferia hasta los órganos linfoides secundarios tales como el bazo y los ganglios linfáticos, donde los linfocitos T específicos de antígeno reconocen, mediante el receptor de linfocitos T, los complejos de péptido-MHC presentados por DC. Mientras que otras APC profesionales y no profesionales pueden solo estimular los linfocitos T activados o de memoria, las DC tienen la capacidad única de sensibilizar a linfocitos T intactos y quiescentes.

25 Dada su función crucial en controlar la inmunidad, se ha propuesto la función terapéutica de DC para muchas enfermedades que implican la activación de linfocitos T, tales como enfermedades autoinmunitarias y trastornos neoplásicos. La pulsación *ex vivo* con antígenos tumorales y la posterior reinfusión de DC puede conducir a protección contra tumores en animales. Para tratar la eficacia de estrategias de inmunoterapia de tumores basadas en DC en seres humanos, actualmente están en progreso varios ensayos clínicos que implican a DC.

30 Las DC se desarrollan a partir de células precursoras hematopoyéticas en la médula ósea, pasando a través de etapas secuencialmente diferentes de diferenciación tales como células precursoras intermedias en sangre y DC inmaduras en tejidos y órganos periféricos (Banchereau et al. 2000, Ann. Rev. Immunol. 18, 767-811). Una vez que han llegado al tejido, las DC inmaduras asumen una función sensora importante que se caracteriza por una alta captación activa de antígenos del medio circundante. Tras la estimulación por señales externas ("señales de peligro") tales como infecciones bacterianas o virales o procesos inflamatorios, las DC migran a los órganos linfáticos periféricos, sometiéndose allí a diferenciación en DC maduras, y linfocitos T activantes por presentación a antígenos.

35 Pueden obtenerse DC diferenciando células progenitoras bajo la influencia de diversas moléculas. Por ejemplo, células progenitoras derivadas de médula ósea (BM) murina podrían diferenciarse en DC mieloides en presencia de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). En seres humanos, se mostró que la adición de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) a GM-CSF e IL-4 inducía el desarrollo de DC a partir de células CD34 positivas (células CD34+) purificadas de médula ósea, sangre del cordón (CB) y sangre periférica (PB).

40 Jacobs et al. (Horm Metab Res. 2008 Feb;40(2):99-107) han dado una visión general de los subtipos de células dendríticas y la generación *in vitro* de células dendríticas. El artículo describe la identificación de diferentes subpoblaciones de DC que incluyen diferencias fenotípicas y funcionales y describe desarrollos recientes sobre protocolos para la generación de DC. Describe que se conocen diversas citocinas y factores de transcripción que son responsables del desarrollo de subpoblaciones de DC. Dependiendo de la subpoblación y el estado de maduración de estas células, son tanto capaces de inducir una amplia respuesta inmunitaria citotóxica, y por tanto representan una herramienta prometedora para las terapias de vacunación contra el cáncer en seres humanos, como de inducir tolerancia inmunitaria y son importantes en el contexto de autoinmunidad.

45 50 Las citocinas son proteínas secretadas pequeñas que median y regulan la inmunidad, inflamación y hematopoyesis. Se producen de novo en respuesta a un estímulo inmunitario. Generalmente (aunque no siempre) actúan a distancias cortas y periodos de tiempo cortos y a concentración muy baja. Actúan uniéndose a receptores de membrana específicos, que entonces señalizan la célula mediante segundos mensajeros, frecuentemente tirosina cinasas, para alterar su comportamiento (expresión génica). Las respuestas a citocinas incluyen aumentar o disminuir la expresión de proteínas de la membrana (que incluyen receptores de citocinas), proliferación y secreción de moléculas efectoras.

5 Citocina es un nombre general; otros nombres incluyen linfocina (citocinas producidas por linfocitos), monocina (citocinas producidas por monocitos), quimiocina (citocinas con actividades quimiotácticas) e interleucina (citocinas producidas por un leucocito y que actúan sobre otros leucocitos). Las citocinas pueden actuar sobre las células que las secretan (acción autocrina), sobre células próximas (acción paracrina), o en algunos casos sobre células distantes (acción endocrina).

10 Es común que diferentes tipos de células secreten la misma citocina o que una única citocina actúe sobre varios tipos diferentes de células (pleiotropía). Las citocinas son redundantes en su actividad, que significa que funciones similares pueden ser estimuladas por diferentes citocinas. Las citocinas se producen frecuentemente en una cascada, ya que una citocina estimula a sus células diana para producir citocinas adicionales. Las citocinas también pueden actuar sinérgicamente (dos o más citocinas que actúan juntas) o antagonísticamente (citocinas que causan actividades opuestas). Su corta semivida, bajas concentraciones plasmáticas, pleiotropía y redundancia complicaron todos el aislamiento y la caracterización de las citocinas.

15 Las citocinas son producidas por muchas poblaciones de células, pero los productores predominantes son los linfocitos T cooperadores (Th) y macrófagos. El grupo de citocinas más grande estimula la proliferación y diferenciación celular inmunitaria. Este grupo incluye interleucina 1 (IL-1), que activa linfocitos T; IL-2, que estimula la proliferación de linfocitos T y B activados por antígeno; IL-4, IL-5 e IL-6, que estimulan la proliferación y diferenciación de linfocitos B; interferón gamma (IFN γ), que activa macrófagos; e IL-3, IL-7 y factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF), que estimulan la hematopoyesis.

20 Además de GM-CSF y TNF- α , se ha mostrado que un amplio espectro de citocinas influye en el crecimiento y la diferenciación de progenitores de DC. Factores de crecimiento de acción temprana, tales como factor de células madre (SCF) y ligando Flt-3 (Flt-3L), apoyan y expanden el número de progenitores de DC, mientras que se ha mostrado que la IL-3 en combinación con GM-CSF potencia la diferenciación de DC. Además, el factor de crecimiento transformante (TGF)-beta1 potencia el desarrollo *in vitro* de DC tipo Langerhans.

25 En ciertas líneas dendríticas humanas como, por ejemplo, la línea celular MUTZ3, las células se diferencian en DC bajo la influencia de citocinas como GM-CSF, IL-4 y TNF-alfa, mientras que GM-CSF, TGF-beta1 y TNF-alfa también potencian el desarrollo *in vitro* de DC tipo Langerhans.

30 Factores solubles, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e IL-6, inhiben la diferenciación de progenitores de CD34 positivas en DC y redirigen su desarrollo hacia el linaje de monocitos-macrófagos. Es de notar que todos estos factores solubles inhibidores son secretados por células cancerosas, que sugiere que la prevención del desarrollo de DC a partir de células CD34+ pueden ser un mecanismo de escape tumoral de la respuesta inmunitaria.

35 Aunque cada vez hay más conocimiento con respecto a cómo de diferente se diferencian los progenitores bajo la influencia de diferentes compuestos, como las citocinas en diversos tipos de DC, normalmente, sin embargo, el tiempo de cultivo es largo. Por ejemplo, las células CD34 positivas generalmente dan lugar a números aceptables de DC después de, por ejemplo, 14 días de cultivo líquido en presencia de GM-CSF más TNF- α .

40 Como se trata anteriormente, pueden aplicarse DC en el tratamiento de diversas enfermedades, que incluyen enfermedades tumorales, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunitarias. Sin embargo, cuando las DC recuperadas de células primarias van a usarse en tal tratamiento, la eficacia del tratamiento puede ser gravemente impedida ya que las DC o sus células precursoras pueden solo obtenerse de pacientes o donantes en cantidades muy bajas. Además, con los métodos actuales, la recuperación requiere mucho tiempo y el uso de reactivos caros, mientras que el rendimiento de DC obtenido puede ser muy pequeño.

Se han obtenido DC de células precursoras, tales como células madre o monocitos CD34 positivos, que maduran *in vitro* por estimulación adecuada con moléculas estimulantes para formar DC, aunque tales células precursoras son extremadamente raras tanto en sangre como tejido.

45 Hay gran un interés en la inmunoterapia específica activa con vacunas terapéuticas basadas en DC para el cáncer. Las DC han sido ampliamente investigadas como adyuvantes celulares para emplear el sistema inmunitario para defenderse del cáncer (véase, por ejemplo, Bull Cancer. 2008 Mar 1;95(3):320-6.)

50 El documento EP1419240 desvela el uso de una línea celular, MUTZ3, que puede diferenciarse en células dendríticas y que puede usarse como agente inmunoterapéutico o como parte de agentes inmunoterapéuticos en el tratamiento de enfermedades inmunitarias. Aunque tal línea celular podría resolver el problema de la disponibilidad de células suficientes, datos experimentales muestran que todavía se requieren al menos 6 a 7 días de cultivo bajo las condiciones correctas para obtener DC inmaduras y al menos 2 días adicionales para obtener DC maduras, requiriendo que usen citocinas caras.

55 El documento WO2006/012359 desvela un método de inducción de la diferenciación de monocitos de sangre en células dendríticas presentadoras de antígenos funcionales. En resumen, las células se tratan por perturbación física, opcional en presencia de, por ejemplo, agentes efectores de la enfermedad.

El documento EP1389234 desvela otro método de diferenciación de células dendríticas linfoides de células madre hematopoyéticas humanas. Las células se diferencian en dos etapas, en un primer medio que comprende GM-CSF y en un segundo medio que contiene IFN-gamma. El cultivo puede durar hasta dos semanas.

5 El documento WO2008/036421 describe el uso de un extracto de reishi para aumentar la expresión de marcadores de células dendríticas (inmaduros) como CD1a y CD83 en un sujeto humano.

El documento WO2008/02882 describe un método de producción de células de Langerhans o células dendríticas intersticiales a partir de monocitos CD14 positivos que comprende poner dichos monocitos en presencia de un entorno de células que comprende células epiteliales y similares.

10 El documento WO2004/076651 describe un método de diferenciación de precursores de células dendríticas monocíticas en células dendríticas inmaduras que comprende poner en contacto precursores de células dendríticas no activados con un medio complementado con GM-CSF en ausencia de citocinas adicionales.

El documento WO2004/083392 desvela un método de inducción de la diferenciación de monocitos en sangre en células presentadoras de antígenos dendríticas funcionales, usando fuerzas resultantes del flujo de monocitos a través de un aparato que tiene canales de plástico.

15 El documento US2004/0009596 describe el uso de un extracto de un mejillón verde indio para la diferenciación y maduración de células dendríticas, y el extracto se sugiere como una sustitución de GM-CSF.

El documento US2005/0008623 describe el uso de monocitos CD14 positivos para obtener diversos tipos de células dendríticas. La diferenciación se efectúa por GM-CSF y TGFbeta 1 (e IL13).

20 A partir de lo anterior será evidente para el experto en la materia que hay una necesidad de mejora adicional de los métodos disponibles para la producción de DC a partir de células progenitoras. En particular, parece haber una necesidad de métodos que permitan la diferenciación acelerada (y maduración) de DC, acortando así el tiempo requerido para el cultivo y, por consiguiente, reducir los costes de tal cultivo reduciendo la cantidad de medio y, por ejemplo, las citocinas requeridas para obtener tal DC funcional.

Sumario de la invención

25 El problema anteriormente mencionado se resuelve por la materia como se expone en cualquiera de las reivindicaciones adjuntas.

Se ha descubierto de manera sorprendente que las células CD34 positivas pueden diferenciarse y opcionalmente posteriormente madurar en diversas DC dentro de un periodo de tiempo que es ventajosamente más corto en comparación con los métodos conocidos en la técnica.

30 En particular, el problema anteriormente mencionado se resuelve por un método para la producción de células dendríticas en el que las células CD34 positivas se ponen en contacto con una antraciclina y/o una antracenodiona. De esta forma se logra una producción acelerada en comparación con métodos según el estado de la técnica que no ponen en contacto células con una antraciclina y/o una antracenodiona.

35 Con el método según la invención, pueden así obtenerse células diferenciadas en periodos de tiempo más cortos, que puede ser importante para el uso de estas células en inmunoterapia con vacunas terapéuticas basadas en DC.

Se encontró que las células obtenibles por el método según la invención presentaban un aumento de la expresión de HLA-DR.

Descripción detallada de la invención

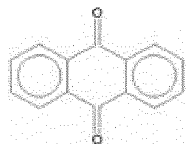
40 La invención proporciona un método *in vitro* para la producción acelerada de células dendríticas en un medio de cultivo que comprende las etapas de poner en contacto células CD34 positivas con una antraciclina y/o una antracenodiona durante un periodo de entre 1 y 7 días, dejar que las células CD34 positivas se diferencien en células dendríticas y obtener dichas células dendríticas del medio de cultivo. El experto en la materia conoce el significado del término "células CD34 positivas". Se refiere a células primarias o líneas celulares que expresan CD34 sobre la superficie celular. Tales células son conocidas por su capacidad para diferenciar en DC.

45 El término "poner en contacto" o "puestas en contacto" debe entenderse como que las células están en contacto físico y directo con la antraciclina y/o antracenodiona y se deja que interaccionen durante un tiempo suficiente para que la antraciclina y/o antracenodiona induzca y/o presente su efecto de aceleración. En la práctica, por ejemplo, la antraciclina y/o antracenodiona pueden añadirse al medio de cultivo usado para mantener y/o cultivar y/o diferenciar las células CD34 positivas en una DC.

50 Las antraciclinas y antracenodionas son conocidas para el experto en la materia. Las antraciclinas, además de las antracenodionas, inhiben la síntesis de ADN y ARN intercalándose entre pares de bases de una hebra de ADN/ARN, previniendo así la replicación de células cancerosas que crecen rápidamente. También crean radicales de oxígeno

libre mediados por hierro que dañan el ADN y las membranas celulares. Las antraciclina y antracenodionas también son capaces de inhibir las enzimas topoisomerasas II, previniendo el alivio de estrés de torsión en ADN durante la replicación del ADN.

En términos estructurales, las antraciclina y antracenodionas pueden definirse como moléculas que comprenden una estructura de antraquinona como se representa en la siguiente fórmula 1:



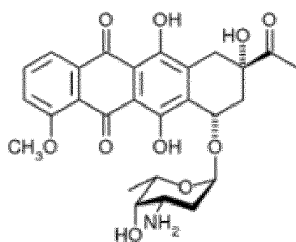
Fórmula 1

La unidad de antraquinona básica puede decorarse con diversas cadenas laterales. El experto conocerá las posiciones exactas donde tales cadenas laterales pueden unirse para obtener antraciclina y antracenodionas funcionalmente activas. Procedimientos para la síntesis de antraciclina y antracenodionas funcionales también se conocen en la técnica. También están disponibles en la materia sistemas de prueba *in vitro* para determinar la funcionalidad de antraciclina y antracenodionas.

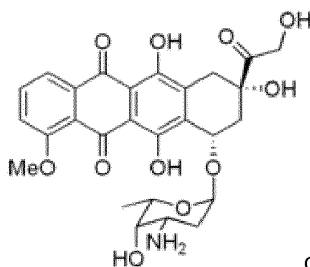
La invención también se refiere al uso de análogos de antraciclina y antracenodionas. Tales análogos están comprendidos dentro del término antraciclina y antracenodionas y tales análogos pueden consistir en estructuras químicamente modificadas de antraciclina y antracenodionas como se describen y ejemplifican en el presente documento que todavía retienen su funcionalidad original.

Miembros muy conocidos de la familia de las antraciclina y antracenodionas son compuestos con una estructura de anillo de tetrahidronaftacenodionas unida por un enlace glucosídico a un amino-azúcar, por ejemplo daunorubicina.

Estructuras de algunas antraciclina importantes tales como daunorubicina y doxorubicina se muestran a continuación.

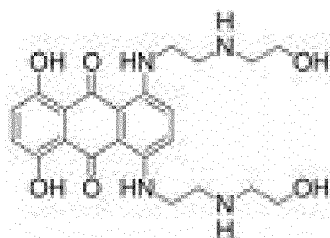


daunorubicina



doxorubicina

Las antracenodionas también comprenden una estructura de antraquinona básica. El anillo de antraceno puede estar sustituido en cualquier posición, excepto en los grupos cetona. La estructura molecular de la mitoxantrona, la antracenodionas clínicamente más importante, se muestra a continuación.



mitoxantrona

Ferlini et al., *Pharmacology and Toxicology* 89: 231-236 (2001) describen el cultivo de células CD34+ *in vitro* en presencia de doxorubicina durante 4 horas (página 232, segunda columna, línea 21). Los resultados muestran que la

doxorubicina tiene un potente efecto tóxico a todas las concentraciones usadas (página 235, primera columna, línea 25).

Zibera et al., *Haematologica* 84: 924-929 (1999), Bengala et al., *Cancer* 82: 867-873 (1990) y Ferrari et al., *Cancer Immunol. Immunotherapy* 52:359-366 (2003) describen métodos *in vivo* para la terapia del cáncer.

- 5 Neuhaus et al., *J. Neuroimmunol.* 168: 128-137 (2005) describen los efectos de la mitoxantrona sobre DC en cultivos *in vitro*. Enseña que la mitoxantrona induce muerte celular apoptótica y necrótica (página 133, capítulo 3.4) y que la mitoxantrona inhibe la maduración de células dendríticas (página 133, capítulo 3,5).

10 El documento WO2007/011693 enseña métodos de generación de composiciones terapéuticamente útiles para el tratamiento de pacientes con cáncer. Preparaciones que incluyen células CD34+ se administran *in vivo* a un paciente en necesidad de un tratamiento tal.

El documento WO 2005/026318 desvela un método de producción de una respuesta antigénica en la que células dendríticas se ponen en contacto con un antígeno y un agente de activación tal como doxorubicina con el fin de crear una respuesta antigénica *in vitro*.

15 El método según la invención proporciona la ventaja que, como consecuencia del tiempo de cultivo más corto requerido, se reduce la necesidad de productos químicos como citocinas y medio de crecimiento y similares, haciendo la producción de las células menos costosa y requiriendo menos productos químicos que van a usarse y desecharse.

20 El experto en la materia entenderá que el método según la invención puede realizarse preferentemente usando células aisladas en un medio de cultivo, es decir, cultivando células usando técnicas comunes en el campo, y como se muestra, por ejemplo, en los ejemplos.

El término "células aisladas" debe entenderse a este respecto como células que se aíslan de su entorno natural, preferentemente células que son del mismo linaje, fenotipo y/o genotipo, tales como células cultivadas o líneas celulares.

25 La invención se refiere, por tanto, a un método como se ha descrito anteriormente, en el que células CD34 positivas aisladas se ponen en contacto con una antraciclina y/o una antracenodiona en un medio de cultivo.

Ejemplos de antraciclinas y antracenodionas que pueden usarse ventajosamente en el método según la invención incluyen daunorubicina, doxorubicina, pirarubicina, aclarubicina, epirubicina, oxaunomicina, idarubicina y mitoxantrona.

30 Un método preferido según la invención es un método en el que la antraciclina y/o una antracenodiona están seleccionadas del grupo que consiste en daunorubicina, doxorubicina, pirarubicina, aclarubicina, epirubicina, oxaunomicina, andidarubicina y mitoxantrona.

Mitoxantrona, daunorubicina y doxorubicina son los compuestos preferidos que van a usarse.

35 En general, cualquier periodo de poner en contacto las células con una antraciclina y/o una antracenodiona, y que reduzca el tiempo requerido para obtener células dendríticas en comparación con la circunstancia en la que las células se cultivaran en ausencia de dicha antraciclina, es un periodo adecuado para poner en contacto las células. Tal periodo de poner en contacto puede ser fácilmente determinado por el experto en la materia, por ejemplo simplemente comparando el tiempo que se requiere para obtener una cierta etapa de desarrollo de la célula dendrítica en ausencia de dicha antraciclina con el tiempo requerido para obtener la misma etapa de desarrollo en presencia de dicha antraciclina.

40 En una realización del método según la invención, las células CD34 positivas se ponen en contacto con una antraciclina y/o una antracenodiona durante un periodo de entre 1 y 7 días, preferentemente entre 1,5 y 5 días e incluso más preferentemente entre 2 y 4 días.

45 Se ha encontrado que células puestas en contacto con una antraciclina y/o una antracenodiona durante el tiempo anteriormente descrito pueden diferenciarse en células dendríticas que pueden ser completamente funcionales, en menos tiempo del que sería posible sin la adición de antraciclina y/o una antracenodiona. Esto se ejemplifica adicionalmente en los ejemplos.

50 Las células obtenidas con el método según la invención pueden ser células dendríticas completamente funcionales, como se ve de los ejemplos. Se muestra en el presente documento que las células maduras obtenidas con el método según la invención son funcionales con respecto a, por ejemplo, la migración hacia CCL19 y CCL21 y la inducción de activación y proliferación de linfocitos T intactos.

El efecto de aceleración anteriormente descrito puede obtenerse únicamente poniendo en contacto una célula CD34 positiva con una antraciclina y/o una antracenodiona, como se ejemplifica en las Figuras 1 y 4. Sin embargo, la presencia de un compuesto inductor de la diferenciación adicional como una citocina también puede contribuir a la

diferenciación acelerada de las células CD34 positivas en diversas DC. Adicionalmente, la presencia de un compuesto adicional capaz de inducir la maduración de las células dendríticas garantiza la rápida maduración de las células.

5 El experto en la materia sabe que el término "compuesto que es capaz de inducir la diferenciación de las células" o "compuestos inductores de la diferenciación" se refiere a tal compuesto que, solo o en combinación específica, puede inducir, cuando está presente en cantidades suficientes en, por ejemplo, medio de cultivo, la diferenciación de célula precursora dendrítica en o hacia células dendríticas.

10 Ejemplos muy conocidos incluyen, pero no se limitan a, tales moléculas químicas y biológicas que influyen en la diferenciación de células, tales como citocinas (IL-1b, IL-3, IL-4, IL-6, PGE-2, TNF-alfa, TGF-beta 1), factores de crecimiento (por ejemplo, GM-CSF) y moléculas sustitutas para citocinas o factores de crecimiento que inducen un efecto biológico comparable al de las propias moléculas estimulantes, tales como, por ejemplo, anticuerpos u otras moléculas biológicas tales como LPS o polyIC.

15 La invención, por tanto, se refiere a un método como se ha descrito anteriormente en el que al menos un compuesto capaz de inducir la diferenciación de las células dendríticas está presente en el medio de cultivo. Ventajosamente, un compuesto tal que es capaz de inducir la diferenciación de las células dendríticas está seleccionado del grupo que consiste en IL-1b, IL-3, IL-4, IL-6, PGE-2, TNF-alfa, TGF-beta 1 y GM-CSF.

20 Por ejemplo, ya se obtuvieron células dendríticas completamente diferenciadas en el día 4 cuando células MUTZ3 se incubaron con mitoxantrona en presencia de citocinas, mientras que cuando las células MUTZ3 se cultivaron en ausencia de tal antraciclina, pero en presencia de citocinas, solo en el día 8 - 10 se obtuvieron células completamente diferenciadas. Esta aceleración de la diferenciación como consecuencia de la presencia de antraciclinas en el sistema también se observa para progenitores CD34 positivos aislados de un sujeto humano.

25 También se observó diferenciación cuando células precursoras CD34 positivas se incubaron con solo antraciclinas y/o antracenodionas, es decir, en ausencia de citocinas. Esto se ilustra en la Figura 1B, donde se muestra que una población de células precursoras CD34 positivas se diferenció en células CD14, CD1a, langerina y CD80 positivas cuando se expuso a mitoxantrona.

30 El experto en la materia entenderá que las células pueden ponerse en contacto con el al menos un compuesto que es capaz de inducir la diferenciación celular tanto simultáneamente con la antraciclina y/o antracenodiona (y que se prefiere por motivos prácticos) como antes o después de que las células se hayan puesto en contacto con la antraciclina y/o antracenodiona. Aunque no se prefiere desde un punto de vista práctico, puede incluso preverse que la puesta en contacto con la antraciclina y/o antracenodiona y la puesta en contacto con el compuesto capaz de inducir la diferenciación hacia células dendríticas se produzca en un modo alternativo.

35 Se han obtenido resultados particularmente ventajosos con un método según la invención en el que las células se pusieron en contacto con al menos un compuesto que es capaz de inducir la diferenciación celular seleccionada del grupo que consiste en GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos), TNF-alfa (factor de necrosis tumoral alfa), IL-4 (interleucina 4), TGF-beta 1 (factor de crecimiento transformante beta) o combinaciones de los mismos.

40 Incluso más en particular, la combinación de GM-CSF, IL-4 y TNF-alfa o la combinación TGF-beta, GM-CSF y TNF-alfa puede usarse ventajosamente en el método según la invención, es decir, en combinación con una antraciclina y/o antracenodiona, por ejemplo mitoxantrona, para obtener células dendríticas. Tales células pueden obtenerse en un periodo de tiempo más corto en comparación con un método en el que las células CD34 positivas no se ponen en contacto con tal antraciclina y/o antracenodiona.

Además, se ha demostrado que las células obtenidas son completamente funcionales como células dendríticas, como puede derivarse del hecho de que las células obtenidas migran hacia CCL19 y CCL21, promueven la proliferación de linfocitos T y la sensibilización de linfocitos T específicos de antígeno (véanse los ejemplos).

45 Con el fin de obtener células dendríticas completamente maduras, las células pueden, por tanto, después de o en el momento en que se ponen en contacto con la antraciclina y/o antracenodiona en un método según la invención, tratarse adicionalmente con al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en TNF-alfa, IL-6, PGE-2 o IL-1beta o combinaciones de los mismos. Tal tratamiento permitirá obtener células dendríticas maduras a partir de células dendríticas inmaduras.

50 El experto en la materia conoce métodos disponibles en la materia para obtener células dendríticas maduras a partir de, por ejemplo, células dendríticas inmaduras. Por ejemplo, pueden madurarse células dendríticas inmaduras (incluyendo células dendríticas de tipo Langerhans inmaduras) añadiendo TNF-alfa, IL-6, IL-1beta y prostaglandina E2, aunque asimismo pueden emplearse otros métodos conocidos en la técnica para madurar células dendríticas inmaduras.

55 La invención, por tanto, se refiere a un método como se ha descrito anteriormente en el que al menos un compuesto capaz de inducir la maduración de las células dendríticas está presente en el medio de cultivo.

La maduración puede ser vista, por ejemplo, por la expresión del marcador de maduración CD83 (Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A (2002)). Las células así obtenidas son completamente funcionales como células dendríticas como puede verse del hecho de que las células obtenidas migran hacia CCL19 y CCL21, y promueven la proliferación de linfocitos T (véanse los ejemplos).

- 5 Es, por tanto, una realización preferida del método según la invención que las células que se tratan con una antraciclina y/o antracenodiona, y opcionalmente con otro compuesto que es capaz de inducir la diferenciación de las células, se pongan en contacto con un compuesto que es capaz de madurar células dendríticas inmaduras, tales como células dendríticas de Langerhans inmaduras.

- 10 Así pueden obtenerse resultados particularmente ventajosos con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en TNF-alfa, IL-6, IL-1beta y prostaglandina E2, preferentemente cuando estos compuestos se usan en combinación (véanse los ejemplos).

En otra realización preferida del método según la invención, las células dendríticas obtenidas son células dendríticas intersticiales, células dendríticas plasmatoideas, células dendríticas de Langerhans, células dendríticas maduras o células dendríticas inmaduras.

- 15 El experto sabe cómo discriminar entre tales tipos de células dendríticas diferentes, un método tal se describe en detalle, por ejemplo, en el documento US2004265998 y en los ejemplos de más adelante.

Por ejemplo, las células dendríticas inmaduras pueden caracterizarse por la expresión inducida de CD1a y/o DCsign, una característica importante de células dendríticas inmaduras sobre la superficie de la célula. Al mismo tiempo, tales células pueden caracterizarse por la ausencia o baja expresión de CD83.

- 20 Las células de Langerhans se caracterizan por la expresión de tanto langerina como CD1a, y pueden inducirse bajo la influencia de TGF-beta 1 (Caux et al. 1997, Blood 90 (4), 1458-1470).

Células dendríticas plasmacitoides se describen, por ejemplo, por McKenna K, Beignon A, Bhardwaj N (2005). "Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity". J. Virol. 79 (1): 17-27. Por ejemplo, expresan BDCA2 (CD303) y/o CD123, mientras que son CDLC negativas.

- 25 En otra realización preferida del método según la invención, las células CD34 positivas son células MUTZ3 CD34 positivas, células humanas CD34 positivas o células tumorales CD34 positivas.

Se ha encontrado que estas células pueden utilizarse ventajosamente en el método según la invención.

MUTZ3 es un modelo de línea celular humana para la diferenciación inducida por citocinas de célula dendrítica de precursores CD34 positivos y se describe en detalle en, por ejemplo, el documento US2004265998.

- 30 Las células CD34 positivas de seres humanos, es decir, de seres humanos que padecen tumores, pueden aislarse de, por ejemplo, sangre como se describe en los ejemplos.

Se ha descubierto de manera sorprendente que las líneas celulares, como MUTZ3, y células primarias de ser humano pueden usarse ventajosamente como células CD34 positivas en el método según la invención. Así pueden obtenerse células dendríticas funcionales, ya que pueden derivarse del hecho de que las células maduras obtenidas con un método según la invención migran hacia CCL19 y CCL21, promueven la proliferación de linfocitos T y la sensibilización de linfocitos T específicos de antígeno. También mostraron la expresión característica de marcadores de la superficie celular como, por ejemplo, CD83 de CD1a. Aquellas células podrían obtenerse en un periodo que es significativamente más corto en comparación con un método de obtención de tales células dendríticas, pero que no incluye poner en contacto dichas células CD34 positivas con antraciclina y/o antracenodiona.

- 40 En una realización preferida de la invención, se ponen en contacto células MUTZ3 con mitoxantrona 0,05 nM a 20 nM y/o doxorubicina 10 a 120 nM, en presencia de 50 a 150 ng/ml de GM-CSF, de 5 a 20 ng/ml de IL-4 y de 0,5 a 4 ng/ml de TNF-alfa. Un método tal da ventajosamente células dendríticas tipo intersticiales.

- 45 En otra realización preferida de la invención, las células MUTZ3 se ponen en contacto con mitoxantrona 0,05 nM a 20 nM y/o doxorubicina 10 a 120 nM, en presencia de 5 a 20 ng/ml de TGF-beta 1, de 50 a 150 ng/ml de GM-CSF y de 0,5 a 4 ng/ml de TNF-alfa. Un método tal da células dendríticas de tipo Langerhans.

Las características y ventajas de las células así obtenidas se muestran en los ejemplos de más adelante.

- 50 En el presente documento también se proporciona un método en el que las células se ponen en contacto con al menos una antraciclina y/o una antracenodiona, seleccionadas preferentemente del grupo que consiste en daunorubicina, doxorubicina, pirarubicina, aclarubicina, epirubicina, oxaunomicina, andidarubicina y mitoxantrona, y en el que la antraciclina y/o antracenodiona se aplica a las células a una concentración que oscila de la concentración C120 a la concentración C180, preferentemente que oscila de la concentración C130 a la concentración C170 (como se determina como explica en los ejemplos).

En el presente documento también se describen células dendríticas obtenibles por el método según la invención. Estas células se caracterizan por un aumento de la expresión de HLA-DR, en comparación con células obtenidas por el mismo método, pero sin poner en contacto las células con una antraciclina. Esto se ejemplifica en la sección de ejemplos, y se muestra en la Figura 6.

5 El término "un aumento de la expresión de HLA-DR" debe interpretarse como que significa que las células obtenidas por un método según la invención tienen una expresión más alta de HLA-DR en comparación con las células cultivadas en un método según el estado de la técnica, es decir, sin la adición de una antraciclina y/o una antracenediona. La expresión de HLA-DR es un factor importante con respecto a las células T colaboradoras.

10 En el presente documento también se describe el uso de una antraciclina y/o antracenediona, seleccionadas preferentemente del grupo que consiste en daunorubicina, doxorubicina, pirarubicina, aclarubicina, epirubicina, oxauomicina, andidarubicina y mitoxantrona, en la fabricación de un medicamento para tratar trastornos inmunológicos en sujetos en necesidad del mismo, en particular para tratar trastornos inmunológicos acelerando la respuesta inmunitaria.

15 Se ha encontrado que cuando tal antraciclina y/o antracenediona se administra por vía local, por ejemplo mediante inyección en un cuerpo humano, y en particular en combinación con las citocinas capaces de inducir la diferenciación hacia DC, puede inducirse una buena respuesta inmunitaria acelerada en el sujeto humano que va a tratarse.

20 Es muy conocido para el experto en la materia que puedan usarse DC en vacunas contra el cáncer. Como las células obtenidas por el método según la invención son completamente funcionales y pueden obtenerse en un periodo de tiempo más corto, es decir, de un modo acelerado, tales células (y los métodos de obtención de tales células) son particularmente ventajosos en terapias dirigidas a tratar tales cánceres. En el tratamiento de cánceres, se prefiere la administración intradérmica de la composición. Esta vía de administración es óptima, ya que expone la antraciclina y/o la antracenediona directamente a células dendríticas dérmicas que residen localmente, además de a células dendríticas de ganglios linfáticos mediante el drenaje linfático. Cuando se administran mediante la vía intravenosa convencional, la presencia de arrolladores números de células irrelevantes tales como glóbulos rojos en la circulación previene este efecto.

25 También se describe en el presente documento el uso de las células obtenibles por un método según la invención en las terapias de vacunación contra el cáncer o terapia auto-inmune. En otras palabras, las células obtenidas de cualquiera de los métodos según la invención pueden usarse para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer o enfermedades autoinmunitarias.

30 Leyenda de las figuras

Figura 1: Se cultivaron progenitores de MUTZ3 durante 72 horas en presencia de mitoxantrona y se analizaron para expansión (Figura 1A) y para la expresión de marcadores de DC (Figura 1 B).

35 Figura 2: Nivel de apoptosis y muerte celular tras el tratamiento con PBS o mitoxantrona dentro de las tres subpoblaciones de MUTZ3, que se habían separado por clasificación magnética con perlas basada en CD14 o CD34 (MACS).

Figura 3: Análisis fenotípico de los efectos de la mitoxantrona o doxorubicina sobre las células MUTZ3.

Figura 4: Representaciones de FSC/SSC de LC de día 4 cultivadas con PBS o mitoxantrona y expresión de CD1a/langerina de estos cultivos

40 Figura 5: El tratamiento con mitoxantrona produjo la pérdida de la mayoría de las células CD34 positivas y un aumento en las células CD14 positivas (Figura 5A). En presencia de citocinas distorsionadas hacia LC, la adición de mitoxantrona 16,7 nM indujo un aumento en el porcentaje de células CD1a⁺ langerina⁺ en el plazo de 72 horas (Figura 5B).

45 La Figura 6 muestra los porcentajes de células que expresan CD1a, DC-SIGN, langerina, CD80, CD40 y CD83 y las intensidades medias de fluorescencia de CD80, CD86, CD40 y HLA-DR de MUTZ3-DC/LC de día 7 maduras y MUTZ3-DC/LC de día 4 maduras diferenciadas en ausencia o presencia de mitoxantrona.

Figura 7: MUTZ3-DC cultivadas en ausencia o presencia de mitoxantrona se analizaron en un ensayo Transwell para su capacidad para migrar hacia las quimiocinas CCL19 y CCL21 (Figura 7A) y se probaron en una MLR para su capacidad para estimular la proliferación de linfocitos T (Figura 7B).

50 Figura 8: MUTZ3-DC cultivadas en presencia de mitoxantrona durante 4 días y cultivos de MUTZ3-DC de d7 de control se analizaron para su capacidad para sensibilizar linfocitos T específicos de antígeno de tumor. Se cargaron MUTZ3-mDC de d7 y mitox-mDC de d4 con péptidos MART1 (26-35L) y se analizaron para su capacidad para sensibilizar linfocitos T CD8⁺ específicos de MART1 dentro de linfocitos T seleccionados para CD8beta positivas a partir de un donante sano HLA-A2 positivo. Se empezaron seis cultivos con cada tipo de

célula DC. Después de la estimulación de DC primarias cargadas con péptido, los linfocitos T se re-estimularon con DC cargadas con péptido después de 10 y 17 días y se analizó la presencia de linfocitos T CD8+ específicos de MART por medio de tinción de tetrámero de MART después de la primera y la segunda re-estimulación. Los porcentajes de linfocitos T CD8+ específicos de MART1 dentro de cada uno de los seis cultivos de los dos tipos de DC se representan en la figura (representado por los puntos). d4 mitox-mDC fueron tan capaces como los cultivos de d7-mDC tradicionales en sensibilizar los linfocitos T CD8+ específicos de MART1. El porcentaje promedio de linfocitos T CD8+ específicos de MART1 dentro de los seis cultivos se representa por la raya.

Ejemplos

10 Ejemplo 1: Materiales y métodos

Productos químicos:

Todos los productos químicos y fármacos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), excepto Ko-143 que fue amablemente proporcionado por Dr. Allen (Instituto del Cáncer de Los Países Bajos, Ámsterdam, Los Países Bajos) y se ha descrito antes (van Loevezijn A., (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11, 29-32) y la doxorubicina, que se compró de Farmitalia Carlo Erba (Bruselas, Bélgica).

Cultivo celular:

Se cultivó la línea celular MUTZ3 CD34+ derivada de AML como se ha descrito antes (Masterson A.J. (2002) Blood 100, 701-703.). En resumen, se cultivaron progenitores MUTZ3 en MEM-alfa (medio esencial mínimo, Gibco) que contenía 20 % de suero bovino fetal (FCS), 100 UI/ml de penicilina sódica, 100 microg/ml de estreptomocina, L-glutamina 2 mM (pen/estrep/glut), beta-mercaptoetanol 50 microM (2ME) y 10 % de medio acondicionado 5637 (medio rutinario de MUTZ3) en placas de 12 pocillos (Co-star) a una concentración de 0,2 millones de células/ml y se sometieron a pases dos veces a la semana. Se cultivaron LC en MEM-alfa que contenía 20 % de FCS, pen/estrep/glut, 2ME y 10 ng/ml de TGF-beta 1 (Biovision, Mountain View, CA), 100 ng/ml de rhGM-CSF (Sagramostim, Berlex) y 2,5 ng/ml de TNFalfa (Strathmann Biotec) (medio de MUTZ3-LC) durante 10 días en placas de 12 pocillos a una concentración de 0,1 millones de células/ml, añadiendo citocinas en el día 0, 4 y 7. Se cultivaron DC intersticiales en MEM-alfa que contenía 20 % de FCS, pen/estrep/glut, 2ME y 10 ng/ml de IL-4 (R&D), 100 ng/ml de rhGM-CSF y 2,5 ng/ml de TNFalfa (medio de MUTZ3-DC). Si procede, se maduraron DC y LC inmaduras, respectivamente, añadiendo 50 ng/ml de TNFalfa, 100 ng/ml de IL-6 (Strathmann Biotec), 25 ng/ml de IL-1beta (Strathmann Biotec) y 1 microg/ml de prostaglandina E2 (PGE2) (Sigma Aldrich) durante 48 horas.

Para cultivos de mitoxantrona y doxorubicina, se sembraron 0,1-0,2 millones células/ml de progenitores de MUTZ3 o subconjuntos de MUTZ3 de clasificación magnética con perlas de CD34+, CD14+ y doble negativas (DN) (MACS) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) en placas de 12 pocillos en medio rutinario de MUTZ3 o medio de MUTZ3-DC/LC en ausencia o presencia de mitoxantrona 1,04 nM, 2,08 nM, 5,6 nM, 16,7 nM o doxorubicina 16,7 nM o 100 nM y se cultivaron durante 72-96 horas antes de la cuantificación de células viables por exclusión con azul de tripano y caracterización fenotípica por citometría de flujo. Se maduraron DC y LC (como antes) en el día 3 o 4 durante 24 horas y se probaron funcionalmente en reacción de leucocitos mixtos o ensayos de migración. En caso de inhibición de transportadores de ABC, se añadió Ko-143 200 nM en el día 0 para bloquear la actividad de BCRP.

Células progenitoras hematopoyéticas CD34+

Se aislaron células progenitoras hematopoyéticas CD34+ de sangre y se expandieron durante 2-5 semanas con 25 ng/ml de ligando de tirosina cinasa-3 tipo fms (Flt3-L) y 10 ng/ml de factor de células madre (SCF) como se ha descrito previamente (Bontkes H.J., de Gruijl T.D., Schuurhuis G.J., Scheper R.J., Meijer C.J., & Hooijberg E. (2002) Expansion of dendritic cell precursors from human CD34(+) progenitor cells isolated from healthy donor blood; growth factor combination determines proliferation rate and functional outcome. J. Leukoc. Biol. 72, 321-329). Para estudiar el efecto de la mitoxantrona sobre estas células, células progenitoras CD34+ expandidas descongeladas se cultivaron con mitoxantrona 16,7 nM durante 72 horas en presencia de 10 ng/ml de Flt3-L y SCF (factor de células madre). Para estudiar los efectos sobre la diferenciación de LC, se cultivaron progenitores CD34+ con mitoxantrona 16,7 nM durante 72 horas en presencia de 100 ng/ml de GM-CSF, 10 ng/ml de TGFbeta y 2,5 ng/ml de TNFalfa. Después de 72 horas, se realizó análisis fenotípico por citometría de flujo.

Transferencia Western

Se lisaron sedimentos de células en tampón de lisis frío en hielo (EDTA 1 mM; 1 % de NP-40; PMSF 1 mM), se mantuvo sobre hielo durante una hora, se sonicó y se guardó a -20 °C hasta uso posterior. Las concentraciones de proteína se determinaron con un ensayo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad, Richmond, CA). Las proteínas se fraccionaron sobre un gel al 8 % de poliacrilamida y posteriormente se transfirieron a filtro de nitrocelulosa por electrotransferencia. Para la detección de BCRP, se bloquearon filtros (PBS que contiene 1 % de BSA, 1 % de leche en polvo y 0,05 % de Tween-20) durante la noche y posteriormente se incubaron con el mAb Bxp-53 (0,5 µg/ml) (véase, por ejemplo, J. Vet. Pharmacol. Ther. 2006 Vol 29(4) p 279-87) en tampón de bloqueo durante dos horas. Se

visualizó la inmunorreactividad con inmunoglobulina de conejo-anti-rata conjugada con HRP, seguido de desarrollo de color con $0,5 \text{ g l}^{-1}$ de tetraclorhidrato de 3,3'-diamino-bencidina, $0,15 \text{ g l}^{-1}$ de cloronaftol y $0,02 \%$ de H_2O_2 en PBS.

Análisis inmunofenotípicos por citometría de flujo

5 Se inmunofenotipificaron células usando los siguientes mAb conjugados con FITC y/o PE reactivos contra: CD1a (1:25), CD54 (1:25), CD80 (1:25), CD86 (1:25), CD40 (1:10) (PharMingen, San Diego, CA), CD14 (1:25), HLA-DR (1:25), DC-SIGN (1:10) (BD Biosciences, San Jose, CA), CD83 (1:10), CD34 (1:10), langerina (1:10) (Immunotech, Marsella, Francia). En resumen, 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 de control específicos o correspondientes durante 30 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Si procede, se añadieron anexina V y/o PI (yoduro de propidio) después de la tinción con marcador y 10 minutos antes del análisis. Se lavaron las células y se analizaron en un citómetro de flujo FACS-calibur (Becton and Dickinson, San Jose, CA) equipado con el software de análisis CellQuest y los resultados se expresaron como la intensidad media de fluorescencia o la mediana o el porcentaje de células positivas.

Reacción de leucocitos mixtos (MLR)

15 Se co-cultivaron $1 \cdot 10^2$ - $3 \cdot 10^4$ DC con $1 \cdot 10^5$ linfocitos de sangre periférica durante 4 días en placas de 96 pocillos en IMDM (medio Dulbecco modificado con Iscove) que contenía 10% de suero reunido humano (HPS), pen/estrep/glut y 2ME. En el día 4, se añadieron $2,5 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]-timidina ($6,7 \text{ Ci/mmol}$, MP Biomedicals, Irvine, CA) por pocillo durante 16 horas. Las placas se recogieron sobre esteras de filtro de fibra de vidrio (Packard Instruments, Groningen, Los Países Bajos) usando un recolector de células Skatron (Skatron Instruments, Noruega) y se cuantificó la incorporación de [^3H]-timidina usando un contador Topcount NXT Microbeta (Packard, Meriden, CT).

Sensibilización de CTL in vitro

25 Se realizó la sensibilización *in vitro* de CTL específicos de MART1 como se ha descrito previamente (Santegoets SJAM. (2006) Cancer Immunol Immunother. 55,1480-1490.) En resumen, se cargaron d7 MUTZ3-DC y d4 mitox-DC maduras a una concentración de $1,0$ millón de células/ml, con $1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de péptido MART1 26-35L en IMDM libre de suero durante 3-4 horas en presencia de $3 \text{ } \mu\text{g/ml}$ de $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2\text{M}$). Después de la carga, las células se irradiaron a 5000 rad , se lavaron y se concentraron a $0,2$ millones de células/ml en medio Yssels (Yssel H. (1984) J Immunol Methods. 72,219-227) complementado con 2% de suero hAB (ICN Biochemicals), pen/estrep/glut, 2ME, 10 ng/ml de IL6 y 10 ng/ml de IL12 en placas de 24 pocillos. Se co-cultivaron $0,1$ millones de DC cargadas con $1,0$ millón de linfocitos T CD8 β^+ , aisladas de un donante de HLA-A2+ por clasificación magnética con perlas, y $0,75$ - $1,0$ millones de células CD8 β^- , irradiadas (5000 rad) del mismo donante, ambas se diluyeron en medio Yssels. Para cada condición de DC, se empezaron 6 pocillos de sensibilización y el experimento se realizó con 2 donantes de HLA-A2+ diferentes. En el día 10 y 19, las CTL se re-estimularon con 10 ng/ml de d7 MUTZ3-DC o d4 mitox-DC maduras cargadas con MART1 26-35L en presencia de 10 ng/ml de IL-7. En el día 12 y 21, se añadieron 10 UI/ml de IL-2 por pocillo. Se realizó el análisis de tetrámeros (Tm) de MART1 en linfocitos T CD8+ en el día 17 (después de la 1ª re-estimulación) y 24 (después de la 2ª re-estimulación) usando Tm de MART1 26-35L marcado con PE y APC.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de los datos usando la prueba de la T de Student bilateral para datos emparejados o independientes. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Ejemplo 2: Sensibilidad de células progenitoras de MUTZ3 a mitoxantrona

40 Se analizaron células progenitoras de MUTZ3 para su sensibilidad al fármaco citostático mitoxantrona. Este fármaco está todavía siendo usado en la clínica para tratar varios cánceres u otras enfermedades como esclerosis múltiple y se ha descrito que es un sustrato para el transportador de ABC relacionado con MDR. Se realizó un ensayo de citotoxicidad de 96 horas (exclusión con azul de tripano) para determinar el valor de CI_{50} para mitoxantrona en progenitoras de MUTZ3. Las células progenitoras de MUTZ3 fueron sensibles a mitoxantrona con un valor de CI_{50} de $1,5 \pm 0,5 \text{ nM}$ ($n=3$). (Un ejemplo de tal ensayo de azul de tripano es: poner un volumen adecuado de una suspensión de células en un tubo apropiado, añadir un volumen igual de $0,4 \%$ de azul de tripano y mezclar suavemente, dejar reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Poner $10 \text{ } \mu\text{l}$ de células teñidas en un hemocitómetro y contar el número de células viables (sin teñir) y muertas (teñidas). Calcular el número promedio de células sin teñir en cada cuadrante y multiplicar por $2 \cdot 10^4$ para encontrar células/ml. El porcentaje de células viables es el número de células viables dividido entre el número de células muertas y viables, y puede determinarse la CI_{50})

Ejemplo 3: La mitoxantrona induce la diferenciación de progenitores de MUTZ3

55 Estudiando los efectos citotóxicos de la mitoxantrona sobre los progenitores de MUTZ3, se observaron cambios morfológicos obvios a una concentración de mitoxantrona $5,6 \text{ nM}$ (CI_{60}) y $16,7 \text{ nM}$ (CI_{70}). Por lo tanto, se cultivaron progenitores de MUTZ3 durante 72 horas en presencia de estas concentraciones y se analizaron para la expansión (Figura 1A) y para la expresión de marcadores de DC (Figura 1B). El análisis reveló que, aunque comprometiendo espectacularmente la división celular, estas dosis de mitoxantrona condujeron a los progenitores de MUTZ3 supervivientes a diferenciación, ya que hubo una relación de $\text{CD}34^+/\text{CD}14^+$ alterada en favor del subconjunto de

CD14⁺ de diferenciación, expresión inducida por el tratamiento con mitoxantrona de los marcadores específicos de LC CD1a y langerina y elevados niveles de expresión de las moléculas coestimulantes CD86 y CD80 (Figura 1B). Se llevaron a cabo experimentos similares con el fármaco doxorubicina. Al igual que la mitoxantrona, la concentración de CI70 de doxorubicina (~100 nM) en MUTZ3 indujo la diferenciación de LC de progenitores de MUTZ3, mientras que no se observaron efectos cuando se añadió doxorubicina 16,7 nM (concentración equimolar a mitoxantrona).

La Figura 2 muestra el nivel de apoptosis y la muerte celular tras el tratamiento con PBS o mitoxantrona dentro de las tres subpoblaciones de MUTZ3, que se habían separado por clasificación magnética con perlas basada en CD14 o CD34 (MACS). Estuvo presente poca apoptosis o necrosis en los controles de PBS (Figura 2A). La población de CD14⁺ no estuvo afectada por el tratamiento con mitoxantrona, ya que estuvo presente una cantidad similar de células CD14⁺ positivas para anexina V después de 72 horas del tratamiento con PBS o mitoxantrona. CD34⁺, y a un menor grado la población de DN, fue sensible al fármaco. Sin embargo, a pesar de la muerte celular, un porcentaje de las células CD34⁺ proliferantes sobrevivió al tratamiento con mitoxantrona. Se obtuvieron resultados comparables con doxorubicina 100 nM.

Ejemplo 4: Células MUTZ3 CD34⁺, pero no CD14⁺, muestran diferenciación inducida por fármaco

Para ver si el efecto de distorsión era debido o no a la muerte de células CD34⁺, que conducen automáticamente a una relación CD34⁺/CD14⁺ alterada o si indujo o no la diferenciación de células CD34⁺ en células CD14⁺ y LC, se incubaron células CD34⁺ y CD14⁺ aisladas con mitoxantrona 16,7 nM o doxorubicina 100 nM durante 72 horas y se analizaron para la inducción de diferenciación.

El análisis fenotípico reveló que los efectos de mitoxantrona o doxorubicina sobre las células MUTZ3 podrían ser contribuidos a la población de CD34⁺ (Figura 3). Las células CD14⁺ no estuvieron afectadas por la incubación con mitoxantrona 16,7 nM o doxorubicina 100 nM, ya que no hubo alteraciones en los porcentajes de células CD1a⁺ o langerina⁺ entre las células tratadas con fármaco y el control de PBS (Figura 3A). Más células CD14⁺ estuvieron presentes en los cultivos de células CD34⁺ tras el tratamiento con ambos fármacos (Figura 3B) y el tratamiento con fármaco produjo la diferenciación de células clasificadas CD34⁺ en células CD1a⁺, de las que aproximadamente el 50 % también expresó el marcador de LC langerina (Figura 3B). Este efecto de diferenciación también podría visualizarse por la dispersión frontal/lateral (FSC/SSC), ya que un claro desplazamiento en SSC podría ser reconocido en las células CD34⁺ tratadas con fármaco, que no estaba presente en las células CD14⁺ tratadas con fármaco (Figura 3A y B). Los gráficos en la Figura 3C muestran la inducción promedio de CD1a y la expresión de langerina dentro de los dos subconjuntos aislados después de 72 horas de tratamiento con PBS, mitoxantrona o doxorubicina (n=3). No se observaron diferencias en la expresión de CD1a o langerina dentro del subconjunto de CD14⁺ entre las muestras tratadas con fármaco y de control de PBS. En el subconjunto de CD34⁺, la incubación con mitoxantrona 16,7 nM conduce a un aumento significativo en tanto la expresión de CD1a como de langerina (p= 0,02 para CD1a; p= 0,03 para langerina). La doxorubicina también indujo la expresión de CD1a y de langerina sobre células MUTZ3 CD34⁺.

Como la mitoxantrona es el sustrato mejor conocido para el transportador de ABC BCRP (ABCG2), los presentes inventores determinaron si la diferencia en la sensibilidad podría explicarse por un nivel de expresión diferente de BCRP entre las tres poblaciones. No pudo detectarse expresión de BCRP por análisis de transferencia Western en poblaciones de CD14⁺, CD34⁺ o DN (datos no mostrados). La adición del inhibidor de BCRP Ko-143 tampoco pudo suprimir la inducción de CD1a y la expresión de langerina en células MUTZ3 CD34⁺ después del tratamiento con mitoxantrona (Figura 3D), sugiriendo que los efectos observados fueron independientes de la actividad de BCRP.

Ejemplo 5: Mitoxantrona y doxorubicina aceleran la diferenciación de LC

A continuación, los presentes inventores probaron si la adición de mitoxantrona o doxorubicina al principio de los cultivos de MUTZ3-LC podría reforzar la diferenciación. La adición de una dosis única de mitoxantrona 16,7 nM en el día 0 de la diferenciación de MUTZ3-LC produjo células completamente diferenciadas con alta expresión de marcadores de LC específicos en el día 4, mientras que los cultivos de control normalmente necesitaron 8-10 días para diferenciarse completamente. En la Figura 4A, se representan representaciones FSC/SSC de LC de día 4 cultivadas con PBS o mitoxantrona y la expresión de CD1a/langerina en estos cultivos. Claramente, las LC tratadas con mitoxantrona se habían diferenciado adicionalmente, ya que presentaron una morfología más dendrítica en la representación de FSC/SSC y ya el 76 % de las células fue CD1a^{hi}Langerina⁺ en comparación con el 25 % en las células de control. Además de CD1a y langerina, estas células también mostraron expresión potenciada de las moléculas co-estimulantes CD80 y CD86 y tuvieron niveles de expresión más altos de HLA-DR y CD54. La Figura 4B muestra datos combinados de 3 experimentos para CD1a, langerina y CD83. Además del aumento significativo ya mencionado en el porcentaje de células que expresan CD1a y langerina (p= 0,02 y p= 0,01 respectivamente), también hubo una disminución significativa en el porcentaje de células CD14⁺ y CD34⁺ (p= 0,04 y p= 0,02, respectivamente) y un aumento significativo en la cantidad de células que expresan el marcador de maduración CD83 (p= 0,03).

Ejemplo 6: Progenitores hematopoyéticos de CD34+ responden a mitoxantrona

Para establecer si precursores de CD34⁺ humanos de sangre respondieron o no de un modo similar a mitoxantrona como las células MUTZ3 CD34⁺, precursores hematopoyéticos CD34⁺ aislados de sangre humana y expandidos durante un periodo de 1-4 semanas con el ligando Flt3 (Flt3L), trombopoyetina y factor de células madre (SCF) (Bontkes et al., J. Leukoc. Biol. 2002 Vol 72(2):321) se descongelaron de nitrógeno líquido y se trataron con mitoxantrona. El tratamiento con mitoxantrona produjo la pérdida de la mayoría de las células CD34⁺ y un aumento en las células CD14⁺ (Figura 5A). En presencia de citocinas de distorsión hacia LC, la adición de mitoxantrona 16,7 nM indujo un aumento en el porcentaje de células CD1a⁺ langerina⁺ en el plazo de 72 horas (Figura 5B) (n=2). A diferencia, cuando se realizaron experimentos similares con monocitos CD14⁺ aislados de sangre, en analogía con los datos de MUTZ3 CD14⁺, no hubo efecto sobre la viabilidad celular, ni se observó ninguna inducción de diferenciación.

Ejemplo 7: Las células cultivadas con mitoxantrona son funcionales

Con tales propiedades de aceleración de la diferenciación, la mitoxantrona podría ser un adyuvante adecuado para la rápida diferenciación *in vitro* de vacunas de DC para las estrategias de vacunación inmunoterapéutica. Por lo tanto, los presentes inventores analizaron si la concentración de mitoxantrona podría reducirse sin perder la ventaja de diferenciación, pero con la ventaja de rendimiento de células viables más alto. En cultivos de MUTZ3-DC y -LC, se realizó una valoración de 2 etapas de la concentración de mitoxantrona 16,7 nM y se analizaron los fenotipos DC/LC después de 72-96 horas. Todavía se observó un robusto efecto sobre la diferenciación de MUTZ3-DC y -LC cuando se añadió mitoxantrona 2,08 nM durante la diferenciación. De forma interesante, en los cultivos de MUTZ3-DC suministrados con mitoxantrona, la expresión de langerina aumentó, sugiriendo una capacidad de distorsión hacia LC de la mitoxantrona. La Figura 6 muestra los porcentajes de células que expresan CD1a, DC-SIGN, langerina, CD80, CD40 y CD83 y las intensidades medias de fluorescencia de CD80, CD86, CD40 y HLA-DR de día 4 maduras MUTZ3-DC/LC y MUTZ3-DC/LC de día 4 maduras diferenciadas en ausencia o presencia de mitoxantrona. En ambos casos, la adición de mitoxantrona 2,08 nM aumentó la cantidad de células que expresan CD1a, langerina, CD80, CD40 y CD83 y también potenció los niveles de expresión de CD80, CD86, CD40 y HLA-DR. Para HLA-DR, la expresión fue incluso más alta que en los cultivos de control (Figura 6).

Si van a usarse tales DC generadas por mitoxantrona para futuras estrategias de vacunación, necesitan ser funcionalmente completamente activas. Por tanto, las MUTZ3-DC cultivadas en ausencia o presencia de mitoxantrona se analizaron en un ensayo Transwell para su capacidad para migrar hacia las quimiocinas CCL19 y CCL21 (Figura 7A) y se probaron en una MLR para su capacidad para estimular la proliferación de linfocitos T alógenos (Figura 7B). A diferencia de las DC de 4 días maduras sin tratar, las DC generadas con mitoxantrona de día 4 fueron comparables a las DC de control maduras de día 7 en su capacidad para migrar hacia las quimiocinas de recirculación de LN y estuvieron capacitadas para inducir la proliferación de linfocitos T.

Ejemplo 8: La mitoxantrona puede estimular la migración de DC de piel humana

Para establecer si la mitoxantrona podría o no ser beneficiosa como adyuvante local, se inyectaron por vía intradérmica explantes de piel humana con GM-CSF e IL-4 en combinación con mitoxantrona 2,08 nM, 5,6 nM o 16,7 nM y se flotaron biopsias en sacabocados de 6 mm en medio que contenía la misma concentración de mitoxantrona. Se dejó que DC de piel migraran de las biopsias durante 2 días, después de lo cual se recogieron, se cuantificaron y se fenotiparon. La Figura 7C muestra que la inyección de mitoxantrona 2,08 nM o 5,6 nM aumentó la cantidad de células migradas aproximadamente el 50-60 %. La inyección de mitoxantrona 16,7 nM solo aumentó ligeramente la cantidad de células migradas, posiblemente debido a la inducción de muerte celular en las DC migrantes o migradas.

En conclusión, los resultados muestran que altas concentraciones de la antraciclina, como los fármacos citotóxicos mitoxantrona y doxorubicina, pueden conducir células precursoras CD34⁺ a la diferenciación de DC y que bajas concentraciones de mitoxantrona pueden acelerar eficientemente (*in vitro*) la diferenciación de DC en combinación con citocinas de diferenciación. Estas DC generadas por antraciclina rápidamente diferenciadas (día 4) se distorsionaron hacia un fenotipo más similar a LC y fueron tan capaces como las cultivadas a largo plazo convencionales (día 7) en migrar hacia las quimiocinas CCL19 y CCL21 y en promover la proliferación de linfocitos T. Además, se mostró que la inyección intradérmica de dosis baja de mitoxantrona en medio puro, pero especialmente en combinación con GM-CSF e IL-4, aumentó la cantidad de DC que emigran de la piel.

Ejemplo 9: Las DC cultivadas con mitoxantrona pueden sensibilizar los linfocitos T específicos de antígeno

Una función muy crucial de las DC en las estrategias de vacunación antitumoral es la capacidad de las células a sensibilizar CTL específicos de antígeno tumoral. Por lo tanto, se analizaron d4 mitox-mDC y d7 MUTZ3-mDC para su capacidad para sensibilizar CTL específicos de MART1 *in vitro*. Ambos tipos de DC fueron capaces de inducir CTL específicos de MART1, como se analizaron por la presencia de células positivas para tetrámero (Tm) específico de MART1 dentro del subconjunto de linfocitos T CD8⁺ en los cultivos en masa (Figura 8). A partir de los 12 cultivos en masa en los que se inició la sensibilización de CTL, pudieron detectarse CTL MART1 Tm⁺ en 12/12 cultivos sensibilizados con d4 mitox-DC en comparación con 11/12 cultivos sensibilizados con d7 MUTZ3-mDC de control. La

Figura 5d muestra el porcentaje de CTL Tm+ para 6 cultivos en masa de un donante HLA-A2+ después de la segunda re-estimulación con DC cargadas con péptido.

5 Los resultados muestran así que las antraciclinas, el fármaco citotóxico mitoxantrona (y también la doxorubicina) inducen la diferenciación de precursores de DC CD34⁺ supervivientes. Además, cuando se añadieron al inicio de la diferenciación en combinación con DC o citocinas que se distorsionan hacia LC, este fármaco potenció espectacularmente la diferenciación.

10 Los datos de los presentes inventores mostraron la inducción y aceleración de la diferenciación de células de Langerhans tras el tratamiento de células precursoras CD34⁺, pero no CD14⁺, con antraciclinas como mitoxantrona a pesar de causar la muerte celular. Las células precursoras CD34⁺ fueron sensibles a los fármacos, pero esta sensibilidad se redujo cuando las citocinas inductoras de la diferenciación estuvieron presentes. Importante para todas las DC cultivadas *in vitro* que van a usarse para fines de vacunación es la capacidad funcional de las DC. La antraciclina (por ejemplo, mitoxantrona) generó DC, aunque solo se diferenciaron durante 3 días y maduraron con una mezcla de maduración de citocinas estándar durante 24 horas, fueron completamente capaces de migrar hacia las quimiocinas CCL19 y CCL21 y pudieron inhibir eficientemente la proliferación de linfocitos T. Este método de diferenciación de DC es así un método más rentable que requiere menos tiempo de generación de DC cultivadas *in vitro* a niveles de (c)GMP para fines de vacunación.

20 Además, los datos muestran que la administración local de antraciclinas como mitoxantrona, en combinación con citocinas, podría inducir la eficiente y potenciada migración de DC de explantes de piel humano. Estos hallazgos muestran que antraciclinas como mitoxantrona son capaces de inducir la activación de DC en sitios periféricos, como la piel (sitio de vacunación preferido) o tumor, donde puede suprimirse la activación o diferenciación de DC de precursores locales. Por ejemplo, en cutis de melanoma, el sitio del tumor está fácilmente accesible y la localización anatómica garantiza la presencia de células precursoras LC dirigibles/accesibles a fármaco. La abundante presencia de antígenos tumorales, especialmente después de la administración local de agentes citostáticos, que inducirá que mueran algunas células de melanoma, y la rápida inducción de diferenciación de LC por antraciclinas como mitoxantrona, pueden dar lugar a excelentes respuestas inmunitarias antitumorales.

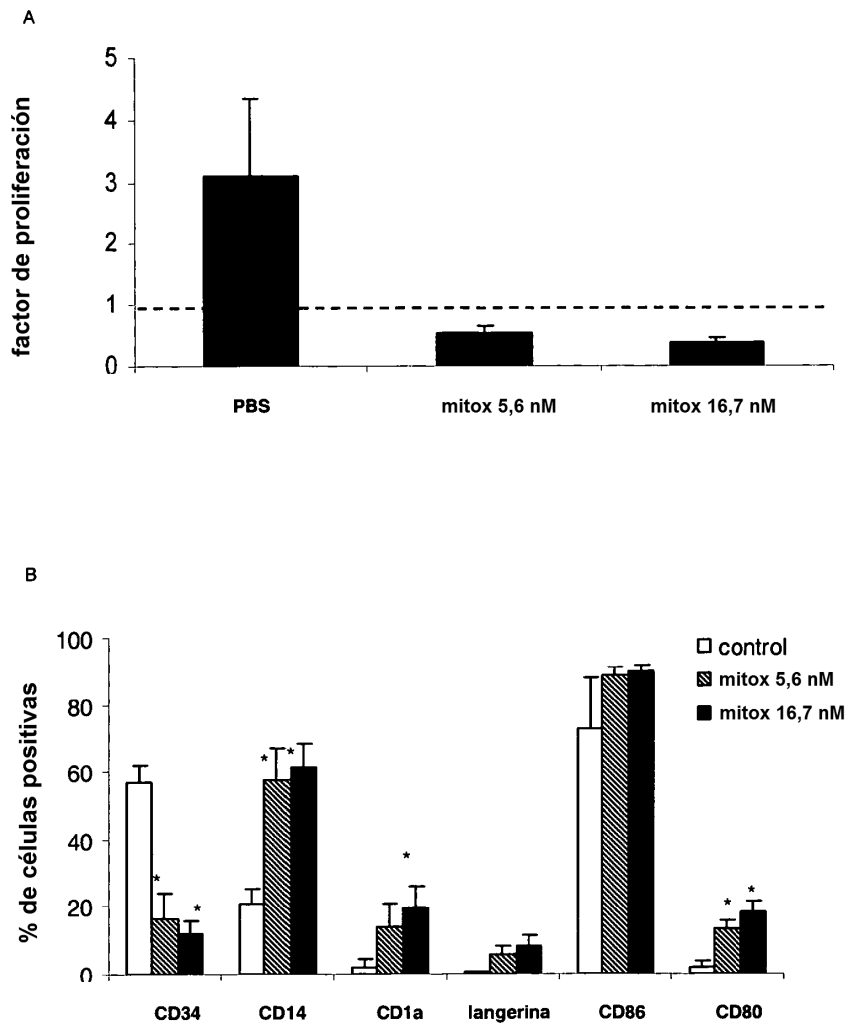
25

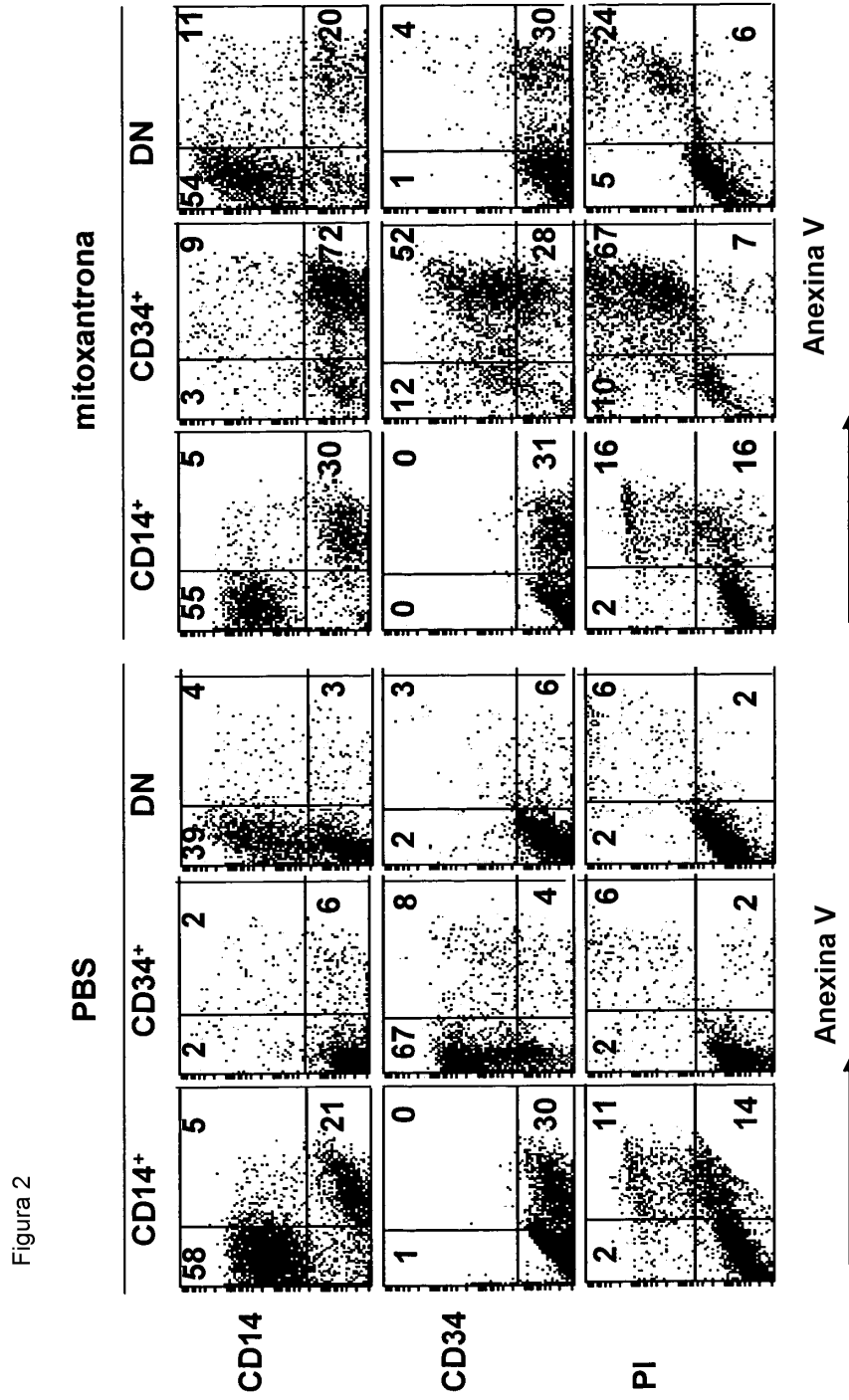
REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para la producción acelerada de células dendríticas en un medio de cultivo que comprende las etapas de:
- 5 a) poner en contacto células CD34 positivas con una antraciclina y/o una antracenodiona durante un periodo de entre 1 y 7 días,
- b) permitir que las células CD34 positivas se diferencien en células dendríticas,
- c) obtener dichas células dendríticas del medio de cultivo.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que células CD34 positivas aisladas se ponen en contacto con una antraciclina y/o una antracenodiona.
- 10 3. Un método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la antraciclina y/o una antracenodiona están seleccionadas del grupo que consiste en daunorubicina, doxorubicina, pirarubicina, aclarubicina, epirubicina, oxaunomicina, andidarubicina y mitoxantrona.
4. Un método según las reivindicaciones 1 - 3, en el que las células CD34 positivas se ponen en contacto con la antraciclina y/o una antracenodiona durante un periodo entre 1,5 y 5 días.
- 15 5. Método según la reivindicación 4, en el que las células CD34 positivas se ponen en contacto con la antraciclina y/o una antracenodiona durante un periodo entre 2 y 4 días.
6. Un método según las reivindicaciones 1 - 5, en el que al menos un compuesto adicional capaz de inducir la diferenciación de las células dendríticas está presente en el medio de cultivo, en el que el compuesto adicional capaz de inducir la diferenciación está seleccionado del grupo que consiste en GM-CSF, TNF-alfa, IL-4 y TGF-beta
- 20 1.
7. Un método según las reivindicaciones 1 - 6, en el que al menos un compuesto adicional capaz de inducir la maduración de las células dendríticas está presente en el medio de cultivo, en el que el compuesto adicional capaz de inducir la maduración está seleccionado del grupo que consiste en TNF-alfa, IL-6, PGE2 e IL-1 Beta.
8. Un método según las reivindicaciones 1 - 7, en el que las células dendríticas están seleccionados del grupo que consiste en células dendríticas intersticiales, células dendríticas inmaduras, células dendríticas de Langerhans, células dendríticas plasmatoideas y células dendríticas maduras.
- 25 9. Un método según las reivindicaciones 1 - 8, en el que las células CD34 positivas son células MUTZ3, células humanas o células tumorales humanas.
10. Un método según la reivindicación 9, en el que las células MUTZ3 se ponen en contacto con mitoxantrona 0,05 nM a 20 nM y/o doxorubicina 10 a 120 nM, en presencia de 50 a 150 ng/ml de GM-CSF, de 5 a 20 ng/ml de IL-4 y de 0,5 a 4 ng/ml de TNF-alfa.
- 30 11. Un método según la reivindicación 9, en el que las células MUTZ3 se ponen en contacto con mitoxantrona 0,05 nM a 20 nM y/o doxorubicina 10 a 120 nM, en presencia de 5 a 20 ng/ml de TGF-beta 1, de 50 a 150 ng/ml de GM-CSF y de 0,5 a 4 ng/ml de TNF-alfa.

35

Figura 1





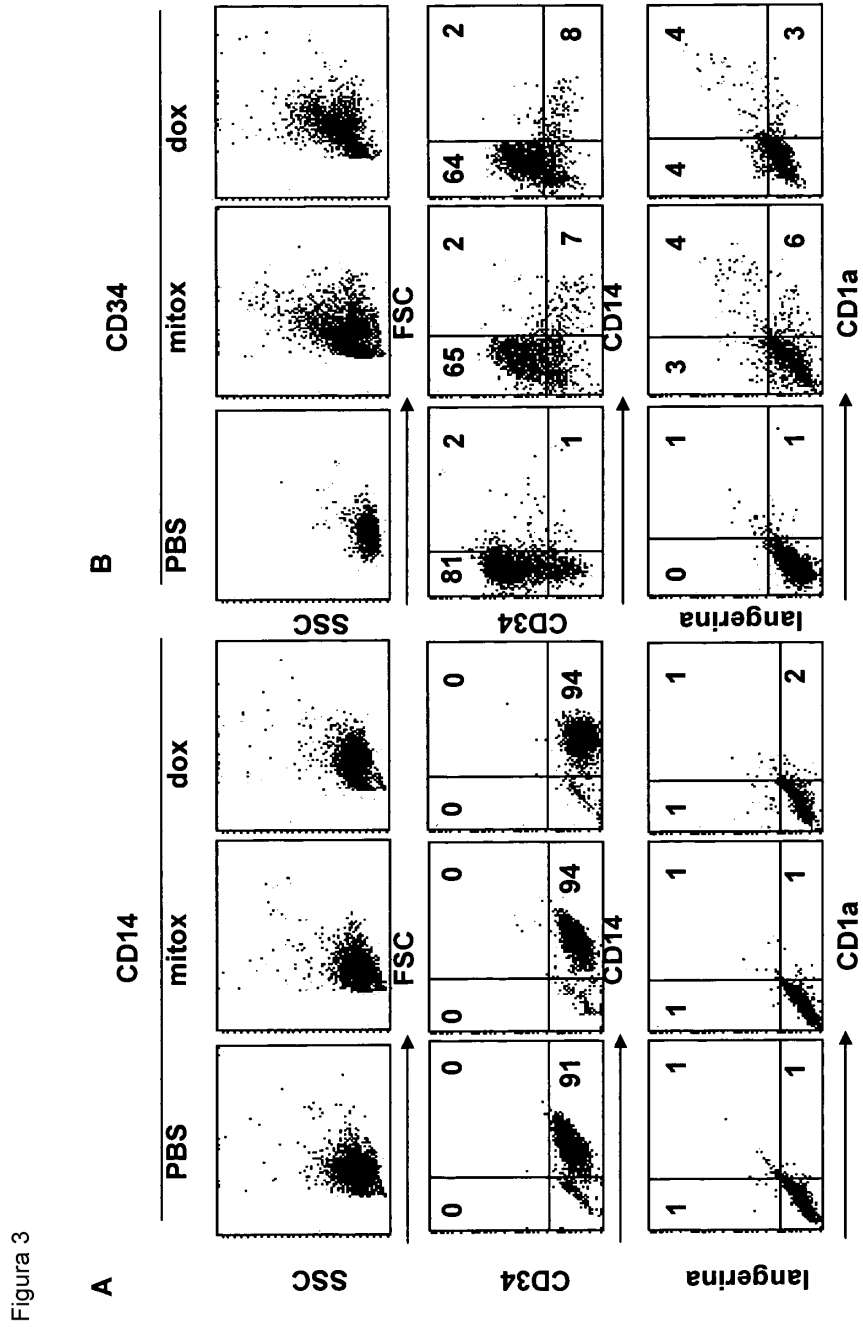
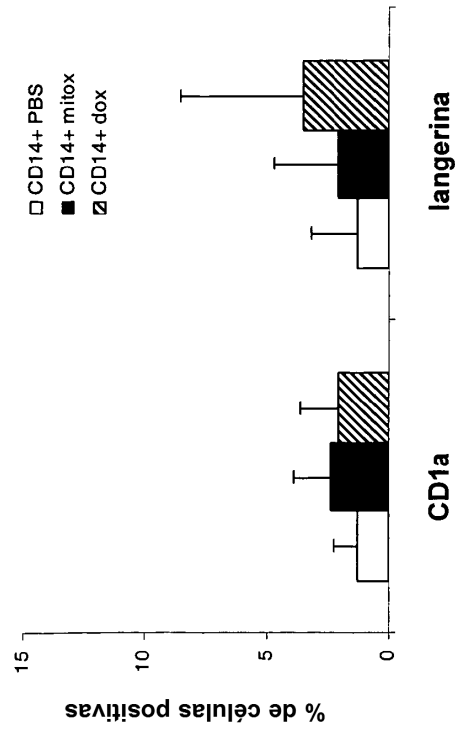


Figura 3

C



D

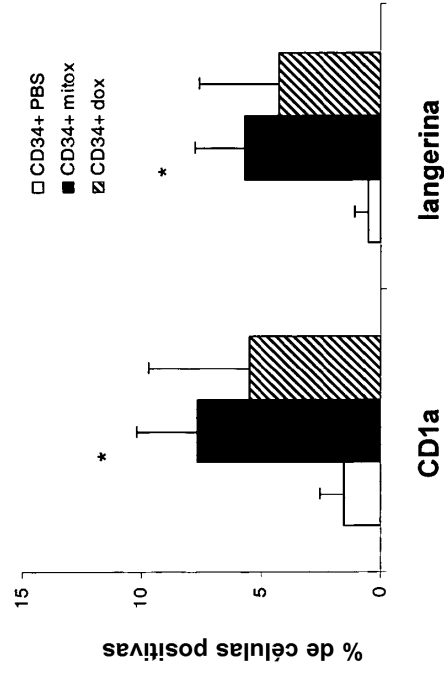
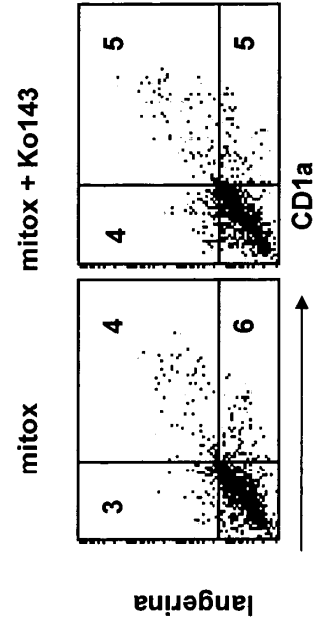


Figura 4

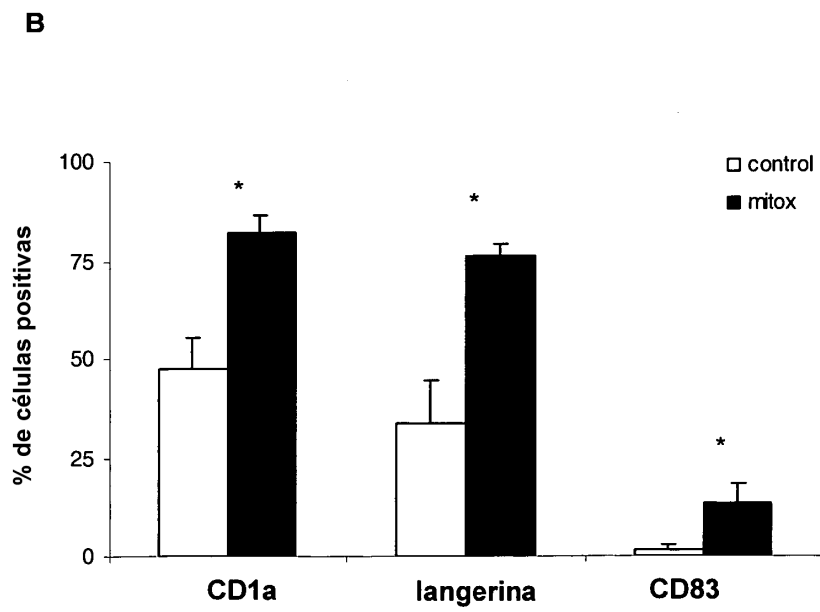
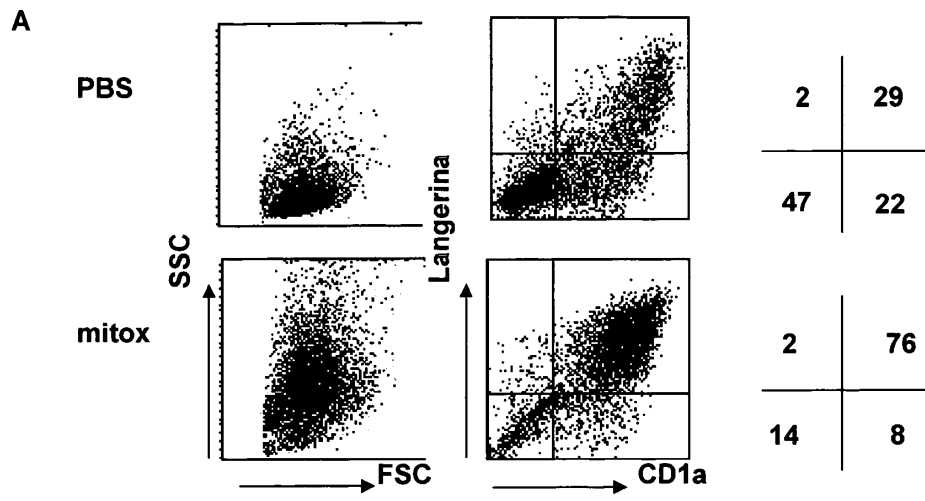
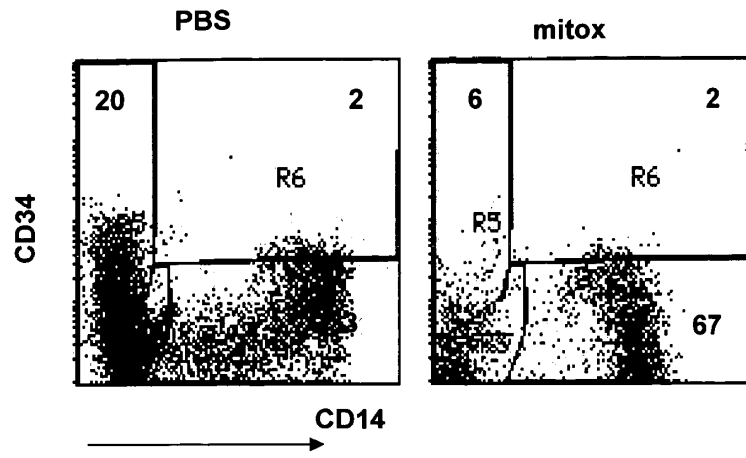


Figura 5

A



B

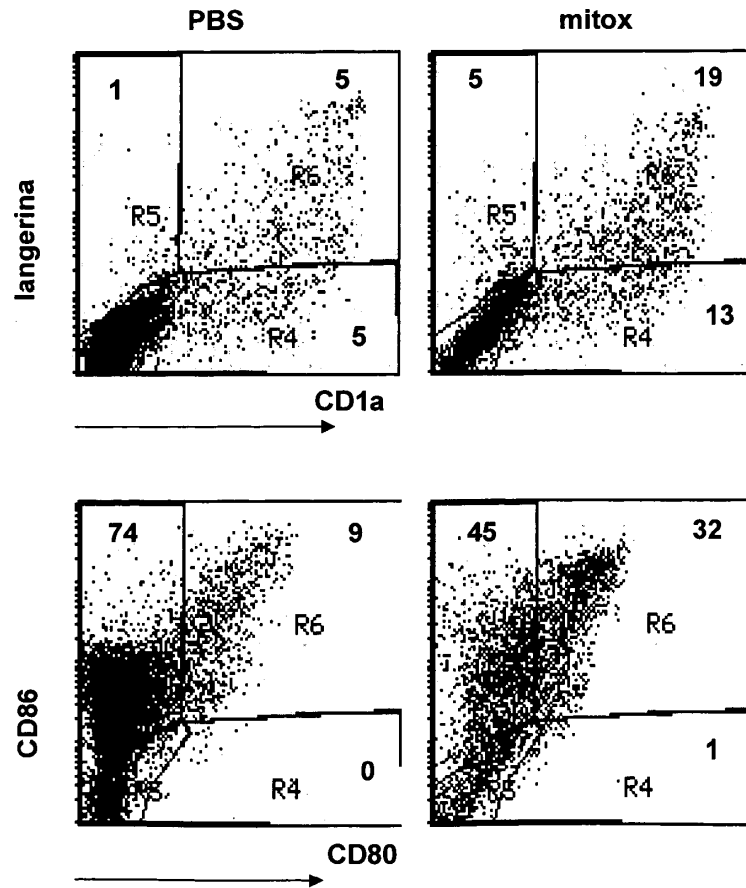


Figura 6

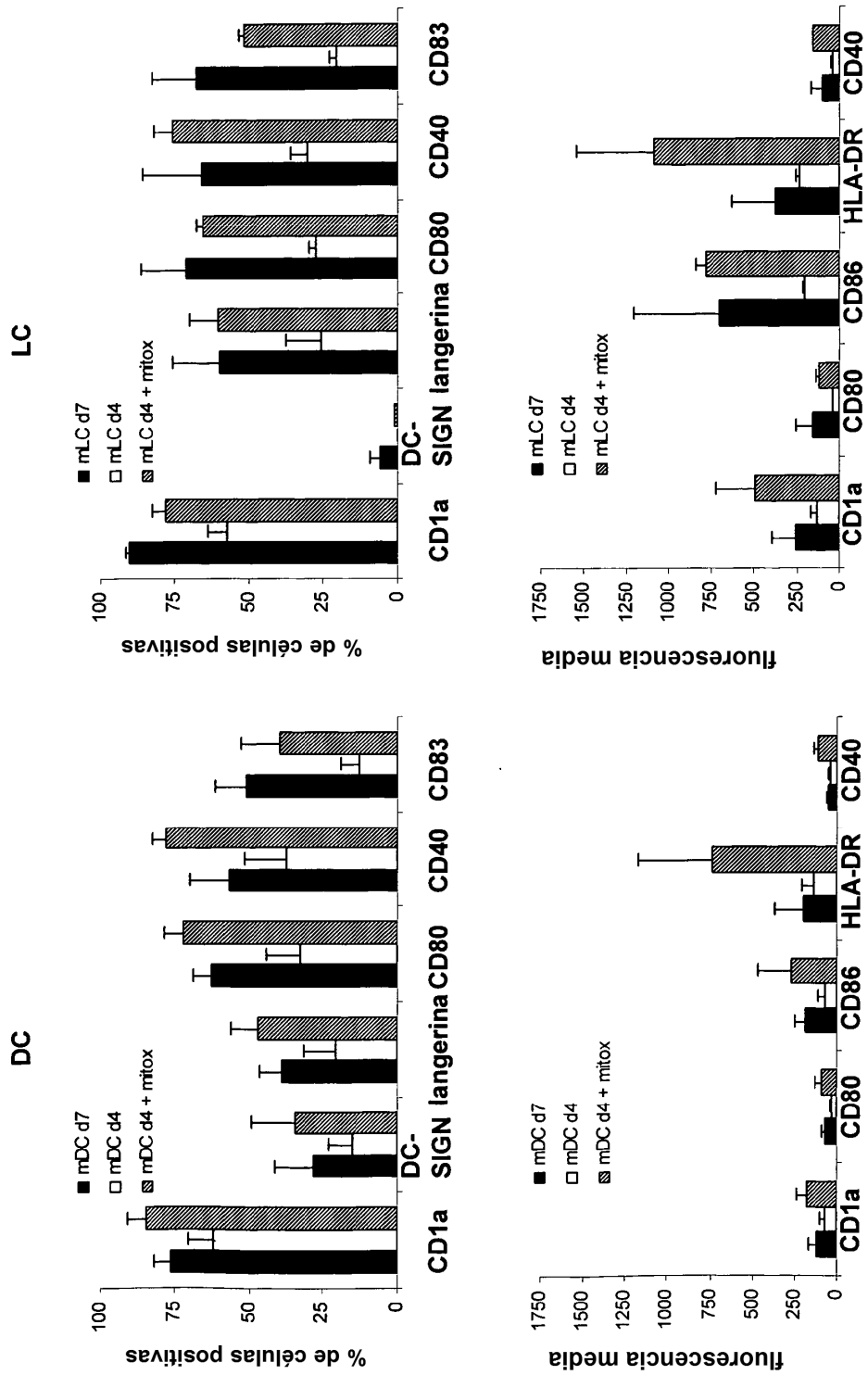


Figura 7

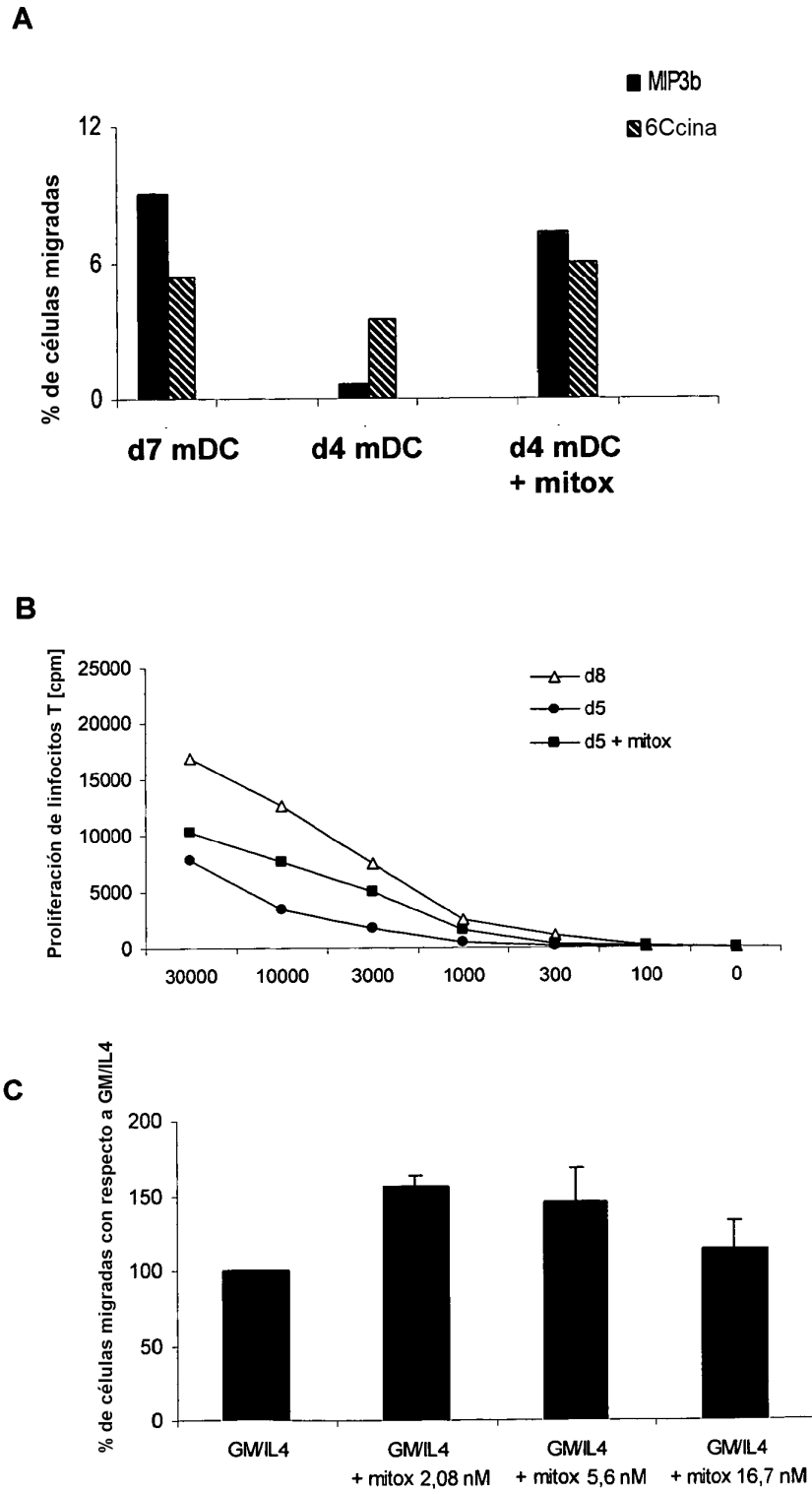


Figura 8

