

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 569**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0784 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2006 PCT/US2006/013159**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2006 WO06127150**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2006 E 06749566 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 1882031**

54 Título: **Composiciones de células dendríticas y métodos**

30 Prioridad:

08.04.2005 US 669468 P

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

19.01.2018

73 Titular/es:

**ARGOS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4233 Technology Drive
Durham, NC 27704, US**

72 Inventor/es:

**POGUE, REBECCA;
MONESMITH, TAMARA;
TCHEREPANOVA, IRINA y
DINTERMAN, LOIS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 650 569 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de células dendríticas y métodos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para la producción de células dendríticas y composiciones relacionadas útiles en el tratamiento de enfermedades.

Antecedentes de la invención

10 Numerosos ensayos clínicos han demostrado la seguridad de las vacunas de células dendríticas, y más de 1000 pacientes han recibido vacunas de células dendríticas sin eventos adversos graves asociados con la terapia y respuestas clínicas en la mitad de los pacientes (Ridgeway (2003) Cancer Invest 21:873-876). Por ejemplo, un estudio reciente demostró que la vacunación con células dendríticas cargadas con cuatro péptidos de melanoma (gp100, melan-A/MART-1, antígeno de melanoma de tirosina (MAGE-3), KLH y matriz de gripe dio como resultado la regresión de melanoma metastásico después de cuatro vacunaciones bimensuales (Banchereau et al. (2001) Cancer Res 61:6451-6458).

15 Un método común de preparación de células dendríticas (DC) es recoger células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de un sujeto, y luego diferenciar los monocitos, que son una pequeña proporción de las PBMC, en DC. Se creía ampliamente que para actuar como precursores apropiados para la fabricación in vitro de células dendríticas, los monocitos se deben congelar o cultivar poco después del aislamiento de un sujeto. De acuerdo con lo anterior, en ensayos clínicos previos en los que las vacunas de células dendríticas se hicieron a partir de monocitos, las PBMC o monocitos ya sea se cultivaron a aproximadamente 37 °C o se congelaron a las pocas horas de la recogida de las
20 PBMC de un paciente. Sin embargo, las consideraciones prácticas de fabricación pueden limitar el uso generalizado de vacunas procesadas mediante un método que requiere el cultivo o la congelación de PBMC o monocitos recién aislados. La diferenciación de las PBMC en DC requiere aproximadamente una semana, requiere una instalación GMP y técnicos capacitados. De acuerdo con lo anterior, proporcionar instalaciones y personal para fabricar vacunas de DC en o cerca de cada sitio clínico donde se obtienen PBMC de un paciente probablemente sería un costo prohibitivo.

25 Un modelo comercialmente viable para fabricar vacunas de DC es proporcionar una o un número relativamente pequeño de instalaciones que pueden fabricar vacunas de DC a partir de PBMC de pacientes o monocitos recogidos en un sitio clínico y luego enviados a un sitio de fabricación. Sin embargo, dicho modelo no se puede aplicar a los métodos actuales de producción de DC que requieren PBMC o monocitos frescos. La congelación de monocitos frescos requiere manipulaciones adicionales en el sitio de recogida después de la leucaféresis, y por lo tanto no es una alternativa deseable. De acuerdo con lo anterior, existe la necesidad de desarrollar métodos de fabricación de vacunas de DC que
30 utilizan PBMC o monocitos que se hayan almacenado durante el envío a una instalación de fabricación. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas adicionales.

Resumen de la invención

35 Los inventores han descubierto métodos que permiten la preparación de células dendríticas y vacunas de células dendríticas a partir de monocitos que se han almacenado a 1-34°C, durante periodos de tiempo de 6-96 horas después del aislamiento de un sujeto. La capacidad de fabricar DC a partir de monocitos almacenados permite una mayor flexibilidad y el envío de los monocitos desde el sitio de recogida a una instalación de fabricación. Además, los inventores han descubierto que las vacunas de células dendríticas fabricadas a partir de monocitos almacenados son fenotípicamente superiores a las células dendríticas fabricadas a partir de monocitos frescos. Por ejemplo, las vacunas de células dendríticas fabricadas a partir de monocitos almacenados tienen niveles aumentados de moléculas coestimuladoras, tales como CD80, CD83 y CD86, así como niveles más altos de moléculas MHC de clase I y MHC de clase II en comparación con células dendríticas fabricadas a partir de monocitos frescos.
40

45 En un primer aspecto, la invención proporciona un método de producción de las células dendríticas a partir de monocitos, que comprende: inducir la diferenciación en células dendríticas de monocitos que se han incubado a una temperatura de 1 °C - 34 °C, durante un período de aproximadamente 6 a 96 horas desde el momento en que están aislados de un sujeto.

50 En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula dendrítica cargada con antígeno que se puede obtener por el método de la invención para su uso como un producto farmacéutico, por ejemplo, como una vacuna, en el que dichas células tienen una proporción de estado de equilibrio de ARN de ALOX15, ARN de TLR1, ARN de TLR2, ARN de IL-1β y/o ARN de CD69 a ARN de β-actina o ARN de GAPDH de menos de 1.0, y/o una proporción de estado de equilibrio de ARN de CD52 a ARN de β-actina o GAPDH de más de 1.0.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición que comprende células dendríticas que se pueden obtener por el método de la invención, en el que dichas células tienen una proporción de estado de equilibrio de ARN de

ALOX15, ARN de TLR1, ARN de TLR2, ARN de IL-1 β y/o ARN de CD69 a ARN de β -actina o ARN de GAPDH de menos de 1.0, y/o una proporción de estado de equilibrio de ARN de CD52 a ARN de β -actina o GAPDH de más de 1.0.

En otro aspecto adicional, la invención proporciona una vacuna que comprende la composición de cualquiera de la invención.

5 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Diagrama de un recipiente de envío preferido y materiales de empaque para el envío con temperatura controlada de monocitos (por ejemplo, producto de leucaféresis).

Figura 2: las DC transfectadas con ARN proporcionan un soporte coestimulador funcional. Las DC se probaron para determinar la capacidad de estimular la producción de INF- γ a partir de PBMC en un ensayo de linfocitos mixtos (MLR). Las DC descongeladas fabricadas a partir de 3 donantes diferentes se emparejaron con PBMC previamente congeladas de cada donante. Todas las combinaciones en pares se probaron usando ELISPOT (INF- γ) como la lectura. Las columnas 1, 4 y 7 representan DC emparejadas con PBMC autólogas. Las columnas 2, 3, 5, 6, 8 y 9 representan DC emparejadas con PBMC no autólogas. Las columnas 10-12 representan los controles de solo DC. Las columnas 13-14 representan controles de solo PBMC.

Figura 3: se compararon DC maduras de cóctel de citoquina con DC inmaduras del mismo donante en su capacidad para estimular la producción de citoquinas Th1 a partir de células T autólogas. Ambas poblaciones de DC se transfectaron con ARN que codifica la proteína de la matriz de la influenza y se usaron para estimular CTL de memoria específicos para la influenza a partir de PBMC autólogas. Se muestran los resultados de los análisis de ELISPOT (# manchas/pocillo como una función de las PBMC de entrada). Cada conjunto de cuatro columnas se organiza en el siguiente orden: producción de IFN γ provocada a partir de células de memoria T específicas para la influenza por DC inmaduras, producción de IFN γ provocada a partir de células de memoria T específicas para la influenza mediante DC maduras; producción de IL-2 provocada por células de memoria T específicas para la influenza por DC inmaduras; y la producción de IL-2 provocada por células de memoria T específicas para la influenza mediante DC maduras.

Figura 4: Se descongelaron dos viales de cada una de las preparaciones de células dendríticas cargadas con ARN preparadas a partir de PBMC de un día obtenidas de 2 donantes sanos diferentes. Un vial de cada donante se analizó inmediatamente en un ensayo allo MLR mientras que el segundo vial de cada preparación se dejó permanecer a temperatura ambiente durante 40 minutos antes de analizarse por el mismo método. Las PBMC utilizadas en este experimento incluyeron células autólogas de cada donante, así como una tercera muestra de PBMC de un donante no relacionado con ninguna de las dos. La lectura para este ensayo fue ELISPOT (INF- γ).

Figura 5: La funcionalidad del precongelmiento de DC frente a postdescongelación se evaluó por la capacidad de las DC para estimular una respuesta de memoria específica a la influenza de PBMC autólogas en función de la disminución de la concentración de ARNm de la influenza usada para la transfección. La lectura del ensayo fue ELISPOT (INF- γ).

Figura 6: Evaluación por citometría de flujo de la expresión de GFP por las DC después de la electroporación con ARN que codifica GFP. Sin transfectar (línea punteada).

Figura 7: Tinción de citoquinas intracelulares: IL-2/IFN- γ en células T CD4 y CD8 después de la estimulación con DC transfectadas con ARN que codifica GFP (control negativo, paneles izquierdos) o pp65 de CMV (paneles derechos).

Figura 8: Dilución de CFSE en células T CD4 y CD8 después de la estimulación con DC transfectadas con ARN que codifica GFP (control negativo, paneles izquierdos) o pp65 de CMV (paneles derechos).

Figura 9: Fenotipos de las células dendríticas inmaduras del día 6 (iDC) preparadas a partir de un producto de leucaféresis de un día.

Figura 10: Fenotipos de las células dendríticas maduras del día 7 (mDC) preparadas a partir de un producto de leucaféresis de un día.

Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (que incluyen técnicas recombinantes),

microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition (1989); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al. eds. (1987)); the series *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR: A Practical Approach* (M. MacPherson et al. IRL Press at Oxford University Press (1991)); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds.

(1995)); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow and Lane eds. (1988)); Using Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow and Lane eds. (1999)); and Animal Cell Culture (R.I. Freshney ed. (1987)).

Definiciones

Como se usa en este documento, ciertos términos pueden tener los siguientes significados definidos.

- 5 Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de las mismas.

10 El término "antígeno" se entiende bien en la técnica e incluye sustancias que son inmunogénicas, esto es, inmunógenos, así como epítomos antigénicos. Se apreciará que el uso de cualquier antígeno se contempla para uso en la presente invención y, de este modo, incluye, pero no se limita a, un autoantígeno (ya sea normal o relacionado con la enfermedad), un antígeno infeccioso (por ejemplo, un antígeno microbiano, antígeno viral, etc.) o algún otro antígeno extraño (por ejemplo, un componente alimenticio, polen, etc.). El término "antígeno" o, alternativamente, "inmunógeno" se aplica a colecciones de más de un inmunógeno, de modo que las respuestas inmunes a múltiples inmunógenos se pueden modular simultáneamente. Además, el término incluye cualquiera de una variedad de diferentes formulaciones de inmunógeno o antígeno. En realizaciones preferidas, el antígeno es de una célula cancerosa o un patógeno. Preferiblemente, la célula cancerosa es una célula de cáncer renal, una célula de mieloma múltiple o una célula de melanoma. Los patógenos preferidos son HIV y HCV. En realizaciones preferidas, el antígeno se administra a la célula presentadora de antígeno (APC) en forma de ARN aislado o derivado de una célula cancerosa o un patógeno. "Derivado de" incluye, pero no está limitado a, variantes recombinantes de secuencias de origen natural, que incluyen fusiones a secuencias no relacionadas o relacionadas.

20 Por "cáncer" se entiende la presencia anormal de células que presentan un crecimiento relativamente autónomo, de modo que una célula cancerosa exhibe un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular. Las células cancerosas pueden ser benignas o malignas. En diversas realizaciones, el cáncer afecta a las células de la vejiga, la sangre, el cerebro, el pecho, el colon, el tracto digestivo, el pulmón, los ovarios, el páncreas, la glándula prostática o la piel. La definición de célula cancerosa, como se usa en este documento, incluye no solo una célula cancerosa primaria, sino también cualquier célula derivada de una célula cancerosa. Esto incluye células cancerosas metastatizadas y cultivos in vitro y líneas celulares derivadas de células cancerosas. El cáncer incluye, pero no se limita a, tumores sólidos, tumores líquidos, tumores malignos hematológicos, cáncer de células renales, melanoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer de vejiga, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, neuroblastoma, glioblastoma, retinoblastoma, leucemias, mielomas, linfomas, hepatoma, adenomas, sarcomas, carcinomas, blastomas, etc.

35 Como se usa en este documento, el término "que comprende" pretende significar que las composiciones y métodos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Consistir esencialmente en" cuando se usa para definir composiciones y métodos, significará excluir otros elementos de importancia esencial para la combinación. De este modo, una composición que consiste esencialmente en los elementos como se definen en este documento no excluirá trazas de contaminantes del método de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina reguladora con fosfato, conservantes y similares. "Consistente en" significará excluir más oligoelementos de otros ingredientes y etapas de método sustanciales para administrar las composiciones de esta invención. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta invención.

45 Como se usa en este documento, el término "citoquina" se refiere a cualquiera de los numerosos factores que ejercen una variedad de efectos sobre las células, por ejemplo, induciendo el crecimiento o la proliferación. Los ejemplos no limitantes de citoquinas que se pueden usar solos o en combinación en la práctica de la presente invención incluyen, interleucina-2 (IL-2), factor de células madre (SCF), interleucina-3 (IL-3), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 (IL-11), interleucina-12 (IL-12), interleucina-13 (IL-13), interleucina-15 (IL-15), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleucina-1 beta (IL-1 β), interferón- γ (IFN γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF α), prostaglandina E₂ (PGE₂), MIP-11, factor inhibidor de la leucemia (LIF), ligando de c-kit, trombopoyetina (TPO) y ligando de flt3.

50 Las citoquinas están disponibles comercialmente en varios proveedores, tal como, por ejemplo, Genzyme (Framingham, MA), Genentech (South San Francisco, CA), Amgen (Thousand Oaks, CA), R&D Systems (Minneapolis, MN) e Immunex (Seattle, WA). Se pretende, aunque no siempre se indica explícitamente, que las moléculas que tienen una actividad biológica similar a las citoquinas de tipo salvaje o purificadas (por ejemplo, producidas recombinantemente o muteínas de las mismas) están destinadas a usarse dentro del espíritu y alcance de la invención.

55 El término "células dendríticas (DC)" se refiere a una población diversa de tipos celulares morfológicamente similares encontrados en una variedad de tejidos linfoides y no linfoides, Steinman (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:271-296. Las células dendríticas constituyen las APC más potentes y preferidas en el organismo. Las células dendríticas se pueden

diferenciar de los monocitos y poseen un fenotipo distinto de los monocitos. Por ejemplo, un marcador diferenciador particular, el antígeno CD14, no se encuentra en las células dendríticas, sino que lo poseen los monocitos. Se ha demostrado que las DC maduras pueden proporcionar todas las señales necesarias para la activación y proliferación de las células T. También, las células dendríticas maduras no son fagocíticas, mientras que los monocitos y las células dendríticas inmaduras son células fuertemente fagocíticas. Las DC inmaduras son capaces de capturar antígenos por endocitosis, fagocitosis, macropinocitosis o pinocitosis adsorbente y absorción de antígenos mediada por receptores, y son fenotípicamente CD80^{bajo} o CD80^{alto}, CD83^{bajo} o CD83^{alto}, CD86^{bajo}, y tienen altas concentraciones intracelulares de moléculas MHC de clase II. Las DC maduras tienen una morfología velada, una menor capacidad para endocitosis y son fenotípicamente CD80^{alto}, CD83^{alto}, CD86^{alto} en comparación con las DC inmaduras. Preferiblemente, las DC maduras secretan el polipéptido o proteína p70 de IL-12, y/o secretan niveles significativamente reducidos (de 0 a 500 pg/ml por millón de DC) de IL-10. Los niveles de IL-10 e IL-12 se pueden determinar mediante ELISA de sobrenadantes de cultivo recogidos hasta 36 horas después de la inducción de la maduración de DC a partir de DC inmaduras. Wierda W.G. et al (2000) Blood 96: 2917. Ajdary S et al (2000) Infection and Immunity 68: 1760. Véase Banchereau and Steinman (1998) Nature 392:245 para una revisión.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones.

Como se usa en este documento, "expresión" se refiere a los procesos mediante los cuales los polinucleótidos se transcriben en ARNm y/o el ARNm se traduce en péptidos, polipéptidos o proteínas. Si el polinucleótido se deriva de ADN genómico de un huésped eucariótico apropiado, la expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm. Los elementos reguladores necesarios para la expresión incluyen secuencias promotoras para unir ARN polimerasa y secuencias de iniciación de la transcripción para la unión de ribosomas. Por ejemplo, un vector o casete de expresión bacteriana incluye un promotor (por ejemplo, promotor lac) y para la iniciación de la transcripción la secuencia de Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG (Sambrook et al. (1989) supra). De forma similar, un vector o casete de expresión eucariota por lo general incluye un promotor heterólogo u homólogo para la ARN polimerasa II, una secuencia de Kozak, el codón de inicio AUG, un codón de terminación para el desprendimiento del ribosoma y una señal de poliadenilación en dirección 3'. Tales vectores se pueden obtener comercialmente o ensamblar mediante las secuencias descritas en métodos conocidos en la técnica.

El término "modificado genéticamente" significa que contiene y/o expresa un gen foráneo o una secuencia de ácido nucleico que, a su vez, modifica el genotipo o fenotipo de la célula o su progenie. En otras palabras, se refiere a cualquier adición, eliminación o alteración de los nucleótidos endógenos de una célula.

El término "aislado" significa separado de constituyentes, celulares y de otro tipo, en los que el polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmentos de los mismos, están normalmente asociados con la naturaleza. Por ejemplo, con respecto a un polinucleótido, un polinucleótido aislado es uno que está separado de las secuencias 5' y 3' con las que normalmente está asociado en el cromosoma. Como es evidente para los expertos en el arte, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, que no son de origen natural, no requiere "aislamiento" para distinguirlo de su contraparte de origen natural. Además, un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, "concentrado", "separado" o "diluido", es distinguible de su contraparte de origen natural en que la concentración o el número de moléculas por volumen es mayor que "concentrado" o menor que "separado" que el de su contraparte de origen natural. Un polinucleótido, péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo o fragmento(s) de los mismos, que difiere de la contraparte de origen natural en su secuencia primaria o, por ejemplo, por su patrón de glicosilación, no necesita estar presente en su forma aislada, ya que es distinguible a partir de su contraparte de origen natural por su secuencia primaria, o alternativamente, por otra característica tal como su patrón de glicosilación. Aunque no se establece explícitamente para cada una de las invenciones descritas en este documento, se debe entender que todas las realizaciones anteriores para cada una de las composiciones descritas a continuación y en las condiciones apropiadas, se proporcionan mediante esta invención. De este modo, se proporciona un polinucleótido que no es de origen natural como una realización separada del polinucleótido de origen natural aislado. Se proporciona una proteína producida en una célula bacteriana como una realización separada de la proteína de origen natural aislada de una célula eucariota en la que se produce en la naturaleza. Una célula de mamífero aislada se separa de donde normalmente se encuentra en el cuerpo, o se elimina del cuerpo. Por ejemplo, los leucocitos recogidos por leucaféresis están "aislados", y las células dendríticas diferenciadas de monocitos in vitro están "aisladas".

Los términos "complejo mayor de histocompatibilidad" o "MHC" se refieren a un complejo de genes que codifican moléculas de la superficie celular que se requieren para la presentación del antígeno a las células T y para el rechazo rápido del injerto. En humanos, el MHC también se conoce como el "antígeno leucocitario humano" o complejo "HLA". Las proteínas codificadas por el MHC se conocen como "moléculas MHC" y se clasifican en moléculas MHC de Clase I y Clase II. Las moléculas del MHC de clase I incluyen proteínas heterodiméricas de membrana formadas por una cadena α codificada en el MHC unida de forma no covalente con la β -2-microglobulina. Las moléculas MHC de Clase I se expresan en casi todas las células nucleadas y se ha demostrado que funcionan en la presentación de antígenos a las células T CD8⁺. Las moléculas de clase I incluyen HLA-A, B y C en humanos. Las moléculas MHC de clase II también incluyen proteínas heterodiméricas de membrana que consisten en cadenas α y β asociadas no

covalentemente. Se sabe que las moléculas MHC de Clase II funcionan en células T CD4+ y, en humanos, incluyen HLA-DP, DQ y DR.

Por monocitos se entiende células mononucleares de sangre periférica CD14+ capaces de diferenciarse en células dendríticas inmaduras en respuesta a GM-CSF e IL-4.

5 "Patógeno", como se usa en este documento, se refiere a cualquier organismo o virus causante de enfermedad, y también a derivados atenuados de los mismos.

Una "composición farmacéutica" pretende incluir la combinación de un agente activo (tal como una DC cargada con antígeno) con un portador, inerte o activo, haciendo que la composición sea apropiada para uso diagnóstico o terapéutico in vitro, in vivo o ex vivo.

10 Como se usa en este documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" abarca cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como suero inactivado por calor más DMSO al 10% más dextrosa al 5%, solución salina reguladora con fosfato, agua y emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir adyuvantes, estabilizantes y conservantes. Para ejemplos de portadores, estabilizantes y adyuvantes, véase Remington's Pharm. Sci. 18th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1990)).

15 Los términos "polinucleótido" y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente para referirse a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden contener desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y/o sus análogos. Los nucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. El término "polinucleótido" incluye, por ejemplo, moléculas helicoidales monocatenarias, bicatenarias y triple, un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Además de una molécula de ácido nucleico nativa, una molécula de ácido nucleico de la presente invención también puede comprender moléculas de ácido nucleico modificadas.

20 El término "péptido" se usa en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más aminoácidos de subunidades, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar unidas por enlaces peptídicos. En otra realización, la subunidad se puede unir por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Como se usa en este documento, el término "aminoácido" se refiere a ya sea aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y los isómeros ópticos tanto D como L, análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina comúnmente oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina comúnmente polipéptido o proteína.

25 Como se usa en este documento, "sujeto" se refiere a un mamífero, que incluye, pero no se limita a, humanos y otros primates, roedores, perros y gatos. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

30 Los inventores han descubierto que las células dendríticas inmaduras, las células dendríticas maduras y las células dendríticas cargadas con antígeno se pueden producir a partir de monocitos almacenados a 1 °C - 34 °C, durante aproximadamente 6 a 96 horas después de la recogida de los monocitos de un paciente. Estos resultados son sorprendentes, ya que comúnmente se creía que era crítico preparar células dendríticas a partir de monocitos recién aislados, en lugar de monocitos que se habían almacenado a temperatura ambiente durante un período de tiempo significativo. Además, las vacunas de DC derivadas de monocitos usadas en ensayos clínicos realizados antes de la presente invención se prepararon cultivando monocitos en menos de 6 horas después de la recogida de un paciente, o congelando PBMC poco después de la recogida, y almacenando las PBMC para descongelación posterior y cultivo de monocitos.

35 Los inventores no solo han descubierto que es posible fabricar células dendríticas y vacunas de células dendríticas a partir de monocitos que se han almacenado a 1 °C - 34 °C, durante aproximadamente 6 a 96 horas, sino que también han descubierto sorprendentemente que las células dendríticas fabricado por este método son fenotípicamente superiores a las células dendríticas preparadas a partir de monocitos frescos. El método de fabricación y las características de las vacunas de células dendríticas producidas por estos métodos son particularmente relevantes para la potencia de la vacuna, la comercialización exitosa en un área extensa y la facilidad de administración. Primero, las células dendríticas maduras fabricadas usando los métodos de la invención, cuando se comparan con DC producidas por métodos de la técnica anterior, expresan niveles aumentados de moléculas coestimulantes CD80, CD83 y CD86, así como niveles aumentados de moléculas MHC de clase I y MHC de clase II, todos los cuales son indicativos de la madurez y potencia de DC. Además, las DC maduras de la invención son capaces de inducir la producción de IL-2 a partir de células T de memoria de un modo específico de antígeno.

40 En segundo lugar, no sería comercialmente factible establecer capacidades de fabricación de células dendríticas cerca de cada sitio donde se recogerán PBMC pacientes. Por lo tanto, la comercialización exitosa y generalizada de una vacuna de células dendríticas autólogas dependerá de la capacidad para enviar PBMC, o monocitos aislados de PBMC

a instalaciones de fabricación centralizadas para la diferenciación en células dendríticas inmaduras y maduras y la preparación de vacunas. Sin embargo, antes de la presente invención, se pensó ampliamente que las PBMC se deben congelar o cultivar poco después de la eliminación de un paciente. Los métodos de la invención resuelven este problema al permitir el procesamiento de PBMC o monocitos aislados a partir de PBMC que se han enviado mediante entrega durante la noche o durante más tiempo.

En tercer lugar, las células dendríticas cargadas con antígeno se congelan por lo general en DMSO y se almacenan hasta la descongelación, el lavado y la resuspensión en un portador farmacéuticamente aceptable libre de DMSO antes de la administración a un paciente. La etapa de lavado se incluyó en los ensayos clínicos previos con vacunas de DC, porque se pensó que el DMSO tiene efectos perjudiciales en las DC no congeladas o descongeladas. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que el DMSO no tiene un efecto perjudicial apreciable sobre las células dendríticas. De este modo, no hay necesidad de lavar y resuspender la vacuna DC descongelada antes de la administración. Omitiendo esta etapa aumenta la facilidad de administración y disminuye tanto el riesgo de contaminación como los efectos adversos para las DC debido a manipulaciones adicionales.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona un método de producción de las células dendríticas a partir de monocitos, que comprende:

- a. proporcionar monocitos que se han incubado a una temperatura de 1 °C - 34 °C, durante un período de aproximadamente 6 a 96 horas desde el momento en que se retiran de un sujeto; e
- b. inducir la diferenciación de los monocitos incubados en células dendríticas.

Como se usa en este documento, "monocito" se refiere a un leucocito CD14⁺ que tiene la capacidad de diferenciarse en una célula dendrítica. El monocito puede ser de cualquier mamífero, y preferiblemente es un monocito humano. Los monocitos se pueden proporcionar e incubar en composiciones tales como, pero no se limitan a, sangre, fracciones de sangre (por ejemplo, glóbulos blancos (WBC), capas de leucocitos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), etc., y también en composiciones enriquecidas adicionalmente para monocitos. En una realización preferida, los monocitos se proporcionan junto con otras células mononucleares de sangre periférica (PBMC), por ejemplo, como un producto de leucaféresis. En otra realización, los monocitos se enriquecen a partir de PBMC o se aíslan directamente de sangre periférica. Los métodos para aislar monocitos o PBMC que contienen monocitos son conocidos para los expertos en el arte. En realizaciones preferidas, los monocitos se recogen junto con otras PBMC, durante leucaféresis. Los métodos de leucaféresis son conocidos en la técnica. En una realización preferida de la invención, las PBMC que contienen monocitos se obtienen de un sujeto mediante leucaféresis en un hospital, clínica, consultorio médico, etc. La leucaféresis es un procedimiento mediante el cual los glóbulos blancos se eliminan de la sangre de un sujeto, a continuación, el resto se transfunde nuevamente al sujeto. El producto de leucaféresis es por lo general una fracción de sangre enriquecida para PBMC, con bajos niveles de glóbulos rojos, granulocitos y plaquetas contaminantes. Los métodos y equipos para realizar leucaféresis son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, gambrobct.com/Products_&_Services/ para información detallada sobre leucaféresis. Los ejemplos de aparatos de leucaféresis incluyen el COBESpectra™ fabricado por GAMBRO BCT, y el separador de células sanguíneas CS3000 Plus fabricado por Baxter Fenwal.

Los monocitos se pueden enriquecer a partir de sangre o fracciones de sangre (por ejemplo, PBMC), durante o después del período de incubación de 1°C - 34°C. Como se usa en este documento, "enriquecer monocitos" significa un método que aumenta la proporción de monocitos con respecto a otros tipos de células que estaban presentes al comienzo del método. Los expertos en el arte conocen métodos para enriquecer monocitos a partir de PBMC, sangre u otras fracciones de sangre e incluyen, pero no se limitan a, elutriación, FACS, cribado, clasificación magnética, centrifugación en gradiente de Ficoll de baja densidad y similares. Preferiblemente, los monocitos se enriquecen a partir de PBMC, durante elutriación. En una realización alternativa, los monocitos se enriquecen a partir de PBMC después del período de incubación de 6 a 96 horas mediante la selección de monocitos que se adhieren al plástico durante el cultivo celular. En otra realización, los monocitos se enriquecen mediante selección inmunomagnética. La selección inmunomagnética puede ser una selección positiva para unirse a monocitos, o puede ser una selección negativa, para unirse a células que no son monocitos (por ejemplo, células T, células B, etc.)

Una vez aislados de un sujeto, los monocitos (por ejemplo, monocitos purificados, monocitos enriquecidos, PBMC que contienen monocitos, etc.) se incuban a una temperatura de 1 °C - 34 °C, durante un período de aproximadamente 6 a 96 horas desde el tiempo que están aislados de un sujeto. Como se usa en este documento, el tiempo en el que los monocitos o PBMC que contienen monocitos se aíslan de un sujeto se refiere al tiempo en el que se completa el proceso de eliminación de las células del sujeto. Por ejemplo, cuando las PBMC se aíslan de un paciente en el transcurso de un procedimiento de leucaféresis de cuatro horas, el momento del aislamiento sería el momento en el que termina la recogida de PBMC, durante leucaféresis.

Preferiblemente, los monocitos se incuban durante 6 a 96 horas a una temperatura de 3°C - 34°C, o 4°C - 32°C o 5°C - 30°C, más preferiblemente a una temperatura de 6°C - 28°C, incluso más preferiblemente a una temperatura de 6°C - 27°C, 8°C - 26°C o aproximadamente 14°C - 24°C. Los intervalos de temperatura más bajos preferidos son 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C y 14 °C. Los intervalos de temperatura superior preferidos son 20 °C, 21 °C, 22 °C,

23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C y 34 °C. Preferiblemente, el período de incubación es de 8 a 72 horas, más preferiblemente de 10 a 48 horas, incluso más preferiblemente de 12 a 24 horas, y lo más preferiblemente de 15 a 22 horas. Otros intervalos preferidos de tiempos de incubación incluyen de 8 a 48 horas, de 10 a 30 horas, de 26 a 72 horas y de 48 a 80 horas. Los límites inferiores preferidos de los tiempos de incubación se pueden seleccionar desde 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 36 y 48 horas. Los límites superiores preferidos de los tiempos de incubación se pueden seleccionar de 24, 26, 28, 30, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas.

Los monocitos en cualquier forma (por ejemplo, monocitos en sangre, fracciones de sangre, PBMC, monocitos purificados, etc.) se pueden enviar desde un sitio clínico a un sitio de fabricación de células dendríticas durante el período de incubación de 1°C a 34°C. Preferiblemente, los monocitos se envían en un recipiente de temperatura controlada. Los expertos en el arte conocen métodos para mantener la temperatura de los monocitos entre 1 °C - 34 °C, durante el período de incubación. Por ejemplo, los monocitos se pueden incubar en una incubadora o en una sala a 1 °C - 34 °C.

Preferiblemente, los monocitos se someten a algún movimiento (ya sea ocasional o continuo) durante el período de incubación. El movimiento puede ser el movimiento asociado con el envío. En otra realización, las células se pueden balancear o girarse suavemente durante la incubación. Si bien no se desea estar obligado por la teoría, se cree que el movimiento puede prevenir el daño celular asociado con la compactación durante la sedimentación.

Durante el período de incubación de 6-96 horas a 1 °C - 34 °C, los monocitos se incuban sin cultivar. Por "sin cultivar", se entiende que, durante el período de incubación de 6 a 96 horas, los monocitos no se cultivan en un medio de cultivo de células de mamífero (incluyendo, pero no se limitan a, concentraciones fisiológicamente apropiadas (por ejemplo, aproximadamente 1X) de medios de cultivo tales como RPMI, DMEM, X-VIVO 15, AIM-V, StemSpan H2000, y similares) a una temperatura de aproximadamente 36-38 °C. Por el contrario, los monocitos procesados por los métodos de la invención se incuban a 1 °C - 34 °C, preferiblemente en sangre o fracciones de sangre (por ejemplo, suero, plasma, producto de leucaféresis (por ejemplo, PBMC), capa de leucocitos, etc.) soluciones reguladoras salina o biológica tales como solución salina reguladora con fosfato (PBS). Más preferiblemente, el producto de leucaféresis que contiene monocitos se incuba a 1 °C - 34 °C en el recipiente de recogida de leucaféresis (por ejemplo, una bolsa de recogida de sangre). Si bien el producto de leucaféresis se puede transferir a otro recipiente al comienzo o durante el período de incubación, es preferible evitar transferencias innecesarias, lo que podría aumentar la probabilidad de contaminación.

Durante o después de la incubación de 6-96 horas a 1 °C - 34 °C, los monocitos se pueden enriquecer antes de la etapa de diferenciación. Las manipulaciones se pueden realizar en los monocitos o PBMC, etc., durante el período de incubación, siempre que las manipulaciones se realicen a 1 °C - 34 °C. En particular, las PBMC se pueden purificar adicionalmente, o los monocitos se pueden enriquecer a partir de PBMC, durante este período de incubación. Tales manipulaciones incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, elutriación, filtración de flujo tangencial, gradiente de densidad de Ficoll, centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll diluido, centrifugación en gradiente de densidad de Percoll diluido, cribado de anticuerpos, clasificación magnética de células, selección inmunomagnética positiva o negativa y similares. En una realización, los monocitos se pueden enriquecer a partir de PBMC después del período de incubación mediante cultivo en un recipiente (preferiblemente un recipiente de plástico) y selección para monocitos adherentes.

Después de la incubación a una temperatura de 1°C - 34°C, durante un período de aproximadamente 6 a 96 horas, y una etapa opcional de enriquecimiento adicional de los monocitos, se induce a los monocitos a diferenciarse en células dendríticas. Por lo general, los monocitos se diferencian en células dendríticas inmaduras y luego las células dendríticas inmaduras se pueden madurar en células dendríticas maduras. Una variedad de métodos para diferenciar monocitos en células dendríticas, y para madurar las células dendríticas son conocidos para los expertos en el arte.

En una realización, los monocitos se cultivan en un medio que comprende una composición que induce la diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras o maduras. Las composiciones que inducen la diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras son conocidas para los expertos en el arte. Dichas composiciones incluyen, pero no se limitan a, GM-CSF+IL-4; GM-CSF+IL-13; GM-CSF+IL-15; IFN α ; y GM-CSF+TNF α . Preferiblemente, la composición que induce la diferenciación es GM-CSF+IL-4. Las concentraciones de GM-CSF e IL-4 pueden variar desde aproximadamente 400 a 2000 U/ml de cada citoquina. Preferiblemente, la concentración de GM-CSF e IL-4 es de 500 a 1000 unidades/ml de cada citoquina. En una realización, los monocitos se ponen en contacto con GM-CSF e IL-4 durante aproximadamente 4-7 días, más preferiblemente durante aproximadamente 5-6 días, durante cuyo tiempo los monocitos se diferencian en células dendríticas inmaduras.

Después de la diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras, las células dendríticas inmaduras se pueden madurar en células dendríticas maduras. Métodos para madurar células dendríticas son conocidos para los expertos en el arte. En una realización, la célula dendrítica inmadura se madura por contacto con un medio que comprende GM-CSF, IL-4 y un cóctel de maduración (PGE₂, TNF α , IL-6 e IL-1 β). Véase, por ejemplo, Jonuliet et al. (1997) Eur J Immunol 27:3135-3142.

5 En un método de maduración alternativo, las células dendríticas inmaduras se señalizan con una primera señal, que comprende IFN- γ , seguido de una segunda señal que comprende CD40L. Por ejemplo, en una realización, las células dendríticas inmaduras se ponen en contacto con PGE₂, IFN- γ y CD40L, preferiblemente en presencia de GM-CSF e IL-4. En una realización preferida, la puesta en contacto con CD40L se efectúa tras la traducción de un ARNm de CD40L recombinante dentro de las células dendríticas. Preferiblemente, la célula dendrítica se transfecta transitoriamente con un ARNm que codifica CD40L o un fragmento activo del mismo.

10 Más preferiblemente, las células dendríticas inmaduras se ponen en contacto con PGE₂, TNF α , e IFN γ , preferiblemente en presencia de GM-CSF e IL-4, para producir las células dendríticas maduras. La madurez de las células dendríticas se puede incrementar adicionalmente por transfección, preferiblemente transfección transitoria, con un ARN que codifica CD40L. Preferiblemente, las células dendríticas se transfectan con un ARN que codifica CD40L y/o ARN que codifica uno o más antígenos o epítopos de interés. Los métodos de maduración anteriores se describen en la solicitud de los Estados Unidos 11/246,387 cuyos contenidos se incorporan como referencia.

15 En realizaciones preferidas de la invención, las células dendríticas se cargan con uno o más antígenos. Las células dendríticas cargadas con antígeno son útiles como vacunas y para la estimulación in vitro de las células T. Los antígenos se pueden cargar en células dendríticas inmaduras o maduras. Si los antígenos se cargan en células dendríticas inmaduras, entonces las células dendríticas inmaduras se pueden madurar mediante el proceso de carga por sí mismo, o mediante otros métodos de maduración descritos en este documento o métodos de maduración alternativos conocidos para los expertos en el arte. El(los) antígeno(s) se puede(n) cargar como el propio antígeno (por ejemplo, proteínas, péptidos, epítopos, lisados celulares, partículas virales, etc.) o se pueden cargar como un(os) ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) antígeno(s). Preferiblemente, el antígeno se carga como un ácido nucleico que codifica el antígeno. Más preferiblemente, el ácido nucleico es un ARN, más preferiblemente un ARNm. En una realización preferida, el ARNm que codifica uno o más antígenos se cotransfecta con ARNm que codifica CD40L. Preferiblemente, el antígeno es autólogo para el sujeto, y se usa para preparar una vacuna de DC autóloga cargada con antígeno para administración al sujeto. Los métodos para cargar células dendríticas con antígenos peptídicos y proteicos, células, lisados celulares o tisulares, virus o partículas virales, ácidos nucleicos y similares son conocidos para los expertos en el arte.

25 En una realización preferida, el antígeno se carga por electroporación de una célula dendrítica (madura o inmadura) con un ácido nucleico, preferiblemente un ARNm. Preferiblemente, las células dendríticas se transfectan con aproximadamente 0.25 a 4 microgramos de ARN por 10⁶ células dendríticas, más preferiblemente con aproximadamente 2 μ g de ARN por 10⁶ células dendríticas. En una realización, se usa 1 microgramo de ARN tumoral por millón de DC, durante transfección. En otra realización, se usan de 0.25 a 1.0 μ g de cada uno de cuatro ARN que codifican cuatro antígenos separados de un patógeno (por ejemplo, HIV) por 10⁶ células dendríticas.

30 El antígeno puede ser de cualquier fuente. Sin embargo, en realizaciones preferidas, el antígeno o antígeno(s) son autólogos para el sujeto. Por autólogo para el sujeto se entiende que el antígeno se obtiene o se deriva del sujeto. Como ejemplos no limitantes, los antígenos pueden ser de células cancerosas o tejido tumoral obtenido de un sujeto. Los antígenos cancerosos podrían cargarse en células dendríticas como células cancerosas, lisados de células o tejidos cancerosos, extractos de células o tejidos cancerosos, componentes purificados o clonados de células o tejidos cancerosos, ARN total o ARNm total, o ARN o ARNm seleccionados de dichas células o tejidos, ya estén presentes en extractos, purificados, amplificados, traducidos in vitro y similares. Alternativamente, el antígeno se puede obtener o derivar de un patógeno o células infectadas con patógenos presentes en un sujeto.

35 Los métodos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención del cáncer y la infección de patógenos. En realizaciones preferidas, el cáncer es carcinoma de células renales, melanoma, cáncer de mama, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de estómago o cáncer de próstata.

45 El término patógeno se refiere a cualquier virus u organismo que esté implicado en la etiología de una enfermedad y también a derivados atenuados de la misma. Tales patógenos incluyen, pero no se limitan a, patógenos bacterianos, protozoarios, fúngicos y virales, tales como Helicobacter, tales como Helicobacter pylori, Salmonella, Shigella, Enterobacter, Campylobacter, diversas micobacterias, tales como Mycobacterium leprae, Bacillus anthracis, Yersinia pestis, Francisella. tularensis, especies de Brucella, Leptospira interrogans, Staphylococcus, (por ejemplo, S. aureus), Streptococcus, Clostridium, Candida albicans, Plasmodium, Leishmania, Trypanosoma, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la hepatitis C (HCV), virus del papiloma humano (HPV), citomegalovirus (CMV), virus linfotrófico T humano (HTLV), herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple tipo 1, virus del herpes simple tipo 2, coronavirus, virus varicela zóster y virus de Epstein-Barr (EBV)), virus del papiloma, virus de la influenza, virus de la hepatitis B, virus de la poliomielitis, virus del sarampión, virus de la parotiditis y virus de la rubéola. Preferiblemente, el patógeno es un patógeno viral, más preferiblemente un patógeno retroviral, y más preferiblemente HIV o HCV.

55 Las células dendríticas, ya sean maduras o inmaduras, cargadas o no de antígeno, se pueden congelar en una composición que comprende un crioprotector. Numerosos crioprotectores son conocidos para los expertos en el arte. Los ejemplos de citoprotectores incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, etanol, metanol,

5 acetamida, glicerol monoacetato, propanodiol, polietilenglicol, etilenglicol, i-eritritol, D-ribitol, D-manitol, D- sorbitol, D-
 lactosa, i-inositol, cloruro de colina, aminoácidos, albúmina (preferiblemente albúmina sérica humana),
 polivinilpirrolidona, dextrano, sacarosa, Ficoll, sales inorgánicas e hidroxietil almidón. En una realización preferida, el
 crioprotector es DMSO. Preferiblemente, la concentración de DMSO es de 2-20%, más preferiblemente de 5-15%, y lo
 10 más preferiblemente de aproximadamente 10%. También, el medio de congelación puede contener uno o más
 compuestos de poliol derivados de carbohidratos, tales como glucosa, dextrosa, sacarosa, etc., preferiblemente en una
 concentración desde 2-30%, más preferiblemente desde 5 - 10%, lo más preferiblemente 5% de dextrosa. Los métodos
 para congelar células dendríticas son conocidos para los expertos en el arte. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente
 de los Estados Unidos 20040253574, Preferiblemente, el crioprotector es dimetilsulfóxido (DMSO). En realizaciones
 preferidas, la concentración de DMSO es del 5% al 20%. Más preferiblemente, la concentración de DMSO en la
 composición es aproximadamente del 10%.

15 Sorprendentemente, las células dendríticas y las vacunas de células dendríticas preparadas mediante los métodos
 descritos en este documento son capaces de sobrevivir in vitro durante al menos 24 horas postdescongelación después
 de la congelación en presencia de 5% -20% de DMSO y descongelación. Debido a que las células dendríticas cargadas
 con antígeno de la invención son resistentes a DMSO, no es necesario lavar la célula antes de administrar la vacuna de
 células dendríticas. De acuerdo con lo anterior, las vacunas de células dendríticas descongeladas están listas para la
 administración a un sujeto en cualquier momento después de la descongelación. La eliminación de la etapa de lavado
 reduce el riesgo de contaminación y evita manipulaciones adicionales que pueden dañar las células dendríticas. De este
 modo, la divulgación proporciona un método para la administración de una vacuna de células dendríticas cargadas con
 20 antígeno, que comprende descongelar una vacuna de células dendríticas congeladas que comprende al menos 2% a
 20% de DMSO, y administrar la vacuna a un sujeto sin alterar la proporción de células dendríticas a DMSO antes de la
 administración. Preferiblemente, la concentración de DMSO en la vacuna es aproximadamente 5-20%, y más
 preferiblemente 10%.

25 También se describe el uso de una célula dendrítica cargada con antígeno para la preparación de un medicamento
 congelado para el tratamiento o prevención de cáncer o infección de patógeno, en el que el medicamento comprende al
 menos 2% de DMSO y está listo para la administración después de la descongelación.

30 Los métodos de la invención permiten la producción de nuevas células dendríticas con funcionalidad aumentada y
 niveles aumentados de marcadores de madurez. Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona células
 dendríticas maduras derivadas de monocitos, en las que las células dendríticas maduras tienen niveles aumentados de
 una o más moléculas CD80, CD83, CD86, MHC de clase I, o moléculas MHC de clase II en comparación con células
 dendríticas maduras preparadas a partir de monocitos frescos.

35 En otra realización más, la invención proporciona una célula dendrítica madura derivada de monocitos, en la que la
 célula dendrítica puede provocar la producción de IL-2 específica de antígeno a partir de una célula T de memoria. Los
 métodos para medir IL-2 son conocidos en la técnica. Los marcadores de superficie celular y la expresión de otras
 moléculas que son características de las células T de memoria, y que los distinguen de otros tipos de células T, se
 describen en la figura 10.35 de Immunobiology, 6th Edition, Eds. Janeway et al., Garland Science Publishing, New York,
 NY, 2005. Por ejemplo, las células T de memoria expresan altos niveles de CD44, CD45RO, CD45RA, Bcl-2, IFN γ ,
 CD127 y Ly6C; niveles moderados de CD122, y CXCR4; bajos niveles de FasL, y son CD69 y CD25 negativos.

40 Como se describe en este documento, el análisis de micromatrices de niveles de ARN en estado de equilibrio muestra
 una expresión génica alterada entre células dendríticas producidas a partir de monocitos de un día en comparación con
 células dendríticas producidas a partir de monocitos frescos. De este modo, en una realización, la invención proporciona
 una célula dendrítica madura derivada de monocitos, en la que la proporción de estado de equilibrio de ARN de ALOX15
 a ya sea ARN de β -actina o ARN de GAPDH en la célula es menor que 1.0. Preferiblemente, la proporción está entre
 0.2 y 0.7, más preferiblemente entre 0.4 y 0.5, y más preferiblemente aproximadamente 0.45.

45 En otra realización, la invención proporciona una célula dendrítica madura derivada de monocitos, en la que la
 proporción de estado de equilibrio de ARN de CD52 a ARN de β -actina o GAPDH en la célula es mayor que 1.0.
 Preferiblemente, la proporción está entre 1.2 y 5.0, más preferiblemente entre 1.5 y 2.2, o entre 1.8 y 1.9, y más
 preferiblemente la proporción es de 1.86.

50 En otra realización más, la invención proporciona una célula dendrítica madura derivada de monocitos, en la que la
 proporción de estado de equilibrio de ARN de TLR1, ARN de TLR2, ARN de IL-1 ARN o CD69 a ARN de actina o ARN
 de GAPDH en la célula es menor que 1.0. Preferiblemente, la proporción está entre 0.2 y 0.9, y más preferiblemente
 entre 0.5 y 0.8.

55 El ARNm de ALOX15 humano (SEQ ID NO: 1) y las variantes alélicas de los mismos se pueden detectar usando las
 sondas Affymetrix de SEQ ID NOs: 2-12. El ARNm de IL- β humano (SEQ ID NO: 13) y las variantes alélicas de los
 mismos se pueden detectar usando las sondas Affymetrix de SEQ ID NOs: 14-24. El ARNm de TLR1 humano (SEQ ID
 NO: 25) y las variantes alélicas de los mismos se pueden detectar usando las sondas Affymetrix de SEQ ID NOs: 26-36.
 El ARNm de TLR2 humano (SEQ ID NO: 37) y las variantes alélicas de los mismos se pueden detectar usando las

sondas Affymetrix de SEQ ID NOs: 38-48. El ARNm de CD69 humano (SEQ ID NO: 49) y las variantes alélicas de los mismos se pueden detectar usando las sondas Affymetrix de SEQ ID NOs: 50-60. El ARNm de CD52 humano (SEQ ID NO: 61) y las variantes alélicas de los mismos se pueden detectar usando las sondas Affymetrix de SEQ ID NOs: 62-77. El ARNm de GAPDH humano (SEQ ID NO: 78) y las variantes alélicas de los mismos se pueden detectar usando las sondas Affymetrix de SEQ ID NOs: 79-98. El ARNm de β -actina humana (SEQ ID NO: 99) y las variantes alélicas de los mismos se pueden detectar usando sondas Affymetrix de SEQ ID NOs: 100-119.

Los niveles de expresión en estado de equilibrio de ARN se pueden detectar mediante micromatrices, preferiblemente usando la matriz Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0. Alternativamente, la hibridación se puede realizar usando las sondas específicas de genes enumeradas en el párrafo anterior. Preferiblemente, las muestras de ARN extraídas de células dendríticas se pueden aplicar a la matriz Genoma Humano U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, Calif) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Genechip® Expression Analysis Technical Manual, 2004). En resumen, tres microgramos de ARN total enriquecido con el kit de control Genechip® Poly-A RNA (Affymetrix, Santa Clara, Calif.) se convierten en ADNc de primera cadena usando la transcriptasa inversa SuperScript™ II. La síntesis de ADNc de segunda cadena es seguida por la transcripción in vitro para la amplificación lineal de cada transcrito y la incorporación de CTP y UTP biotinilados. Los productos de ARNc están fragmentados a alrededor de 100 nucleótidos, y se hibridan durante 16 horas a las micromatrices. A continuación, las micromatrices se lavan con rigurosidad baja (6xSSPE) y alta (MES 100 mM, NaCl 0.1 M) y se tiñen con estreptavidina-ficoeritrina.

La fluorescencia se amplifica adicionando antiestreptavidina biotinilada y una alícuota adicional de la tinción de estreptavidina ficoeritrina. El GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix, Santa Clara, Calif) se utiliza para recoger la señal de fluorescencia con una resolución de 3 μ m después de la excitación a 570 nm. La señal promedio de dos exploraciones secuenciales se calcula para cada característica de micromatrices de interés. Las imágenes escaneadas se analizaron con el software Genechip® Operating v1.1 (Affymetrix, Santa Clara, Calif.). Preferiblemente, se confirma una alta correlación lineal ($R^2 > 0.95$) de 4 ARN de control incluidos en el kit de control de Poly-A RNA (Affymetrix, Santa Clara, Calif.) como control del éxito del proceso de marcación.

Se importan datos de perfil para todos los genes, o solo los genes de interés (por ejemplo, ALOX15, IL-1 β , TLR1, TLR2, CD69 y/o CD52, así como β -actina y/o GAPDH) en el programa de ordenador GeneSpring™ y se normalizan. Se realizan tres etapas en la etapa de normalización de acuerdo con el método estándar sugerido por GeneSpring™ para matrices Affymetrix.

1) transformación de datos (todos los valores menores que 0.01 fueron configurados a 0.01)

2) Normalización al percentil 50.

3) Normalización a la mediana.

La proporción de ARNm en estado de equilibrio de interés (ARNm de ALOX15, IL-1 β , TLR1, TLR2, CD69 o CD52) a ARNm de GAPDH o β -Actina en estado de equilibrio se puede determinar entonces dividiendo la expresión normalizada del ARNm de interés por la expresión normalizada de GAPDH o ARNm de β -actina.

Las células dendríticas cargadas con antígeno de la invención son útiles como vacunas en el tratamiento o prevención de enfermedades o para la activación de células T, que luego se pueden usar en terapia. Por ejemplo, las células dendríticas cargadas con antígeno se pueden usar para provocar una respuesta inmune contra un antígeno. Se pueden usar como vacunas para prevenir futuras infecciones o enfermedades, o para activar el sistema inmune para tratar enfermedades en curso, tales como, entre otras, la infección por patógenos o el cáncer. Las células dendríticas cargadas con antígeno se pueden formular para usar como vacunas o composiciones farmacéuticas con portadores apropiados tales como soluciones reguladoras fisiológicas u otros líquidos inyectables. Las vacunas o composiciones farmacéuticas se administrarían en cantidades terapéuticamente eficaces suficientes para provocar una respuesta inmune.

Preferiblemente, las células dendríticas se cargan con un antígeno autólogo para el sujeto del que se deriva la célula dendrítica, y se administran al mismo sujeto. Véase, por ejemplo, el documento de los Estados Unidos 5,853,719, que describe la preparación y los usos de células dendríticas cargadas con antígeno y particularmente células dendríticas cargadas de ARN. Alternativamente, la célula dendrítica se puede cargar con un antígeno que no sea autólogo para el receptor deseado de la terapia con DC. Los ejemplos de tales antígenos incluyen, pero no se limitan a, antígenos que son dianas terapéuticas conocidas, tales como telomerasa, antígeno prostático específico y otros marcadores tumorales, o antígenos conocidos de un patógeno.

Métodos para recoger monocitos o PBMC que contienen monocitos

Una variedad de métodos para recoger monocitos y PBMC que contienen monocitos de un sujeto son conocidos para los expertos en el arte. Véase, por ejemplo, gambrobct.com/Products_&_Services/ para información detallada sobre leucaféresis para la recogida de PBMC y elutriación para la purificación de monocitos. En una realización preferida, se

recogen un producto de leucaféresis y plasma en bolsas de citoforesis desechables, desechables, de uso único, estéril separadas, usando el procedimiento AutoPBSC (célula madre de sangre periférica automática) en un Gambro BCT COBE Spectra (Gambro BCT, Lakewood, CO).

5 En un método alternativo a la leucaféresis, las PBMC se obtienen recogiendo sangre en una jeringa heparinizada, dilución en PBS, estratificación sobre Histopaque 1077 (Sigma), centrifugación y recuperación de PBMC en la interfase. Véase, Woodhead et al. (2000) *International Immunol* 12:1051-1061. Los métodos adicionales para recoger, purificar o fraccionar PBMC son conocidos para los expertos en el arte.

10 Después de la recogida del producto de leucaféresis u otro producto sanguíneo, los monocitos contenidos en el mismo se incuban a 1-34 °C, durante 6-96 horas. En una realización, el producto de leucaféresis se recoge en una bolsa y luego se transporta a la instalación de fabricación de vacuna en un recipiente de envío de temperatura controlada mantenido a 1-34°C, preferiblemente a aproximadamente 6-28°C, y más preferiblemente a 8- 26 °C. Los paquetes de gel, tales como los descritos en la Patente de los Estados Unidos 4,102807, que ayudan a prevenir los cambios de temperatura, se pueden incluir en el recipiente de envío. Por ejemplo, los monocitos se pueden enviar en un recipiente aislado (por ejemplo, recipiente aislado con espuma de poliuretano ThermoSafe™ modelo E65) y empacados con paquetes de gel ThermoSafe™ U-tek y esterillas de gel como se muestra en la figura 1. Por ejemplo, en el procedimiento de empaque que se muestra en la figura 1, una esterilla de gel U-tek de 16 oz ajustada a una temperatura de -1 °C se coloca plana en la parte inferior del recipiente E65. Dos esterillas de gel U-tek de 16 oz se pliegan y se colocan entre la primera esterilla de gel y la pared corta del recipiente E65. Dos esterillas de gel U-tek de 16 oz (ajustado a +18 °C) se colocan luego verticalmente al lado de las esterillas de gel anteriores. Un recipiente de trasplante ThermoSafe™ INF3000 se coloca entre los geles. Las bolsas de leucaféresis se colocan en una bolsa interior sellada (STP711). Se puede usar un dispositivo que registra la temperatura de la bolsa interna para controlar la temperatura durante el envío. Uno de esos dispositivos es el ThermoSafe™ DataLogger. La bolsa interior se coloca en una bolsa externa sellada (STP710) y luego las bolsas se colocan en el recipiente INF3000. Se coloca un gel U-tek de 16 oz (+ 18 °C) encima del recipiente INF300 cerrado, cubierto con papel Kraft y luego con un tapón de espuma de 4".
25 Luego se sella la caja con cinta adhesiva y está lista para su envío.

30 Durante o después del período de incubación a 1-34 °C, el producto de leucaféresis se puede procesar o purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll a temperatura ambiente en tubos cónicos de 50 ml para separar y concentrar la fracción de células mononucleares que incluye precursores de células dendríticas (monocitos). Preferiblemente, después de múltiples etapas de lavado con solución salina reguladora con fosfato (PBS), se puede determinar la concentración celular y la viabilidad celular.

Enriquecimiento para monocitos

35 Los métodos de enriquecimiento para monocitos son conocidos para los expertos en el arte, e incluyen, pero no se limitan a, centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll diluido, centrifugación en gradiente de densidad de Percoll diluido, etc.), elutriación, adherencia al plástico, filtración de flujo tangencial, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), técnicas de separación celular inmunológica (cribado de anticuerpos para seleccionar monocitos o eliminar no monocitos (por ejemplo, leucocitos, macrófagos, granulocitos, etc.), lisis diferencial, clasificación magnética de células, etc.), cultivo en bolsas de cultivo de plástico recubiertas con perlas de microportadoras de plástico, etc. Véase, por ejemplo, O'Doherty et al. (1993) *J Exp Med* 178:1067-1076; Young et al. (1990) *J Exp Med* 171:1315-1332; Freudenthal et al. (1990) *PNAS* 87:7698-7702; Bernhard et al. (1995) *Cancer Res* 55:1099-1104; Caux et al. (1992) *Nature* 360:258-261; Read et al. (2003) "Evaluation of a Closed Automated System to Isolate Peripheral Blood Monocytes for Dendritic Cell (DC) Immunotherapy", Ninth annual meeting of the ISCT; Mu et al. (2003) *Scand J Immunol* 58:578-586; Maffei et al. (2000) *Transfusion* 40:1419-1420; mitenybiotec.com; Meyer-Wentrup et al. (2003) *J Hematother Stem Cell Res* 12:289-299; y WO 2004/000444.
40 Por ejemplo, la clasificación magnética de células se puede usar para enriquecer monocitos mediante selección positiva (células CD14+) o mediante selección negativa (esto es, eliminación de células que no son monocitos, por ejemplo, células CD3+, CD19+ y CD2+).

45 Preferiblemente, los monocitos se enriquecen a partir del producto de leucaféresis mediante elutriación, un método automático para aislar monocitos de la leucaféresis en cuestión. Los métodos de leucaféresis son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la elutriación se puede realizar en el sistema de separación celular Gambro BCT Elutra™ (Gambro BCT, Lakewood, CO). La solución reguladora de elutriación se puede preparar adicionando 1000 ml de suero de albúmina humana (HSA) al 5% a una bolsa de 4 l de solución salina equilibrada de Hank (HBSS). Las células se pueden fraccionar por elutriación de acuerdo con el protocolo del fabricante. En una realización preferida, se usa una versión modificada del protocolo del fabricante (Gambro) para la elutriación, en la que la fracción final del rotor es la cuarta fracción en lugar de la quinta fracción. Se puede realizar CBC con análisis diferencial en la fracción de monocitos para verificar la pureza y la recuperación. Alternativamente, la pureza de monocitos se puede evaluar mediante inmunofenotipado con CD14. Los monocitos enriquecidos luego se pueden diferenciar en células dendríticas, o se pueden congelar y almacenar para un uso posterior. En una realización, las células se congelan en bolsas de congelación de 25 ml o 50 ml. Ejemplos de bolsas de congelación incluyen las bolsas de congelación Cryocyte™, las bolsas de congelación Origen™ (Cryostore) y las bolsas de congelación Pall™. Preferiblemente, cada bolsa de congelación contiene 15 ml de hasta 3×10^9 células en medio de cultivo (por ejemplo, AIM V, X-VIVO, RPMI, etc.) con
60

aproximadamente 10-12% de DMSO y 10-20% de plasma filtrado inactivado por calor, aproximadamente 107 a 507 mg/l de concentración final de CaCl_2 y aproximadamente 44 a 241 mg/l de concentración final de MgSO_4 . Las células se pueden congelar usando un congelador de velocidad controlada, y luego se almacenan criogénicamente.

5 En una realización alternativa, después de la incubación de PBMC y la purificación por gradiente de densidad de Ficoll, las PBMC se resuspenden en medio AIM-V® y se siembran en matraces T150 cm^2 a 2.0×10^8 células por matraz. En el caso de que se obtenga un número insuficiente de PBMC, las PBMC se pueden congelar y combinar con una segunda leucaféresis. Los monocitos se seleccionan de la población de células mononucleares de PBMC mediante la adhesión a matraces de plástico estériles de cultivo tisular durante una o dos horas a 37 °C, 5% de CO_2 , $\geq 75\%$ de humedad. Se eliminan las células no adherentes y semi adherentes. Se adiciona PBS a los matraces para eliminar las células no adherentes restantes, las células semi adherentes y el medio residual. Las células adherentes restantes son predominantemente monocitos, y representan una población de monocitos enriquecidos.

Métodos para diferenciar monocitos en células dendríticas

15 Una variedad de métodos para diferenciar monocitos en células dendríticas es conocida para los expertos en el arte. Véanse los documentos U.S. 6,607,722, WO 97/29182, Romani, et al. (1994) J. Exp. Med. 180:83-93; Sallusto and Lanzavecchia (1994) J. Exp. Med. 179:1109 en adelante, y Reddy et al. (1997) Blood 90:3640-3646. La mayoría de estos métodos implican el cultivo de monocitos en presencia de citoquinas que inducen la diferenciación de monocitos en células dendríticas. Los ejemplos de métodos alternativos para diferenciar monocitos en células dendríticas incluyen, pero no se limitan a, exposición a perturbación física (por ejemplo, cizallamiento), irradiación en presencia de un agente fotoactivable capaz de formar fotoaductos con componentes de ADN celular, y/o tratamiento con un agente de unión al ADN, seguido de incubación con agentes efectores de la enfermedad, tales como microbios, hongos, virus y células malignas. Véase la Patente de los Estados Unidos 6,607,722.

20 En una realización, los monocitos se diferencian en células dendríticas mediante cultivo en un medio que comprende una composición que induce la diferenciación de monocitos en células dendríticas. Los medios apropiados para el cultivo de monocitos, células dendríticas inmaduras y maduras incluyen, pero no se limitan a, AIM-V, X-VIVO-15, RPMI, DMEM y similares. Las composiciones que inducen la diferenciación de monocitos en células dendríticas son conocidas en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, GM-CSF más IL-4; GM-CSF más IL-13; e $\text{IFN}\alpha$.

30 En una realización preferida, los monocitos enriquecidos se diferencian en células dendríticas mediante cultivo en presencia de GM-CSF e IL-4 (véase, por ejemplo, WO 97/29182; Sallusto and Lanzavecchia (1994) J. Exp. Med. 179:1109; y Romani et al. (1994) J. Exp. Med. 180:83-93). En resumen, se cultivan monocitos enriquecidos, preferiblemente a una concentración de 1×10^5 células/ml en medio AIM V, medio X-VIVO 15 u otro medio apropiado en presencia de 800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL- 4 durante aproximadamente 4-7 días, preferiblemente 6 días a 37 °C, 5% de CO_2 , $\geq 75\%$ de humedad para permitir la diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras. Las concentraciones de citoquinas se pueden variar. Por ejemplo, las concentraciones preferidas de GM-CSF son de 500 a 1500 U/ml, más preferiblemente de 700 a 1000 U/ml, más preferiblemente de 800 U/ml. Las concentraciones preferidas de IL-4 son 400-1500 U/ml, más preferiblemente 450 a 1000 U/ml, más preferiblemente 500 U/ml. IL-13 o IL-15 se pueden usar en lugar o además de IL-4. Se puede usar $\text{IFN}\alpha$ en lugar de GM-CSF más IL-4, IL-13 o IL-15. A medida que los monocitos se diferencian en células dendríticas, pierden progresivamente la expresión de CD14 y adquieren una expresión de CD80 compatible con el fenotipo de las células dendríticas en el estado inmaduro.

Métodos para la maduración de células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras

40 Los métodos para madurar células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras son conocidos para los expertos en el arte, e incluyen, pero no se limitan a, absorción de antígeno y/o contacto con composiciones que inducen la maduración. Las composiciones que inducen la maduración de células dendríticas inmaduras incluyen, pero no se limitan a, medio acondicionado de monocitos; medio acondicionado de PBMC; *Staphylococcus aureus* fijo (Pansorbin™); lipopolisacáridos (LPS); otros productos de células bacterianas, tales como monofosforil-lípido A (MPL), ácido lipoteicoico, etc.; fosforilcolina; ionóforos de calcio; ésteres de forbol tales como PMA; proteínas de choque térmico; nucleótidos, tales como ATP, etc.; lipopéptidos; receptor tipo Toll 4; ligandos artificiales para receptores tipo Toll; ARN bicatenario, tal como poly-I: C, etc.; secuencias de ADN inmunoestimulante; cóctel de maduración ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β y PGE_2); GM-CSF, IL-4 y cóctel de maduración ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β y PGE_2), GM-CSF, IL-4, PGE_2 y señalización secuencial de $\text{IFN}\gamma$ seguida por la señalización con CD40L; y similares. Véase, por ejemplo, Cisco et al. (2004) J Immunol 172:7162-7168; Jonluit et al. (1997) Eur J Immunol 27:3135-3142; la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos 20040203143; la Solicitud PCT PCT/US2005/036304 (WO2006/042177).

En una realización, se adiciona un cóctel de maduración que contiene $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β y PGE_2 a un cultivo de células dendríticas inmaduras. Las células se cultivan durante la noche (aproximadamente 12 horas o más) para producir las células dendríticas maduras.

55 En una realización alternativa, las células dendríticas inmaduras se transfectan, preferiblemente mediante electroporación, con ARNm que codifica CD40L, y opcionalmente con ARNm que codifica uno o más antígenos, y luego

se cultiva durante la noche (aproximadamente 12 horas o más) en presencia de IFN γ . Y opcionalmente PGE $_2$ para producir las células dendríticas maduras. Se muestran un ADNc y una proteína de CD40L humano en la SEQ ID NO: 120 y la SEQ ID NO: 121, respectivamente. Otros ARNm de CD40L son conocidos para los expertos en el arte.

5 En una realización preferida, se adiciona una formulación de maduración en medio AIM V directamente a la DC inmadura para dar una concentración final de TNF- α (10 ng/ml), IFN- γ (1000 U/ml), y PGE $_2$ (1 μ g/ml). Las células se pueden cultivar durante la noche (aproximadamente 12 horas o más) para producir las células dendríticas maduras. La maduración se puede aumentar opcionalmente además mediante la exposición de las células al ligando CD40 (CD40L), ya sea adicionado al medio de cultivo o, más preferiblemente, expresado dentro de la célula. CD40L se puede expresar de manera constitutiva o transitoria. Preferiblemente, las células dendríticas maduras se transfectan con un ARNm que codifica CD40L, y opcionalmente con ARNm que codifica uno o más antígenos de interés.

Antígenos

15 Se puede cargar cualquier antígeno en células dendríticas inmaduras o maduras. A continuación, el antígeno será procesado y presentado por las DC maduras. Los ejemplos de antígenos incluyen, pero no se limitan a, partículas virales, bacterias u otros patógenos, proteínas y fragmentos de los mismos, polipéptidos, lisados de patógenos, extractos de patógenos, ácidos nucleicos patógenos, células cancerosas, proteínas de células cancerosas y fragmentos de los mismos, lisados de células cancerosas, extractos de células cancerosas y ácidos nucleicos de células cancerosas. Los antígenos pueden ser de origen natural, químicamente procesados o producidos de forma recombinante. Los antígenos se pueden administrar a las células como polipéptidos, proteínas o como ácidos nucleicos usando métodos conocidos en la técnica.

20 Se puede administrar un antígeno en su forma "natural" en el sentido de que ningún ser humano intervino en la preparación del antígeno o inducirlo a entrar en el entorno en el que se encuentra con la célula dendrítica. Alternativa o adicionalmente, el antígeno puede comprender una preparación en bruto, por ejemplo, del tipo que se administra comúnmente en una inyección de alergia convencional o en un lisado tumoral. El antígeno alternativamente se puede purificar sustancialmente, por ejemplo, al menos aproximadamente 90% de pureza.

25 Cuando el antígeno es un péptido, se puede generar, por ejemplo, por escisión proteolítica de proteínas aisladas. Se puede utilizar cualquiera de una variedad de agentes de escisión incluyendo, pero no se limitan a, pepsina, bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, etc. Alternativamente, los péptidos se pueden sintetizar químicamente, preferiblemente en un sintetizador automático tal como está disponible en la técnica, o expresado de forma recombinante. Además, se pueden emplear técnicas recombinantes para crear un ácido nucleico que codifique el péptido de interés, y para expresar ese péptido en las condiciones deseadas. Alternativamente, los ácidos nucleicos que codifican antígenos se pueden purificar o derivar de una célula, tejido o virus.

30 El antígeno puede tener una estructura que es distinta de cualquier compuesto de origen natural. En ciertas realizaciones de la invención, el antígeno es un "antígeno modificado" en el sentido de que el antígeno tiene una estructura que es sustancialmente idéntica a la de un antígeno de origen natural pero que incluye una o más desviaciones de la estructura precisa del compuesto de origen natural.

35 Por ejemplo, cuando el antígeno de origen natural es una proteína o antígeno de polipéptido, un antígeno modificado en comparación con esa proteína o antígeno de polipéptido tendría una secuencia de aminoácidos que difiere de la del antígeno de origen natural en la adición, sustitución, o delección de uno o más aminoácidos, y/o incluiría uno o más aminoácidos que difieren del aminoácido correspondiente en el antígeno de origen natural mediante la adición, sustitución o delección de una o más unidades estructurales químicas unidas covalentemente al aminoácido. En un aspecto, los antígenos de origen natural y modificados comparten al menos una región de al menos 5 aminoácidos que son idénticos al menos en un 75%. Los expertos en el arte apreciarán que, al comparar dos secuencias de aminoácidos para determinar el alcance de su identidad, la separación entre tramos (esto es, regiones de al menos dos) de aminoácidos idénticos no necesita siempre conservarse con precisión. Los antígenos de proteínas o polipéptidos de origen natural y modificados pueden mostrar al menos aproximadamente 80% de identidad, más alternativamente 85%, 45 90%, 95% o más de 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos para al menos una región de al menos 5 aminoácidos. Con frecuencia, puede ser útil para una región mucho más larga (por ejemplo, 10, 20, 50 o 100 aminoácidos o más) de la secuencia de aminoácidos para mostrar el grado de identidad designado.

50 En realizaciones preferidas, el antígeno se administra como un polinucleótido o gen que codifica el antígeno, de modo que la expresión del gen da como resultado la producción de antígeno en el individuo que se está tratando (cuando se administra in vivo) o en el sistema de cultivo celular (cuando se administra in vitro). Las técnicas para generar ácidos nucleicos que incluyen un gen expresable o ARNm, y para introducir tales ácidos nucleicos en un sistema de expresión en el que se producirá cualquier proteína codificada por el gen expresable son conocidas en la técnica y se describen en resumen a continuación. Preferiblemente, el antígeno se administra como un ARNm. El ARN o ARNm obtenido de una 55 célula (por ejemplo, una célula cancerosa, una célula patógena o una célula infectada con patógenos) se puede cargar directamente en las células dendríticas. Alternativamente, el ARN o ARNm se puede amplificar antes de la carga. En una realización, el ARNm total o dirigido se amplifica por RT-PCR usando un cebador que contiene un promotor sentido para hacer una construcción de expresión de ADNc. El ARN transcrito in vitro a partir de la construcción de expresión se

puede usar para cargar las células. Los métodos para aislar, amplificar, transcribir in vitro el ARN y cargar ARN u otros ácidos nucleicos en células dendríticas son conocidos para los expertos en el arte.

5 En una realización de la invención, el antígeno es una o más proteínas de HIV o fragmentos de las mismas. Como ejemplo no limitante, el plasma de un paciente infectado con HIV puede servir como fuente para el aislamiento del ARN del HIV. En una realización, se centrifuga una porción del plasma, y el sobrenadante se recoge y se filtra usando filtros de 0.22 μm y se almacena a -20°C hasta su uso en la formulación de la vacuna de células dendríticas. El ARN del HIV presente en el plasma se amplifica mediante RT-PCR y reacciones de transcripción in vitro para proporcionar una cantidad suficiente de ARN de HIV amplificado para la carga en células dendríticas. En resumen, el ARN viral se transcribe de forma inversa en ADN(ss) monocatenario usando una transcriptasa inversa, soluciones reguladoras de reacción apropiadas y hexámeros aleatorios o cebadores inversos dirigidos. El ADNc monocatenario se amplifica luego mediante PCR en ADN bicatenario en una reacción de PCR primaria usando cebadores múltiples. La identidad de región(es) amplificada(s) en la reacción de PCR primaria se determina mediante la selección de cebadores específicos complementarios a las secuencias diana que flanquean esas regiones. El producto de la reacción de PCR primaria se purifica usando un kit de purificación de QIAquick® PCR y luego sirve como plantilla en una segunda ronda o 10 amplificación por PCR anidada. En esta ronda de amplificación, los cebadores 5' contienen un saliente con un sitio de unión de ARN polimerasa (por ejemplo, un promotor T7), y el cebador 3' contiene un saliente con tramos de poly T. Las modificaciones introducidas por las regiones sobresalientes en una ronda de PCR anidada permiten la transcripción del producto de PCR in vitro y una traducción exitosa tras la administración en células dendríticas. La purificación del ARN transcrito in vitro se realiza usando el kit Qiagen RNeasy®, y el ARN se eluye en agua exenta de nucleasas. Si es necesario, se realiza precipitación de etanol para concentrar el ARN. El ARN se resuspende en agua sin nucleasas y se pasa a través de un filtro de polietilensulfona (PES) de 0.8/0.2 μm , luego se dispensa en tubos de polipropileno de seguridad de 0.5 ml y se carga en DC o se crioconserva a $\leq -150^{\circ}\text{C}$ hasta descongelar antes de la transfección.

En otra realización preferida, el ARN o ARNm se extrae de una o más células cancerosas.

Carga de antígeno de células dendríticas

25 Las células dendríticas se pueden cargar con uno o más antígenos como células dendríticas inmaduras, células dendríticas maduras, o durante la diferenciación de células dendríticas inmaduras a maduras. Las células dendríticas son capaces de ingerir antígenos, tales como proteínas, péptidos, virus, células, lisados celulares y similares. De acuerdo con lo anterior, la carga de antígeno se puede realizar simplemente poniendo en contacto la célula dendrítica con el antígeno o ácido nucleico que codifica el antígeno. Otros métodos para cargar células dendríticas son conocidos para los expertos en el arte, que incluyen, pero no se limitan a, transfección de ácidos nucleicos, exosomas, vectores 30 virales, administración de micropartículas, etc. Véase, por ejemplo, Mitchell et al. (2000) Curr Opin Mol Ther 2:176-181; Zitvogel et al. (1998) Nature 4:594-600; Jenne et al., (2001) Trends Immunol 22:102-106, y la publicación de la Patente de los Estados Unidos 2005/0158856. Uno o más antígenos se pueden cargar directamente en las células dendríticas, o los ácidos nucleicos que codifican uno o más antígenos pueden cargarse (transfectarse) en las células dendríticas. En una realización preferida, las células dendríticas se cargan con ácidos nucleicos que codifican uno o más antígenos. Preferiblemente, el ácido nucleico es un ARNm.

40 Los métodos de transfección de ácidos nucleicos en células dendríticas son conocidos para los expertos en el arte e incluyen, pero no se limitan a, transfección pasiva, transfección mediada por lípidos, transfección mediada por lípidos catiónicos (por ejemplo, DOTAP), transfección mediada por péptidos catiónicos, electroporación. Véase Nair et al. (1998) Nat Biotechnology 16:364-369; Van Tendeloo et al. (2001) Blood 98:49-56; Saeboe-Larssen et al. (2002) J Immunol Methods 259:191-203; Boczkowski et al (2000) Cancer Res 60:1028-1034; Gilboa et al. Immunol Rev (2004) 199:251-263 y la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos 10/177,390.

Carga de células dendríticas por pulsación de péptidos

45 Los métodos para cargar células dendríticas con proteínas, polipéptidos, péptidos, extractos de células o tejidos y otros tipos de antígenos son conocidos para los expertos en el arte. En una realización preferida, las células dendríticas inmaduras se cargan con uno o más antígenos. En una realización de la invención, los péptidos, polipéptidos y/o extractos de células o tejidos se cargan simplemente mediante incubación con células dendríticas inmaduras en medio de cultivo.

50 Carga de antígenos por electroporación seguido de maduración de células dendríticas inmaduras usando un cóctel de citoquinas

En una realización de la invención, las células dendríticas inmaduras se recogen golpeando el matraz de cultivo para desprender las células. Las células en suspensión se transfieren luego a tubos cónicos. Se adiciona PBS al matraz de cultivo para eliminar las células flotantes restantes y el medio residual, que se adiciona al matraz cónico. Algunas células dendríticas inmaduras pueden permanecer adheridas al matraz. El desprendimiento de estas células se promueve mediante la adición de PBS y la incubación de los matraces en cualquier lugar de 2°C hasta la temperatura ambiente. Al final del período de incubación, los matraces se golpean y las células desprendidas se adicionan a los tubos cónicos. A continuación, la suspensión celular total se sedimenta, se lava en PBS y se resuspende en ViaSpan®

enfriado a 4×10^7 /ml en 0.5 ml y se coloca en hielo. Las DC se mezclan con ARNm a $2 \mu\text{g}/10^6$ células para ARNm que codifica antígeno(s) y se colocan en una cubeta de electroporación de 4 mm y se electroporan a un pulso de 275-350 V, 100-300 Ω y 150 μF , y preferiblemente a 325 V, 200 Ω . Inmediatamente después de la electroporación, las DC se lavan en medio X-VIVO 15 y se vuelven a suspender a 1×10^6 /ml en X-VIVO 15 suplementado con GM-CSF (800 U/ml), IL-4 (500 U/ml) y PGE_2 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) e IL-6 (100 ng/ml). A continuación, las células dendríticas inmaduras se incuban durante la noche a 37 °C, 5% de CO_2 , $\geq 75\%$ de humedad para producir las células dendríticas establemente maduras. Las células dendríticas maduras se lavan luego en PBS.

Carga de antígenos por electroporación y maduración usando CD40L

En una realización de la invención, las células dendríticas inmaduras se maduran usando CD40L e IFN- γ . Preferiblemente, las DC inmaduras se transfectan con 4 μg de ARNm de CD40L por 10^6 y ARNm (2 $\mu\text{g}/10^6$ células) que codifican uno o más antígenos por electroporación como se describió anteriormente, y luego se cultivan durante la noche en X-VIVO 15 suplementado con GM-CSF (800-1000) U/ml, IL-4 (500-1000 U/ml), IFN- γ (500-1000 U/ml) o TNF- α (10 ng/ml) y PGE_2 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para generar células dendríticas maduras. Las células dendríticas maduras por este proceso secretan niveles más altos de IL-12 (un factor de crecimiento de células T) y una IL-10 mínima, en comparación con la célula dendrítica madurada por el proceso de cóctel de citoquinas descrito anteriormente.

Carga de antígeno por electroporación de células dendríticas maduras

Las células dendríticas maduras pueden cargarse con antígeno mediante métodos conocidos para los expertos en el arte. En una realización no limitante de la invención, en el sexto día después de iniciar la diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras, se adiciona una formulación de maduración en medio AIM V directamente a la DC inmadura para dar una concentración final de TNF- α (10 ng/ml), IFN- γ (1000 U/ml) y PGE_2 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las células se cultivan durante la noche para producir las células dendríticas maduras. Las DC se recogen luego y se electroporan conjuntamente con 1 mg de ARN que codifica antígeno y opcionalmente con 4 μg de ARN de CD40L por 10^6 células. Después de la electroporación, las células se cultivan durante 4 horas en 1×10^6 células de medio AIM V suplementado con GM-CSF (800 U/ml) e IL-4 (500 U/ml). Las células pueden formularse entonces para administración a un sujeto sin congelación, o formularse para congelación. Para la congelación, las células se formulan preferiblemente en plasma autólogo inactivado por calor, DMSO al 10% y dextrosa al 5% a 2×10^7 células/ml. Los viales criogénicos se llenan con 0.7 ml para un número total de 1.4×10^7 células por vial. Los viales se congelan en cajas de alcohol a -85 °C, durante un mínimo de 4 horas y se transfieren al congelador criogénico para su almacenamiento. La vacuna de células dendríticas congeladas se puede descongelar y administrar a un sujeto sin lavado o reformulación.

Análisis de citometría de flujo de las DC para evaluar la maduración

En un método preferido, se recogen 10^6 DC y se resuspenden en PBS enfriado/FCS al 1%. Ficoeritrina (PE) o anticuerpos conjugados FITC específicos para moléculas MHC (HLA-ABC, HLA-DR), moléculas coestimuladoras (CD80, CD86), marcadores de maduración (CD83) y marcadores de monocitos (CD14) se mezclan con 1×10^5 DC, durante pocillo en placas de 96 pocillos (BD Biosciences) e incubadas a 4 °C, durante un mínimo de 15 minutos. Se utilizaron anticuerpos de isotipo coincidente como controles. Después de un lavado completo, se realizó un análisis de fluorescencia con un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences) usando el software CellQuest (BD Biosciences).

Formulación de vacunas

Los métodos para formular vacunas de células dendríticas son conocidos para los expertos en el arte. En una realización preferida, las células dendríticas maduras se lavan y resuspenden en plasma inactivado por calor (preferiblemente plasma autólogo) y dextrosa al 10% a una concentración de 4×10^7 células/ml. A continuación, las células se pueden diluir 1:1 con una mezcla de plasma inactivado por calor y DMSO al 20% para dar una concentración final de dextrosa al 5%, DMSO al 10% en plasma inactivado por calor. La formulación diana final llenada es 1.4×10^7 células/0.7 ml en un recipiente apropiado para la ciroconservación. Las células dendríticas pueden luego administrarse a un paciente o congelarse, preferiblemente a -85°C, y almacenarse en un congelador criogénico (preferiblemente en un congelador de nitrógeno líquido seco diseñado para evitar la contaminación), preferiblemente a una temperatura de ≤ -150 °C. La vacuna congelada puede luego enviarse a un sitio clínico para la administración del paciente (preferiblemente por inyección intradérmica). Al descongelarse, la vacuna se puede administrar directamente al paciente sin procesamiento adicional.

Otras formulaciones apropiadas para la administración pueden incluir soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas, que pueden contener antioxidantes, soluciones reguladoras, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, conservantes, inmunoestimulantes, citoquinas y adyuvantes.

En una realización preferida, las células dendríticas maduras se suspenden en plasma autólogo inactivado por calor y dextrosa al 10%, a una concentración final de 4×10^7 células/ml. A continuación, estas células se diluyen 1:1 con una

mezcla de plasma autólogo inactivado por calor y DMSO al 20% para dar una concentración final de 2×10^7 células/ml en plasma autólogo inactivado por calor que contiene 5% de dextrosa y 10% de DMSO. La formulación final llena es de 1.4×10^7 células/0.7 ml en un recipiente apropiado para la crioconservación. La vacuna luego se congela y almacena a ≤ -150 °C en un congelador de nitrógeno líquido seco. La vacuna está lista para su administración después de la descongelación, sin necesidad de lavado y resuspensión.

Métodos de administración

La vacuna de células dendríticas se puede administrar mediante una variedad de métodos, tales como, pero no se limitan a, inyección (por ejemplo, subcutánea, intradérmica, intravenosa, intralinfática, intraarticular, intramuscular, intraperitoneal), mediante infusión continua, liberación sostenida desde implantes, etc. Por lo general, las vacunas de DC se han administrado a intervalos de dos a cuatro semanas. La vacuna de células dendríticas se puede administrar con portadores, soluciones reguladoras, diluyentes, adyuvantes, inmunomoduladores, etc., fisiológicamente aceptables. Preferiblemente, la vacuna de células dendríticas es autóloga para el paciente en el que se administra, o es HLA coincidente.

La dosis de células (por ejemplo, células T activadas o células dendríticas) administradas a un sujeto está en una cantidad eficaz, eficaz para lograr la respuesta terapéutica beneficiosa deseada en el sujeto a lo largo del tiempo, o para inhibir el crecimiento de células cancerosas, o para inhibir la infección. Una dosis preferida es aproximadamente 10^7 células. Los modificadores de la respuesta biológica se adicionan opcionalmente para el tratamiento mediante las DC o las células T activadas de la invención. Por ejemplo, las células se administran opcionalmente con un adyuvante, o citoquina tal como GM-CSF, IL-12 o IL-2.

Métodos para evaluar la inmunogenicidad de células dendríticas cargadas con antígeno o células T educadas

La inmunogenicidad de las células dendríticas cargadas con antígeno o células T educadas producidas por los métodos de la invención se puede determinar mediante metodologías bien conocidas que incluyen, pero no se limitan a, las siguientes:

Ensayo de lisis de liberación de ^{51}Cr . Se puede comparar la lisis de dianas marcadas con ^{51}Cr pulsadas con péptido por células T específicas de antígeno. Las composiciones "más activas" mostrarán una mayor lisis de las dianas en función del tiempo. La cinética de la lisis, así como la lisis diana global en un punto de tiempo fijo (por ejemplo, 4 horas) se pueden usar para evaluar el rendimiento. Ware, C.F. et al. (1983) J. Immunol. 131:1312.

Ensayo de liberación de citoquinas. El análisis de los tipos y cantidades de citoquinas secretadas por células T al entrar en contacto con APC modificadas puede ser una medida de la actividad funcional. Las citoquinas se pueden medir mediante ensayos ELISA o ELISPOT para determinar la velocidad y la cantidad total de producción de citoquinas. Fujihashi, K. et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:181; Tanquay, S. and Killian, J.J. (1994) Lymphokine Cytokine Res. 13:259.

Educación de células T in vitro. Las composiciones de la invención se pueden ensayar para determinar la capacidad de provocar poblaciones de células T reactivas a partir de PBMC derivadas de donantes normales o de pacientes. En este sistema, las células T provocadas se pueden analizar para determinar su actividad lítica, liberación de citoquinas, policlonalidad y reactividad cruzada con el epítipo antigénico. Parkhurst, M.R. et al. (1996) J. Immunol. 157:2539.

Ensayos de proliferación. Las células T proliferarán en respuesta a composiciones reactivas. La proliferación se puede controlar cuantitativamente midiendo, por ejemplo, la absorción de 3H-timidina. Caruso, A. et al. (1997) Cytometry 27:71.

Modelos animales transgénicos. La inmunogenicidad se puede evaluar in vivo vacunando ratones transgénicos HLA con las composiciones de la invención y determinando la naturaleza y magnitud de la respuesta inmune inducida. Alternativamente, el modelo de ratón hu-PBL-SCID permite la reconstitución de un sistema inmune humano en un ratón mediante transferencia adoptiva de PBL humanos. Estos animales pueden ser vacunados con las composiciones y analizados para la respuesta inmune como se menciona previamente en Shirai, M. et al. (1995) J. Immunol. 154:2733; Mosier, D.E. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2443.

Modelos de primates Se puede utilizar un sistema modelo de primate no humano (chimpancé) para controlar inmunogenicidades in vivo de ligandos restringidos a HLA. Se ha demostrado que los chimpancés comparten la superposición de las especificidades del ligando de MHC con las moléculas MHC humanas, permitiendo de este modo probar los ligandos restringidos por HLA para la inmunogenicidad relativa in vivo. Bertoni, R. et al. (1998) J. Immunol. 161:4447.

Monitoreo de eventos de transducción de señales TCR. Varios eventos de transducción de señal intracelular (por ejemplo, fosforilación) están asociados con el acoplamiento exitoso de TCR por complejos MHC-ligando. El análisis cualitativo y cuantitativo de estos eventos se ha correlacionado con las habilidades relativas de las composiciones para

activar las células efectoras mediante el acoplamiento de TCR. Salazar, E. et al. (2000) *Int. J. Cancer* 85:829; Isakov, N. et al. (1995) *J. Exp. Med.* 181:375).

Métodos para aislar y caracterizar las células inmunes

- 5 El aislamiento celular o inmunoensayos para la detección de células durante la purificación celular se puede realizar en cualquiera de varias configuraciones, por ejemplo, las revisadas en Maggio (ed.) (1980) *Enzyme Immunoassay* CRC Press, Boca Raton, Fla.; Tijan (1985) "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam; Harlow and Lane, supra; Chan (ed.) (1987) *Immunoassay: A Practical Guide* Academic Press, Orlando, Fla.; Price and Newman (eds.) (1991) *Principles and Practice of Immunoassays* Stockton Press, NY; y Ngo (ed.) (1988) *Non-isotopic Immunoassays* Plenum Press, NY.
- 10 Las células se pueden aislar y caracterizar por métodos de citometría de flujo como un análisis FACS. Se conoce una amplia variedad de métodos de citometría de flujo. Para una descripción general de la citometría de flujo activada por fluorescencia, véase, por ejemplo, Abbas et al. (1991) *Cellular and Molecular immunology* W.B. Saunders Company, particularly chapter 3, and Kuby (1992) *Immunology* W.H. Freeman and Company, particularly chapter 6. Las máquinas FACS están disponibles, por ejemplo, de Becton Dickinson.
- 15 Los agentes de marcación que se pueden usar para marcar el antígeno celular incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, proteínas u otros polímeros tales como matrices de afinidad, carbohidratos o lípidos. La detección procede por cualquier método conocido, tal como inmunotransferencia, análisis de transferencia Western, seguimiento de marcadores radiactivos o bioluminiscentes, electroforesis capilar u otros métodos que rastrean una molécula en función del tamaño, la carga o la afinidad.
- 20 Los siguientes ejemplos están destinados a ilustrar, en lugar de limitar la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Célula dendrítica preparada a partir de leucaféresis de un día

- 25 Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 4 donantes humanos mediante leucaféresis y se transportaron mediante administración durante la noche a una instalación de fabricación de células dendríticas en recipientes de envío de temperatura controlada mantenidos a una temperatura de 8 °C-26 °C. El día de la administración, el producto de leucaféresis se centrifugó en gradiente de densidad Ficoll en tubos cónicos de 50 ml (800 x g) durante 20 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 19-22 °C) para separar y concentrar la fracción de células mononucleares que incluye los precursores de células dendríticas. (monocitos). Después de dos etapas de lavado con solución salina reguladora con fosfato (PBS), se determinaron la concentración celular y la viabilidad celular.
- 30 Después de la tercera etapa de centrifugación/lavado con PBS, las células mononucleares se resuspendieron en medio StemSpan™ H2000 (StemCell Technologies, Inc.) y se sembraron en matraces T150 cm² a 2.0 x 10⁶ células por matraz. Luego se seleccionaron monocitos de la población de células mononucleares por adhesión al matraz de plástico de cultivo tisular estéril durante 1 - 2 horas a 37 °C, 5% de CO₂, ≥75% de humedad. Las células no adherentes y semi adherentes (principalmente linfocitos) se descartaron. Las células adherentes restantes, que eran predominantemente monocitos, se cultivaron en medio StemSpan™ H2000 que contenía GM-CSF (800 U/ml) e IL-4 (500 U/ml). Estas células se incubaron durante 6 días a 5% de CO₂, ≥75% de humedad para permitir la diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras.
- 35 La población rica en células dendríticas inmaduras se recogió golpeando suavemente los matraces para desprender las células. Las células en suspensión se transfirieron a tubos cónicos. Se adicionó PBS adicional a los matraces para eliminar las células flotantes restantes y los medios residuales y se adicionaron a la suspensión celular en los tubos cónicos. Se completó el desprendimiento de las células adherentes restantes adicionando PBS e incubando los matraces a 2-8 °C, durante aproximadamente 10 minutos. Mientras estas células estaban incubando, la suspensión celular en los tubos cónicos se centrifugó, y el sedimento celular se resuspendió en PBS. Al final del período de incubación, los matraces se golpearon suavemente y los contenidos se adicionaron a la suspensión celular en los tubos cónicos. La suspensión celular total se sedimentó y se resuspendió en PBS, y se extrajo una muestra para determinar la concentración celular, la viabilidad celular y el inmunofenotipado. Los siguientes cuatro conjuntos de marcadores celulares se examinaron mediante citometría de flujo: marcadores de linaje de monocitos (CD3, CD14, CD19 y CD56), indicación de presencia de células dendríticas (CD11c), un marcador de células presentadoras de antígenos (HLA-DR) y marcador de células dendríticas maduras (CD83). La preparación enriquecida de células dendríticas inmaduras expresaba niveles insignificantes de marcadores de linaje y CD83, y altos niveles de CD11c y HLA-DR.
- 40 La población rica en células dendríticas inmaduras se recogió golpeando suavemente los matraces para desprender las células. Las células en suspensión se transfirieron a tubos cónicos. Se adicionó PBS adicional a los matraces para eliminar las células flotantes restantes y los medios residuales y se adicionaron a la suspensión celular en los tubos cónicos. Se completó el desprendimiento de las células adherentes restantes adicionando PBS e incubando los matraces a 2-8 °C, durante aproximadamente 10 minutos. Mientras estas células estaban incubando, la suspensión celular en los tubos cónicos se centrifugó, y el sedimento celular se resuspendió en PBS. Al final del período de incubación, los matraces se golpearon suavemente y los contenidos se adicionaron a la suspensión celular en los tubos cónicos. La suspensión celular total se sedimentó y se resuspendió en PBS, y se extrajo una muestra para determinar la concentración celular, la viabilidad celular y el inmunofenotipado. Los siguientes cuatro conjuntos de marcadores celulares se examinaron mediante citometría de flujo: marcadores de linaje de monocitos (CD3, CD14, CD19 y CD56), indicación de presencia de células dendríticas (CD11c), un marcador de células presentadoras de antígenos (HLA-DR) y marcador de células dendríticas maduras (CD83). La preparación enriquecida de células dendríticas inmaduras expresaba niveles insignificantes de marcadores de linaje y CD83, y altos niveles de CD11c y HLA-DR.
- 45 La población rica en células dendríticas inmaduras se recogió golpeando suavemente los matraces para desprender las células. Las células en suspensión se transfirieron a tubos cónicos. Se adicionó PBS adicional a los matraces para eliminar las células flotantes restantes y los medios residuales y se adicionaron a la suspensión celular en los tubos cónicos. Se completó el desprendimiento de las células adherentes restantes adicionando PBS e incubando los matraces a 2-8 °C, durante aproximadamente 10 minutos. Mientras estas células estaban incubando, la suspensión celular en los tubos cónicos se centrifugó, y el sedimento celular se resuspendió en PBS. Al final del período de incubación, los matraces se golpearon suavemente y los contenidos se adicionaron a la suspensión celular en los tubos cónicos. La suspensión celular total se sedimentó y se resuspendió en PBS, y se extrajo una muestra para determinar la concentración celular, la viabilidad celular y el inmunofenotipado. Los siguientes cuatro conjuntos de marcadores celulares se examinaron mediante citometría de flujo: marcadores de linaje de monocitos (CD3, CD14, CD19 y CD56), indicación de presencia de células dendríticas (CD11c), un marcador de células presentadoras de antígenos (HLA-DR) y marcador de células dendríticas maduras (CD83). La preparación enriquecida de células dendríticas inmaduras expresaba niveles insignificantes de marcadores de linaje y CD83, y altos niveles de CD11c y HLA-DR.
- 50 La población rica en células dendríticas inmaduras se recogió golpeando suavemente los matraces para desprender las células. Las células en suspensión se transfirieron a tubos cónicos. Se adicionó PBS adicional a los matraces para eliminar las células flotantes restantes y los medios residuales y se adicionaron a la suspensión celular en los tubos cónicos. Se completó el desprendimiento de las células adherentes restantes adicionando PBS e incubando los matraces a 2-8 °C, durante aproximadamente 10 minutos. Mientras estas células estaban incubando, la suspensión celular en los tubos cónicos se centrifugó, y el sedimento celular se resuspendió en PBS. Al final del período de incubación, los matraces se golpearon suavemente y los contenidos se adicionaron a la suspensión celular en los tubos cónicos. La suspensión celular total se sedimentó y se resuspendió en PBS, y se extrajo una muestra para determinar la concentración celular, la viabilidad celular y el inmunofenotipado. Los siguientes cuatro conjuntos de marcadores celulares se examinaron mediante citometría de flujo: marcadores de linaje de monocitos (CD3, CD14, CD19 y CD56), indicación de presencia de células dendríticas (CD11c), un marcador de células presentadoras de antígenos (HLA-DR) y marcador de células dendríticas maduras (CD83). La preparación enriquecida de células dendríticas inmaduras expresaba niveles insignificantes de marcadores de linaje y CD83, y altos niveles de CD11c y HLA-DR.
- 55 Las células dendríticas inmaduras se lavaron una vez con medio de suero OPTI-MEM® I reducido (GIBCO™) con solución reguladora HEPES, L-glutamina, sin rojo de fenol. Las células dendríticas se transfectaron luego con ARN tumoral amplificado por electroporación en una proporción de aproximadamente 2 µg de ARN por 10⁶ células dendríticas. La electroporación se realizó en cubetas con abertura de 4 mm que contenían 600 µl de una suspensión

ES 2 650 569 T3

5 celular que contenía 5×10^7 células/ml, a un pulso de 500 V durante 500 μ s. Después de la electroporación, las células transfectadas se transfirieron a matraces T150 (una cubeta por matraz) que contenían medio StemSpan H2000™ (medio de cultivo sin suero), suplementado con IL-4 (500 U/ml) y GM-CSF (800 U/ml). Las células transfectadas se incubaron durante 2 - 3 horas a 37°C, 5% de CO₂, \geq 75% de humedad para permitir que las células se recuperaran de la electroporación.

10 Las células dendríticas electroporadas inmaduras se maduraron en medio StemSpan H2000™, suplementado con IL-4 (500 U/ml) y GM-CSF (800 U/ml) y un cóctel de maduración (IL-1 β a 5 ng/ml, IL-6 a 150 ng/ml, TNF- α a 5 ng/ml y PGE₂ a 1 μ g/ml) a 37°C, 5% de CO₂, \geq 75% de humedad durante 20-24 horas. Todas las citoquinas, así como PGE₂, se reconstituyeron o diluyeron (en el caso de PGE₂) en PBS con HSA al 1%. Antes de la etapa de dilución, PGE₂ se reconstituyó en etanol. Las células dendríticas maduras se enjuagaron luego con PBS antes de adicionar solución reguladora de disociación celular (libre de tripsina) y luego se lavaron tres veces con PBS para eliminar la solución reguladora de disociación celular. Se recogieron muestras para determinar la concentración celular, la viabilidad y el inmunofenotipo. Una comparación del inmunofenotipo de células dendríticas inmaduras y maduras se muestra en la tabla 1.

15

Tabla 1

	Donante 39	Donante 40	Donante 41	Donante 42	Promedio	S.D.
DC inmaduras						
% de viabilidad (Tripano)	96.0	95.0	96.0	97.0	96.0	0.8
% de rendimiento (PBMC)	6.1	2.3	1.9	6.0	4.1	2.3
INMUNOFENOTIPO						
Bloqueado en células pequeñas+grandes						
% CD3+	1.2	1.4	0.8	0.9	1.1	0.3
% CD19+	1.9	11.7	3.5	4.8	5.5	4.3
% CD14+	1.4	0.3	0.3	0.0	0.5	0.6
% CD56+	1.0	1.1	0.8	1.0	1.0	0.1
CD3+CD19+CD14+CD56+	5.5	14.5	5.4	6.7	8.0	4.4
Bloqueado en células grandes						
%CD11c+	99.6	97.8	99.7	99.7	99.2	0.9
%CD80+	26.6	77.3	37.0	46.6	46.9	21.9
%CD83+	2.2	2.5	2.3	8.2	3.8	2.9
%CD86+	92.1	42.4	66.2	82.0	70.7	21.7
%HLA-DR+	90.8	74.9	72.4	42.7	70.2	20.1
DC maduras						
Fuente de tumor	Melanoma	Renal CC	Renal CC	Melanoma		
% de viabilidad (Tripano)	93.0	83.0	88.0	91.0	88.8	4.3
% de rendimiento (PBMC)	73.0	72.0	61.0	57.3	65.8	7.9
INMUNOFENOTIPO						
Bloqueado en células pequeñas+grandes						

% CD3+	1.2	1.2	0.9	1.0	1.1	0.2
% CD19+	2.3	11.3	2.2	5.3	5.3	4.3
% CD14+	1.4	0.4	0.9	0.1	0.7	0.6
% CD56+	1.0	1.4	2.0	0.9	1.3	0.5
CD3+CD19+CD14+CD56+	5.9	14.3	6.0	7.3	8.4	4.0
Bloqueado en células grandes						
%CD11c+	99.6	98.9	99.4	99.6	99.4	0.3
%CD80+	90.8	92.8	92.9	91.8	92.1	1.0
%CD83+	75.0	50.8	79.2	72.9	69.5	12.7
%CD86+	99.4	94.2	98.8	99.1	97.9	2.5
%HLA-DR+ (MHC de clase II)	97.5	97.2	98.1	93.9	96.7	1.9

Se suspendieron células dendríticas maduras transfectadas en plasma autólogo a una concentración final de 2×10^7 células/ml. A continuación, las células se diluyeron 1:1 con una mezcla de 80% de plasma y 20% de DMSO para dar concentraciones finales de 3×10^6 o 1×10^7 células/ml en 90% de plasma con 10% de DMSO, luego congeladas en crioviales usando congelación de velocidad controlada, y se almacenan a ≤ -150 °C.

5 Ejemplo 2

Las vacunas de células dendríticas preparadas a partir del producto de leucaféresis de un día permanecen viables durante al menos 2 horas después de la descongelación en 10% de DMSO

10 Una vacuna de células dendríticas congeladas preparada como se describe en el ejemplo 1 se descongeló a 37 °C, y se mantuvo a 20-25 °C o a 2-8 °C, durante 2 horas. La viabilidad se determinó inmediatamente de la postdescongelación y en intervalos de 30 minutos durante hasta dos horas. La viabilidad inmediatamente de la postdescongelación a 37 °C fue del 92%. Los resultados se muestran en la tabla 2 y confirman que la vacuna puede descongelarse y almacenarse en DMSO al 10% durante al menos dos horas.

Tabla 2

Tiempo de postdescongelación (minutos)	Viabilidad (%)	
	20-25 °C postdescongelación	2-8 °C postdescongelación
30	91	88
60	89	86
90	89	80
120	87	83

15 Ejemplo 3

Aislamiento de células mononucleares de un paciente y diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras

20 Se recogieron células mononucleares de sangre periférica y plasma de un paciente o voluntario mediante leucaféresis a temperatura ambiente en un sitio clínico. El producto de leucaféresis (PBMC) y el suero se enviaron durante la noche en un recipiente de temperatura controlada mantenido en un intervalo de temperatura de 6-28 °C. El día siguiente a la leucaféresis, las PBMC se purificaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll en tubos cónicos de 50 ml a temperatura ambiente para separar y concentrar la fracción de células mononucleares que incluye monocitos (precursores de células dendríticas) y leucocitos. Las células mononucleares se lavaron varias veces en solución salina reguladora con fosfato (PBS) y se determinó la concentración celular. Después de la etapa de centrifugación/lavado final

5 con PBS, las células mononucleares se resuspendieron en medio AIM-V y se sembraron en matraces T150 cm² a 2.0 x 10⁸ células por matraz. Luego se seleccionaron monocitos de la población de células mononucleares por adhesión a matraces de cultivo de tejidos estériles durante una o dos horas a 37°C, 5% de CO₂, ≥75% de humedad. Las células no adherentes y semiadherentes se eliminaron mediante lavado suave con PBS. Las células adherentes restantes, que eran predominantemente monocitos, se cultivaron en medio de cultivo X-VIVO 15 que contenía 1000 U/ml de GM-CSF y 1000 U/ml de IL-4. Las células se incubaron durante 6 días a 37 °C, 5% de CO₂, ≥ 75% de humedad para permitir la diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras.

10 Después del cultivo in vitro, la población rica en células dendríticas inmaduras se recogió golpeando los matraces para desprender las células. Las células en suspensión se transfirieron a tubos cónicos. Se adicionó PBS a los matraces para eliminar las células flotantes restantes y el medio residual, y luego se adicionó a la suspensión de células en los mismos tubos cónicos. El desprendimiento de las células dendríticas inmaduras restantes adherentes se promovió mediante la incubación en PBS a 2-8 °C. Al final del período de incubación, los matraces se golpearon y los contenidos se adicionaron a la suspensión celular en los mismos tubos cónicos. La suspensión celular total se sedimentó y se resuspendió en PBS, y se extrajo una muestra para determinar la concentración celular.

15 Las células dendríticas inmaduras se lavaron y se resuspendieron en ViaSpan y se transfectaron con 2 µg de ARNm que codifica antígeno por 10⁶ células dendríticas. La electroporación se realizó en cubetas con aberturas de 4 mm que contenían 0.4 ml de la suspensión celular (4 x 10⁷ células/ml) a un pulso de 300 V, 100 Ω y 150 µF. Después de la electroporación, las células transfectadas se diluyeron con medio X-VIVO 15, se centrifugaron y se resuspendieron en medio X-VIVO 15 (sin suero) suplementado con GM-CSF (800 U/ml), IL-4 (500 U/ml), IL -1β (10 ng/ml), IL-6 (150 ng/ml), 20 TNF-α (10 ng/ml) y PGE₂ (1 µg/ml). Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO₂, ≥75% de humedad durante la noche para madurar.

25 Las células dendríticas maduras transfectadas se suspendieron en plasma autólogo inactivado por calor y dextrosa al 10%, a una concentración final de 4 x 10⁷ células/ml. A continuación, las células se diluyeron 1:1 con una mezcla de DMSO al 20% para dar una concentración final de 2 x 10⁷ células/ml en plasma autólogo inactivado por calor que contiene DMSO al 10% y dextrosa al 5% y luego se congelaron en crioviales estériles a ≤ 150 °C.

Ejemplo 4

Caracterización física y funcional de las células dendríticas preparadas a partir de monocitos incubados durante la noche a 6-28 °C

30 Los datos en este ejemplo respaldan la funcionalidad y la viabilidad de producir células dendríticas transfectadas con ARN a partir de un producto de aféresis de un día. Las células dendríticas se prepararon mediante el método descrito en el ejemplo 3. Los datos siguientes muestran que las células dendríticas se pueden fabricar reproduciblemente con el rendimiento apropiado de un producto de aféresis de un día y que las células resultantes (1) presentan un fenotipo maduro clásico, (2) se pueden transfectar eficientemente con ARN, y (3) se pueden crioconservar con una alta viabilidad posdescongelación. Inmunofenotipo de las DC. Las DC maduras se caracterizaron ampliamente por tinción de FACS para marcadores moleculares que deberían estar presentes o ausentes en la preparación final de la célula. HLA-DR, 35 CD83, CD86, CD80, CD1a y CD209 deben mostrar alta expresión y CD14, CD56, CD19 y CD3 deben mostrar baja expresión. La tabla 3 (a continuación) muestra los resultados (media y desviación estándar para el porcentaje de células positivas) compilados de 11 análisis consecutivos de vacunas de células dendríticas productoras de PBMCs obtenidas de diferentes donantes sanos.

40 Tabla 3

Expresión de marcadores de superficie celular en DC producidas a partir de monocitos de un día		
Marcador	% de células positivas (Media)	Desviación estándar % de células positivas
HLA-DR	99.08	1.21
CD83	91.46	4.97
CD14	0.87	0.89
CD56	6.45	6.85
CD19	1.57	0.71
CD3	2.33	0.66

CD86	98.87	1.66
CD80	83.73	25.50
CD1a	56.15	19.45
CD209	95.73	4.81

Estos datos, junto con fotomicrografías (no mostradas) demuestran que las DC producidas por los métodos de las condiciones de la invención presentan el fenotipo y la morfología de DC clásicos. Adicionalmente, las desviaciones estándar relativamente bajas son indicativas de la reproducibilidad del proceso.

5 Rendimiento, fenotipo y viabilidad. Los métodos de células dendríticas se han probado exhaustivamente y se ha demostrado que generan de forma reproducible células dendríticas maduras transfectadas con ARN de alta calidad. La tabla 4 muestra el resultado de 11 análisis de vacunas usando ARN de la línea celular tumoral amplificada total como carga útil del antígeno y células dendríticas donantes normales como el vehículo.

Tabla 4

Resumen de los resultados de la prueba de liberación para el producto de vacuna de DC generado en 11 análisis de consistencia					
Análisis de consistencia	Fenotipo MatDC			Viabilidad postdescongelación	Dosis
	CD14	CD83	HLA-DR		
1	1.5%	86.6%	99.7%	81%	5
2	0.7%	95.0%	100.0%	N/A	2
3	2.9%	94.8%	99.9%	93%	22
4	0.3%	89.6%	96.1%	88%	15
5	2.0%	81.2%	97.7%	64%	17
6	0.5%	92.7%	100.0%	88%	34
7	0.1%	85.8%	98.7%	84%	20
8	0.6%	95.2%	99.5%	85%	12
9	0.5%	93.0%	99.8%	83%	18
10	0.3%	96.4%	99.8%	90%	38
11	0.2%	95.6%	98.6%	88%	12
Media ± SD para 11 análisis	0.9% ± 0.9%	91.4% ± 5.0%	99.0% ± 1.2%	84% ± 8%	17.7±10.8

10

Las DC transfectadas con ARN madurado expresan CCR7 y son migratorias. Además de los marcadores de DC maduras descritos anteriormente, se evaluó la expresión de CCR7, que es crítica para la migración de los ganglios linfáticos de las DC in vivo. En este estudio, se utilizó el análisis FACS con un anticuerpo específico de CCR7 para examinar las DC transfectadas con ARN descongeladas producidas usando el proceso de GMP a escala completa (los análisis de consistencia 3, 4, 6, 7, 8 y 10). Los resultados se muestran en la tabla 5 a continuación:

15

ES 2 650 569 T3

Tabla 5

Porcentaje de células dendríticas CCR7+

	IgG isotipo control	anticuerpo CCR7
Análisis #3	0.37*	41.9
Análisis #4	0.12	44.6
Análisis #6	0.14	42.42
Análisis #7	0.65	42.96
Análisis #8	0.17	26.94
Análisis #10	0.13	32.76
*% de células positivas		

Además de demostrar la presencia física de CCR7 en las DC después de la maduración, se demostró que las DC también tienen capacidad migratoria usando el ensayo de migración espontánea de la matriz de gel de colágeno, que indica que la CCR7 expresada también es funcional (datos no mostrados).

- 5 Las DC transfectadas con ARN proporcionan un soporte coestimulante funcional. Los experimentos descritos anteriormente muestran que las DC fabricadas expresan todos los marcadores coestimuladores críticos, mientras que los experimentos siguientes demuestran que estas moléculas son funcionales. Con este fin, se determinó la capacidad de las DC para estimular la producción de interferón gamma (INF- γ) de PBMC en un ensayo de linfocitos allo mezclados (MLR) usando DC descongeladas fabricadas a partir de 3 donantes diferentes junto con PBMC previamente congeladas de cada donante. La expectativa era que las DC no estimularan la producción de INF- γ de sus PBMC autólogas compatibles con HLA, pero sí lo harían cuando se mezclaran con PBMC no autólogas. Todas las combinaciones por pares se probaron usando ELISPOT (INF- γ) como la lectura. Los datos se presentan en la figura 2. El resultado de este experimento demuestra que, como se anticipó, solo las combinaciones DC/PBMC de apareamiento erróneo provocan la producción de INF- γ , una propiedad que requiere la expresión de MHC funcional y moléculas coestimuladoras.
- 10
- 15 Las DC maduras tienen funcionalidad añadida. En este experimento, el cóctel de citoquinas usado para madurar las DC después de la transfección y el precongelamiento contiene TNF- α , IL-1 β , IL-6 y PGE₂. Para demostrar que las DC maduras son superiores a las DC inmaduras, la capacidad de estas dos poblaciones (del mismo donante) para estimular la producción de citoquinas T_H¹ a partir de células T autólogas. Ambas poblaciones de DC se transfectaron con ARN que codifica la proteína de la matriz de la influenza y se usaron para estimular CTL de memoria específicos de la influenza a partir de PBMC autólogas. La figura 3 a continuación muestra los resultados de los análisis ELISPOT (# manchas/pocillo como una función de las PBMC de entrada). No se observó diferencia estadística entre DC inmaduras y maduras para provocar la producción de INF- γ a partir de células T de memoria específicas para la influenza. Sin embargo, solo las DC maduras también podrían provocar la producción de IL-2 a partir de estas células. La inducción de IL-2 se considera importante porque (1) la secreción inducida de IL-2 sostiene la proliferación de CTL específicos del antígeno autocrino y (2) recientemente se ha demostrado que la baja producción de INF- γ e IL-2 se correlaciona con un aumento del riesgo de mortalidad en pacientes con HIV y en un estudio reciente, la falta de secreción de INF- γ o IL-2 ha resultado en la función de las células T deteriorada y la incapacidad de mantener las respuestas de la memoria central. Por simplicidad, los controles negativos no fueron graficados. El número promedio de manchas observadas de las PBMC solas (esto es, sin DC) fue de 9.7 (INF- γ) y 1.3 (IL-2). Este experimento se repitió con vacunas preparadas a partir de las PBMC de 3 donantes independientes y los resultados fueron cualitativamente idénticos. De acuerdo con lo anterior, las DC maduras tienen funcionalidad añadida y superior en comparación con las DC inmaduras.
- 20
- 25
- 30
- 35 Las DC transfectadas con ARN postdescongelación son estables. Si bien los protocolos clínicos pueden especificar la inyección inmediata de la vacuna de células dendríticas al descongelarse, podrían surgir circunstancias imprevistas que podrían retrasar la administración. Para demostrar que las DC permanecerían viables y funcionales si se descongelaban, pero no se inyectaban inmediatamente, se realizó el siguiente experimento. Se descongelaron dos viales de cada una de 2 preparaciones de células dendríticas correspondientes a 2 donantes sanos diferentes. Un vial de cada donante se analizó inmediatamente en un ensayo allo MLR mientras que el segundo vial de cada preparación se dejó permanecer a temperatura ambiente durante 40 minutos antes de analizarse por el mismo método. Las PBMC utilizadas en este experimento incluyeron células autólogas de cada donante, así como una tercera muestra de PBMC de un donante no relacionado con ninguna de las dos. La lectura para este ensayo fue ELISPOT (INF- γ). El resultado de este experimento se muestra en la figura 4 e indica que no existe una diferencia apreciable en la función entre las DC analizadas inmediatamente luego de la postdescongelación y las que permanecieron a temperatura ambiente durante 40 minutos. Además de este ensayo funcional, se determinó la viabilidad celular postdescongelación y 40 minutos postdescongelación mediante la exclusión del colorante tripano y se obtuvieron resultados idénticos (datos no mostrados).
- 40
- 45

La congelación-descongelación no afecta la función de DC. Para evaluar si la función de DC se ve afectada negativamente por el proceso congelación-descongelación, se comparó la funcionalidad de precongelación y postdescongelación de DC. La funcionalidad se evaluó mediante la capacidad de las DC para estimular una respuesta de memoria específica de la influenza de PBMC autólogas en función de la disminución de la concentración de ARNm de la influenza usada para la transfección. La lectura del ensayo fue ELISPOT (INF- γ). Los resultados se muestran en la figura 5 a continuación e indican que el proceso de congelación-descongelación no tiene ningún efecto sobre la funcionalidad de las DC en este ensayo. Se mezcló una cantidad constante de ARNm de GFP (0.5 μ g) para controlar las eficacias de transfección. Las muestras de postdescongelación se descongelaron después de congelarse durante 24 horas.

Expresión de proteína después de la electroporación de DC con ARNm. Como primer paso, se evaluó si la transfección de DC con ARNm conduce a la expresión adecuada de la proteína codificada por ARNm. Para la preparación de DC, las PBMC (ya sea frescas o congeladas) obtenidas por leucaféresis de voluntarios sanos se enriquecieron para monocitos mediante adherencia al matraz de plástico después de una incubación de 2 horas in vitro. Después del lavado, las células adherentes se cultivaron durante seis días en medio X-VIVO 15 suplementado con factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos recombinantes (rGM-CSF) e interleucina-4 (rIL-4) para generar DC inmaduras (iDC). Luego las iDC se electroporaron (300V, 150 μ F, 100 Ω) con ARN que codificaba proteínas virales o de control y se indujeron a madurar durante 24 horas en medio X-VIVO 15 suplementado con IL-1 β , IL-4, IL-6, GM-CSF, TNF- α y prostaglandina E₂ (PGE₂). Para probar la expresión de la proteína después de la transfección, las DC se electroporaron con ARN que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) y se midió la expresión mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura 6, una gran fracción de DC maduras producidas a partir de monocitos de un día expresa altos niveles de GFP hasta cuatro días después de la transfección, confirmando que este método es eficaz para promover la expresión proteica a largo plazo en DC.

A continuación, se determinó la capacidad de las DC autólogas transfectadas por electroporación con ARNm que codifica la proteína pp65 de CMV para inducir respuestas de células T CD4 y CD8 en PBMC de individuos infectados con CMV. Los sujetos infectados con CMV se identificaron estimulando PBMC de varios donantes de sangre con péptidos inmunodominantes bien definidos derivados de la proteína pp65 y midiendo la secreción de IL-2/INF- γ así como la proliferación celular tanto en las células T CD4 como CD8. Se seleccionaron los individuos en los que se detectaron respuestas de células T específicas de CMV positivas y que aceptaron someterse a leucaféresis después del consentimiento informado para estudios posteriores.

Las DC de estos individuos se prepararon como se describió anteriormente. Las DC maduras transfectadas con ARN que codifica la proteína pp65 de CMV se incubaron a continuación durante 16 horas (ICS) o 6 días (proliferación) con PBMC autólogas en una proporción de 1/40. Después de la estimulación, la IL-2 y la secreción de INF- γ (Figura 7) y la proliferación (Figura 8) de las células T CD4 y CD8 específicas de CMV se evaluaron mediante citometría de flujo. Las DC electroporadas con ARN de pp65 de CMV indujeron selectivamente una alta expresión de INF- γ e IL-2, así como la proliferación de células T CD8 de sujetos infectados con CMV. Sin embargo, este protocolo induce una activación mínima de las células T CD4, como lo demuestra el bajo nivel de secreción y secreción de citoquina detectado en las células T CD4 (Figuras 7 y 8, paneles inferiores).

Ejemplo 5

Comparación de la diferenciación de monocitos en células dendríticas usando 500 U/ml o 1000 U/ml de IL-4

Se lavaron las PBMC de leucaféresis de un día mantenidas a una temperatura de 6-28°C y se sembraron @ ~ 2x10⁸/matraz en medio AIM-V para una etapa de adherencia de 2 horas. Después de 2 horas, se eliminaron las células no adherentes, y las células adherentes se lavaron y resuspendieron en X-VIVO 15 suplementado con 1000 U/ml de GM-CSF y ya sea 500 U/ml o 1000 U/ml de IL-4; se incubaron a 37 °C, durante 6 días. Además, para cultivo en X-VIVO 15 suplementado con 1000 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4, el efecto de cambiar el medio en el día 3 se comparó con el cultivo durante 6 días sin un cambio en el medio. Específicamente, en el día 3, los medios se eliminaron junto con las células en suspensión; el matraz se lavó suavemente con medio X-VIVO para recoger células poco adherentes; y los medios y el lavado se centrifugaron @ 1300 rpm durante 8 minutos para sedimentar las células. Las células se resuspendieron en medio X-VIVO 15 fresco suplementado con 1000 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4; los medios y las células se adicionaron nuevamente a los matraces que aún contenían las células adherentes; y los matraces se incubaron a 37°C, durante otros tres días.

Todos los matraces se recogieron individualmente para la electroporación. El día 6 las DC se transfectaron con 2 μ g de ARNm de GFP por 10⁶ células (20 μ g de ARNm de GFP por 5x10⁶ células), se resuspendieron en X-VIVO 15 y se sembraron a 1x10⁶/ml; suplementado con 800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4 y maduraron con cóctel de citoquinas (TNF α -10ng/ml; IL-1 β -10ng/ml; IL-6 -100 ng/ml; PGE₂ - 1 μ g/ml). Las DC se incubaron durante la noche @ 37 °C; 5% de CO₂. El fenotipado se realizó en DC inmaduras el día 6 (DC inmaduras, Figura 9) y 24 horas después de la transfección (DC maduras, Figura 10). El rendimiento (% Rec) y la viabilidad (% V) para cada condición de cultivo inmediatamente después de la transfección y a las 24 horas después de la transfección se muestran en las tablas 6A-C.

Tabla 6A

1000 U/ml de IL-4										
	Rendimiento DC día 6	% Rec	% V	DC, durante Tn	DC @ 0hr después de Tn	% Rec	% V	DC @ 24 horas después de Tn	% Rec	% V
F1	3.76x10 ⁷	21	97	5x10 ⁶	2.08x10 ⁶	42	81	1.03x10 ⁶	21	84
F2	3.88x10 ⁷	22	94	5x10 ⁶	2.41 x10 ⁶	48	84	8.80 x10 ⁵	18	91
F3	4.44x10 ⁷	25	96	5x10 ⁶	2.06 x10 ⁶	41	83	8.10 x10 ⁵	16	84
mezcla				5 x10 ⁷	1.04 x10 ⁷	52	80	7.40 x10 ⁶	37	94
mezcla				2 x10 ⁷	1.11 x10 ⁷	56	93	7.50 x10 ⁶	38	93

Tabla 6B

500 U/ml de IL-4										
	Rendimiento DC día 6	% Rec	% V	DC, durante Tn	DC @ 0hr después de Tn	% Rec	% V	DC @ 24 horas después de Tn	% Rec	% V
F1	4.16x10 ⁷	23	97	5x10 ⁶	2.81 x10 ⁶	56	77	1.19 x10 ⁶	24	87
F2	4.23x10 ⁷	24	97	5x10 ⁶	2.43 x10 ⁶	49	84	1.32 x10 ⁶	26	85
F3	3.87x10 ⁷	22	96	5x10 ⁶	3.26 x10 ⁶	65	84	1.52 x10 ⁶	30	89

5

Table 6C

500 U/ml de IL-4, cambio del medio el día 3										
	Rendimiento DC día 6	% Rec	% V	DC, durante Tn	DC @ 0hr después de Tn	% Rec	% V	DC @ 24 horas después de Tn	% Rec	% V
F1	2.81x10 ⁷	16	94	5x10 ⁶	1.79x10 ⁶	36	62	9.6x10 ⁵	19	82
F2	2.82x10 ⁷	16	93	5x10 ⁶	2.37x10 ⁶	47	69	9.0x10 ⁵	18	83
F3	2.06x10 ⁷	11	85	5x10 ⁶	2.15x10 ⁶	43	71	1.07x10 ⁶	21	84

Ejemplo 6

Enriquecimiento de monocitos por elutriación y diferenciación en DC inmaduras y maduras

10 La elutriación, también conocida como centrifugación a contracorriente, se realizó en el sistema de separación de células Elutra™ (Gambro BCT, Lakewood, CO) como un método automático para aislar monocitos de una leucaféresis de un día, que se había enviado a la instalación de fabricación desde un sitio de recogida mediante entrega durante la noche en un recipiente con temperatura controlada (6-28 °C). La solución reguladora de elutriación se preparó adiciendo 1000 ml de suero de albúmina humana al 5% (HSA, Baxter Healthcare, Westlake, CA) a una bolsa de 4 l de solución de sales balanceadas de Hank (HBSS, Cambrex Bio Science, Walkersville, MD). Esta solución reguladora de elutriación se adicionó al producto de la féresis de un día en un volumen igual al de la féresis. El sistema de separación de células Elutra™ (Gambro BCT, Lakewood, CO) se cebó con solución reguladora de elutriación y se cargó el producto de la féresis. Después de que se realizó el procedimiento de elutriación, se recogieron monocitos de la fracción de rotor apagado. Los monocitos se almacenaron congelados.

15

Los monocitos de la elutriación congelados se descongelaron, y luego se diferenciaron a 1 millón de células/ml en X-VIVO 15 (Cambrex Bioscience, Walkersville, MD) con 800 U/ml de GM-CSF (Berlex Laboratories, Richmond, CA) y 500 U./mL de IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, MN) en matraces durante 5 días para producir las células dendríticas inmaduras (iDC). Las iDC se recolectaron y el antígeno se cargó con ARN tumoral RCC amplificado usando electroporación. Las células se cultivaron con 800 U/ml de GM-CSF, 500 U/ml de IL-4 y citoquinas de maduración (TNF- α , IL-1 β , IL-6 y PGE₂) y se recogieron después de 24 horas de cultivo. El recuento celular y la viabilidad para las células dendríticas maduras (mDC) se determinaron usando la exclusión del azul de tripano por ViCell (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). Las mDC resultantes fueron fenotipadas. Las células cultivadas en matraces fueron 99% CD83+ y 0.2% CD14+. El rendimiento de mDC fue del 34% de las células CD14+ cultivadas en matraces.

10 Ejemplo 7

Comparación de la expresión de moléculas coestimuladoras en DC preparadas a partir de leucaféresis fresca frente a la de un día

Se recogió sangre periférica de 3 donantes humanos sanos en tres días separados mediante leucaféresis y se transportó a la Universidad de Montreal dentro de los 30 minutos posteriores a la recogida. Se eliminaron 20 ml de la leucaféresis y se preparó plasma autólogo mediante centrifugación. El volumen de leucaféresis se dividió en dos partes iguales. Una parte se procesó inmediatamente para generar monocitos "frescos", mientras que la segunda parte se almacenó como alícuotas de 20 ml en cinco tubos cónicos de 50 ml para generar células de una "féresis de un día". Los tubos se colocaron en un recipiente de plástico dentro de una caja que se almacenó inclinada sobre una plataforma oscilante entre 16-20 °C, durante 24 horas. Después del período de incubación, las PBMC se separaron usando un gradiente de densidad Ficoll.

Se separó una fracción de células mononucleares que incluye los precursores de células dendríticas (monocitos) tanto de la féresis fresca como de la de un día usando un gradiente de densidad de Ficoll. La Leucaféresis se dispuso en capas en Ficoll en tubos cónicos de 50 ml y los tubos se centrifugaron (800Xg) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron cuatro veces con solución salina reguladora con fosfato (PBS) y se contaron para determinar la concentración celular y la viabilidad celular. Para obtener una población de monocitos altamente purificada, la fracción mononuclear se purificó adicionalmente usando microperlas de CD14 (Miltenyi). Se resuspendieron 1×10^9 células en 8 ml de solución reguladora que contenía PBS, BSA al 0.5% y EDTA 2 mM (solución reguladora Miltenyi). Se adicionaron 2 ml de microperlas de CD14 a cada tubo de 50 ml que contenía 1×10^9 células y se incubaron a 4 °C, durante 15 minutos. Las células se lavaron en 100 ml de la misma solución reguladora, se centrifugaron a 300 x g y se resuspendieron en 20 ml de solución reguladora Miltenyi. La suspensión celular se aplicó a cuatro columnas LS situadas debajo del campo magnético (Miltenyi Quadromax™). Después de la aplicación de las células usando flujo por gravedad, las columnas se lavaron tres veces con 3 ml de solución reguladora Miltenyi. Los monocitos se eluyeron dos veces en ausencia de un campo magnético con 5 ml de solución reguladora Miltenyi y se centrifugaron a 300 x g durante 10 minutos. La pureza tanto del eluato como de las fracciones de flujo se determinaron con citometría de flujo usando anticuerpos específicos para CD3, CD19, CD16, CD56, CD14 y CD209. La fracción de eluato contenía 88-98% de monocitos y menos de 2% de células pequeñas. Las fracciones no adherentes contenían solo un pequeño porcentaje (2%) de monocitos. El ARN total se extrajo de una porción de los monocitos purificados (50 millones) en este momento.

Para preparar DC diferenciadas maduras, se sembraron 50 millones de monocitos en matraces T150 cm² en medio X-VIVO que contenía IL-4 y GM-CSF a 37 °C, durante cinco días. Se adicionó un cóctel de citoquina (TIP) que contenía factor de necrosis tumoral, interferón gamma y prostaglandina E2 a las células el día cinco. Las células se recogieron el día seis de cultivo y en este momento se denominaron "TIP-DC". La población rica en células dendríticas se recogió golpeando suavemente los matraces para desprender las células, lavados adicionales con solución salina reguladora con fosfato (PBS) y desprendimiento de las células adherentes restantes incubando en PBS y a 2-8°C, durante aproximadamente 10 minutos. La suspensión celular total se sedimentó y se resuspendió en PBS, y se analizó la concentración celular, la viabilidad celular y el inmunofenotipado. Los siguientes conjuntos de marcadores celulares se examinaron mediante citometría de flujo: marcadores de linaje de monocitos (CD3, CD14, CD19, CD16 y CD56), indicación de la presencia de células dendríticas (CD11c, CD1a y CD209), un marcador de células presentadoras de antígenos (HLA -II), marcadores de migración (CD38 y CCR7) y marcadores para células dendríticas maduras (CD83 y CD86).

Se resuspendieron 20 millones de TIP-DC en 600 μ l de ViaSpan™ y se electroporaron con ARN de CD40L en una proporción de 4 μ g de ARN por un millón de células dendríticas. La electroporación se realizó en cubetas con aberturas de 4 mm, a un pulso de 300 V durante 300 μ s. Después de la electroporación, las células se transfirieron a matraces T75 (una cubeta por matraz) que contenía medio X-VIVO (medio de cultivo sin suero), suplementado con IL-4 y GM-CSF. Las células transfectadas se incubaron durante 4 horas a 37°C, 5% de CO₂, \geq 75% de humedad para permitir que las células se recuperaran de la electroporación. Después de esto, las células se maduraron adicionalmente y se denominaron "DC PME-CD40L". El ARN se aisló a partir de una porción de las DC de PME-CD40L generadas.

Las DC de PME-CD40L se congelaron en plasma autólogo al 90% con DMSO al 10%, en crioviales usando congelación de velocidad controlada, y se almacenaron $\leq -85^{\circ}\text{C}$. Una vacuna de células dendríticas congeladas preparada como se describió anteriormente se descongeló a 37°C y se mantuvo a $20-25^{\circ}\text{C}$, durante 30 minutos. La viabilidad se determinó inmediatamente después de la descongelación y a intervalos de 10 minutos hasta 30 minutos. Las DC PME-CD40L postdescongeladas se analizaron mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos para marcadores de linaje de monocitos (DC 14), marcadores de células dendríticas (CD11c, CD1a y CD209), un marcador de células presentadoras de antígeno (HLA-II), marcadores de migración (CD38 y CCR7) y marcadores para células dendríticas maduras (CD80, CD83 y CD86).

Resultados

10 Generación de monocitos

Los datos de los tres donantes demuestran que la selección positiva usando perlas de CD14 da como resultado una población de monocitos del 88-98% de pureza (tabla 7). La cantidad máxima de contaminación de células pequeñas es del 2% (tabla 7). La fracción no adherente (flujo continuo) contenía hasta 2% de monocitos (células grandes) en los tres donantes (datos no mostrados). Por lo tanto, no hay una pérdida significativa de monocitos en la fracción no adherente. La contaminación de la población de células pequeñas presente en el eluato está compuesta principalmente de células T, como es evidente a partir de una alta expresión de CD3 y una menor expresión de marcadores CD19, 16 o 56 (datos no mostrados). No hubo diferencias visibles en la expresión de los marcadores CD83, CD86, CD11C, HLA-I o HLAII en la fracción de eluato entre leucaféresis frescas y de un día.

Tabla 7 Resumen de monocitos

Donante	Monocitos	Fracción	% de células grandes	% de células pequeñas	% de CD14 ⁺
1	Fresco	Eluato	97-98	<1-1.5	99
1	De un día	Eluato	88-89	0.8-1.5	99
2	Fresco	Eluato	98-99	0.9-1.4	99
2	De un día	Eluato	94-98	1-2	98
3	Fresco	Eluato	97-98	<1	99
3	De un día	Eluato	89-90	<1	97

20 TIP-DCs

Los monocitos fueron muy puros inicialmente (90%), y la pureza se mejoró adicionalmente durante el proceso de diferenciación ya que el porcentaje de células grandes en los TIP-DC de los tres donantes fue 98-99% y, de este modo, el porcentaje de las células pequeñas eran menos del 2% (datos no mostrados). El análisis del fenotipo de TIP-DC con citometría de flujo reveló que había una diferencia en la expresión de CD83 entre las TIP-DC generadas a partir de leucaféresis frescas y de un día. El porcentaje de células positivas se refiere al número de células positivas para un marcador bajo investigación. El porcentaje de DC que expresan el marcador de maduración superficial CD83 fue menor en las TIP-DC de los 3 donantes preparados a partir de leucaféresis fresca que las preparadas a partir de leucaféresis de un día (tabla 8). No hubo otras diferencias en ningún otro marcador de las TIP-DC generadas a partir de leucaféresis frescas y de un día.

30

Tabla 8 Resumen de TIP-DC

Donante	Leucaféresis	% de CD83 ⁺	% de CD86 ⁺
1	Fresco	26	90
	De un día	59	81
2	Fresco	40	74

	De un día	51	85
3	Fresco	57	98
	De un día	87	98

DC PME-CD40L

4 horas después de la transfección

- 5 Las DC después de la transfección (DC PME-CD40L) se analizaron para la expresión de DC 154 (CD40L) cuatro horas después de la transfección. Las DC PME-CD40L de leucaféresis de un día expresaron más CD40L en los donantes 1 y 2 cuatro horas después de la transfección que las DC PME-CD40L generadas a partir de leucaféresis fresca (tabla 9). También hubo una diferencia en la intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD40L entre las DC PME-CD40L generadas a partir de la féresis fresca y de un día en los donantes uno y dos (tabla 9).

DC PME-CD40L postdescongelación

- 10 Las DC PME-CD40L se analizaron para la expresión de una variedad de marcadores de DC postdescongelación. Hubo diferencias en el fenotipo de DC PME-CD40L postdescongelación generadas a partir de leucaféresis fresca versus de un día. La intensidad de fluorescencia media de la expresión de CD40L en DC PME-CD40L preparadas a partir de leucaféresis fresca fue menor que la de DC preparadas a partir de leucaféresis de un día (tabla 9).

- 15 También hubo una tendencia que sugiere que, en dos donantes, la eficacia de la transfección (del porcentaje positivo de la expresión de CD40L) es menor en las DC generadas a partir de la leucaféresis fresca (tabla 9).

Donante	Leucaféresis	DC PME-CD40L	%CD154 ⁺	CD154 MFI
1	Fresca	4 horas después de la electroporación	35	26
	De un día	4 horas después de la electroporación	63	51
2	Fresca	4 horas después de la electroporación	40	41
	De un día	4 horas después de la electroporación	50	60
3	Fresca	4 horas después de la electroporación	58	61
	De un día	4 horas después de la electroporación	52	35
1	Fresca	Postdescongelada	21	31
	De un día	Postdescongelada	38	50
2	Fresca	Postdescongelada	16	39
	De un día	Postdescongelada	30	44
3	Fresca	Postdescongelada	60	56
	De un día	Postdescongelada	56	64

El porcentaje de células positivas medido por citometría de flujo reveló que, en dos de cada tres casos, más células se tiñeron positivas con anticuerpos CD83 en células dendríticas generadas a partir de la porción de leucaféresis de un día (tabla 10).

Tabla 10: fenotipo de DC PME-CD40L postdescongelada

Donante	Leucaféresis	% de CD83+	% de CD86+	% de CD80+
1	Fresca	50	97	95
	De un día	86	99	99
2	Fresca	57	97	98
	De un día	71	99	94
3	Fresca	90	98	97
	De un día	89	99	97

Mientras que la diferencia en porcentaje de células positivas para CD80, CD83 y CD86 no siempre es mayor en la DC generada a partir de leucaféresis de un día (donante 3, tabla 10), la intensidad fluorescente media de las células generadas a partir de leucaféresis teñidas con los anticuerpos específicos es más alta en todos los donantes (tabla 11). Además de CD80, CD86 y CD83, HLA-I y HLA-II presentaron el mismo resultado (tabla 11). La señal de intensidad fluorescente media se correlaciona con una expresión de nivel de proteína más alta por célula y la expresión de moléculas CD80, CD83, CD86, HLA-I y HLA-II se aumenta en una DC madura. Por lo tanto, el fenotipo de estas células refleja un estado más maduro de las células dendríticas obtenidas a partir de la porción de un día en los tres donantes. Estos cambios reflejan el estado de maduración de las DC. Los datos tomados en conjunto obtenidos con la medida del porcentaje de células positivas, así como la intensidad de fluorescencia media, nos permiten concluir que las células generadas a partir de una porción de leucaféresis de un día presentan un fenotipo más maduro.

Tabla 11 MFI de las DC PME-CD40L postdescongeladas

Donante	Leucaféresis	MFI de CD83	MFI de CD86	MFI de CD80	MFI de HLA-I	MFI de HLA-II
1	Fresca	55	97	48	330	145
	De un día	73	282	71	904	338
2	Fresca	43	66	47	249	115
	De un día	55	123	55	383	214
3	Fresca	27	104	38	630	175
	De un día	53	219	57	974	182

Ejemplo 8

Análisis de micromatrices de la expresión génica en monocitos frescos frente a monocitos de un día y células dendríticas preparadas a partir de estos

Las muestras de ARN de monocitos frescos y monocitos de un día (monocitos que se habían incubado a 16-20 °C, durante 24 horas después de la leucaféresis), y ARN de DC preparadas a partir de monocitos frescos y de un día, como se describe en el ejemplo 8, se aplicaron a la matriz Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, Calif) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Genechip® Expression Analysis Technical Manual, 2004). En resumen, se convirtieron tres microgramos de ARN total enriquecido con el kit Genechip® Poly-A RNA Control (Affymetrix, Santa Clara, Calif) en ADNc de primera cadena usando la transcriptasa inversa SuperScript™ II. La síntesis de ADNc de segunda hebra fue seguida por la transcripción in vitro para la amplificación lineal de cada transcrito y la incorporación de CTP y UTP biotinilados. Los productos de ARNc se fragmentaron en alrededor de 100 nucleótidos y se hibridaron durante 16 horas a las micromatrices. A continuación, las micromatrices se lavaron con rigurosidad baja (6XSSPE) y alta (MES 100 mM, NaCl 0.1 M) y se tiñeron con estreptavidina ficoeritrina.

La fluorescencia se amplificó mediante la adición de antiestreptavidina biotinilada y una alícuota adicional de la tinción con estreptavidina ficoeritrina. El GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix, Santa Clara, Calif) se usó para recoger la señal de fluorescencia con una resolución de 3 µm después de la excitación a 570 nm. La señal promedio de dos exploraciones secuenciales se calculó para cada característica de micromatriz. Las imágenes escaneadas se analizaron

con el software de Genechip® Operating v1.1 (Affymetrix, Santa Clara, Calif.). Se confirmó una alta correlación lineal ($R^2 > 0.95$) de 4 ARN de control incluidos en el kit de Poly-A RNA Control (Affymetrix, Santa Clara, Calif) para garantizar el éxito del proceso de marcación.

5 Todos los datos de perfil se importaron en el programa informático Genespring y se normalizaron según el tipo de muestra (esto es, muestras de monocitos a monocitos y muestras dendríticas a dendríticas). Se realizaron tres etapas en la etapa de normalización y se realizaron de acuerdo con el método estándar sugerido por Genespring para matrices Affymetrix.

4) transformación de datos (todos los valores menores que 0.01 fueron configurados a 0.01)

5) Normalización al percentil 50.

10 6) Normalización a la mediana.

15 Los datos se filtraron primero para banderas con puntos faltantes. Los datos se analizaron luego con una vía única de anova sin modelos de predicción aleatorios con un nivel de confianza que oscila desde p.05 o p.1. La lista de genes filtrados generados se analizó para ver los cambios en el pliegue, el nivel de expresión o la confianza. Esto se realizó usando las muestras como promedios o como muestras individuales. El nivel de expresión entre monocitos frescos o de un día o células dendríticas se comparó antes o después de una anova. Las listas de genes se compararon entre sí y las que se superponen en varias listas se eligieron por su fiabilidad. Los genes con niveles de ARN en estado de equilibrio alterados en células dendríticas preparados a partir de monocitos de un día frente a células dendríticas preparadas a partir de monocitos frescos se enumeran en la tabla 12A. Las descripciones de estos genes se enumeran en la tabla 12B. Los genes con niveles de ARN en estado de equilibrio alterados en monocitos de un día frente a monocitos frescos se enumeran en la tabla 13A. Las descripciones de estos genes se enumeran en la tabla 13B. Estos resultados demuestran que los monocitos frescos son fenotípicamente diferentes de los monocitos de un día, y que las células dendríticas preparadas a partir de monocitos frescos son fenotípicamente diferentes de las células dendríticas preparadas a partir de monocitos de un día.

Tabla 12A

Genes con niveles alterados de ARN de estado de equilibrio en células dendríticas preparadas a partir de monocitos de un día en comparación con células dendríticas preparadas a partir de monocitos frescos						
Símbolo del gen	Identificador Affymetrix	NCBI	Unigene	Doblez	Valor de P	Cambio en un día
ALOX15	207328_at	NM_001140	Hs.73809	5.8	0.0699	Disminución
	1558517_s_at	AK094804	Hs.24181	5.5	0.0957	Disminución
KRT17; PC; K17; PC2; PCHC1	212236_x_at	NM_000422	Hs.2785	5	0.0759	Disminución
KCNJ2	231513_at, 206765_at	NM_000891	Hs.1547	4.5	0.0507	Disminución
YWHAZ	214848_at	NM_003406, NM_145690	Hs.492407	4.3	0.0581	Disminución
IL1B	205067_at, 39402_at	NM_000576	Hs.126256	3.7	0.0752	Disminución
PTX3	206157_at	NM_002852	Hs.127657	3.5	0.0408	Disminución
FYN	216033_s_at, 210105_s_at	NM_002037, NM_153047, NM_153048	Hs.390567	3.5	0.0724	Disminución
GALNT3	203397_s_at	NM_004482	Hs.170986	3.3	0.0295	Disminución
FLJ20073	219691_at	NM_017654	Hs.65641	3	0.0262	Disminución

ES 2 650 569 T3

CDK6	243808_at	NM_001259	Hs.119882	3	0.00634	Disminución
CD69	209795_at	NM_001781	Hs. 208854	2.6	0.0145	Disminución
TLR1	210176_at	NM_003263	Hs.111805	2.193	0.456	Disminución
TLR2	204924_at	NM_003264	Hs.519033	2	0.089	Disminución
ENO3	204483_at	NM_001976 NM_053013	Hs.224171	6	0.0588	Aumento
CD52	34210_at	NM_001803	Hs.276770	5	0.0925	Aumento
TRPS1	234351_x_at	NM_014112	Hs.253594	4	0.067	Aumento
FLJ21069 (RSNL2)	226425_at	NM_024692	Hs.122927	3.7	0.0806	Aumento
TNS	218864_at	NM_022648	Hs.471381	3.5	0.019	Aumento
CPEB1	219578_s_at	NM_030594	Hs.459132	3.2	0.0779	Aumento
RAB9P40	203150_at	NM_005833	Hs.19012	3	0.0357	Aumento
PIR	207469_s_at	NM_001018109 NM_003662	Hs.495728	3	0.0559	Aumento
CALM2	235190_at	NM_001743	Hs.468442	3	0.0913	Aumento
ABCG2	209735_at	NM_004827	Hs.480218	3	0.0985	Aumento
A2M	217757_at	NM_000014	Hs.212838	3	0.0384	Aumento
	232750_at		Hs.550958	3	0.0207	Aumento
APEX2	204408_at	NM_014481	Hs.555936	4.3038	0.027	Aumento
THBD	203888_at	NM_000361	Hs.2030	6.5432	0.122	Disminución
DNASE1L3	205554_s_at	NM_004944	Hs.476453	3.9148	0.108	Disminución
PKIB	223551_at	NM_032471	Hs.486354	3.6986	0.130	Disminución
PTGER3	210375_at	NM_000957	Hs.445000	28.2	0.0979	Disminución
CAMTA1	213268_at	NM_015215	Hs.397705	6.4	0.0897	Disminución
PLS3	201215_at	NM_005032	Hs.496622	6.4	0.0436	Disminución
TREM1	219434_at	NM_018643	Hs.283022	5.2	0.031	Disminución
TMEPAI	217875_at	NM_020182	Hs.517155	5.5	0.0784	Disminución
CHI3L1	209396_at	NM_001276	Hs.382202	6.5	0.0367	Aumento

Tabla 12B

Descripción de los genes enumerados en la tabla 12A	
Símbolo del gen	Descripción Go

ES 2 650 569 T3

ALOX15	Araquidonato 15-lipoxigenasa	Transporte de electrones, metabolismo lipídico, respuesta inflamatoria, biosíntesis de leucotrienos, metabolismo de leucotrienos
	CDNA FLJ37485 fis, clon BRAWH2014379	
KRT17; PC; K17; PC2; PCHC1	Queratina 17	Desarrollo de la epidermis
KCNJ2	Canal de rectificación interna de potasio, subfamilia J, miembro 2	Transporte de iones
YWHAZ	Proteína de activación tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa, polipéptido zeta	Unión específica del dominio de la proteína
IL1B	Interleucina 1, beta	respuesta inmune beta, respuesta inflamatoria
PTX3	Gen relacionado con Pentraxin, rápidamente inducido por IL-1 beta	respuesta inflamatoria
FYN	FYN oncogén relacionado con SRC, FGR, YES	fosforilación de aminoácidos de proteínas, fosforilación de aminoácidos de proteínas, cascada de señalización intracelular, cascada de proteína quinasa, fosforilación de aminoácidos de proteína transporte de iones calcio
GALNT3	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina polipeptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 3 (GalNAc-T3)	Metabolismo de los carbohidratos
FLJ20073	Dominio de motivo alfa estéril que contiene 9	Unión
CDK6	Ciclina dependiente de quinasa 6	Regulación de la progresión a través de la fase G1 del ciclo celular de la proteína del ciclo celular mitótico fosforilación de aminoácidos proliferación celular
CD69	Antígeno CD69 (p60, antígeno de activación temprano de células T)	Respuesta de defensa, transducción de señal unida al receptor de superficie celular
TRL1	Receptor tipo Toll 1	respuesta inflamatoria, respuesta inmune
TRL2	Receptor tipo Toll 2	Inducción de apoptosis, respuesta inflamatoria, transducción de señales, respuesta inmune
ENO3	Enolase 3 (beta, muscular)	Glucólisis
CD52	Antígeno CD52 (antígeno CAMPATH-1)	integral de la membrana plasmática
TRPS1	Síndrome tricorriñofalángico 1	Regulación de la transcripción del desarrollo esquelético de la transcripción, transcripción dependiente de ADN del promotor de la ARN polimerasa II Importación de un sustrato portador de NLS en el núcleo
FLJ21069, RSNL2	Restin-line 2	
TNS	Tensinl	cascada de señalización intracelular
CPEB1	Proteína de unión al elemento de poliadenilación citoplasmática 1	procesamiento de ARNm
RAB9P40	Proteína efectora Rab9 con motivos de kelch	Endocitosis mediada por receptor, acoplamiento de

ES 2 650 569 T3

		vesículas durante la exocitosis
PIR	Pirin (proteína nuclear de unión a hierro)	Actividad de cofactor de transcripción unión de iones de hierro de ion de metal
CALM2	Calmodulin 2 (fosforilasa quinasa, delta)	Vía de señalización de proteína del receptor acoplado a proteína G
ABCG2	casete de unión a ATP, subfamilia G (WHITE), miembro 2	Respuesta de transporte al transporte de fármacos
A2M	Alfa-2 macroglobulina	Proteína de transporte proteína intracelular homooligomerización
	CDNAFLJ13750 fis, clon PLACE 3000331	
APEX2	APEX nucleasa (apurínico/apirimidínico endonucleasa) 2	Respuesta de reparación de ADN al estímulo de daño al ADN
THBD	Trombomodulina	Actividad del receptor transmembrana, unión a iones calcio, unión a azúcar, actividad del receptor, actividad del receptor de unión a iones calcio
DNASE1L3	DNASE1L3	Catabolismo del ADN, apoptosis, metabolismo del ADN
PKIB	Inhibidor beta (cAMP-dependiente, catalítico) de proteína quinasa	Regulación negativa de la actividad proteína quinasa
PTGER3	Receptor de prostaglandina E 3 (subtipo EP3)	Transcripción, dependiente del ADN, transducción de señal, muerte celular, vía de señalización de proteína del receptor acoplado a proteína G
CAMTA1	Activador de transcripción de unión a Calmodulina 1	Vía de señalización del receptor WNT
PLS3	Plastin 3 (isoforma T)	Actina que se une a la unión de actina de unión a iones de calcio
TREM1	Receptor desencadenante expresado en células mieloides 1	Respuesta inmune humoral cascada de señalización intracelular
TMEPAI	Transmembrana, ARN inducido por andrógenos de próstata	Integral a la membrana
CHI3L1	Quitinasa-3 tipo 1 (glucoproteína-39 del cartílago)	Metabolismo de los carbohidratos catabolismo de la quitina

Tabla 13A

Genes con niveles alterados de ARN de estado de equilibrio en monocitos de un día en comparación con monocitos frescos						
Símbolo del gen	Identificador Affymetrix	NCBI	Unigene	Doble	Valor de P	Cambio en un día
ADM	202912_at	NM_001124	Hs.440147	6.67	0.020	Aumento
Est	230127_at	AW044663	Hs.232417	5.29	0.017	Aumento
PPARD	242218_at	NM_006238	Hs.485196	5.29	0.040	Aumento

ES 2 650 569 T3

CIAS1	216016_at	NK004895, NM_183395	Hs.159483	4.60	0.030	Aumento
SLC6A6	211030_s_at	NM_003043	Hs.529488	3.30	0.020	Aumento
Est	243423_at	AF150368	Hs.205098	3.40	0.015	Aumento
WTAP	1560274_at	NM_004906, NM_152857, NM.152858	Hs.446091	3.30	0.008	Aumento
	1556072_at	AK097861	Hs.517397	3.90	0.010	Aumento
APAF1	204859_s_at	NM_013229	Hs.552567	3.00	0.020	Disminución
CCR2	206978_at	NM_000647, NM_000648	Hs.511794	4.05	0.004	Disminución
SLC35A5	218519_at	NM_017945	Hs.237480	4.12	0.030	Disminución
RPE	225039_at	NM_006916, NM_199229	Hs.282260	4.12	0.040	Disminución
TRPS1	222651_s_at	NM_014112	Hs.253594	4.17	0.020	Disminución
OXR1	222553_x_at	NM_181354	Hs.148778	4.22	0.006	Disminución
TRIM14	203148_s_at	NM_014788 NM_033219 NM_033220 NM_033221	Hs.555909	4.22	0.040	Disminución
MRF2	212614_at	NM_032199	Hs.535297	4.22	0.040	Disminución
TNFSF10	214329_x_at	NM_003810	Hs.478275	4.37	0.040	Disminución
DKFZp434 L142	219872_at	NM_001031700 NM_016613	Hs.535739	4.42	0.030	Disminución
LOC115294 (PCMTD1)	232382_s_at	NM_052937	Hs.308480	4.15	0.030	Disminución
LOC201895	227052_at	NM_174921	Hs.205952	4.88	0.040	Disminución
PAG1	227354_at	NM_018440	Hs.266175	5.03	0.046	Disminución
DMXL1	203791_at	NM_005509	Hs.181042	5.46	0.002	Disminución
CX3CR1	205898_at	NM_001337	Hs.78913	10.88	0.030	Disminución

Tabla 13B

Descripción de los genes enumerados en la tabla 13A		
Símbolo del gen		Descripción Go
ADM	Adrenomedulina	biosíntesis de cAMP, biosíntesis de progesterona, señal de transducción, señalización de células y células, embarazo, excreción
Est	locus transcrito	
PPARA	Peroxisoma receptor activado proliferativo, delta	regulador de la transcripción
CIAS1	Síndrome autoinflamatorio en frío 1	Apoptosis, inducción de apoptosis, respuesta

		inflamatoria, transducción de señales
SLC6A6	Familia de portadores de soluto 6, miembro 6	Metabolismo de aminoácidos, integral a la membrana plasmática
Est	locus transcrito	
WTAP	proteína asociada al tumor de Wilms 1 Proteína hipotética	
APAF1	factor de activación de la peptidasa apoptótica	Regulación de la apoptosis
CCR2	receptor 2 de quimiocina (motivo C-C)	Quimiotaxis, respuesta inflamatoria, respuesta de defensa celular, transducción de señales
SLC35A5	Familia de portadores de soluto35, miembro A5	Transporte de carbohidratos, transporte de nucleótidos y azúcar
RPE	Ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa	Metabolismo de carbohidratos
TRPS1	Síndrome tricorinofalángico 1	Actividad del factor de transcripción
OXR1	Resistencia a la oxidación 1	Respuesta al estrés oxidativo
TRIM14	motivos tripartitos que contienen 14	Especificación de compartimentos
MRF2	5B dominio interactivo rico en AT (MRF1-tipo)	Transcripción, regulación negativa de la transcripción, dependiente del ADN, regulación de la transcripción, dependiente del ADN
TNFSF10	Factor de necrosis tumoral. (ligando) superfamilia, miembro 10	Apoptosis, inducción de la apoptosis, respuesta inflamatoria, señal de transducción, señalización de célula-célula
DKFZp434L142	Proteína hipotética DKFZp434L142	
LOC115294 (PCMTD1)	Proteína-L-isoaspartato (D-aspartato) O-metiltransferasa dominio que contiene 1	Modificación de proteínas
LOC201895	Proteína hipotética LOC201895	Unión de proteínas
PAG1	Fosfoproteína asociada a microdominios de glicosfingolípidos 1	Regulación negativa de la activación de células T, cascada de señalización intracelular, regulación de la activación de células T.
DMXL1	Unión de proteínas	
CX3CR1	Quimiocina (motivo C-X3-C) receptor 1	Quimiotaxis, respuesta de defensa celular, adhesión celular, transducción de señal

Los genes de las células dendríticas se normalizaron adicionalmente para la expresión de dos genes de mantenimiento que se ha demostrado que permanecen constantes entre las DC producidas a partir de monocitos frescos y de un día. La expresión promedio de cada gen (normalizado) se dividió por la expresión promedio (normalizada) de GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) o β -actina para producir una proporción de expresión relativa al gen de mantenimiento. Los resultados para seis genes se muestran en la tabla 14. "DC_{do}" se refiere a las DC preparadas a partir de monocitos de un día. "DC_r" se refiere a las DC preparadas a partir de monocitos frescos.

5

Tabla 14

Proporciones de expresión de ARN de estado de equilibrio de determinados ARN a GAPDH o β -actina en las DC
--

preparadas a partir de monocitos de un día o frescos				
Gen	Gen:GAPDH DC _{do}	Gen:GAPDH DC _f	Gen:Actina DC _{do}	Gen:Actina DC _f
ALOX15	0.45	1.5	0.45	1.52
IL1 β	0.58	1.38	0.57	1.37
TLR1	0.68	1.49	0.68	1.48
TLR2	0.67	1.34	0.66	1.33
CD69	0.66	1.61	0.65	1.60
CD52	1.86	0.74	1.85	0.74

Se realizó una verificación adicional, hasta la fecha, de la expresión diferencial en monocitos de dos de los genes candidatos mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) usando los cebadores mostrados en la tabla 15. Se generó ADNc de primera cadena a partir de cada ARN total (idéntico al que se usa en el análisis de GeneChip) usando cebadores oligo (dT) y el Sistema de Síntesis First-Strand SuperScript™ III para RT-PCR de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, Calif.). La QPCR se realizó usando un sistema de detección de secuencia ABI Prism® 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ABI Prism® 7900HT Sequence System User Guide). Los ensayos de expresión génica TaqMan® o los ensayos de expresión génica Custom TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) se usaron como sondas TaqMan®. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado usando ABSolute™ QPCR ROX Mix (ABgene, UK). La cuantificación de las concentraciones relativas de ADNc se realizó usando el método de curva estándar relativa como se describe en ABI Prism® 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Un ADNc con la mayor expresión de cada gen en el análisis GeneChip se utilizó para generar la curva estándar relativa. Todos los datos se muestran como expresión relativa a la expresión GAPDH interna. Se demostró que la proteína efectora APAF-1 y CDCA2 2 disminuía, con respecto a GAPDH, al menos 2.5 veces y 3 veces, respectivamente, entre monocitos frescos y de un día.

Tabla 15

Cebadores	
Gen	Ensayos de expresión génica TaqMan® ID
GAPDH	Hs99999905_m1
Proteína efectora CDC42 2	Hs00198943_m1
APAF1	Hs00185508_m1

Ejemplo 10

20 Comparación de células dendríticas preparadas a partir de PBMC incubadas a temperatura ambiente durante 23, 48 o 71 horas desde el momento del aislamiento de un donante

Métodos:

Se recibieron productos de leucaféresis de "donantes sanos" de dos donantes después del envío durante la noche. Aproximadamente un tercio de cada producto se procesó para la generación de DC en los tiempos especificados después de la recogida de la aféresis de la siguiente manera. El producto de leucaféresis (esto es, PBMC) se incubó a temperatura ambiente durante 23, 48 o 71 horas antes de la centrifugación en gradiente de densidad de ficoll histopaque y la etapa de adherencia que se describe a continuación. Después del período de incubación a temperatura ambiente, se determinaron la viabilidad de las PBMC y los porcentajes de células B, células T, monocitos y células NK. Los resultados se muestran en la tabla 16.

30

Tabla 16

Caracterización del producto celular en el día 0 del cultivo						
	Donante 1			Donante 2		
	23hrs	48hrs	71hrs	23hrs	48hrs	71hrs
Viabilidad PBMC (%)	97	99	97	98	99	97
% de células B	4	3.8	4.4	5.15	4.55	5.45
% de células T	38.9	35.5	27.4	49.3	42.7	46.4
% de monocitos	41.9	37.7	41.2	29.5	24.4	28.7
% de células NK	6.4	11.3	10.9	4.7	2.54	5.7

Generación de productos DC

Se prepararon PBMC mediante centrifugación de densidad de ficoll-histopaque, y se lavaron cuatro veces en PBS a temperatura ambiente. 2×10^8 PBMC se resuspendieron en 30 ml de medio AIM-V (Invitrogen) y se dejaron adherir a 5 matracas de plástico de 150 cm^3 durante 2 horas a 37°C . Las células no adherentes se eliminaron y las células restantes se cultivaron en medio X-VIVO 15, suplementado con 1000 U/ml de GM-CSF (Leukine) y 1000 U/ml de IL-4 (R&D systems), durante 5 días a 37°C , 5% de CO_2 . Las DC inmaduras se maduraron inicialmente mediante la adición de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml), $\text{IFN-}\gamma$ (1000 U/ml) y PGE_2 (1 $\mu\text{g/ml}$). Después de un cultivo durante la noche, los productos intermedios TIP-DC se recogieron por eliminación de medios y un lavado con PBS frío. TIPDC se fenotipificaron para 10 confirmar la generación de una población madura de células. Para generar DC completamente madura cargada con antígeno, se sometieron a electroporación las TIP-DC: las células se resuspendieron en Viaspan enfriado a $4 \times 10^7/\text{ml}$ en 0.5 ml y se colocaron en hielo. Las DC se mezclaron con ARNm de carcinoma de células renales tumorales totales amplificado a $1 \mu\text{g}/10^6$ células, como carga útil de codificación de antígeno modelo, más $4 \mu\text{g}/10^6$ ARNm de CD40L, y se colocaron en una cubeta de electroporación con abertura de 4 mm, seguida de electroporación usando un Sistema Biorad GenePulsar Xcell. Inmediatamente después de la electroporación, las DC se lavaron en medio X-VIVO 15 y finalmente se resuspendieron en 20 ml de X-VIVO 15 suplementado con GM-CSF (800 U/ml) e IL-4 (500 U/ml) a $1 \times 10^6/\text{ml}$, y se cultivaron durante 4 horas a 37°C en matracas T75 de baja adherencia. Los recuentos celulares y las determinaciones de viabilidad se realizaron usando yoduro de propidio y perlas de recuento de CalTag como se describe por el fabricante. Las muestras de PBMC post-ficoll, día 6 TIPDC, DC recuperadas 4 horas después de la 20 electroporación y cultivo (DC PME-CD40L), y postdescongelación del producto final, se sometieron todos a recuento de células y análisis de viabilidad. Los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17

Recuperación y rendimiento de DC, durante la generación de DC PME-CD40L				
	No. de PBMC sembradas/matraz	Porcentaje de PBMC de entrada recuperado día 6/viabilidad	% de recuperación/viabilidad 4 horas después de la electroporación	congelación/descongelación % de recuperación/viabilidad del producto final
Donante 1				
23hrs	2×10^8	27%/96% viable	60%/93% viable	78%/86% viable
48hrs	2×10^8	17%/98% viable	58%/95% viable	85%/94% viable
72hrs	2×10^8	9%/97% viable	50%/96% viable	71%/ 93% viable
Donante 2				
19hrs	2×10^8	6.6%/ 95% viable	68%/ 95% viable	68.9%/ 91% viable

41hrs	2x10 ⁸	12%/ 96% viable	62%/ 93% viable	78.5%/ 89% viable
66hrs	2x10 ⁸	3.1%/ 97% viable	41%/91% viable	86.3%/ 90% viable

Fenotipado de productos de PBMC y DC

5 Todos los anticuerpos se obtuvieron de BD Biosciences y se usaron a las diluciones recomendadas por el fabricante. PBMC: cada una de 3x10⁵ células se tiñeron con CD19-PE, CD14-PE y CD3-PE, o controles conjugados con isotipo coincidente por incubación en anticuerpo durante 30 minutos a 4°C. Después de la incubación, las células teñidas se lavaron 3 veces en FBS al 1% frío/PBS y se resuspendieron en PBS para análisis de fluorescencia usando un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences) usando el software CellQuest (BD Biosciences). 3 minutos antes de la adquisición, se adicionó yoduro de propidio (1 µg/ml) a cada muestra como un colorante de viabilidad para fines de activación. DC: se resuspendieron 1x10⁶ células (TIP-DC y DC PME-CD40L) en PBS enfriado/FBS al 1%. Los anticuerpos conjugados PE o FITC específicos para moléculas MHC (HLA-ABC, HLA-DR) o moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) o marcadores de maduración (CD83) o marcadores de monocitos/DC del linaje (DC 14, CD209) se mezclaron con 1x10⁵ DC, durante e incubadas a 4 °C, durante 30 minutos. Se utilizaron anticuerpos de isotipo coincidente como controles. Después de lavar a fondo las células se sometieron a citometría de flujo como se describió anteriormente. El CD40L intracelular se determinó de la siguiente manera: 2 x 10⁵ DC de PME-CD40L resuspendidas en 250 ml de solución Cytotifx/Cytoperm (BD Biosciences) durante un mínimo de 10 minutos hasta 2 horas a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 2 ml de solución reguladora de tinción (PBS, BSA, NaN₃ y EDTA), se resuspendieron en 0.5 ml de solución reguladora de tinción y se almacenaron durante la noche a 4 °C. Las células se resuspendieron en 2.0 ml de solución Perm/Wash (BD Biosciences) durante 15 minutos, se centrifugaron y se volvieron a suspender en 100 ml de solución Perm/Wash. Se adicionaron 20 µl de CD40L APC antihumano de ratón o APC de IgG1 de ratón a cada preparación de DC y se incubaron a 4 °C, durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de solución Perm/Wash y se volvieron a suspender en solución reguladora de tinción antes del análisis citométrico de flujo. Los resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18

Fenotipo de intermedio TIP-DC y producto final DC PME-CD40L						
Día 6 TIP-DC (%)	Donante 1			Donante 2		
	23hrs	48hrs	71hrs	23hrs	48hrs	71hrs
CD14	4.1	1.23	.62	.16	1.38	.89
CD80	96.92	97.9	98.3	99.4	99.5	87.8
CD83	84.19	88	93	92.2	88.5	62.1
CD86	99.31	99.6	98.4	99.8	99.9	99.4
HLA-I	95.65	94.6	96.1	95.6	97.4	82.6
HLA-II	99.55	99.7	98.5	99.8	99.8	96.9
Producto final PME-CD40L (%)						
CD14	1.19	1.36	1.3	.43	.66	1.08
CD209	97.98	97.60	98.23	89.9	98.2	96.3

25

Se entenderá que las realizaciones particulares descritas en la presente se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en el arte a la que pertenece esta invención.

Todas las composiciones y/o métodos descritos y reivindicados en este documento se pueden realizar y ejecutar sin una experimentación excesiva a la luz de la presente descripción.

5 Los datos en la tabla 16, de dos experimentos independientes, muestran que los productos de aféresis que se mantienen durante hasta 72 horas después de la recogida del paciente pueden producir poblaciones de PBMC altamente viables, sin sesgo significativo en los subconjuntos de leucocitos recuperados. La siembra de matraces con PBMC de cada punto de tiempo y el cultivo para la generación de DC maduras (TIP-DC) da como resultado una alta frecuencia de células viables, aunque la recuperación total de DC usando productos de aféresis mantenidos durante 10 períodos de tiempo prolongados disminuye (tabla 17). Sin embargo, se pueden generar DCs suficientes para un procesamiento adicional mediante electroporación con ARN tumoral amplificado total y ARN de CD40L. Lo más importante es que las Tablas 17 y 18 muestran que los TIPDC generados a partir de los diversos productos de partida son igualmente susceptibles de electroporación y recuperación, con una maduración completa en el producto final, DC 15 DC PME-CD40L. DC PME-CD40L generado a partir de este estudio se puede formular como "vacuna" y congelarse y descongelarse sin ningún deterioro de las preparaciones de DC. En conclusión, los productos de aféresis mantenidos hasta por 72 horas después de la recogida son una materia prima viable para la fabricación centralizada de vacunas de DC para su aplicación en la clínica.

Listado de secuencias

<110> ARGOS THERAPEUTICS, INC. KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA caley, Rebecca Monesmith, Tamara Tcherepanova, Irina Dinterman, Lois

<120> Composiciones de células dendríticas y métodos

20 <130> ARG035WO

<140> aún no asignada

<141> 2006-04-07

<150> 60/669,468

<151> 2005-04-08

25 <160> 121

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2707

<212> ADN

30 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(2003)

<223> Secuencia codificante ALOX-15

35 <400> 1

ES 2 650 569 T3

catctttgag	caagatgggt	ctctaccgca	tccgcgtgtc	cactggggcc	tcgctctatg	60
ccggttccaa	caaccaggtg	cagctgtggc	tggtcggcca	gcacggggag	gcggcgctcg	120
ggaagcgact	gtggcccgca	cggggcaagg	agacagaact	caaggtggaa	gtaccggagt	180
atctggggcc	gctgctgttt	gtgaaactgc	gcaaacggca	cctccttaag	gacgacgcct	240
ggttctgcaa	ctggatctct	gtgcagggcc	ccggagccgg	ggacgaggtc	aggttccctt	300
gttaccgctg	ggtggagggc	aacggcgctc	tgagcctgcc	tgaaggcacc	ggccgcactg	360
tgggcgagga	ccctcagggc	ctgttccaga	aacaccggga	agaagagctg	gaagagagaa	420
ggaagttgta	ccggtgggga	aactggaagg	acgggttaat	tctgaatatg	gctggggcca	480
aactatatga	cctccctgtg	gatgagcgat	ttctggaaga	caagagagtt	gactttgagg	540
tttcgctggc	caaggggctg	gccgacctcg	ctatcaaaga	ctctctaaat	gttctgactt	600
gctggaagga	tctagatgac	ttcaaccgga	ttttctggtg	tggtcagagc	aagctggctg	660
agcgcgtgcg	ggactcctgg	aaggaagatg	ccttatgttg	gtaccagttt	cttaatggcg	720
ccaaccccg	ggtgctgagg	cgctctgctc	accttctg	tcgcctagtg	ttccctccag	780
gcatggagga	actgcaggcc	cagctggaga	aggagctgga	gggaggcaca	ctgttcgaag	840
ctgacttctc	cctgctggat	gggatcaagg	ccaacgcat	tctctgtagc	cagcagcacc	900
tggctgcccc	tctagtcatg	ctgaaattgc	agcctgatgg	gaaactcttg	cccatggtca	960

ES 2 650 569 T3

tccagctcca gctgccccgc acaggatccc caccacctcc ctttttcttg cctacggatc 1020
 cccaatggc ctggcttctg gccaaatgct ggggtgcgag ctctgacttc cagctccatg 1080
 agctgcagtc tcatcttctg aggggacact tgatggctga ggtcattggt gtggccacca 1140
 tgaggtgcct gccgtcgata catcctatct tcaagcttat aattccccac ctgcgataca 1200
 ccctggaaat taacgtccgg gccaggactg ggctggcttc tgacatggga attttcgacc 1260
 agataatgag cactgggtggg ggaggccacg tgcagctgct caagcaagct ggagccttcc 1320
 taacctacag ctcttctgt cccctgatg acttggccga ccgggggctc ctgggagtga 1380
 agtcttcctt ctatgcccac gatgctgctg ggctctggga aatcatctat cggtatgtgg 1440
 aaggaatcgt gagtctccac tataagacag acgtggctgt gaaagacgac ccagagctgc 1500
 agacctgggtg tcgagagatc actgaaatcg ggctgcaagg ggcccaggac cgagggtttc 1560
 ctgtctcttt acaggctcgg gaccaggttt gccactttgt caccatgtgt atcttcacct 1620
 gcaccggcca acacgcctct gtgcacctgg gccagctgga ctggtactct tgggtgccta 1680
 atgcaccctg cacgatgctg ctgccccgc caaccaccaa ggatgcaacg ctggagacag 1740
 tgatggcgac actgcccac ttccaccagg cttctctcca gatgtccatc acttggcagc 1800
 tgggcagacg ccagcccgtt atggtggctg tgggccagca tgaggaggag tatttttcgg 1860
 gccctgagcc taaggctgtg ctgaagaagt tcagggagga gctggctgcc ctggataagg 1920
 aaattgagat ccggaatgca aagctggaca tgccctacga gtacctgctg cccagcgtgg 1980
 tggaaaacag tgtggccatc taagcgtcgc caccctttgg ttatttcagc ccccatcacc 2040
 caagccacaa gctgaccctt tcgtggttat agccctgccc tccaagtcc caccctcttc 2100
 ccatgtcca cctccctag aggggcacct tttcatggtc tctgcacca gtgaacacat 2160
 tttactctag aggcatcacc tgggacctta ctctctttc cttccttctt ctttctctat 2220
 cttccttctt ctctctcttc ctctttcttc attcagatct atatggcaaa tagccacaat 2280
 tatataaatc atttcaagac tagaataggg ggatataata catattactc cacacctttt 2340
 atgaatcaaa tatgattttt ttggtgtgtg taagacagag tctcactttg acaccaggc 2400
 tggagtgcag tggtgccatc accacggctc actgcagcct cagcgtcctg ggctcaaagt 2460
 atcctcccac ctgagctctc tgagtagctg ggactacagg ctcatgcat catgcccagc 2520
 taatattttt ttattttcgt ggagacgggg cctcactatg ttgcctaggc tggaaatagg 2580
 attttgaacc caaattgagt ttaacaataa taaaaagttg ttttacgcta aagatggaaa 2640
 agaactagga ctgaactatt ttaaataaaa tattggcaaa agaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2700
 aaaaaaa 2707

<210> 2

<211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 2
 ccctagaggg gcacctttc atggt 25
 <210> 3
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 3
 tagaggggca cctttcatg gtctc 25
 15 <210> 4
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 4
 ttactctag aggcatcacc tggga 25
 <210> 5
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 5
 30 tagaggcatc acctgggacc ttact 25
 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 6
 5 tcctcttct tcattcagat ctata 25
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 7
 cttcattcag atctatatgg caaat 25
 <210> 8
 15 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 8
 tagccacaat tatataaatc attc 25
 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 9
 atattactcc acaccttta tgaat 25
 30 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 10
 actccacacc tttatgaat caaat 25
 5 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 11
 tatttcgtg gagacggggc ctcac 25
 <210> 12
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 12
 20 ggctggaat aggatttga accca 25
 <210> 13
 <211> 1498
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (88)..(897)
 <223> Secuencia artificial IL-1B
 <400> 13

ES 2 650 569 T3

accaaacctc ttcgaggcac aaggcacaac aggctgctct gggattctct tcagccaatc 60
 ttcattgctc aagtgtctga agcagccatg gcagaagtac ctgagctcgc cagtgaaatg 120
 atggcttatt acagtggcaa tgaggatgac ttgttctttg aagctgatgg ccctaaacag 180
 atgaagtgct ccttccagga cctggacctc tgccctctgg atggcggcat ccagctacga 240
 atctccgacc accactacag caagggcttc aggcaggccg cgtcagttgt tgtggccatg 300
 gacaagctga ggaagatgct ggttccctgc ccacagacct tccaggagaa tgacctgagc 360
 accttctttc ccttcatctt tgaagaagaa cctatcttct tcgacacatg ggataacgag 420
 gcttatgtgc acgatgcacc tgtacgatca ctgaaactgca cgctccggga ctcacagcaa 480
 aaaagcttgg tgatgtctgg tccatatgaa ctgaaagctc tccacctcca gggacaggat 540
 atggagcaac aagtgggtgtt ctccatgtcc tttgtacaag gagaagaaag taatgacaaa 600
 atacctgtgg ccttgggcct caaggaaaag aatctgtacc tgtcctgctg gttgaaagat 660
 gataagccca ctctacagct ggagagtgta gatcccaaaa attacccaaa gaagaagatg 720
 gaaaagcgat ttgtcttcaa caagatagaa atcaataaca agctggaatt tgagtctgcc 780
 cagttcccca actggtacat cagcacctct caagcagaaa acatgcccgt cttcctggga 840
 gggaccaaag gcggccagga tataactgac ttcaccatgc aatttgtgtc ttcctaaaga 900
 gagctgtacc cagagagtcc tgtgctgaat gtggactcaa tccttagggc tggcagaaag 960
 ggaacagaaa ggtttttgag tacggctata gcctggactt tcctgttgtc tacaccaatg 1020
 cccaactgcc tgccttaggg tagtgctaag aggatctcct gtccatcagc caggacagtc 1080
 agctctctcc tttcagggcc aatccccagc cttttgttg agccaggcct ctctcacctc 1140
 tcctactcac ttaaagcccg cctgacagaa accacggcca catttggttc taagaaacc 1200
 tctgtcattc gctcccacat tctgatgagc aaccgcttcc ctatttattt atttatttgt 1260
 ttgtttgttt tattcattgg tctaatttat tcaaaggggg caagaagtag cagtgtctgt 1320
 aaaagagcct agtttttaat agctatggaa tcaattcaat ttggactggt gtgctctctt 1380
 taaatcaagt cctttaatta agactgaaaa tatataagct cagattattt aaatgggaat 1440
 atttataaat gagcaaatat catactgttc aatggttctg aaataaactt cactgaag 1498

<210> 14

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 14

	agctgtaccc agagagtct gtgct	25
	<210> 15	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 15	
	tgactcaat ccctagggt ggcag	25
10	<210> 16	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 16	
	ggttttgag tacggctata gcctg	25
	<210> 17	
	<211> 25	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
25	tatagcctgg acttcctgt tgtct	25
	<210> 18	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 18	
	ccaactgcct gcctagggt agtgc	25

<210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 19
 ctaagaggat ctctgtcca tcagc 25
 <210> 20
 10 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 20
 cacttaaagc ccgctgaca gaaac 25
 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 21
 gacagaaacc acggccacat ttgt 25
 25 <210> 22
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 22
 cattcgctcc cacattctga tgagc 25
 <210> 23

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 23
 cacattctga tgagcaaccg ctcc 25
 <210> 24
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 24
 15 ggtgtgctct ctttaatca agtcc 25
 <210> 25
 <211> 2867
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (275)..(2635)
 <223> Secuencia codificante TLR1
 <400> 25
 25 **acagactgcc aaatggaaca gacaagcagg ttgtcttgtg ttaaagaaaa tgagatataa 60**

ES 2 650 569 T3

gtcagttact cccggaggca atgctgctgt tcagctcttc tgtttttgtg gccagggtct 120
 tcatgaacac taataggggt accaggccct cttcctcggt agaagaaatc aggataacaa 180
 aggcataattg ggcacccccta caaaaggaat ctgtatctgt atcaagatga tctgaagaac 240
 agcttctacc ttttaggaatg tctagtgttc caaaatgact agcatcttcc attttgccat 300
 tatcttcatg ttaatacttc agatcagaat acaattatct gaagaaagtg aatttttagt 360
 tgataggtca aaaaacggtc tcatccacgt tcctaaagac ctatcccaga aaacaacaat 420
 cttaaataata tcgcaaaatt atatatctga gctttggact tctgacatct tctactgtc 480
 aaaactgagg attttgataa tttctcataa tagaatccag tatcttgata tcagtgtttt 540
 caaattcaac caggaattgg aatacttggg tttgtcccac aacaagttgg tgaagatttc 600
 ttgccaccct actgtgaacc tcaagcactt ggacctgtca tttaatgcat ttgatgccct 660
 gcctatatgc aaagagtttg gcaatatgtc tcaactaaaa tttctgggggt tgagcaccac 720
 acacttagaa aatctagtgt tgctgccaat tgctcatttg aatcagca aggtcttgct 780
 ggtcttagga gagacttatg gggaaaaaga agaccctgag ggccctcaag actttaacac 840
 tgagagtctg cacattgtgt tccccacaaa caaagaattc cattttattt tggatgtgtc 900
 agtcaagact gtagcaaatc tggaactatc taatatcaaa tgtgtgctag aagataacaa 960
 atgttcttac ttcctaagta ttctggcgaa acttcaaaca aatccaaagt tatcaaatct 1020
 taccttaaac aacattgaaa caacttggaa ttctttcatt aggatcctcc agctggtttg 1080
 gcatacaact gtatggattt tctcaatttc aaacgtgaag ctacagggtc agctggactt 1140
 cagagatttt gattattctg gcacttcctt gaaggccttg tctatacacc aagttgtcag 1200
 cgatgtgttc ggttttccgc aaagttatat ctatgaaatc ttttcgaata tgaacatcaa 1260
 aaatttcaca gtgtctggta cacgcatggg ccacatgctt tgcccatcca aaattagccc 1320
 gttcctgcat ttggatttt ccaataatct cttaacagac acggtttttg aaaattgtgg 1380
 gcaccttact gagttggaga cacttatttt acaaatgaat caattaaaag aactttcaaa 1440
 aatagctgaa atgactacac agatgaagtc tctgcaacaa ttggatatta gccagaattc 1500
 tgtaagctat gatgaaaaga aaggagactg ttcttggact aaaagtttat taagtttaaa 1560
 tatgtcttca aatatactta ctgacactat tttcagatgt ttacctcca ggatcaaggt 1620
 acttgatctt cacagcaata aaataaagag cattcctaaa caagtcgtaa aactggaagc 1680
 tttgcaagaa ctcaatgttg ctttcaattc tttactgac cttcctggat gtggcagctt 1740
 tagcagcctt tctgtattga tcattgatca caattcagtt tcccacccat cggctgattt 1800
 cttccagagc tgccagaaga tgaggtcaat aaaagcaggg gacaatccat tccaatgtac 1860
 ctgtgagcta ggagaatttg tcaaaaatat agaccaagta tcaagtgaag tgtagaggg 1920
 ctggcctgat tcttataagt gtgactacc ggaaagttat agaggaaccc tactaaagga 1980
 ctttcacatg tctgaattat cctgcaacat aactctgctg atcgtcacca tcggtgccac 2040
 catgctgggtg ttggctgtga ctgtgacctc cctctgcagc tacttggatc tgccctggta 2100

ES 2 650 569 T3

tctcaggatg gtgtgccagt ggacccagac ccggcgcagg gccaggaaca tacccttaga 2160
 agaactccaa agaaatctcc agtttcatgc atttatttca tatagtgggc acgattcttt 2220
 ctgggtgaag aatgaattat tgccaaacct agagaaagaa ggtatgcaga tttgccttca 2280
 tgagagaaac tttgttcctg gcaagagcat tgtggaaaat atcatcacct gcattgagaa 2340
 gagttacaag tccatctttg ttttgtctcc caactttgtc cagagtgaat ggtgccatta 2400
 tgaactctac tttgcccac acaatctctt tcatgaagga tctaatagct taatcctgat 2460
 cttgctggaa cccattccgc agtactccat tcctagcagt tatcacaagc tcaaaagtct 2520
 catggccagg aggacttatt tggaaatggcc caaggaaaag agcaaactgt gccttttttg 2580
 ggctaactta agggcagcca ttaatattaa gctgacagag caagcaaaga aatagattac 2640
 acatcaagtg aaaaatattc ctctgttga tattgctgct tttggaagt ccaacaatga 2700
 ctttattttg catcagcata gatgtaaaca caattgtgag tgtatgatgt aggtaaaaat 2760
 atataccttc gggtcgcagt tcaccattta tatgtggtat taaaaattaa tgaaatgata 2820
 taactttgat ttaaacagtt ctgacacata aaaaaaaaaa aaaaaaa 2867

<210> 26

<211> 25

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 26

10 ggcacgattc ttctgggtg aagaa 25

<210> 27

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 27

aaggatgca gattgcctt catga 25

<210> 28

20 <211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 28
 aatggtgccca ttatgaactc tactt 25
 <210> 29
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 29
 atagcttaat cctgatcttg ctgga 25
 15 <210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 30
 gtactccatt cctagcagtt atcac 25
 <210> 31
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 31
 30 aagctcaaaa gtctcatggc cagga 25
 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 32
 5 ggaggactta ttggaatgg cccaa 25
 <210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 33
 gagcaaacgt ggccttttt gggct 25
 <210> 34
 15 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 34
 ttgggctaac ttaagggcag ccatt 25
 <210> 35
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 35
 tattcctcct gttgatattg ctgct 25
 30 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 650 569 T3

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 36

gactttatt tgcatcagca tagat 25

5 <210> 37

<211> 3417

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (220)..(2574)

<223> Secuencia codificante TLR-2

<400> 37

```

cggaggcagc gagaaagcgc agccaggcgg ctgctcggcg ttctctcagg tgactgctcg      60
gagttctccc agtgtttggg gttgcaagca ggatccaaag gagacctata gtgactccca      120
ggagctctta gtgaccaagt gaaggtacct gtggggctca ttgtgcccac tgctctttca      180
ctgctttcaa ctggtagttg tggggtgaag cactggacaa tgccacatac tttgtggatg      240
gtgtgggtct tgggggtcat catcagcctc tccaaggaag aatcctccaa tcaggcttct      300
ctgtcttggtg accgcaatgg tatctgcaag ggcagctcag gatctttaa ctccattccc      360
tcagggtcct cagaagctgt aaaaagcctt gacctgtcca acaacaggat cacctacatt      420
agcaacagtg acctacagag gtgtgtgaac ctccaggctc tggtgctgac atccaatgga      480
attaacacaa tagaggaaga ttctttttct tcctgggca gtcttgaaca tttagactta      540
tcctataatt acttatctaa tttatcgtct tcctggttca agccccttc ttctttaaca      600
ttcttaaact tactgggaaa tccttacaaa accctagggg aaacatctct tttttctcat      660
ctcacaaaat tgcaaactct gagagtggga aatatggaca cttcactaa gattcaaaga      720
aaagatthttg ctggacttac cttccttgag gaacttgaga ttgatgcttc agatctacag      780
agctatgagc caaaaagttt gaagtcaatt cagaatgtaa gtcactctgat cttcatatg      840
aagcagcata ttttactgct ggagatthtt gttagatgta caagttccgt ggaatgthttg      900

```

ES 2 650 569 T3

gaactgcgag atactgattt ggacactttc catttttcag aactatccac tggtgaaaca 960
 aattcattga ttaaaaagtt tacatttaga aatgtgaaaa tcaccgatga aagtttgttt 1020
 caggttatga aacttttgaa tcagatttct ggattgttag aattagagtt tgatgactgt 1080
 acccttaatg gagttggtaa ttttagagca tctgataatg acagagttat agatccaggt 1140
 aaagtggaaa cgtaacaat ccggaggctg catattccaa ggttttactt attttatgat 1200
 ctgagcactt tatattcact tacagaaaga gttaaaagaa tcacagtaga aaacagtaaa 1260
 gtttttctgg ttccttgttt actttcacia catttaaaat cattagaata cttggatctc 1320
 agtgaaaatt tgatggttga agaatacttg aaaaattcag cctgtgagga tgcctggccc 1380
 tctctacaaa ctttaatttt aaggcaaaat catttggcat cattggaaaa aaccggagag 1440
 actttgctca ctctgaaaaa cttgactaac attgatatca gtaagaatag ttttcattct 1500
 atgcctgaaa cttgtcagtg gccagaaaag atgaaatatt tgaacttatc cagcacacga 1560
 atacacagtg taacaggctg cattccaag aactggaaa ttttagatgt tagcaacaac 1620
 aatctcaatt tattttcttt gaatttgccg caactcaaag aactttatat ttccagaaat 1680
 aagttgatga ctctaccaga tgcctccctc ttaccatgt tactagtatt gaaaatcagt 1740
 aggaatgcaa taactacgtt ttctaaggag caacttgact catttcacac actgaagact 1800
 ttggaagctg gtggcaataa cttcatttgc tcctgtgaat tcctctcctt cactcaggag 1860
 cagcaagcac tggccaaaagt cttgattgat tggccagcaa attacctgtg tgactctcca 1920
 tcccatgtgc gtggccagca ggttcaggat gtccgcctct cgggtgctgga atgtcacagg 1980
 acagcactgg tgtctggcat gtgctgtgct ctgttcctgc tgatcctgct cacgggggctc 2040
 ctgtgccacc gtttccatgg cctgtggtat atgaaaatga tgtgggcctg gctccaggcc 2100
 aaaaggaagc ccaggaagc tcccagcagg aacatctgct atgatgcatt tgtttcttac 2160
 agtgagcggg atgcctactg ggtggagaac cttatggtcc aggagctgga gaacttcaat 2220
 ccccccttca agttgtgtct tcataagcgg gacttcattc ctggcaagtg gatcattgac 2280
 aatatcattg actccattga aaagagccac aaaactgtct ttgtgctttc tgaaaacttt 2340
 gtgaagagtg agtggtgcaa gtatgaactg gacttctccc atttccgtct ttttgatgag 2400
 aacaatgatg ctgccattct cattcttctg gagcccattg agaaaaaagc cattccccag 2460
 cgcttctgca agctgcggaa gataatgaac accaagacct acctggagtg gcccatggac 2520
 gaggctcagc ggggaaggatt ttgggtaaat ctgagagctg cgataaagtc ctaggttccc 2580
 atatttaaga ccagtccttg tctagttggg atctttatgt cactagttat agttaagttc 2640
 attcagacat aattatataa aaactacgtg gatgtaccgt catttgagga cttgcttact 2700
 aaaactacaa aacttcaaat tttgtctggg gtgctgtttt ataaacatat gccagattta 2760
 aaaattgggt tttggttttt ctttttcta tgagataacc atgatcataa gtctattact 2820
 gatatctgaa tatagtcctt tggatccaa gggaaattggt tgcaggatcc tcgtggatat 2880

ES 2 650 569 T3

caaaattcat agatgatcaa gtcccttata agagtggcat agtatttgca tataacctgt 2940
 gtacattctc ctgtatactt taaatcatct ctagattact tatgatacc aatacaatgt 3000
 aaatactatg taaatagttg tactgtcttt ttatttatat tattattggt attttttatt 3060
 ttcaaaatth ttaaaacata cttttgatcc acagttgggt gacttcatgg atgcagaacc 3120
 catggatata gagggccaac tgtaatctgt agcaactggc ttagttcatt aggaaacagc 3180
 acaaatgaac ttaagattct caatgactgt gtcattcttt cttcctgcta agagactcct 3240
 ctgtggccac aaaaggcatt ctctgtccta cctagctgtc acttctctgt gcagctgac 3300
 tcaagagcaa caaggcaaag tatttggggc actcccaaaa acttgttgct attcctagaa 3360
 aaaagtgctg tgtatttctt attaaacttt acaggatgag aaaaaaaaaa aaaaaaa 3417

<210> 38

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 38

gtttcttaca gtgagcggga tgcct 25

10 <210> 39

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 39

gagaacctta tggccagga gctgg 25

<210> 40

<211> 25

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 40

25 ataagcggga cttcattcct ggcaa 25

<210> 41
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 41
 gtatgaactg gacttctccc atttc 25
 <210> 42
 10 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 42
 ctcccatttc cgtcttttg aagag 25
 <210> 43
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 43
 aatgatgctg ccatttcat tcttc 25
 25 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 44
 agcgcttctg caagctgagg aagat 25
 <210> 45

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 45
 acaccaagac ctacctggag tggcc 25
 <210> 46
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 46
 15 tggagtggcc catggacgag gctca 25
 <210> 47
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 47
 agctgcgata aagtcctagg ttccc 25
 <210> 48
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30 <400> 48
 gaccagtctt tgtctagttg ggatc 25
 <210> 49
 <211> 1702

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (82)..(681)

<223> Secuencia codificante CD69

<400> 49

ES 2 650 569 T3

agactcaaca agagctccag caaagacttt cactgtagct tgacttgacc tgagattaac 60
 tagggaatct tgagaataaa gatgagctct gaaaattggt tcgtagcaga gaacagctct 120
 ttgcatccgg agagtggaca agaaaatgat gccaccagtc cccatttctc aacacgtcat 180
 gaagggctct tccaagttcc tgtcctgtgt gctgtaatga atgtggctct catcaccatt 240
 ttaatcatag ctctcattgc cttatcagtg ggccaataca attgtccagg ccaatacaca 300
 ttctcaatgc catcagacag ccatgtttct tcatgctctg aggactgggt tggctaccag 360
 aggaaatgct actttatttc tactgtgaag aggagctgga cttcagccca aaatgcttgt 420
 tctgaacatg gtgctactct tgctgtcatt gattctgaaa aggacatgaa ctttctaaaa 480
 cgatacgag gtagagagga aactggggt ggactgaaaa aggaacctgg tcacctatgg 540
 aagtggtaa atggcaaaga atttaacaac tggttcaacg ttacagggtc tgacaagtgt 600
 gtttttctga aaaacacaga ggtcagcagc atggaatgtg agaagaattt atactggata 660
 tgtaacaaac cttacaaata ataaggaaac atgttcaact attgactatt atagaatgga 720
 actcaaggaa atctgtgtca gtggatgctg ctctgtggtc cgaagtcttc catagagact 780
 ttgtgaaaaa aaattttata gtgtcttggg aattttcttc caaacagaac tatggaaaaa 840
 aaggaagaaa ttccaggaaa atctgcactg tgggctttta ttgccatgag ctagaagcat 900
 cacaggttga ccaataacca tgcccaagaa tgagaagaat gactatgcaa cctttggatg 960
 cactttatat tattttgaaat ccagaaataa tgaaataact aggcgtaggac ttactattta 1020
 ttgctgaatg actaccaaca gtgagagccc ttcatgcatt tgcactactg gaaggagtta 1080
 gatgttggtta ctagatactg aatgtaaaca aaggaattat ggctggtaac ataggttttt 1140

 agtctaattg aatcccttaa actcagggag catttataaa tggacaaatg cttatgaaac 1200
 taagatttgt aatatttctc tctttttaga gaaatttgcc aatttacttt gttatttttc 1260
 cccaaaaaga atgggatgat cgtgtattta ttttttact tcctcagctg tagacaggtc 1320
 cttttc gatg gtacatat ttttgcttt ataactttt atacagtgtc ttacagagaa 1380
 aagacataag caaagactat gaggaatatt tgcaagacat agaatagtgt tggaaaatgt 1440
 gcaatatgtg atgtggcaaa tctctattag gaaatattct gtaatcttca gacctagaat 1500
 aatactagtc ttataatagg tttgtgactt tcctaaatca attctattac gtgcaatact 1560
 tcaatacttc atttaaaata tttttatgtg caataaaatg tatttgtttg tattttgtgt 1620
 tcagtacaat tataagctgt ttttatatat gtgaaataaa agtagaataa acacaaaaaa 1680
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1702

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 50
 tagtctaatt gaatccctta aactc 25
 <210> 51
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 51
 15 atgggatgat cgtgtatta tttt 25
 <210> 52
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 52
 tttttactt cctcagctgt agaca 25
 <210> 53
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30 <400> 53
 acttcctcag ctgtagacag gtcct 25
 <210> 54
 <211> 25

- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- 5 <400> 54
- gacaggtcct ttcgatggt acata 25
- <210> 55
- <211> 25
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- <400> 55
- tggtacatat ttcttgcct ttata 25
- 15 <210> 56
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Oligonucleótido sintético
- <400> 56
- tataatcttt tatacagtg cttac 25
- <210> 57
- <211> 25
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido sintético
- <400> 57
- 30 gtgatgtggc aaatctctat tagga 25
- <210> 58
- <211> 25
- <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 58
 5 atattctgta atcttcagac ctaga 25
 <210> 59
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 59
 aggtttgtga ctttctaaa tcaat 25
 <210> 60
 15 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 60
 tacgtgcaat acttcaatac ttcac 25
 <210> 61
 <211> 523
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (99)..(284)
 <223> Secuencia codificante CDW52
 30 <400> 61

ES 2 650 569 T3

ctcctgggtc aaaagcagct aaaccaaag aagcctccag acagccctga gatcacctaa 60
 aaagctgcta ccaagacagc cacgaagatc ctaccaaagt gaagcgcttc ctcttcctcc 120
 tactcaccat cagcctcctg gttatggtac agatacaaac tggactctca ggacaaaacg 180
 acaccagcca aaccagcagc ccctcagcat ccagcaacat aagcggaggc attttccttt 240
 tcttcgtggc caatgccata atccacctct tctgcttcag ttgaggtgac acgtctcagc 300
 cttagccctg tgccccctga aacagctgcc accatcactc gcaagagaat cccctccatc 360
 tttgggaggg gttgatgcca gacatcacca ggttgtagaa gttgacaggc agtgccatgg 420
 gggcaacagc caaaataggg gggtaatgat gtaggggcca agcagtgccc agctgggggt 480
 caataaagtt acccttgtagc ttgcaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 523

<210> 62

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 62

taatcggctc actataggaa ttgac 25

10 <210> 63

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 63

aagcagctaa accaaaagaa gcctc 25

<210> 64

<211> 25

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 64

25 cagatacaaa ctggactctc aggac 25

<210> 65
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 65
 caaactggac tctcaggaca aaacg 25
 <210> 66
 10 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 15 <400> 66
 tcaggacaaa acgacaccag ccaaa 25
 <210> 67
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 67
 ttcttttct tcgtggccaa tgcca 25
 25 <210> 68
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 68
 ttctcgtgg ccaatgcat aatcc 25
 <210> 69

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 69
 ttctgctca gttgaggtga cacgt 25
 <210> 70
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 70
 15 ttcagttgag gtgacacgtc tcagc 25
 <210> 71
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 71
 gtgacacgtc tcagccttag ccctg 25
 <210> 72
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30 <400> 72
 ggttgatgcc agacatcacc aggtt 25
 <210> 73
 <211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 73
 atcaccaggt tgtagaagtt gacag 25
 <210> 74
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 74
 caccaggttg tagaagttga caggc 25
 15 <210> 75
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 75
 atgtaggggc caagcagtc ccagc 25
 <210> 76
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 76
 30 tgtaggggcc aagcagtgcc cagct 25
 <210> 77
 <211> 25
 <212> ADN

ES 2 650 569 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 77

5 gtcaataaag ttacccttgt acttg 25

<210> 78

<211> 1310

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (103)..(1110)

<223> Secuencia codificante Gapdh

<400> 78

aaattgagcc cgcagcctcc cgcttcgctc tctgctcctc ctgttcgaca gtcagccgca 60

tcttcttttg cgtcgccagc cgagccacat cgctcagaca ccatggggaa ggtgaaggtc 120

ggagtcaacg gatttggtcg tattgggagc ctggtcacca gggctgcttt taactctggt 180

aaagtggata ttgttgccat caatgacccc ttatttgacc tcaactacat ggtttacatg 240

ttccaatatg attccaccca tggcaaattc catggcaccg tcaaggctga gaacgggaag 300

cttgtcatca atggaaatcc catcaccatc ttccaggagc gagatccctc caaaatcaag 360

15 tggggcgatg ctggcgctga gtacgctgtg gagtccactg gcgtcttcac caccatggag 420

ES 2 650 569 T3

aaggctgggg ctcatTTgca ggggggagcc aaaagggTca tcatctctgc cccctctgct 480
gatgccccca tgTtcgTcat gggTgtgaac catgagaagt atgacaacag cctcaagatc 540
atcagcaatg cctcctgcac caccaactgc ttagcacccc tggccaaggt catccatgac 600
aactTtggtA tcgTggaagg actcatgacc acagTccatg ccatcactgc cacccagaag 660
actgtggatg gcccctccgg gaaactgtgg cgtgatggcc gcggggctct ccagaacatc 720
atccctgcct ctactggcgc tgccaaggct gtgggcaagg tcatccctga gctgaacggg 780
aagctcactg gcatggcctt ccgtgtcccc actgccaacg tGtcagTggt ggacctgacc 840
tgccgtctag aaaaacctgc caaatatgat gacatcaaga aggtggTgaa gcaggcgtcg 900
gagggccccc tcaagggcat cctgggctac actgagcacc aggtggTctc ctctgacttc 960
aacagcgaca cccactcctc cacctTtgac gctggggctg gcattgcctt caacgaccac 1020
Tttgtcaagc tcatttctctg gtatgacaac gaattTggct acagcaacag ggtggTggac 1080
ctcatggccc acatggcctc caaggagtaa gaccctgga ccaccagccc cagcaagagc 1140
acaagaggaa gagagagacc ctactgctg gggagTccct gccacactca gtccccacc 1200
aactgaatc tcccctcctc acagTtgcca tGtagacccc ttgaagaggg gaggggccta 1260
gggagccgca cctTgtcatg taccatcaat aaagtaccct gtgctcaacc 1310

<210> 79

<211> 25

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 79

cctctgactt caacagcgac accca 25

10 <210> 80

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 80

gggctggcat tgccctcaac gacca 25

<210> 81

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 81
 ccctcaacga ccactttgtc aagct 25
 <210> 82
 <211> 25
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 82
 15 accactttgt caagctcatt tctg 25
 <210> 83
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 83
 ttgtcaagct catttctgg tatga 25
 <210> 84
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 30 <400> 84
 tcatttctg gtagacaac gaatt 25
 <210> 85
 <211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 85
 acaacgaatt tggctacagc aacag 25
 <210> 86
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 86
 ggggtggtgga cctcatggcc cacat 25
 15 <210> 87
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 87
 tcatggccca catggcctcc aagga 25
 <210> 88
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 88
 30 acatggcctc caaggagtaa gacct 25
 <210> 89
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 89
 5 aggagtaaga cccctggacc accag 25
 <210> 90
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 90
 gccccagcaa gagcacaaga ggaag 25
 <210> 91
 15 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 91
 gagagagacc ctcaactgctg gggag 25
 <210> 92
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 92
 cctcaactgct ggggagtccc tgcca 25
 30 <210> 93
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 93
 cctcctcaca gttgcatgt agacc 25
 5 <210> 94
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 94
 agtgccatg tagaccctt gaaga 25
 <210> 95
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 95
 20 catgtagacc cctgaagag gggag 25
 <210> 96
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 96
 tagggagccg cacctgtca tgtac 25
 <210> 97
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 97
 gccgcacctt gtcatgtacc atcaa 25
 <210> 98
 5 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 10 <400> 98
 tgtcatgtac catcaataaa gtacc 25
 <210> 99
 <211> 1793
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (74)..(1201)
 <223> Secuencia codificante B-actina
 20 <400> 99

ES 2 650 569 T3

cgcgtccgcc cgcgagcac agagcctcgc ctttgccgat ccgccgcccg tccacacccg 60
 ccgccagctc accatggatg atgatatcgc cgcgctcgtc gtcgacaacg gtcgccgcat 120
 gtgcaaggcc ggcttcgcgg gcgacgatgc cccccgggcc gtcttcccct ccatcgtggg 180
 gcgccccagg caccagggcg tgatgggtggg catgggtcag aaggattcct atgtgggcca 240
 cgaggcccag agcaagagag gcatcctcac cctgaagtac cccatcgagc acggcatcgt 300
 caccaactgg gacgacatgg agaaaatctg gcaccacacc ttctacaatg agctgcgtgt 360
 ggctcccagag gagcaccgcc tgctgctgac cgaggccccc ctgaaccca aggccaaccg 420
 cgagaagatg acccagatca tgtttgagac cttcaacacc ccagccatgt acgttgctat 480
 ccaggctgtg ctatccctgt acgcctctgg ccgtaccact ggcacgtga tggactccgg 540
 tgacgggggtc acccactg tgcccatcta cgaggggtat gccctcccc atgccatcct 600
 gcgtctggac ctggctggcc gggacctgac tgactacctc atgaagatcc tcaccgagcg 660
 cggctacagc ttcaccacca cggccgagcg ggaaatcgtg cgtgacatta aggagaagct 720
 gtgctacgtc gccctggact tcgagcaaga gatggccacg gctgcttcca gctcctccct 780
 ggagaagagc tacgagctgc ctgacggcca ggtcatcacc attggcaatg agcggttccg 840
 ctgccctgag gcactcttcc agccttccct cctgggcatg gagtcctgtg gcatccacga 900
 aactaccttc aactccatca tgaagtgtga cgtggacatc cgcaaagacc tgtacgcaa 960
 cacagtgtg tctggcggca ccaccatgta ccctggcatt gccgacagga tgcagaagga 1020
 gatcactgcc ctggcaccca gcacaatgaa gatcaagatc attgctctc ctgagcgcaa 1080
 gtactccgtg tggatcggcg gctccatcct ggccctcgtg tccaccttcc agcagatgtg 1140
 gatcagcaag caggagtatg acgagtccgg cccctccatc gtccaccgca aatgcttcta 1200
 ggcggactat gacttagttg cgttacacc tttcttgaca aaacctact tgcgcagaaa 1260
 acaagatgag attggcatgg ctttatttgt tttttttgtt ttgttttggg tttttttttt 1320
 tttttggctt gactcaggat ttaaaaactg gaacgggtgaa ggtgacagca gtcggttggg 1380
 gcgagcatcc cccaaagttc acaatgtggc cgaggacttt gattgcacat tgttgttttt 1440
 ttaatagtca ttccaaatat gagatgcatt gttacaggaa gtcccttgcc atcctaaaag 1500
 ccacccact tctctctaag gagaatggcc cagtcctctc ccaagtccac acaggggagg 1560

 tgatagcatt gctttcgtgt aaattatgta atgcaaaatt tttttaatct tcgccttaat 1620
 acttttttat tttgttttat tttgaatgat gagccttcgt gccccctt cccctttttt 1680
 gtccccaac ttgagatgta tgaaggcttt tggctccct gggagtgggt ggaggcagcc 1740
 agggcttacc tgtactga cttgagacca gttgaataaa agtgcacacc tta 1793

<210> 100

<211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 5 <400> 100
 tcttgacaaa acctaactg cgcag 25
 <210> 101
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 101
 atgagattgg catggctta tttgt 25
 15 <210> 102
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 102
 gcagtcggtt ggagcgagca tcccc 25
 <210> 103
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 103
 30 ccaaagtcca caatgtggcc gagga 25
 <210> 104
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 104
 5 aagttcaca tggtgccgag gactt 25
 <210> 105
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 105
 atgtgccga ggacttgat tgcac 25
 <210> 106
 15 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 20 <400> 106
 ccgaggact tgattgcaca ttgtt 25
 <210> 107
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 107
 ttaaatagtc attcaaata tgaga 25
 30 <210> 108
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 108
 agtcattcca aatatgagat gcatt 25
 5 <210> 109
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 109
 tgttacagga agtcccttgc catcc 25
 <210> 110
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 110
 20 tacaggaagt cccttgccat cctaa 25
 <210> 111
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 111
 tcccttgcca tcctaaaagc caccc 25
 <210> 112
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido sintético
 <400> 112
 cttctctcta aggagaatgg cccag 25
 <210> 113
 5 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 10 <400> 113
 gaggtgatag cattgccttc gtgta 25
 <210> 114
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 114
 tatttgaat gatgagcctt cgtgc 25
 20 <210> 115
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 115
 ttggaatgat gagccttcgt gcccc 25
 <210> 116
 <211> 25
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 116
 gtatgaaggc ttttggctc cctgg 25
 <210> 117
 <211> 25
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 117
 10 ggtggaggca gccaggcct acctg 25
 <210> 118
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 118
 caggcctac ctgtacctg acttg 25
 <210> 119
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 25 <400> 119
 ttacctgtac actgactga gacca 25
 <210> 120
 <211> 1816
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(825)

<223> Secuencia codificante CD40L

<400> 120

ES 2 650 569 T3

cttctctgcc agaagatacc atttcaactt taacacagca tgatcgaaac atacaaccaa 60
 acttctcccc gatctgctggc cactggactg cccatcagca tgaaaatttt tatgtattta 120
 cttactgttt ttcttatcac ccagatgatt gggtcagcac tttttgctgt gtatcttcat 180
 agaaggttgg acaagataga agatgaaagg aatcttcatg_aagattttgt attcatgaaa 240

 acgatacaga gatgcaacac aggagaaaga tccttatcct tactgaactg tgaggagatt 300
 aaaagccagt ttgaaggctt tgtgaaggat ataatgttaa acaaagagga gacgaagaaa 360
 gaaaacagct ttgaaatgca aaaaggatgat cagaatcctc aaattgcggc acatgtcata 420
 agtgaggcca gcagtaaaac aacatctgtg ttacagtggg ctgaaaaagg atactacacc 480
 atgagcaaca acttggtaac cctggaaaat gggaaacagc tgaccgttaa aagacaagga 540
 ctctattata tctatgcca agtcaccttc tgttccaatc ggaagcttc gactcaagct 600
 ccatttatag ccagcctctg cctaaagtcc cccggtagat tcgagagaat cttactcaga 660
 gctgcaaata cccacagttc cgccaaacct tgcgggcaac aatccattca cttgggagga 720
 gtatttgaat tgcaaccagg tgcttcggtg tttgtcaatg tgactgatcc aagccaagtg 780
 agccatggca ctggcttcac gtcctttggc ttactcaaac tctgaacagt gtcaccttgc 840
 aggctgtggt ggagctgacg ctgggagtct tcataataca gcacagcggg taagcccacc 900
 ccctgttaac tgcctattta taaccctagg atcctcctta tggagaacta tttattatac 960
 actccaaggc atgtagaact gtaataagtg aattacaggt cacatgaaac caaacgggc 1020
 cctgctccat aagagcttat atatctgaag cagcaacccc actgatgcag acatccagag 1080
 agtcctatga aaagacaagg ccattatgca caggttgaat tctgagtaaa cagcagataa 1140
 cttgccaagt tcagttttgt ttctttgctg gcagtgtctt tccatggata atgcatttga 1200
 tttatcagtg aagatgcaga agggaaatgg ggagcctcag ctcacattca gttatggttg 1260
 actctggggt cctatggcct tgttggaggg ggccaggctc tagaacgtct aacacagtgg 1320
 agaaccgaaa ccccccccc ccccccgcc accctctcgg acagttattc attctcttc 1380
 aatctctctc tctccatctc tctctttcag tctctctctc tcaacctctt tcttccaatc 1440
 tctctttctc aatctctctg tttccctttg tcagtctctt ccctccccca gtctctcttc 1500
 tcaatcccc tttctaacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac 1560
 acacacacac acacacacac agagtcaggc cgttgctagt cagttctctt ctttccacc 1620
 tgtccctatc tctaccacta tagatgaggg tgaggagtag ggagtgcagc cctgagcctg 1680
 cccactcctc attacgaaat gactgtattt aaaggaaatc tattgtatct acctgcagtc 1740
 tccattgttt ccagagtgaa cttgtaatta tcttgttatt tattttttga ataataaaga 1800
 cctcttaaca ttaaaa 1816

ES 2 650 569 T3

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 121

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

5

ES 2 650 569 T3

Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45
 Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val
 50 55 60
 Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys
 85 90 95
 Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu
 100 105 110
 Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser
 115 120 125
 Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly
 130 135 140
 Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln
 145 150 155 160
 Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr
 165 170 175
 Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser
 180 185 190
 Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala
 195 200 205
 Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His
 210 215 220
 Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn
 225 230 235 240
 Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe
 245 250 255
 Gly Leu Leu Lys Leu
 260

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de las células dendríticas a partir de monocitos, que comprende:
 5 enriquecer monocitos de un producto de leucaféresis mediante elutriación, en donde antes de la elutriación, los monocitos se han incubado sin cultivar a una temperatura mantenida de 1 °C - 14 °C, durante un período de aproximadamente 6 a 96 horas después del momento en que se recoge el producto de leucaféresis de un sujeto; e inducir la diferenciación de dichos monocitos en células dendríticas.
2. El método de la reivindicación 1, en el que los monocitos son monocitos humanos.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la temperatura de incubación se mantiene entre 1 °C - 8 °C.
- 10 4. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el período de incubación es de 8 a 48 horas.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el período de incubación es de 10 a 30 horas.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el período de incubación es de 26 a 72 horas.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el período de incubación es de 48 a 80 horas.
- 15 8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la diferenciación se induce poniendo en contacto los monocitos con un medio de cultivo que comprende una cantidad eficaz de una composición que induce la diferenciación de monocitos en células dendríticas inmaduras, en el que la composición es GM-CSF e IL-4; GM-CSF e IL-13; GM-CSF e IL-15; o IFN α .
9. El método de la reivindicación 1, en el que los monocitos enriquecidos se congelan y descongelan antes del cultivo.
- 20 10. El método de la reivindicación 8, que comprende además una etapa de maduración de las células dendríticas inmaduras en células dendríticas maduras.
11. El método de la reivindicación 10, que comprende además cargar uno o más antígenos en dichas células dendríticas maduras.
- 25 12. El método de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que la etapa comprende (a) poner en contacto las células dendríticas inmaduras con PGE $_2$, TNF α , IL-6 e IL-1 β o (b) señalar dichas células dendríticas inmaduras con IFN- γ , seguido por la señalización de las células dendríticas con CD40L.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha señalización con CD40L se efectúa tras la traducción de un ARNm de CD40L recombinante dentro de las células dendríticas.
14. El método de la reivindicación 10, en el que la etapa comprende poner en contacto las células dendríticas inmaduras con PGE $_2$, TNF α , e IFN γ para producir las células dendríticas maduras.
- 30 15. El método de la reivindicación 14, que comprende además transfectar dichas células dendríticas maduras con un ARN que codifica CD40L y/o ARN que codifica uno o más antígenos o epítotos de interés.
16. El método de la reivindicación 15, en el que el ARN codifica uno o más antígenos de células cancerosas y/o uno o más antígenos de patógenos.
- 35 17. El método de cualquier reivindicación precedente, que comprende además cargar las células dendríticas con uno o más antígenos para producir una célula dendrítica cargada con antígeno.
18. El método de la reivindicación 17, en el que el antígeno es autólogo para el sujeto.
19. El método de la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en el que dicho antígeno se carga transfectando dicha célula dendrítica con uno o más ARN que codifican dicho(s) antígeno(s).
- 40 20. El método de la reivindicación 19, en el que las células dendríticas se transfectan con el ARN mediante electroporación.
21. El método de la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en el que dichas células se transfectan con aproximadamente 1-4 μ g de ARN por 10⁶ células dendríticas.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en el que dicha célula dendrítica es inmadura en el momento de la carga del antígeno.
23. El método de la reivindicación 22, que comprende además madurar dichas células dendríticas inmaduras cargadas con antígeno en células dendríticas maduras cargadas con antígeno.
- 5 24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 23, en el que el antígeno procede de o deriva de una o más células cancerosas o patógenos.
25. El método de la reivindicación 24, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de células renales, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de estómago y cáncer de páncreas.
- 10 26. El método de la reivindicación 24, en el que dicho patógeno es HIV o HCV.
27. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dichos monocitos se someten a un movimiento ocasional o continuo durante el período de incubación.
28. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que dichos monocitos están sujetos a movimientos ocasionales o continuos asociados con el envío durante el período de incubación.
- 15 29. El método de la reivindicación 27, en el que dicho movimiento está asociado con el envío.
30. Una célula dendrítica cargada con antígeno que se puede obtener por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 para su uso como un producto farmacéutico, por ejemplo, como una vacuna, en el que dichas células tienen una proporción de estado de equilibrio de ARN de ALOX15, ARN de TLR1, ARN de TLR2, ARN de IL-1 β y/o ARN de CD69 para ARN de β -actina o ARN de GAPDH de menos de 1.0, y/o proporción de estado de equilibrio de ARN de CD52 a ARN de β -actina o GAPDH de más de 1.0.
- 20 31. Una célula dendrítica cargada con antígeno que se puede obtener por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 para uso en el tratamiento o prevención del cáncer o una enfermedad causada por un patógeno, en el que dichas células tienen una proporción de estado de equilibrio de ARN de ALOX15, ARN de TLR1, ARN de TLR2, ARN de IL-1 β y/o ARN de CD69 a ARN de β -actina o ARN de GAPDH de menos de 1.0, y/o una proporción de estado de equilibrio de ARN de CD52 a ARN de β -actina o GAPDH mayor que 1.0.
- 25 32. Una composición que comprende células dendríticas que se pueden obtener por el método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 29, en el que dichas células tienen una proporción de estado de equilibrio de ARN de ALOX15, ARN de TLR1, ARN de TLR2, ARN de IL-1 β y/o ARN de CD69 a ARN de β -actina o ARN de GAPDH de menos de 1.0, y/o una proporción de estado de equilibrio de ARN de CD52 a ARN de β -actina o GAPDH de más de 1.0.
- 30 33. La composición de la reivindicación 32, en la que las células dendríticas están cargadas con antígeno.
34. La composición de la reivindicación 32 o la reivindicación 33, en la que las células dendríticas se transfectan con ARNm que codifica CD40L.
- 35 35. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, en la que las células dendríticas maduras tienen niveles aumentados de una o más CD80, CD83, CD86, moléculas de clase I MHC, o moléculas de clase II MHC en comparación con células dendríticas maduras preparadas a partir de monocitos frescos.
36. Una vacuna que comprende la composición de cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35.

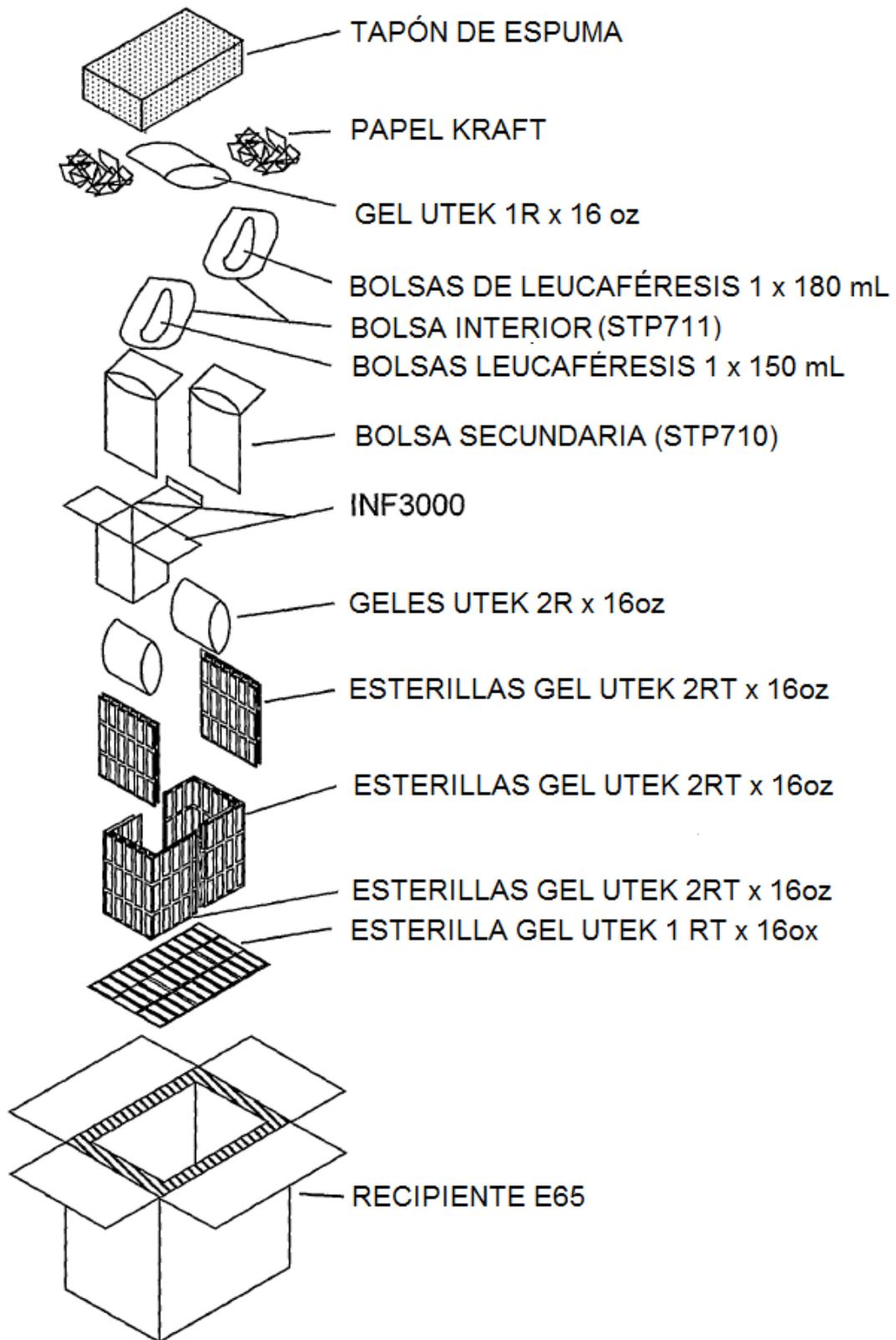


FIG. 1

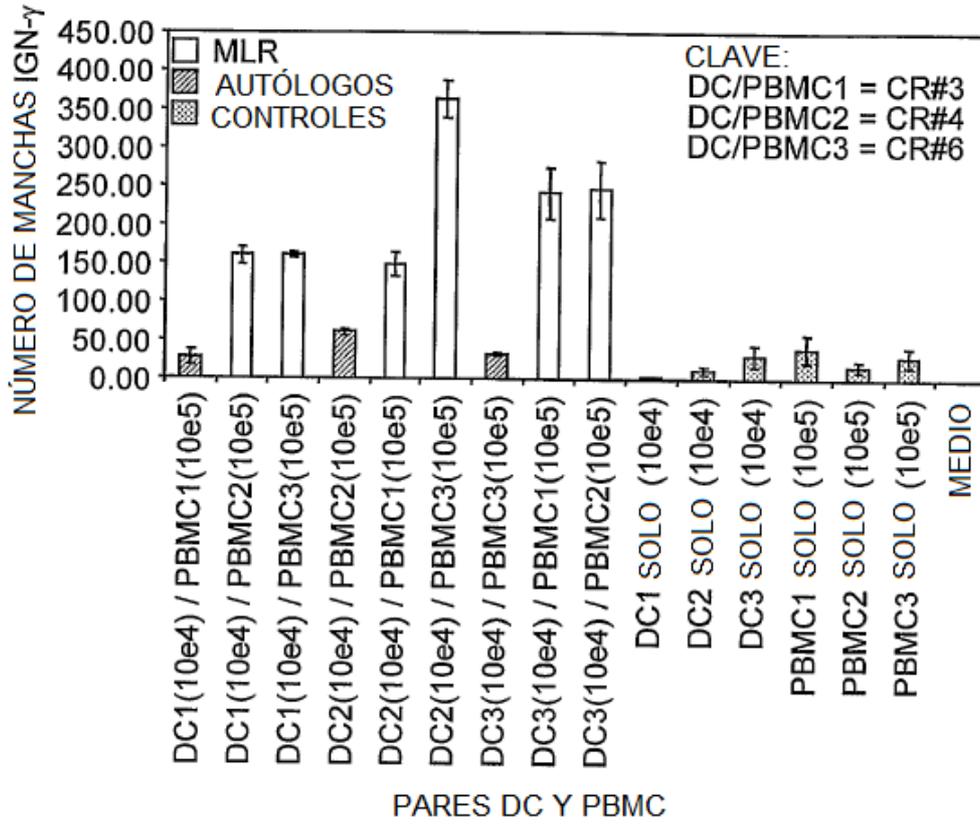


FIG. 2

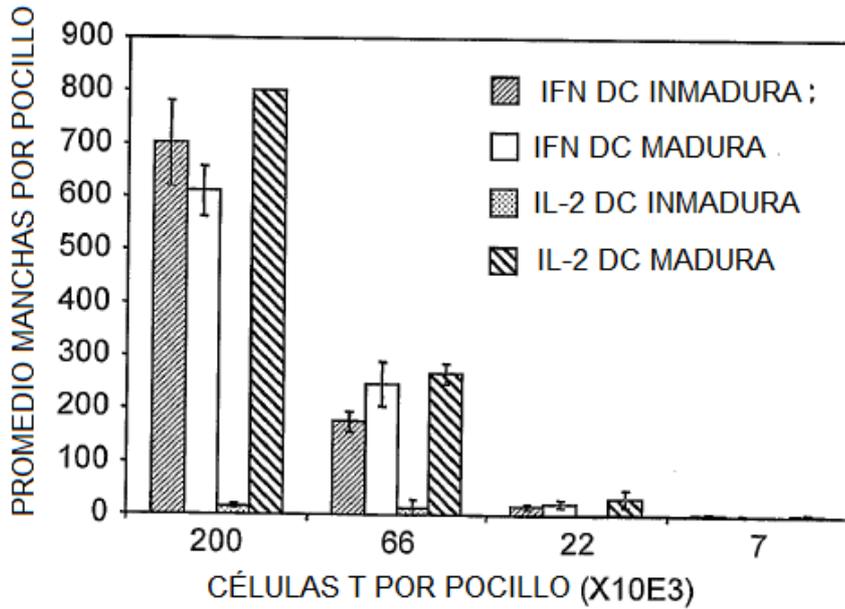


FIG. 3

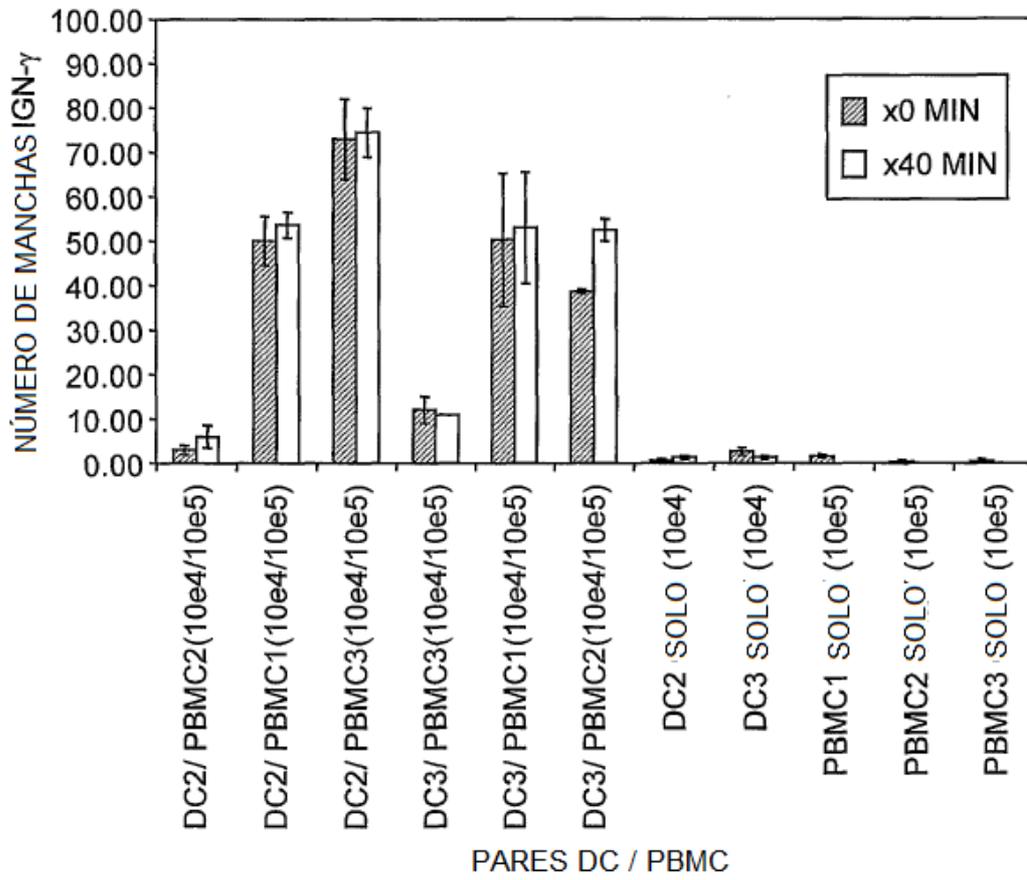


FIG. 4

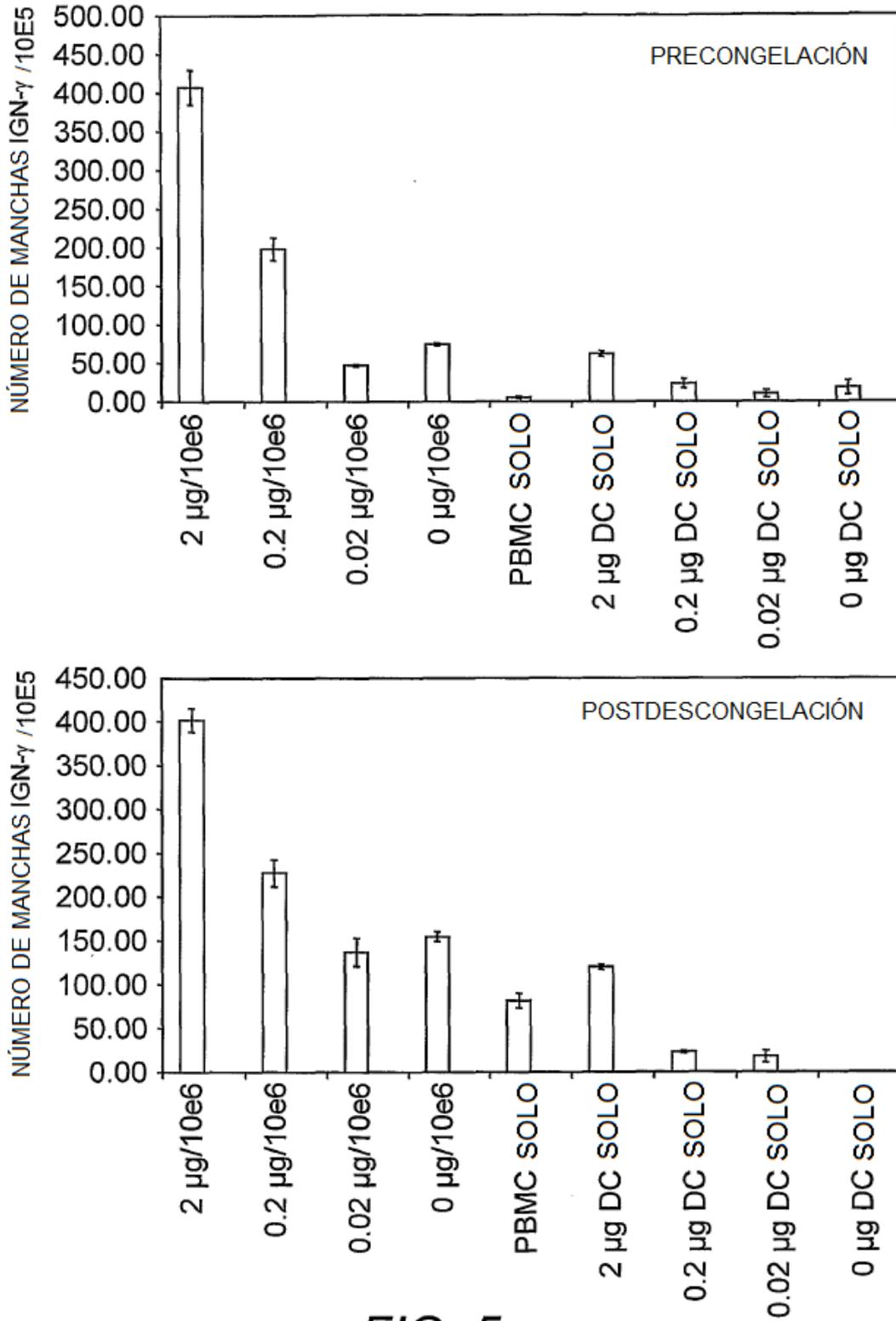


FIG. 5

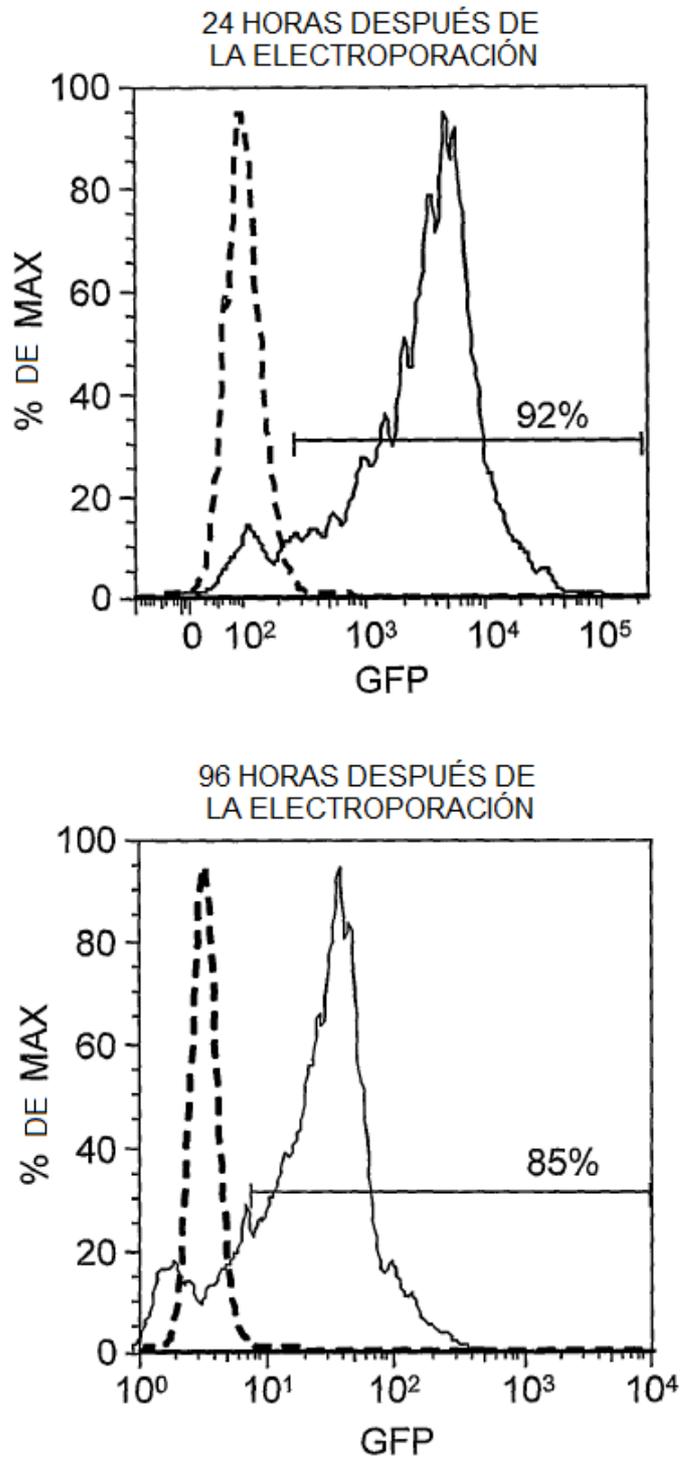


FIG. 6

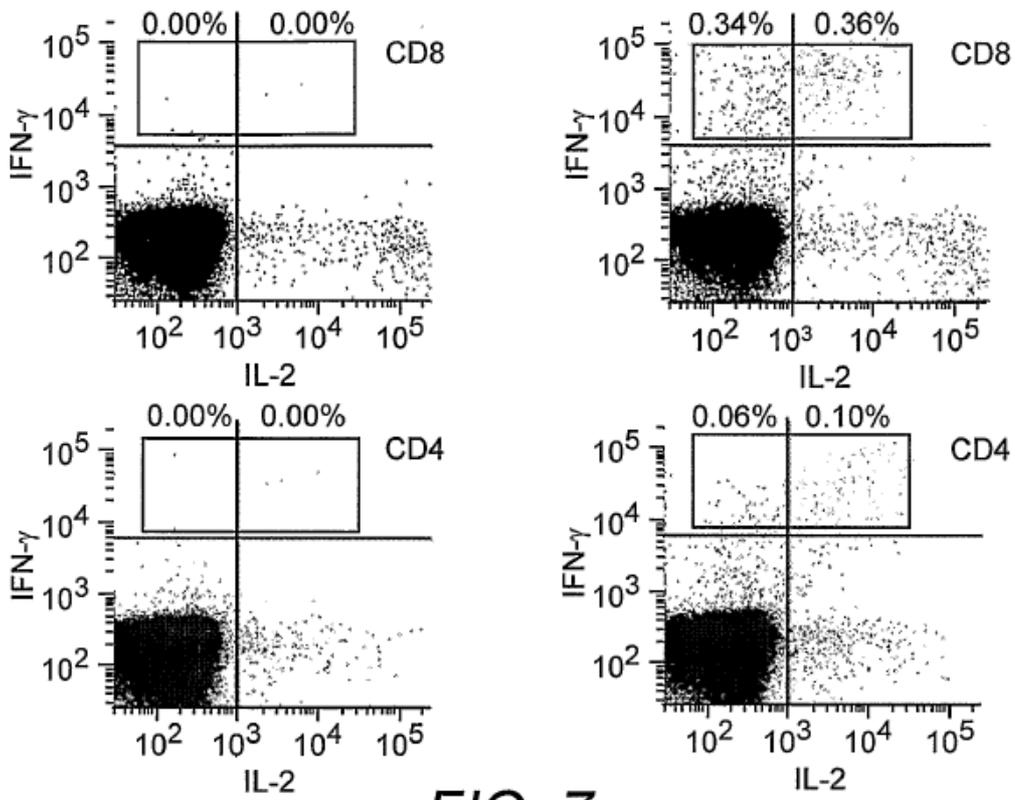


FIG. 7

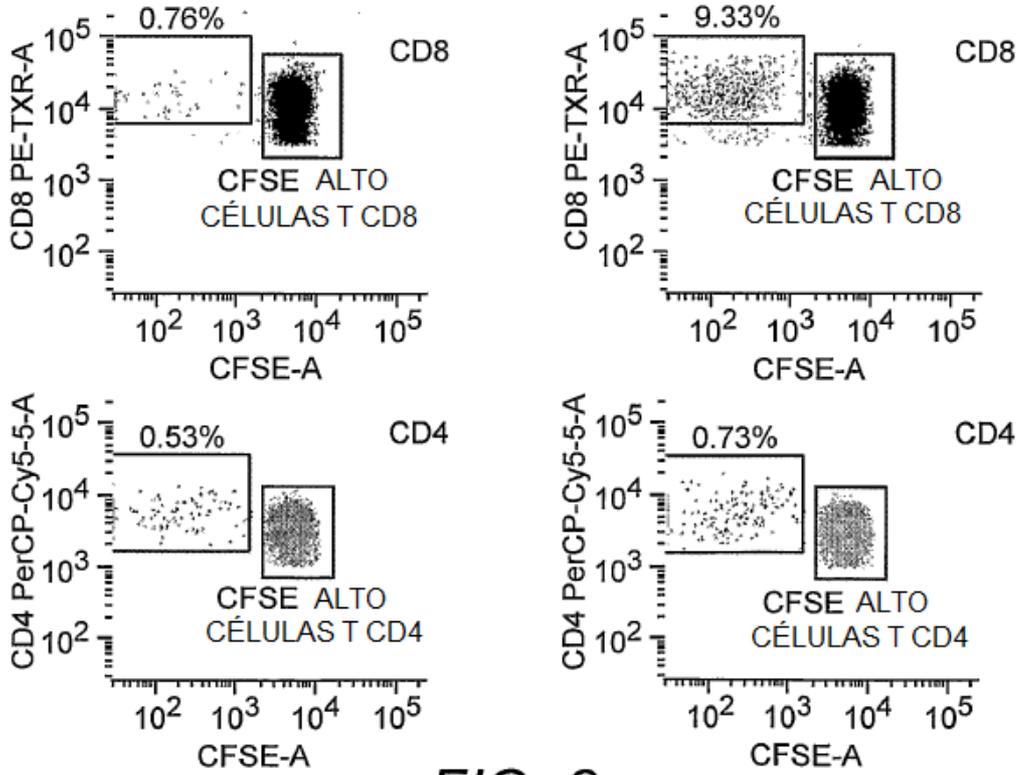


FIG. 8

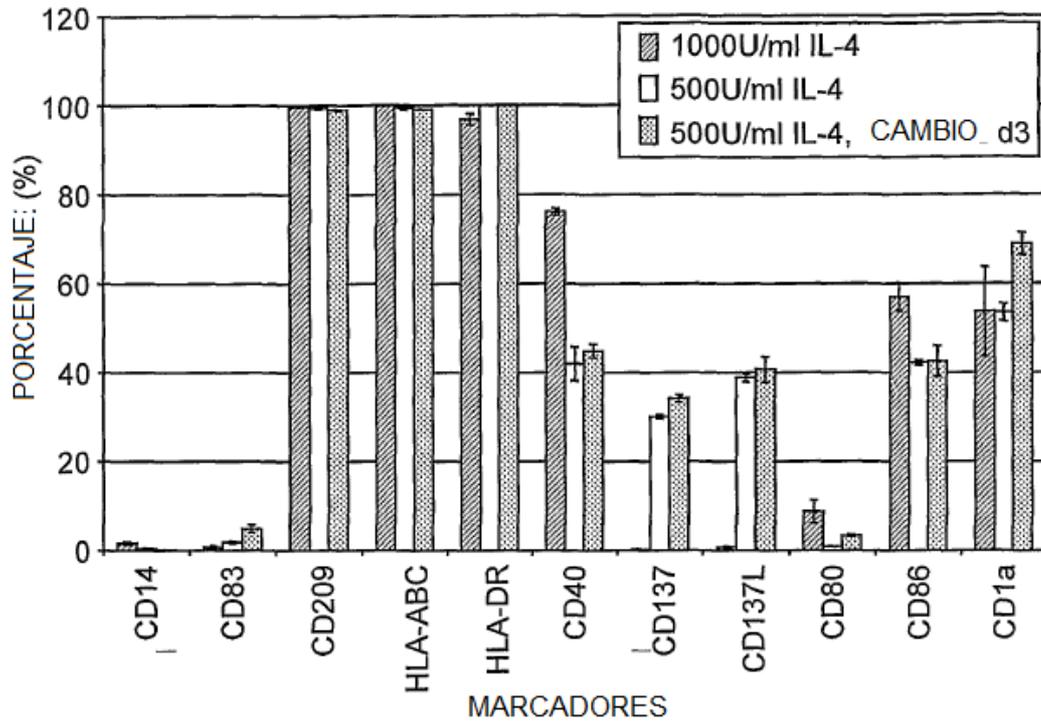


FIG. 9

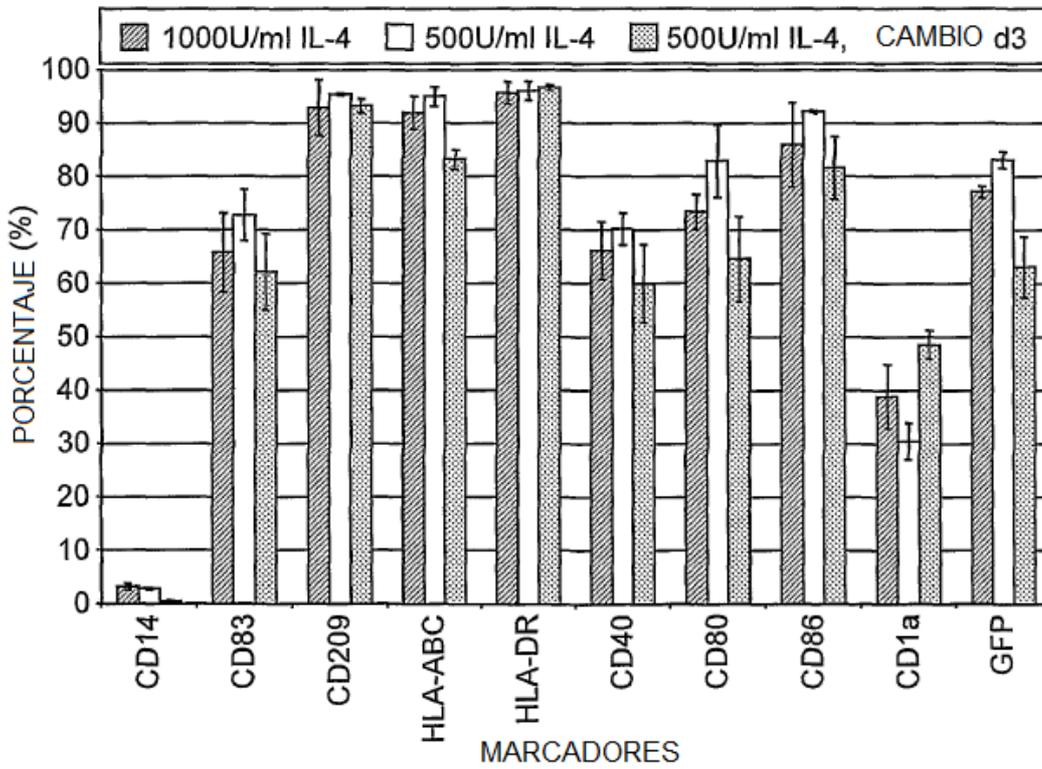


FIG. 10