(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 673 321**

(51) Int. CI.:

C12N 5/0784 (2010.01)
A61K 35/14 (2015.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)
A61K 38/21 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 31/38 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2013 PCT/EP2013/058812**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.11.2013 WO13171055**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 13720885 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2847321**

(54) Título: **Método para la maduración in vitro de células dendríticas**

(30) Prioridad:

12.05.2012 EP 12167799

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2018

(73) Titular/es:

CIMAAS B.V. (100.0%)
Oxfordlaan 70
6229 EV Maastricht, NL

(72) Inventor/es:

BOS, GERARDUS MARINUS JOSEF;
GERMERAAD, WILFRED THOMAS VINCENT;
GIJSBERS, LAMBERTA MARIA GERARDINA;
OTH, TAMMY y
VANDERLOCHT, JORIS

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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

DESCRIPCIÓN

Método para la maduración *in vitro* de células dendríticas

Campo de la invención

La invención pertenece al campo de la biología celular y la inmunología. La invención proporciona métodos para la producción de una vacuna contra el cáncer y enfermedades infecciosas. Más en particular, proporciona un método para la producción mejorada de células dendríticas.

Antecedentes de la invención

A pesar de las mejoras en los tratamientos convencionales contra el cáncer, tales como cirugía, quimioterapia y radioterapia, el cáncer aún es una causa principal de muerte en todo el mundo (1). Por lo tanto, existe una necesidad urgente de tratamientos más eficaces y menos invasivos. Un campo de interés en crecimiento en investigación para estrategias terapéuticas novedosas es el de inmunoterapia. Como el sistema inmunitario de muchos pacientes con cáncer está suprimido, se pierde la primera línea de defensa contra las células malignas. Esto crea un entorno permisivo para el tumor.

La inmunoterapia tiene como objetivo superar esta supresión y reactivar el propio sistema inmunitario del paciente para rechazar el tumor. Existen diversas estrategias que ya se están usando en clínica, que utilizan inmunidad tanto activa como pasiva.

El tratamiento del cáncer con anticuerpos monoclonales es un ejemplo de inmunoterapia pasiva. Se inyectan anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales conocidos, donde reconocen y se unen a su epítopo específico. Estos anticuerpos se usan en solitario, dependiendo de la citotoxicidad mediada por moléculas dependiente de anticuerpos o de una señal antiapoptótica, o se acoplan a agentes terapéuticos que permiten la administración localizada. Los anticuerpos monoclonales han mostrado resultados positivos tanto en supervivencia a largo plazo como en supervivencia a corto plazo, aunque el tratamiento a menudo tiene que acoplarse a radioterapia. La desventaja de esta estrategia es que la mayoría de los epítopos asociados a tumor están localizados dentro de la célula, lo que los hace inaccesibles para los anticuerpos. Además, unos pocos antígenos son específicos de tumor, lo que provoca un abordaje indeseado de las células sanas.

Otros ejemplos de inmunoterapias pasivas son adyuvantes inmunitarios y citocinas. Estos tratamientos tienen como objetivo crear un entorno inflamatorio que contrarrestaría la naturaleza inmunosupresora de la neoplasia, lo que permite que tengan lugar respuestas inmunitarias espontáneas. Sin embargo, los resultados usando estos tratamientos son limitados. La desventaja de las inmunoterapias pasivas, en general, es que no se forman células inmunitarias de memoria, haciendo que sea probable la recidiva.

Estas desventajas pueden esquivarse por inmunoterapia activa, que inicia una respuesta inmunitaria contra el tumor, por lo que no solamente se hace uso de las células efectoras (específicas de antígeno), tales como linfocitos citotóxicos (CTL), células plasmáticas y linfocitos NK, sino también de la memoria protectora. Una estrategia de inmunoterapia activa es a través de vacunación con células dendríticas (DC). Estas células son las células presentadoras de antígeno más importantes del organismo, que pueden iniciar respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas.

En determinados pacientes, se ha demostrado que las DC tienen alteración en su actividad, lo que las hace dianas atractivas para inmunoterapia (2). Estas y otras inmunoterapias se revisan ampliamente en las referencias 3 y 4 de la bibliografía.

Las vacunas basadas en DC ya están en uso en clínica, lo que revela efectos secundarios ausentes o únicamente leves (5). Sin embargo, únicamente un 10-15% de los pacientes así tratados respondieron al tratamiento (5). Esto indica que las mejoras en los protocolos de vacunación basados en DC siguen siendo de vital importancia si tiene que conseguirse una erradicación de tumores a gran escala.

Las células dendríticas son un grupo heterogéneo de células del organismo que difieren en la localización, el fenotipo y la función. En la sangre periférica, los dos tipos principales son DC plasmocitoides CD11c- (pDC) y DC mieloides CD11c+ (myDC). Aunque las pDC comprende únicamente un 0,1% de todas las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), son cruciales en la inmunidad antivírica a través de la producción de grandes cantidades de interferones de tipo I (6; 7). La myDC pueden subdividirse además en células que expresan de forma diferencial BDCA1 (CD1c), CD16 y BDCA3 (8; 9). Aunque las myDC CD16+ comprenden un 65-75% de la población de myDC total, las myDC BDCA1+ (10-20%) son las mejor descritas en la bibliografía y se cree que son los estimuladores de linfocitos T más potentes de las tres subpoblaciones de myDC (8).

In vivo, los monocitos pueden diferenciarse en myDC después de detectar una señal inflamatoria, manteniendo una cantidad estable de DC en la sangre (7; 10). *Ex vivo*, las DC inmaduras derivadas de monocitos (iDC) se obtienen

cultivando monocitos en presencia de diferentes factores de crecimiento (10).

Dependiendo de los factores añadidos, los monocitos se diferencian en DC con diferentes funciones y fenotipos (revisado en (10)). Debido a la baja cantidad de DC en circulación en la sangre, la mayoría de los estudios de vacunas basadas en DC usan estas iDC cultivadas *ex vivo*. El cóctel convencional actual para inducir la activación de monocitos y la diferenciación hacia iDC contiene GM-CSF e IL-4.

Como células presentadoras de antígeno profesionales (APC), las DC tienen una función central en la activación del sistema inmunitario innato y adaptativo y pueden adaptar la respuesta inmunitaria a la naturaleza específica de un patógeno. Las iDC captan los patógenos mediante endocitosis, lo procesan y presentan fragmentos peptídicos pequeños (antígenos) de ese patógeno específico sobre su superficie celular mediante moléculas MHC de clase I y de clase II.

Tras el reconocimiento del patógeno, las DC experimentan maduración. Este proceso implica la regulación por disminución de su capacidad fagocítica, mientras se regula por aumento al mismo tiempo las citocinas inflamatorias y la expresión de moléculas superficiales, tales como moléculas coestimuladoras y receptores de quimiocinas (11). La naturaleza del patógeno dictamina las citocinas y moléculas superficiales que se expresan por la DC. Este proceso está mediado por receptores de reconocimiento de patrones (PRR; véase la sección 1.5) y permite que las DC inicien una respuesta inmunitaria adaptada al patógeno específico. La migración de las DC maduras (mDC) hacia los ganglios linfáticos contribuye a su capacidad de montar respuestas inmunitarias, porque la arquitectura de estos órganos es tal que se maximizan los encuentros de mDC con células efectoras inmunitarias adaptativas (12).

En inmunidad tumoral, es importante que las DC monten una respuesta polarizada a T_H1 potente para maximizar la eliminación tumoral específica de antígeno por CTL (13). Más recientemente, la importancia del reclutamiento y la activación de linfocitos NK ha salido a la luz, ya que no solamente pueden lisar las células tumorales, sino que también ayudan a propagar a respuesta TH1.

Los linfocitos NK son parte del sistema inmunitario innato y desempeñan una función importante en la vigilancia inmunitaria de células transformadas, ya que proporcionan una primera línea de defensa para células transformadas por virus y malignas (14). La activación de linfocitos NK está regulada por un equilibrio frágil entre receptores de activación e inhibición. En célula sanas, el equilibrio favorece la inhibición, protegiendo de ese modo a la célula de la lisis (15). La activación de linfocitos NK se produce por la pérdida de señales inhibidoras y por la obtención de señales activadoras, lo que proporciona dos mecanismos distintos mediante los que los linfocitos NK pueden realizar su función (15). Las señales inhibidoras se proporcionan a los linfocitos NK mediante el reconocimiento de moléculas MHC de clase I por receptores de tipo inmunoglobulina de linfocitos citolíticos (KIR) y de HLA-E no clásico por NKG2A (16).

Cada KIR reconoce una molécula HLA específica y se sabe que los linfocitos NK son heterogéneos en su expresión de KIR (16). Esta especificidad y distribución permite una vigilancia continuada de cada molécula HLA por los linfocitos NK. Se sabe que tanto las células infectadas por virus como malignas regulan por disminución las moléculas MHC de clase I para escapar a la detección por el sistema inmunitario adaptativo (17). Esta regulación por disminución provoca la pérdida de señales inhibidoras en linfocitos NK, que quedan activados y lisan la célula. La activación de los linfocitos NK mediante la pérdida de inhibición se menciona como "pérdida de autorreconocimiento". Los receptores que están implicados en transmisión de las señales de activación incluyen receptores de citotoxicidad natural (por ejemplo, NKp30, NKp40 y NKp46), NKG2D y 2B4. Los estudios funcionales indican que las neoplasias a menudo expresan ligandos para estos receptores (16). La presencia de estos ligandos podría estimular los receptores hasta un grado en que el equilibrio se inclinará hacia la activación y señales de anulación e inhibidoras proporcionadas por moléculas del MHC, activando de ese modo los linfocitos NK. Esta ruta de activación de linfocitos NK se conoce como "autorreconocimiento inducido".

Además de su función de vigilancia inmunitaria para células transformadas, los linfocitos NK también tienen una función inmunorreguladora produciendo citocinas, tales como TNF-alfa e IFN-gamma. Esta función de los linfocitos NK es especialmente importante en la interferencia NK-DC. Esta interferencia provoca la potenciación recíproca de las funciones, y ha recibido un interés creciente como un factor importante en inmunidad antitumoral. Por un lado, las DC activan los linfocitos NK secretando citocinas, tales como IL-12, IL-18 e IL-15 (con IL-2). Se demostró que IL-15 potencia la supervivencia de los linfocitos NK (18), mientras que IL-12 promovía la producción de IFN-gamma de linfocitos NK (19; 20). Además, las DC pueden reclutar linfocitos NK en los ganglios linfáticos secundarios de una manera dependiente de CCR5 (21), donde los linfocitos NK proporcionan una fuente temprana de IFN-gamma que ayuda a la polarización TH1 y la sensibilización de CTL por DC (22; 23). Estos efectos de la interferencia NK-DC en los linfocitos T son cruciales en la inmunidad antitumoral, ya que sensibilizan los linfocitos TH1 y CTL para erradicar el tumor de una manera específica de antígeno (24). Posteriormente, los ensayos que usan DC que activan linfocitos NK muestran una actividad antitumoral potenciada (25; 26).

Por otro lado, los linfocitos NK pueden eliminar iDC inmunosupresoras, así como DC maduradas de forma inapropiada, asegurando de ese modo la calidad de la respuesta inmunitaria (27). En determinadas circunstancias, los linfocitos NK también pueden madurar las DC mediante la secreción de TNF-alfa e IFN-gamma (20). Estas DC

expresan altos niveles de CCR7, facilitando de ese modo la migración a los ganglios linfáticos secundarios (20). Mediante estas diferentes interacciones con DC, los linfocitos NK pueden modular la respuesta inmunitaria adaptativa. Se cree que la interferencia NK-DC principalmente tiene lugar en tejido maltratado y los ganglios linfáticos secundarios, con respuestas que difieren de acuerdo con el sitio de encuentro (28).

Las DC y otras células del sistema inmunitario innato, tales como los linfocitos NK, tienen que ser capaces de identificar directamente patógenos específicos para activar la respuesta inmunitaria apropiada (31). Pueden hacer esto mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos altamente conservados (PAMP), típicos para patógenos y que nunca están presentes en un hospedador sano. Dependiendo del PAMP encontrado, quedarán activos diferentes PRR y sus rutas de señalización.

Las células difieren en su expresión de PRR, haciéndolas susceptibles de forma diferencial a los patógenos. Debido a su función central en el sistema inmunitario, las DC expresan una amplia serie de PRR, incluyendo receptores de tipo Toll (TLR), receptores de tipo de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), receptores de lectina de tipo C (CLR) y receptores de tipo del gen 1 inducible por ácido retinoico (RIG-1). Estos receptores reconocen diferentes clases de patógenos, lo que asegura la inducción de la respuesta inmunitaria apropiada (30).

Los PRR mejor descritos son miembros de la familia de receptores de tipo Toll, que pueden encontrarse de forma tanto intracelular como extracelular. El TLR-3, TLR-7, TLR-8 y TLR-9 intracelulares están localizados en los endosomas y reconocen ADN o ARN bacteriano y vírico. El TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 y TLR-6 extracelulares están localizados en la superficie celular y reconocen componentes de membrana de los patógenos, tales como LPS, peptidoglucano y flagelina. Todos los TLR, excepto TLR-3, emiten señales de una manera dependiente de Myd88, lo que da lugar a la activación de NF-kappa B. Además, el TLR-3 y el TLR-4 activan NF-kappa B y otros factores de transcripción importantes para la producción de IFN de tipo I, mediante TRIF (31).

Los CLR pueden encontrarse en la membrana celular y son parte del mecanismo de reconocimiento fúngico del sistema inmunitario, activando finalmente NF-kappa B. También desempeñan una función importante en la captación y presentación de antígenos. Más recientemente, se ha demostrado que son reguladores importantes de la migración de DC (32).

Los receptores de tipo NOD y RIG se encuentran en el citoplasma, reconociendo componentes víricos y bacterianos que están presentes en la célula. Su activación desencadena la producción de IFN de tipo I mediante NF-kappa B (33; 34).
Dependiendo del PAMP encontrado, quedan activados diferentes PRR y sus rutas de señalización. Un patógeno normalmente activa más de un PRR. Dependiendo de la combinación de PRR desencadenada, se inicia una cascada de señalización distintiva que dictamina la respuesta inmunitaria y el programa de maduración de las DC. Este programa de maduración regula la expresión de moléculas coestimuladoras, citocinas proinflamatorias, quimiocinas y sus receptores (30). El hecho de que diferentes subconjuntos de DC varíen en su idoneidad para responder a diferentes activadores puede explicarse por el hecho de que no son iguales en su expresión de PRR (revisado en 7). Se cree que desencadenar combinaciones específicas de PRR dará lugar a la maduración de las DC más adecuadas para vacunas contra el cáncer, lo que da lugar a un sesgo TH1 potente y respuestas de linfocitos NK. Sin embargo, se desconoce la combinación de PRR que es óptima para inducir este efecto.

Las investigaciones se han centrado en identificar los activadores de PRR que puedan producir un fenotipo de DC maduras con un perfil predominante de citocina IL-12 que pueda potenciar la activación de CTL y las repuestas de linfocitos NK proporcionando una respuesta TH1. Se ha establecido que la adición de fragmentos de membrana de *Klebsiella pneumoniae* (FMKp; activador de TLR2/4) junto con IFN-gamma al cóctel de maduración de DC, produce DC que son superiores al "producto de referencia" que son DC maduradas en presencia de un cóctel de TNF-alfa/PGE2. El cóctel de FMKp/IFN-gamma ha demostrado ser superior *in vitro* respecto a la activación de CTL (35), la secreción de IL-12 y la posterior polarización TH1 (36). Se demostró que las DC maduradas con FMKp/IFN-gamma producen más quimiocinas que pueden atraer a otras células inmunitarias (35).

Uno de los retos que afrontan las vacunas basadas en DC es el microentorno inmunosupresor del tumor (17). Las DC tienen que superar esta actividad supresora para activar las células efectoras inmunitarias.

Muchas neoplasias secretan activamente factores inmunosupresores, entre los que están la prostaglandina E2 (PGE2) (36). Esto crea un estado permisivo en que el tumor puede crecer, escapando al mismo tiempo la detección por el sistema inmunitario. Se ha demostrado que la PGE2 modula el sistema inmunitario adaptativo favoreciendo la propagación de TH2/TH17 por encima de la respuesta TH1 (37; 38). Adicionalmente, disminuye la capacidad citotóxica de CTL (39), así como inhibiendo la maduración y presentación de antígeno de las DC (40). Además del efecto sobre los linfocitos T, también tiene un efecto negativo sobre la función de los linfocitos NK uniéndose directamente a los receptores EP en la membrana de los linfocitos NK (41). Se ha demostrado que esto reduce la proliferación de linfocitos NK, la citotoxicidad y la migración, así como la inhibición de la secreción de IFN-gamma (42). Aunque se describen estos efectos negativos sobre los linfocitos NK, aún no está clara la manera en que la interferencia NK-DC se ve influida por PGE2.

De forma paradójica, el cóctel del "producto de referencia" para madurar DC *ex vivo* en los actuales ensayos clínicos contiene PGE2. Este cóctel produce un fenotipo de DC completamente maduras, con la capacidad de migrar *in vitro* hacia un gradiente de quimiocinas CCL-19/21, lo que indica que podrían ser eficaces en la migración hacia los ganglios linfáticos (35). Sin embargo, los resultados clínicos muestran que esta capacidad migradora está limitada (43). Además, estas DC son malos productores de IL-12, necesaria para la polarización TH1 (44).

Por lo tanto, puede concluirse que hay una gran necesidad de cócteles de maduración que sean mejores para producir DC maduras, en particular DC que puedan atacar a un tumor.

Sumario de la invención

Se descubrió que una determinada combinación de agentes de maduración en un cóctel mejora de forma sinérgica la producción y maduración de células dendríticas. Esto puede usarse en la producción de vacunas basadas en células dendríticas para el tratamiento del cáncer y enfermedades infecciosas.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método *ex vivo* para la producción de células dendríticas maduras, en el que las células dendríticas inmaduras se exponen a una composición que comprende FMKp e interferón-gamma en combinación con CL075 o poli IC en un medio de cultivo durante una cantidad de tiempo suficiente para obtener células dendríticas maduras y en el que las células dendríticas maduras se aíslan del medio de cultivo.

El cóctel de maduración como se describe en este documento también puede usarse como preparación farmacéuticamente activa en el tratamiento de seres humano o animales. Por tanto, la invención también se refiere a una composición que comprende FMKp e interferón-gamma en combinación con CL075 o poli IC para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un animal o ser humano. La solicitud también divulga células dendríticas maduras que se pueden obtener por el método de acuerdo con la invención.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Gráfico que muestra la influencia dependiente de la dosis de la adición de IL-12 para la producción de IFN-gamma de linfocitos Th1.

Figura 2. Gráfico que muestra la producción de IFN-gamma por linfocitos NK después de 16 h de activación en sobrenadante de DC maduradas en diferentes cócteles clínicos.

Figura 3. Gráfico que muestra el efecto sinérgico sobre la producción de IL-12 tras la exposición de células dendríticas a IFN-gamma, FMKp y CL075.

Figura 4. Gráfico que muestra el efecto sinérgico sobre la producción de IL-12 tras la exposición de células dendríticas a IFN-gamma, FMKp y CL075 en un único donador.

Figura 5. Gráfico que muestra el efecto sinérgico de la exposición de células dendríticas a IFN-gamma FMKp y CL075 en un ensayo de activación de NK.

Figura 6. Gráfico que muestra la producción de IFN-gamma por linfocitos citolíticos naturales en relación a diferentes factores de crecimiento.

Figura 7. Gráfico que muestra la producción de IFN-gamma en un ensayo de polarización de linfocitos Th1 en relación a diferentes factores de crecimiento.

Figura 8. Gráfico que muestra un experimento individual que demuestra la sinergia sobre la producción de IL-12 mediante la maduración de células dendríticas con IFN-gamma, FMKp y poli IC.

Figura 9. Gráfico que muestra la producción de interferón-gamma por los linfocitos T auxiliares en un ensayo de polarización Th1 en relación a interferón-gamma, FMKp y poli IC.

Figura 10. Gráfico que muestra un resumen de ocho experimentos sobre la activación de linfocitos NK en sobrenadante de DC maduradas de forma diferente medida por producción de IFN-gamma.

Figura 11. Gráficos que muestran los resultados de una comparación de DC maduradas con FMKp/IFN-γ y LPS/IFN-γ.

Descripción detallada de la invención

En primer lugar, se compararon varios cócteles de maduración. Se usaron DC maduradas con FMKp/IFN-gamma como referencia y DC maduradas con PGE2, TNF-alfa/± IL-6 e IL-1 beta (PGE2 DC) como controles. Estas últimas DC se usan hasta ahora en la mayoría de estudios y ensayos clínicos. Las células dendríticas inmaduras (iDC) se cultivaron en presencia de FMKp e interferón-gamma (FI). Las DC maduras obtenidas de esta manera se llamaron FI-DC. Las características de las DC se analizaron a 3 niveles diferentes: Proliferación y polarización de linfocitos T auxiliares, producción de IL-12 por DC y activación de linfocitos citolíticos naturales. Se descubrió que un cóctel de

maduración que consistía en 10 µg/ml de FMKp y 500 U/ml de IFN-gamma además de 500 U/ml de IL-4 y 400 U/ml de GM-CSF funcionaba mejor (figura 2).

Posteriormente se analizó si se podían obtener DC que pudieran inducir cantidad incluso mayores de IL-12 y/o polarización Th1 mejorada y/o activación de linfocitos citolíticos naturales (NK) mejorada.

Se descubrió que determinadas combinaciones de agentes de maduración proporcionaban un efecto sinérgico inesperado. En primer lugar, se pudo demostrar que la combinación de FMKp, IFN-gamma (FI) y CL075 proporcionaba ventajas inesperadas para los tres parámetros usados en este documento.

La figura 3 muestra el efecto sinérgico sobre la producción de IL-12 de FI más CL075. La figura muestra los resultaos promedio de 5 experimentos con una dosis fija de FMKp (dosis = 1 microgramo/ml) para FI-DC y una dosis fija de CL075 (dosis = 1 microgramo/ml). Se observó que la producción de IL-12 de DC inducidas con FI + CL075 era mayor que la suma de la producción de IL-12 de las DC maduradas en cualquiera de los constituyentes individuales del cóctel.

La figura 4 muestra los datos obtenidos con un único donador. La dosis de FMKp es variable, así como la dosis de CL075. La respuesta máxima que esperar debido a un efecto aditivo completo de los diversos agentes de maduración se indica con una línea horizontal en la figura 4. Está claro que la mayoría de las combinaciones de FI y CL075 mostraron un efecto sinérgico, es decir, más que la suma de las partes constituyentes.

Este cóctel también proporcionó resultados sinérgicos en nuestro ensayo de activación de NK (figura 5). Está claro a partir de estos datos que la activación de NK por el sobrenadante de DC con FMKp/IFN-gamma + CL075 es superior a la activación con el sobrenadante de DC maduradas con FMKp/IFN-gamma o CL075 en solitario. La combinación de tres compuestos desencadena un efecto sinérgico sobre la activación de linfocitos NK. La figura 5 muestra un experimento representativo que muestra la cantidad de IFN-gamma derivado de linfocitos NK después de estimulación durante una noche con el sobrenadante de DC maduradas con diversas dosis de FMKp y/o diversas dosis de CL075.

La figura 6 muestra la suma de 7 experimentos, que indica la cantidad de interferón-gamma producido por linfocitos NK y demuestra que FI + CL075 es superior en la activación de linfocitos NK. FI en solitario induce la activación de linfocitos NK, pero mucho menos que la combinación. La dosis de FMKp usada fue 1 microgramo/ml, la dosis de CL075 usada fue 1 microgramo/ml. Estos datos también demuestran que no todas las activaciones del receptor de tipo Toll tienen un efecto sinérgico y que la respuesta es específica para CL075 (en este caso, se usa ARNmc40 como activador para el TLR idéntico como CL075). El cóctel de combinación de FI más CL075 también fue superior en nuestro ensayo de polarización de linfocitos Th1, como se muestra en la figura 7).

También se descubrió que la combinación de poli IC y FMKp/IFN-gamma proporcionaba ventajas sinérgicas. La figura 8 muestra un experimento individual que demuestra la sinergia sobre la producción de IL-12 mediante la maduración de células dendríticas con FI más poli IC. Se usan diversas dosis de FMKp para las FI-DC y diversas dosis de poli IC. La producción de IL-12 obtenida con la combinación de FI más poli IC es más que la suma de las partes constituyentes, lo que demuestra sinergia verdadera.

Se observó que la cantidad de IL-12 producida por DC es variable entre los donadores, pero que la sinergia está presente tanto en altos como en bajos productores de IL-12. Esto puede ser de extrema relevancia clínica ya que también en pacientes con DC de baja producción de IL-12 la producción puede potenciarse por el método de la invención.

La combinación de FI más poli IC también demostró resultados sinérgicos en nuestro ensayo de polarización Th1, que se representan por la producción de interferón-gamma por los linfocitos T auxiliares (figura 9). Únicamente la combinación de factores demuestra cantidades relevantes de IFN-gamma, lo que ilustra la polarización de linfocitos T auxiliares vírgenes en linfocitos Th1, una etapa crucial en la activación del sistema inmunitario.

La figura 10 muestra un resumen de ocho experimentos sobre la activación de linfocitos NK en sobrenadante de DC maduradas de forma diferente medida por la producción de IFN-gamma. La dosis de FMKp usada en esta ocasión es 1 microgramo/ml. Se uso poli IC en combinación con IFN-gamma. La comparación del segundo grupo con el cuarto grupo y la línea de puntos (activación en sobrenadante de FI-DC) muestra que la presencia de la combinación de tres factores (FMKp, IFN-gamma y poli IC) es superior a otros dos factores cualesquiera en solitario o en combinación.

Por consiguiente, la invención se refiere a un método *ex vivo* para la producción de células dendrítica maduras, en el que las células dendríticas maduras se exponen a una composición que comprende FMKp e interferón-gamma en combinación con CL075 o poli IC en un medio de cultivo durante una cantidad de tiempo suficiente para obtener células dendríticas maduras y en el que las células dendríticas maduras se aíslan del medio de cultivo.

El cóctel de maduración como se describe en este documento también puede usarse como preparación

farmacéuticamente activa en el tratamiento de seres humano o animales. Por tanto, la invención también se refiere a una composición que comprende FMKp e interferón-gamma en combinación con CL075 o poli IC para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un animal o ser humano. La solicitud también divulga células dendríticas maduras que se pueden obtener por el método de acuerdo con la invención. La solicitud divulga una composición que comprende células dendríticas maduras que se pueden obtener por el método de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento del cáncer y/o enfermedades infecciosas. En términos alternativos, la solicitud divulga un método para el tratamiento del cáncer y/o enfermedades infecciosas, en el que se administra una composición que comprende células dendríticas que se pueden obtener por el método de acuerdo con la invención a un sujeto que necesita dicho tratamiento. Como alternativa, la solicitud divulga un método para el tratamiento del cáncer y/o enfermedades infecciosas, en el que se administra una composición que comprende una combinación de IFN-gamma, FMKp y CL075 o poli IC a un sujeto que necesita dicho tratamiento.

Ejemplo 1: Generación de DC maduras

Se consiguió enriquecimiento de monocitos a partir de productos de leucocitaférisis de cinco voluntarios sanos (aprobado por el Comité de Ética Médica de azM/ Maastricht University) por elutriación centrífuga a contracorriente usando la aplicación de enriquecimiento de monocitos del sistema de separación celular Elutra® (Elutra®, Gambro BCT Europa, Zaventem, Bélgica). La pureza de la fracción de monocitos enriquecidos excedía un 90% evaluada por citometría de flujo. Los monocitos se congelaron a 50*10^6 células por vial. La recuperación después de la descongelación generalmente excedía un 50-70%.

Después de la descongelación, los monocitos se diferenciaron durante 7 días en medio AIM-V sin suero (Gibco Life Technologies, Gaithesburg, MD, EE. UU.) a 2*10^6 células/ml complementado con IL-4 (2000 U/ml; Strathmann Biotech AG, Hannover, Alemania) y GM-CSF (400 U/ml; Berlex, Richmond, CA, EE. UU.). Después de 7 días, las DC inmaduras (iDC) se recogieron y cultivaron durante dos días adicionales en placas de 24 pocillos (Costar, Nueva York, NY, EE. UU.) a 0,5 x 10^6 células por pocillo en cócteles de maduración.

Los cócteles de maduración usados en este documento contenían IL-4 (500 U/ml) GM-CSF (400 U/ml) e IFN-gamma (500 U/ml). Se complementaron con uno o más de los siguientes agentes: FMKp (que varía de 1-50 microgramos/ml), ligandos de PRR (CL075 (0,1-10 microgramos/ml), poli IC lyovec (0,1-5 microgramos/ml) o poli IC LMW (0,1-100 microgramos/ml). Un cóctel de maduración de referencia contenía PGE2, TNF-α/IL-6 e IL-1beta.

En el día 9, se recogieron los sobrenadantes de DC maduras (mDC) y se determinó la IL-12 por micromatriz de microesferas citométricas (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica). Para la activación de NK se usó sobrenadante lavado. Por lo tanto, los cócteles de maduración se lavaron 6 h después de la inducción de la maduración y las células se incubaron durante 42 h adicionales en medio AIM-V.

Ejemplo 2: Validación de sistemas de ensayo, proliferación de linfocitos T auxiliares.

En primer lugar, se configuró un sistema modelo que emplea células CD4+ vírgenes cocultivadas con DC. El sistema de cultivo de las DC se describe en el ejemplo 1. En este experimento las DC se maduraron con FMKp e IFN-gamma. La adición de diferentes concentraciones de IL-12 recombinante a este cocultivo dio lugar a un aumento dependiente de la dosis de células agrandadas. Se observó que la presencia de FI-DC en solitario provocaba una cantidad aumentada de células en comparación con el control, en el que únicamente se cultivaron linfocitos T (sin DC e IL-12 adicional), como se muestra en la tabla 1. También se observó que el porcentaje de células agrandadas respecto a la cantidad de células totales de células vivas aumentaba (tabla 1), lo que indica que la adición de IL-12 al cocultivo de FI-DC con linfocitos T CD4+ vírgenes induce la expansión de linfocitos T. Estos datos ilustran que la cantidad de IL-12 es de gran importancia para la estimulación de linfocitos T.

Tabla 1. Expansión de linfocitos T tras exposición a células dendríticas maduras por FMKp/IFN-gamma y diferentes concentraciones de IL-12 recombinante. En el día cinco, las células se recogieron y analizaron por citometría de flujo.

Condición	Cantidad de células agrandadas/cantidad total de células x 100 (%)
Linfocitos T (control negativo)	2,3
Linfocitos T+20 000 DC	18,5
Linfocitos T+20 000 DC+10 pg/ml de IL-12	14,6
Linfocitos T+20 000 DC+100 pg/ml de IL-12	21,5
Linfocitos T+20 000 DC+1000 pg/ml de IL-12	30,0
Linfocitos T+20 000 DC+10 000 pg/ml de IL-12	36,4

Se concluyó que la expansión de linfocitos T es dependiente de la concentración de IL-12 en un intervalo entre 10 y 1000 pg/ml de IL-12.

Ejemplo 3: Validación de sistemas de ensayo, polarización de linfocitos auxiliares T1.

También se validó nuestra configuración experimental para determinar la polarización Th1. Para ese fin, se cocultivaron DC madurados en FMKp/IFN-gamma (FI) durante 24 h lavados (véase el ejemplo 2) con linfocitos T alogénicos (CD4+CD45RA+CD45RO-) vírgenes durante siete días, y se cuantificaron las citocinas específicas de TH en sobrenadante de cultivo en el día 1, 4 y 7 por CBA. El valor de IFN-gamma se presenta en la figura 1. De nuevo, se añaden diversas cantidades de IL-12 recombinante al cocultivo. Esta figura demuestra que las FI-DC maduras por sí mismas no inducen la polarización T auxiliar, pero que se necesita IL-12 adicional. Estos estudios de complementación exógena demostraron que la necesidad de IL-12 para la polarización Th1 es cuantitativa en lugar de cualitativa, como se evidencia por una secreción dependiente de la dosis de la citocina Th1 y IFN-gamma.

Se aislaron linfocitos T CD4+ vírgenes de sangre periférica por separación de células inmunomagnéticas negativas usando un kit de aislamiento de linfocitos T CD4+ vírgenes, humanos (Miltenyi Biotec, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se usó centrifugación en gradiente de densidad con Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Noruega) para aislar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre completa fresca. Las PBMC se incubaron adicionalmente con un cóctel de anticuerpos biotinilados que se unen a todos los linfocitos T que no son CD4+ y a linfocitos T de memoria. En una segunda etapa de incubación se añadieron microesferas antibiotina y la suspensión celular se añadió finalmente a una columna colocada en un campo magnético que da lugar a la reducción de las células marcadas magnéticamente. Los linfocitos T CD4+ vírgenes se recogieron en el flujo continuo. Para conseguir una mayor pureza se incubó el flujo continuo un segundo tiempo con anticuerpos biotinilados y microesferas. Los tiempos de incubación fueron dos veces tan largos como se indica en el manual. Las CD4+CD45RA+CD45RO- aisladas excedieron un 98% de pureza.

Se evaluó la capacidad de DC maduradas de forma diferente de polarizar células CD4+ vírgenes cocultivando mDC junto con linfocitos T CD4+ vírgenes durante una semana. En el día -1 se recogieron las iDC, se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo redondo (20 000 células/pocillo) y se maduraron con diferentes cócteles como se describe en el ejemplo 1. Después de 24 h, se añadieron linfocitos T CD4+ vírgenes, autólogos (50 000 células/pocillo) junto con 50 microgramos/ml de péptido de unión a pan-HLA-DR (PADRE; AGVAAWTLKAAA, SEQ ID NO: 1), que funciona como superantígeno. Durante toda una semana, cada día se recogió el sobrenadante y se congelo a -20°C para las mediciones de citocinas por micromatriz de microesferas citométricas (CBA; BD Biosciences). Además, las células se recogieron y lisaron en tampón RLT (que contiene betamercaptoetanol) y se congelaron a -80°C para el aislamiento del ARN.

Ejemplo 4: Validación de sistemas de ensayo, activación de linfocitos citolíticos naturales (NK)

Se purificaron los linfocitos NK de capas leucocitarias (obtenidas del Centro de transfusión de sangre, Liege, Bélgica) por separación de células inmunomagnéticas negativas usando un kit de aislamiento de linfocitos NK humanos (Miltenyi Biotec, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se hizo una modificación mínima respecto a los tiempos de incubación, que se ampliaron hasta 30 min. Los linfocitos NK aislados eran >95% CD56+CD3-.

Los linfocitos NK purificados se resuspendieron en medio sin suero y se pusieron a una densidad de 10*10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl de sobrenadante de cultivo sin células de 48 h (lavado después de 6 h) de DC maduradas de forma diferente. Como control negativo, se incubaron células en medio AIM-V en solitario. Todas las condiciones se ensayaron por triplicado. Después de 16 h de incubación a 37°C/CO_2 al 5%, se determinó la activación NK midiendo la producción total de IFN-gamma en el sobrenadante con ELISA.

La figura 2 muestra la producción de IFN-gamma por linfocitos NK después de 16 h de activación en sobrenadante de DC maduradas en diferentes cócteles clínicos. La producción de IFN-gamma es un marcador de activación y se determinó por ELISA. Ensayo por parejas coincidentes de Wilcoxon: FI-DC (1 microgramo/ml de FMKp) frente a cócteles clínicos y FI-DC (10 microgramos/ml de FMKp) frente a cócteles clínicos *, $p<0.05$. n = 8 (excepto PGE2/TNF-α y FI 10 microgramos/ml: n = 6; LPSi/IFN-gamma: n = 7). Estos datos demuestran que FI-DC es la DC más óptima para activar linfocitos NK y que el fenómeno es de nuevo dependiente de la dosis (de FMKp). Mayores dosis (por encima de 10 microgramos/ml) no inducen activación de NK más fuerte (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Comparación de DC maduradas con FMKp/IFN-γ y LPS/IFN-γ. A.

Secreción de citocinas derivadas de DC (IL-12, IL-10, IL-1β). Se maduraron iDC durante 48 h con cóctel de FMKp/IFN-γ a 2 concentraciones diferentes o con LPS/IFN-γ. Se obtuvo LPS 1 y 2 de 2 fabricantes diferentes y se añadieron a diferentes concentraciones. Se recogió el sobrenadante y se determinaron las citocinas por micromatriz de microesferas citométricas. Los resultados se muestran en la figura 11A. Estos datos - producción de IL-1β - demuestran que las DC en FMKp/IFNg son un tipo diferente de DC que las de DC en LPS/IFN-gamma.

Ejemplo 6: Capacidad de las DC maduradas en FMKp/IFN-γ y LPS/IFN-γ de inducir la polarización Th1.

Se determinó la capacidad de DC maduradas en FMKp/IFN-γ y LPS/IFN-γ de inducir la polarización Th1 en un

ensayo de polarización de linfocitos T CD4 vírgenes. Los linfocitos T CD4 vírgenes se cocultivaron con DC maduradas de forma diferente durante 7 días. Se controló la secreción de IFN-γ, una citocina característica de Th1, en el tiempo en el sobrenadante del cocultivo. Los resultados se muestran en la muestra 11B.

Ejemplo 7: C. Capacidad de activación de linfocitos NK de DC maduradas de forma diferente.

Las DC se maduraron con cócteles de FMKp/IFN-γ o LPS/IFN-γ y se lavaron 6 h después de la inducción de la maduración. Los linfocitos NK se incubaron durante una noche con los sobrenadantes lavados y se determinó la activación de linfocitos NK midiendo su producción de IFN-γ. Los resultados se muestran en la figura 11C.

Lista de secuencias

<110> Universiteit Maastricht y Academisch Ziekenhuis Maastricht

<120> Método para la maduración *in vitro* de células dendríticas

<130> 185 WO

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

```
Ala Gly Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Ala
1               5                   10
```

Referencias

1. WHO: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/ Acceso de 23 de abril de 2012.
2. Yang L, Carbone DP. Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction. Advances in Cancer Research. Enero de 2004; 9213-27.
3. Davis ID. Rational approaches to human cancer immunotherapy. Journal of Leukocyte Biology. 1 de enero de 2003; 73(1):3-29.
4. Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. [Internet]. Annual review of Immunology. 20 de enero de 2009; 2783-117.
5. Ridgway D. The First 1000 Dendritic Cell Vaccinees. Cancer Invest. 2003; 21 (6):873-86.
6. Colonna M, Trinchieri G, Liu Y-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. Nature Immunology. 17 de diciembre de 2004; 5(12):1219-26.
7. Schreibelt G, Tel J, Sliepen KHEWJ, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, *et al.* Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2010; 59(10):1573-1582.
8. MacDonald KPA, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DNJ. Characterization of human blood dendritic cell subsets. Blood. 15 de diciembre de 2002; 100(13):4512-20.
9. Piccioli D, Tavarini S, Borgogni E, Steri V, Nuti S, Sammicheli C, *et al.* Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. Blood. 15 de junio de 2007; 109(12):5371-9.
10. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nature Reviews Immunology. 1 de abril de 2005; 5(4):296-306.
11. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. Annual Review of Immunology. 28 de enero de 2000; 18767-811.
12. Figdor CG, Vries IJM de, Lesterhuis WJ, Melief CJM. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. Nature Medicine. 30 de mayo de 2004; 10(5):475-80.
13. Kalinski P, Okada H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors. [Internet]. Seminars in immunology. Junio de 2010; 22(3):173-82.
14. Mailliard RB, Alber SM, Shen H, Watkins SC, Kirkwood JM, Herberman RB, *et al.* IL-18-induced CD83+CCR7+NK helper cells. Journal of Experimental Medicine. 3 de octubre de 2005; 202(7):941-53.
15. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. Nature Reviews Immunology. 1 de julio de 2006; 6(7):520-31.
16. Degli-Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. Nature Reviews Immunology. 1 de febrero de 2005; 5(2):112-24.

17. Vasievich EA, Huang L. The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. Molecular Pharmaceutics. 6 de junio de 2011; 8(3):635-41.
18. Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, VanDeusen JB, Waite RE, Liu Y, *et al. In vivo* evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. Blood. 15 de noviembre de 2002; 100(10):3633-8.
19. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, *et al.* Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 23 de noviembre de 2004; 101 (47):16606-11.
20. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Aricò M, Moretta L, *et al.* NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. Blood. 15 de julio de 2005; 106(2):566-71.
21. Van Elssen CHMJ, Vanderlocht J, Frings PWH, Senden-Gijsbers BLMG, Schnijderberg MCA, Gelder M van, *et al.* Klebsiella pneumoniae-triggered DC recruit human NK cells in a CCR5-dependent manner leading to increased CCL19-responsiveness and activation of NK cells. European Journal of Immunology. Noviembre de 2010; 40(11):3138-49.
22. Mailliard RB, Son Y-I, Redlinger R, Coates PT, Giermasz A, Morel PA, *et al.* Dendritic Cells Mediate NK Cell Help for Th1 and CTL Responses: Two-Signal Requirement for the Induction of NK Cell Helper Function. J. Immunol. 2003 ;171 (5):2366-2373.
23. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, *et al.* Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. Nature Immunology. 7 de diciembre de 2004; 5(12):1260-5.
24. Kalinski P, Urban J, Narang R, Berk E, Wieckowski E, Muthuswamy R. Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need. Future Oncology. 1 de abril de 2009; 5(3):379-90.
25. Karimi K, Boudreau JE, Fraser K, Liu H, Delanghe J, Gauldie J, *et al.* Enhanced antitumor immunity elicited by dendritic cell vaccines is a result of their ability to engage both CTL and IFN gamma-producing NK cells. Molecular Therapy. 4 de febrero de 2008; 16(2):411-8.
26. Fernandez NC, Lozier A, Flament C, Ricciardi-Castagnoli P, Bellet D, Suter M, *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. Nature Medicine. 1 de abril de 1999; 5(4):405-11.
27. Ferlazzo G. Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells. Journal of Experimental Medicine. 4 de febrero de 2002; 195(3):343-351.
28. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. Nature Reviews Immunology. 1 de diciembre de 2002; 2(12):957-64.
29. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, *et al.* Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells. J. Immunol. 2000; 164(11):5998-6004.
30. Padovan E, Landmann RM, De Libero G. How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system. Trends in Immunology. Julio de 2007; 28(7):308-14.
31. Lee MS, Kim Y-J. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. Annual review of biochemistry. 19 de enero de 2007; 76447-80.
32. Figdor CG, Kooyk Y van, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. Nature Reviews Immunology. 1 de febrero de 2002; 2(2):77-84.
33. Fritz JH, Girardin SE. How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals. Journal of Endotoxin Research. 1 de diciembre de 2005; 11(6):390-394.
34. Cella M. Maturation, Activation, and Protection of Dendritic Cells Induced by Double-stranded RNA. Journal of Experimental Medicine. 1 de marzo de 1999; 189(5):821-829.
35. Vanderlocht J, Elssen CHMJ van, Senden-Gijsbers BLMG, Meek B, Cloosen S, Libon C, *et al.* Increased tumorspecific CD8+ T cell induction by dendritic cells matured with a clinical grade TLR-agonist in combination with IFNg. International Journal of Immunopathology and Pharmacology. 2010; 23(1):35-50.
36. Oth T. Role of selective pattern recognition receptor-triggering in dendritic cell-mediated type 1 response. Internal Medicine, Haematology. 2010; Master Thesis 56.
37. Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer. Nature Reviews Cancer. 19 de marzo de 2010; 10(3):181-93.
38. Boniface K, Bak-Jensen KS, Li Y, Blumenschein WM, McGeachy MJ, McClanahan TK, *et al.* Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. The Journal of Experimental Medicine. 16 de marzo de 2009; 206(3):535-48.
39. Snijdewint FG, Kalinski P, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. Journal of Immunology. 15 de junio de 1993; 150(12):5321-9.
40. Zeddou M, Greimers R, Valensart N de, Nayjib B, Tasken K, Boniver J, *et al.* Prostaglandin E2 induces the expression of functional inhibitory CD94/NKG2A receptors in human CD8+ T lymphocytes by a cAMP-dependent protein kinase A type I pathway. Biochemical Pharmacology. 1 de septiembre de 2005; 70(5):714-24.
41. Ahmadi M, Emery DC, Morgan DJ. Prevention of both direct and cross-priming of antitumor CD8+ T-cell responses following overproduction of prostaglandin E2 by tumor cells in vivo. Cancer Research. 15 de septiembre de 2008; 68(18):7520-9.
42. Walker W, Rotondo D. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. Immunology. Marzo de 2004;111(3):298-305.
43. Yakar I, Melamed R, Shakhar G, Shakhar K, Rosenne E, Abudarham N, *et al.* Prostaglandin e(2) suppresses

NK activity *in vivo* and promotes postoperative tumor metastasis in rats. Annals of Surgical Oncology. Mayo de 2003; 10(4):469-79.

44. Verdijk P, Aarntzen EHJG, Lesterhuis WJ, Boullart ACI, Kok E, Rossum MM van, *et al.* Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. Clinical Cancer Research. 1 de abril de 2009; 15(7):2531-40.

45. Kalinski P, SchuitemakerJHN, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Final Maturation of Dendritic Cells Is Associated with Impaired Responsiveness to IFN-{gamma} and to Bacterial IL-12 Inducers: Decreased Ability of Mature Dendritic Cells to Produce IL-12 During the Interaction with Th Cells. J. Immunol. 1999;162(6):3231-3236.

46. Cools N, Van Tendeloo VFI, Smits ELJM, Lenjou M, Nijs G, Van Bockstaele DR, *et al.* Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. Journal of cellular and molecular medicine. Abril de 2008; 12(2):690-700.

47. Spranger S, Javorovic M, Bürdek M, Wilde S, Mosetter B, Tippmer S, *et al.* Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). 1 de julio de 2010; 185(1):738-47.

48. Boullart ACI, Aarntzen EHJG, Verdijk P, Jacobs JFM, Schuurhuis DH, Benitez-Ribas D, *et al.* Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration. Cancer immunology, immunotherapy: CII. Noviembre de 2008; 57(11):1589-97.

49. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, Van Deusen JB, Wei X-qing, Liew FY, *et al.* Coordinated and Distinct Roles for IFN-{alpha}{beta}, IL-12, and IL-15 Regulation of NK Cell Responses to Viral Infection. J. Immunol. 15 de octubre de 2002; 169(8):4279-4287.

50. Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, *et al.* alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. Cancer research. 1 de septiembre de 2004; 64(17):5934-7.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universiteit Maastricht y Academisch Ziekenhuis Maastricht

<120> Método para la maduración *in vitro* de células dendríticas

<130> 185 WO

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Trp	Thr	Leu	Lys	Ala	Ala	Ala
1				5				10			

REIVINDICACIONES

1. Método *ex vivo* para la producción de células dendríticas maduras, en el que se exponen células dendríticas inmaduras a una composición que comprende

(i) fragmentos de membrana de *Klebsiella pneumoniae* (FMKp), interferón-gamma (IFN-gamma) y el ligando del receptor de reconocimiento de patrones (ligando de PRR) CL075, o
(ii) FMKp, IFN-gamma y el ligando de PRR poli IC

en un medio de cultivo durante una cantidad de tiempo suficiente para obtener células dendríticas maduras y en el que las células dendríticas maduras se aíslan del medio de cultivo.

2. Composición que comprende FMKp e interferón-gamma en combinación con (i) CL075 o (ii) poli IC para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un animal o ser humano.

Figura 1

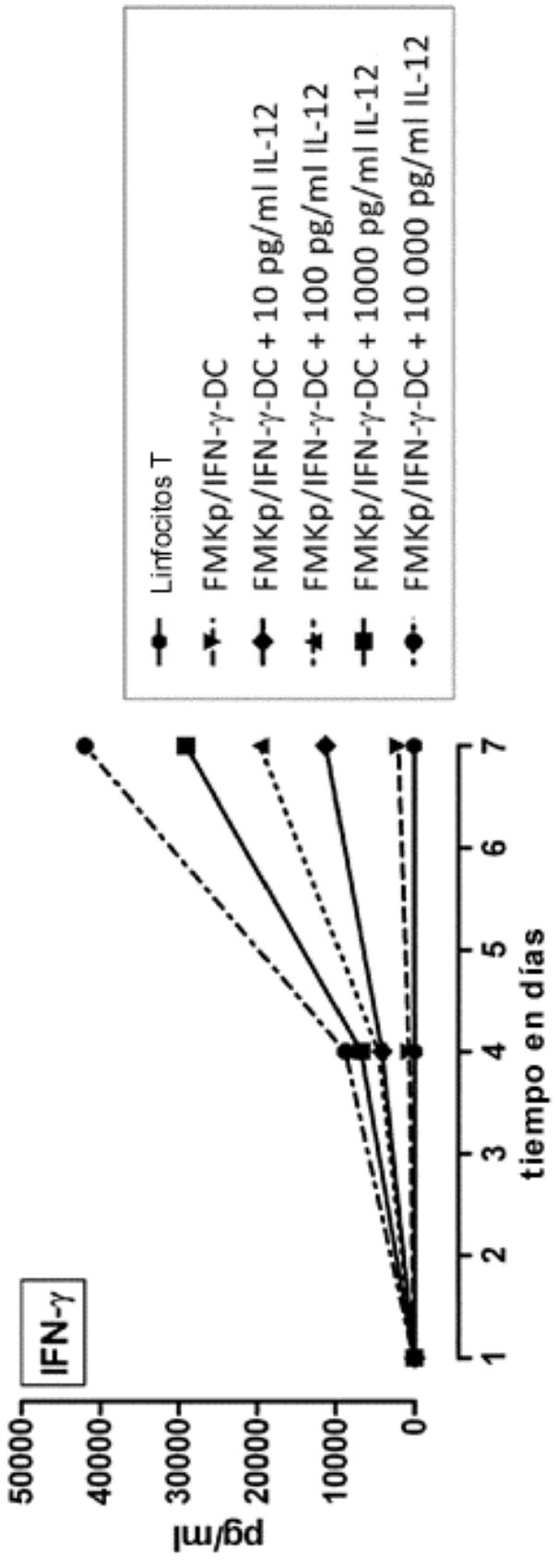

IFN-γ
pg/ml
50000
40000
30000
20000
10000
0
1
2
3
4
5
6
7
tiempo en días
Linfocitos T
FMKp/IFN-γ-DC
FMKp/IFN-γ-DC + 10 pg/ml IL-12
FMKp/IFN-γ-DC + 100 pg/ml IL-12
FMKp/IFN-γ-DC + 1000 pg/ml IL-12
FMKp/IFN-γ-DC + 10 000 pg/ml IL-12

Figura 2

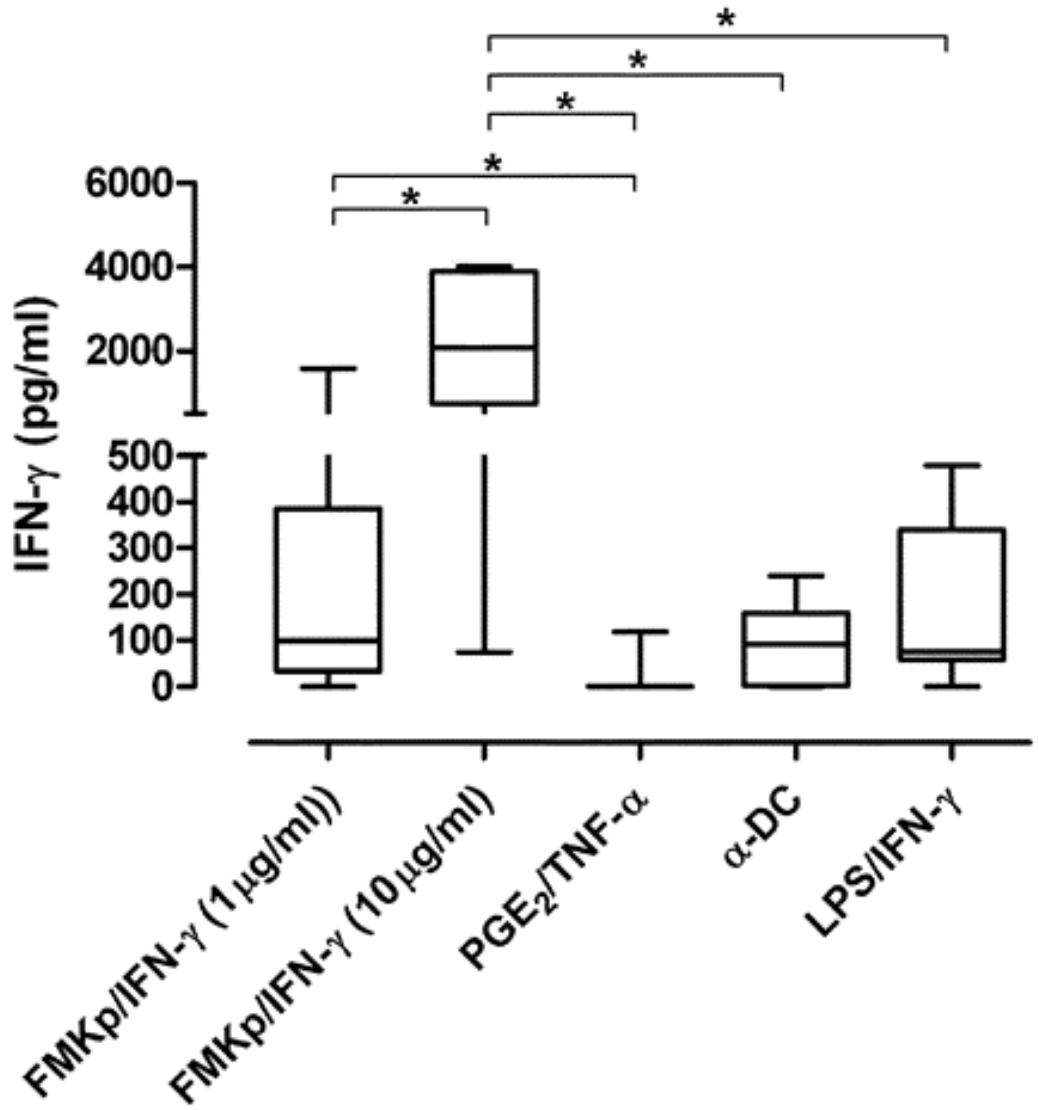

*
*
*
*
*
*
6000
4000
2000
500
400
300
200
100
0
IFN-γ (pg/ml)
FMKp/IFN-γ (1 μg/ml))
FMKp/IFN-γ (10 μg/ml)
PGE2/TNF-α
α-DC
LPS/IFN-γ

Figura 3

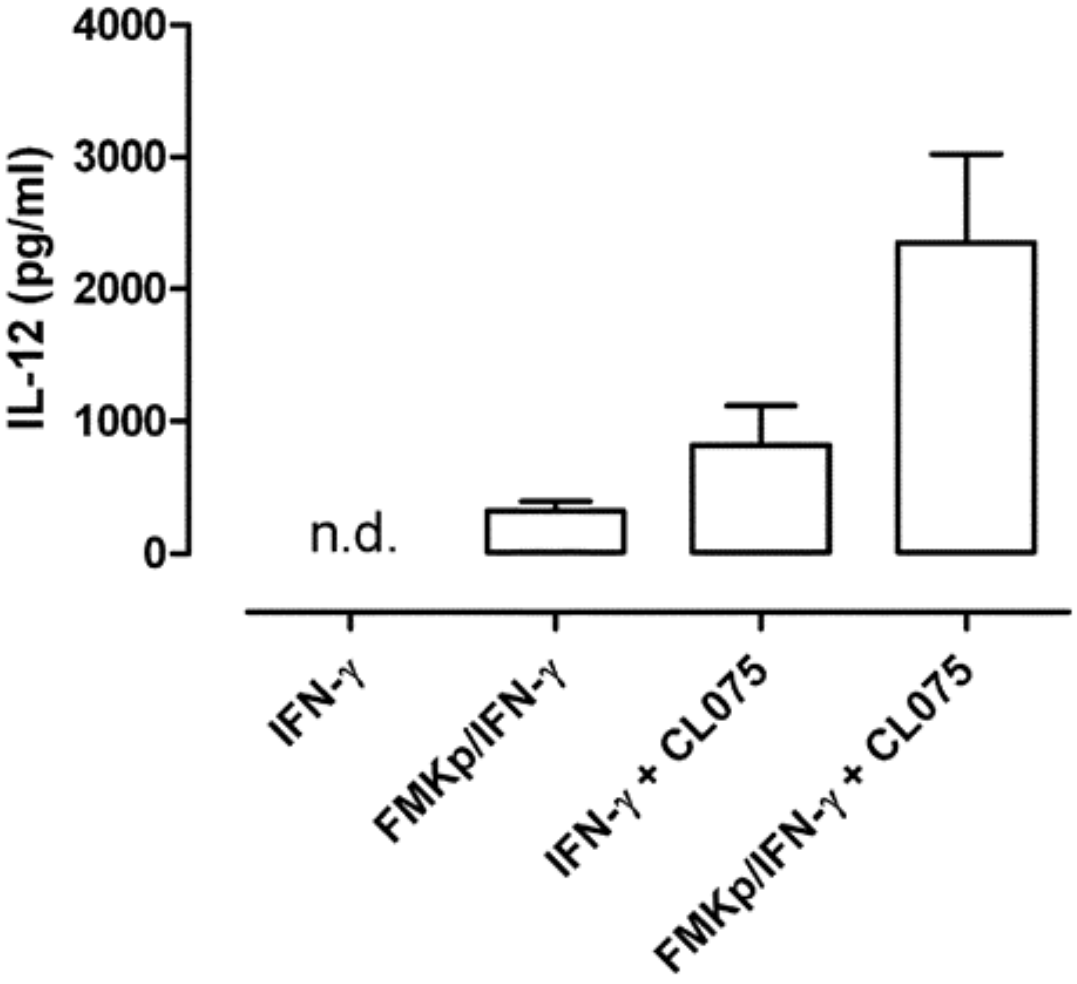
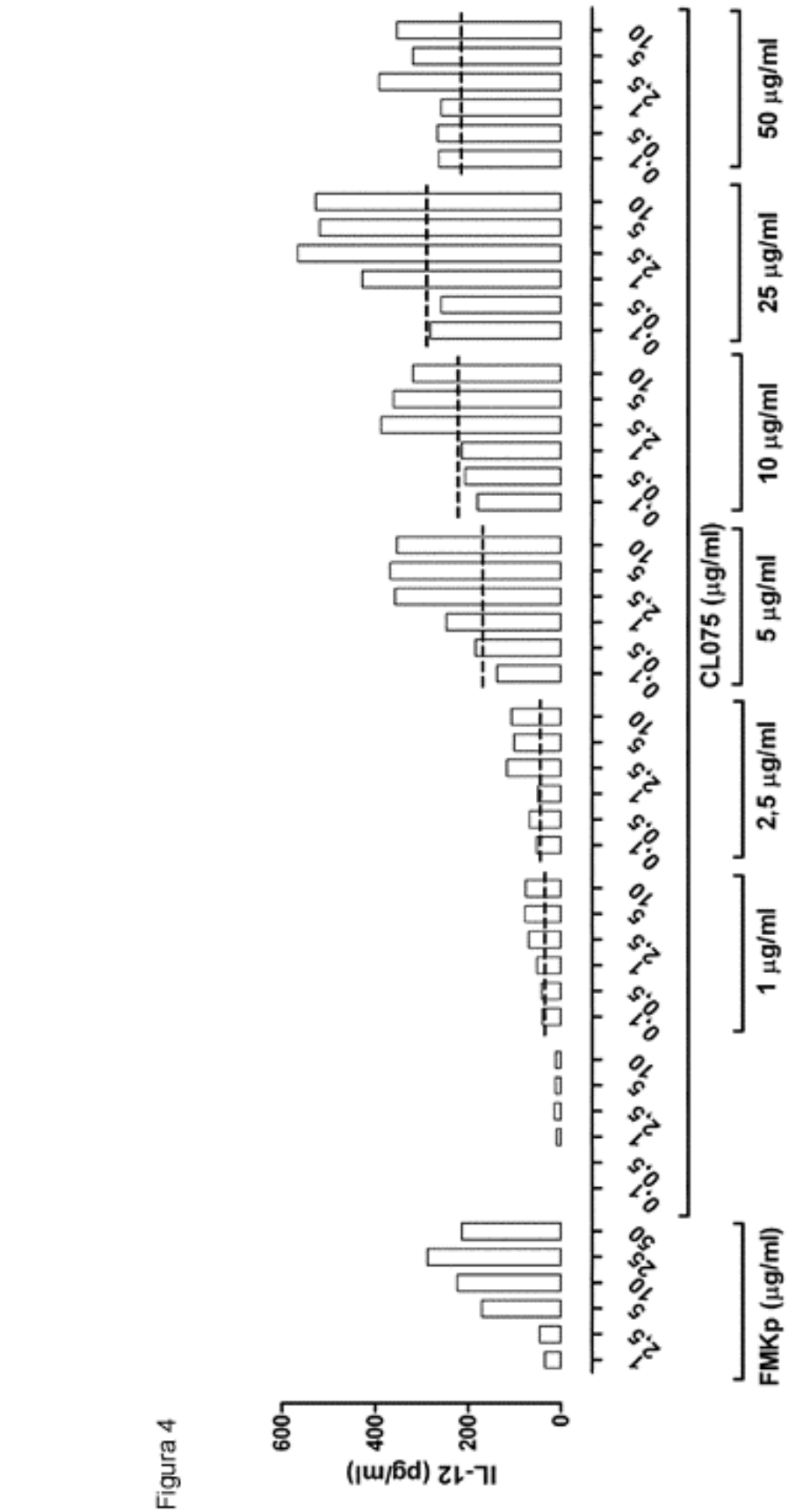

4000
3000
2000
1000
0
IL-12 (pg/ml)
n.d.
IFN-γ
FMKp/IFN-γ
IFN-γ + CL075
FMKp/IFN-γ + CL075

Figura 4


IL-12 (pg/ml)
600
400
200
0
FMKp (µg/ml)
CL075 (µg/ml)
1 µg/ml
2,5 µg/ml
5 µg/ml
10 µg/ml
25 µg/ml
50 µg/ml

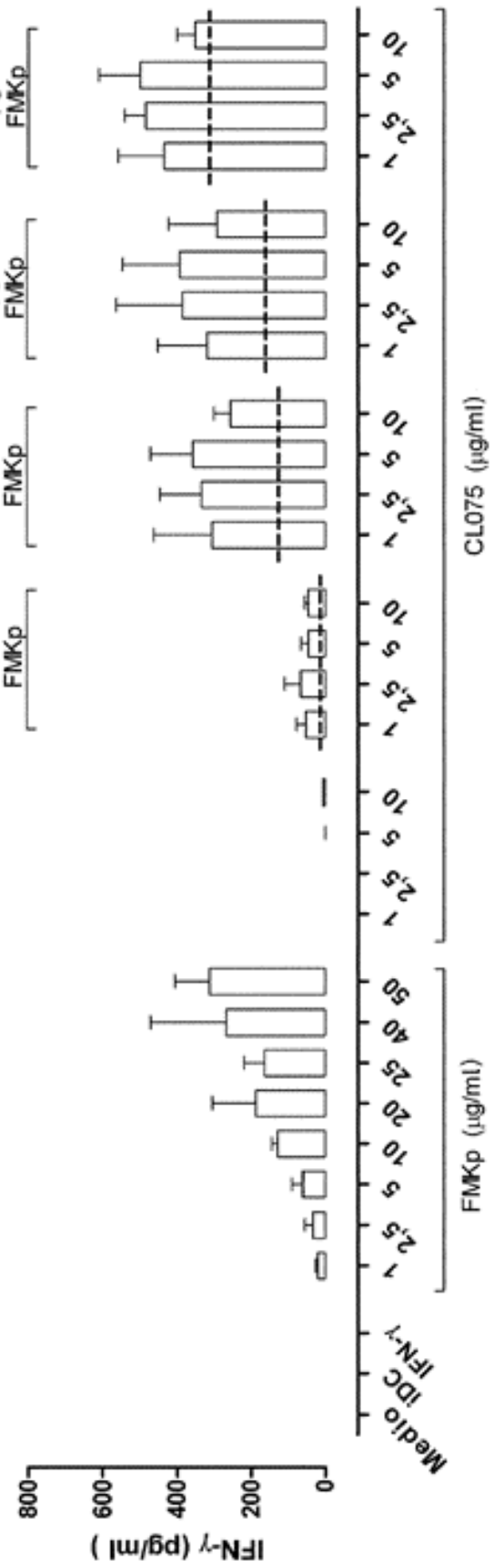
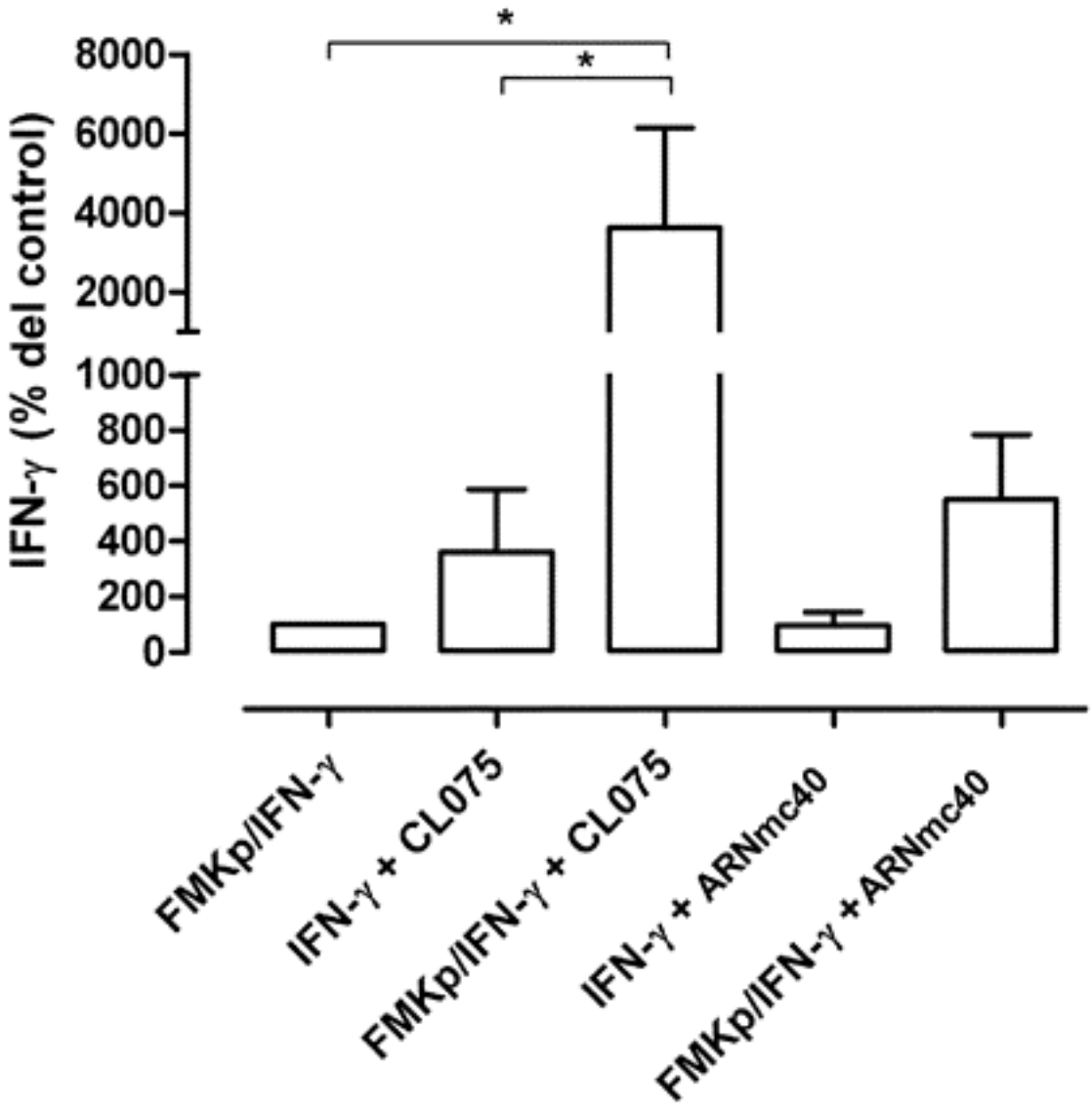

IFN-γ (pg/ml)
800
600
400
200
0
Medio
IDC
IFN-γ
FMKp (μg/ml)
1
2,5
5
10
20
25
40
50
CL075 (μg/ml)
1 μg/ml FMKp
10 μg/ml FMKp
25 μg/ml FMKp
50 μg/ml FMKp

Figura 5

Figura 6


*
*
8000
6000
4000
2000
1000
800
600
400
200
0
IFN-γ (% del control)
FMKp/IFN-γ
IFN-γ + CL075
FMKp/IFN-γ + CL075
IFN-γ + ARNmc40
FMKp/IFN-γ + ARNmc40

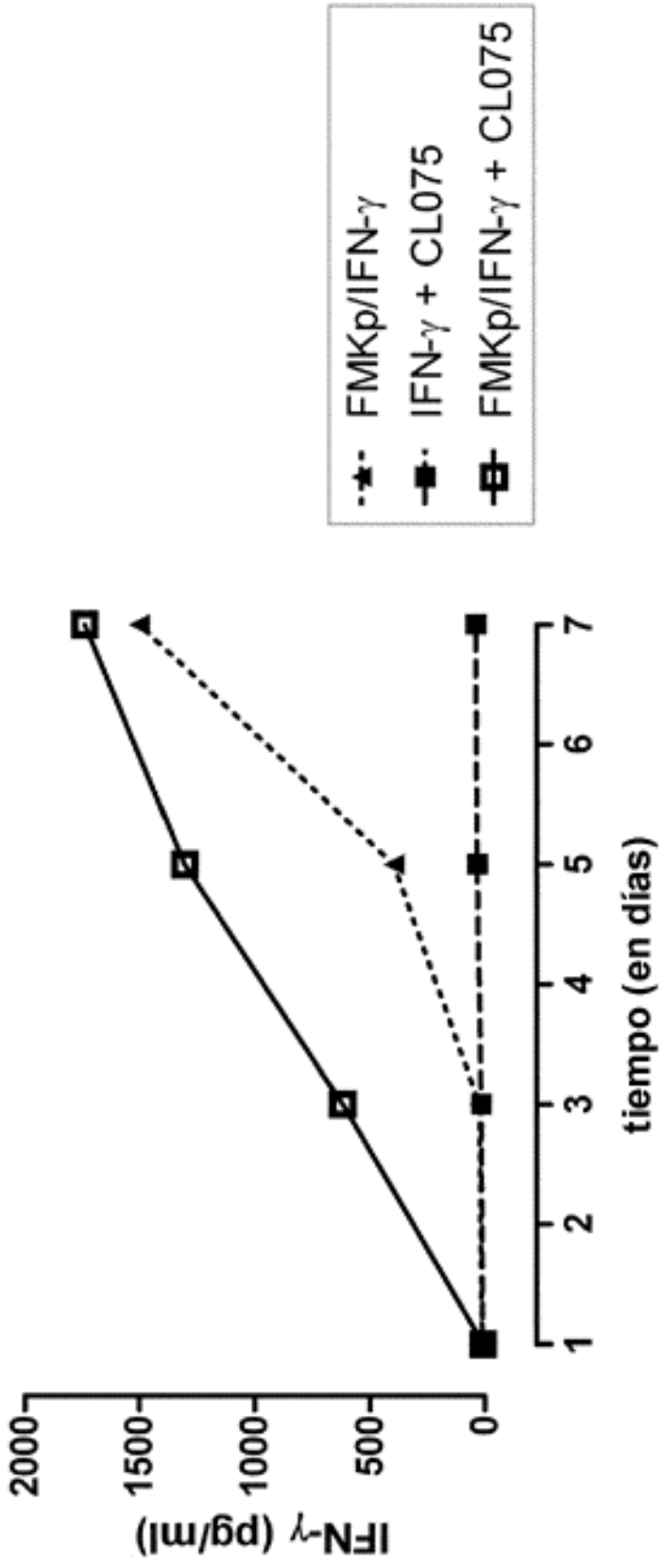
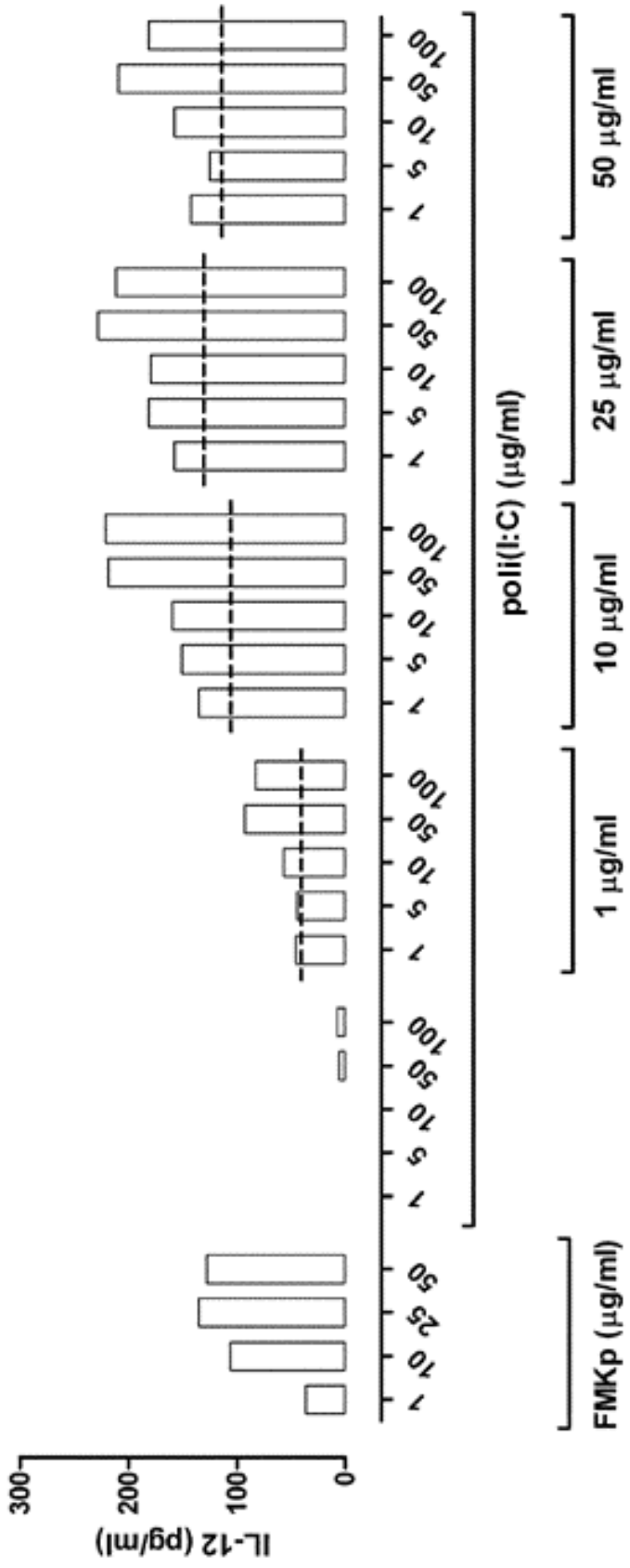

FMKp/IFN-γ
IFN-γ + CL075
FMKp/IFN-γ + CL075
IFN-γ (pg/ml)
2000
1500
1000
500
0
1
2
3
4
5
6
7
tiempo (en días)

Figura 7

Figura 8


IL-12 (pg/ml)
300
200
100
0
FMKp (µg/ml)
1 10 25 50
poli(I:C) (µg/ml)
1 5 10 50 100
1 µg/ml
10 µg/ml
25 µg/ml
50 µg/ml

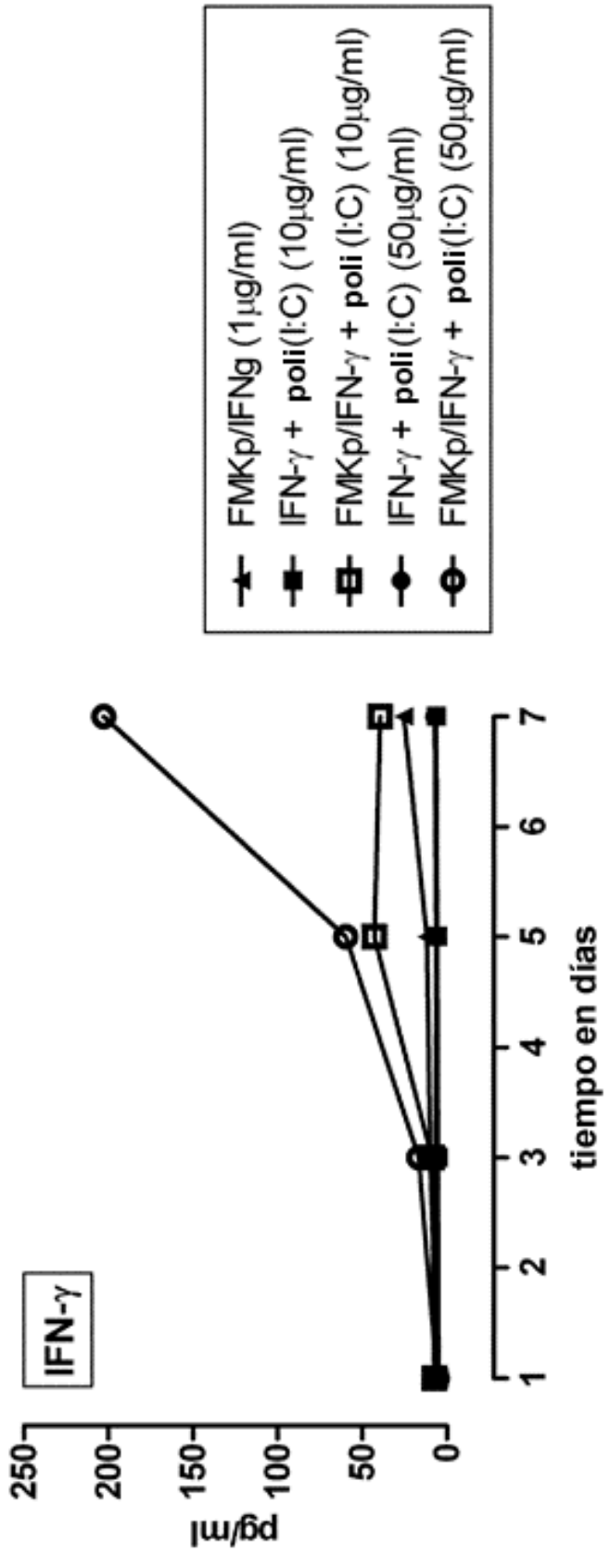

FMKp/IFNg (1µg/ml)
IFN-γ + poli(I:C) (10µg/ml)
FMKp/IFN-γ + poli (I:C) (10µg/ml)
IFN-γ + poli(I:C) (50µg/ml)
FMKp/IFN-γ + poli(I:C) (50µg/ml)
IFN-γ
pg/ml
250
200
150
100
50
0
1
2
3
4
5
6
7
tiempo en días

Figura 9

Figura 10

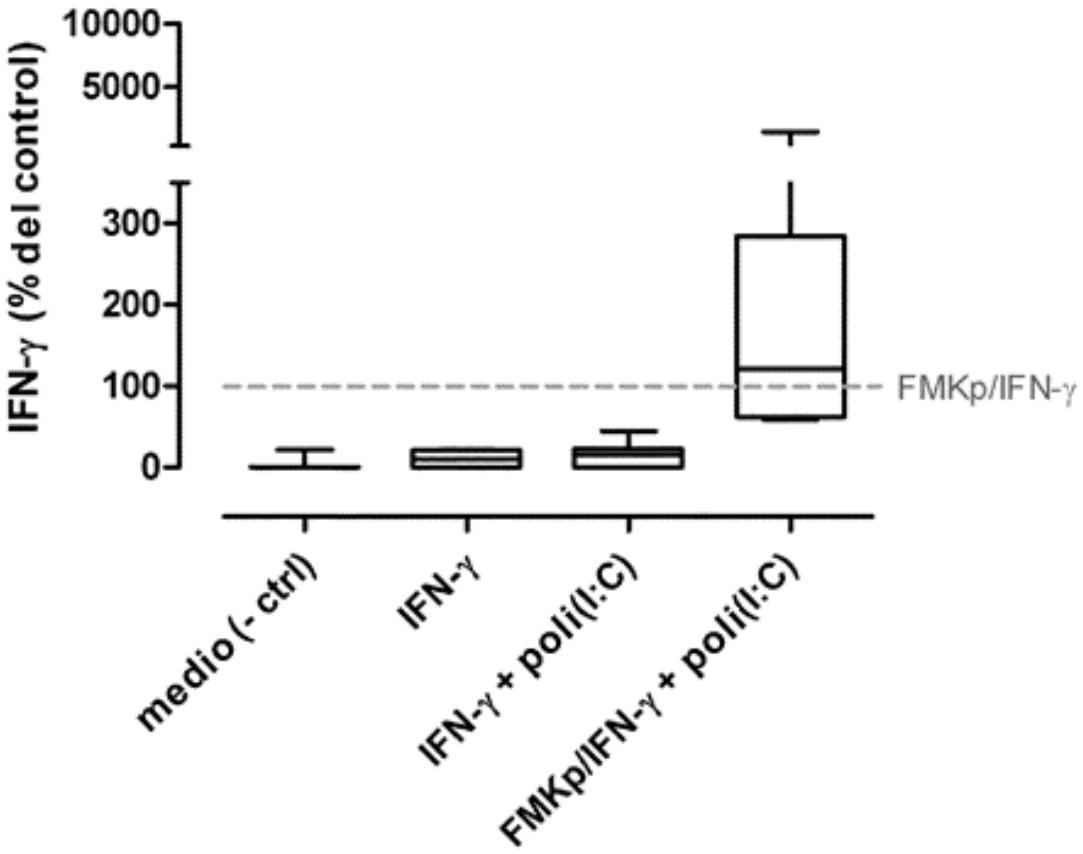

IFN-γ (% del control)
10000
5000
300
200
100
0
FMKp/IFN-γ
medio (- ctrl)
IFN-γ
IFN-γ + poli(I:C)
FMKp/IFN-γ + poli(I:C)

Figura 11

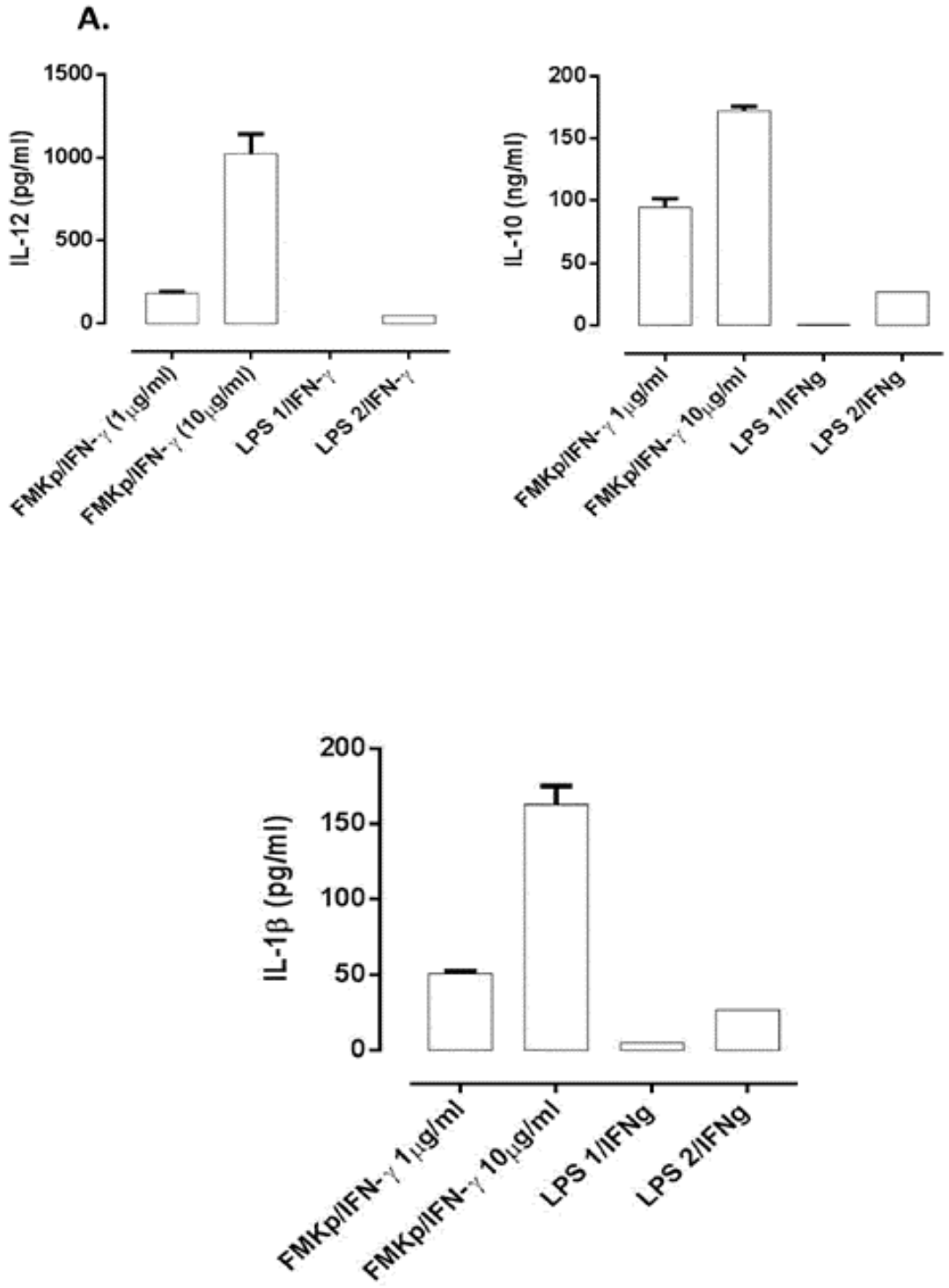
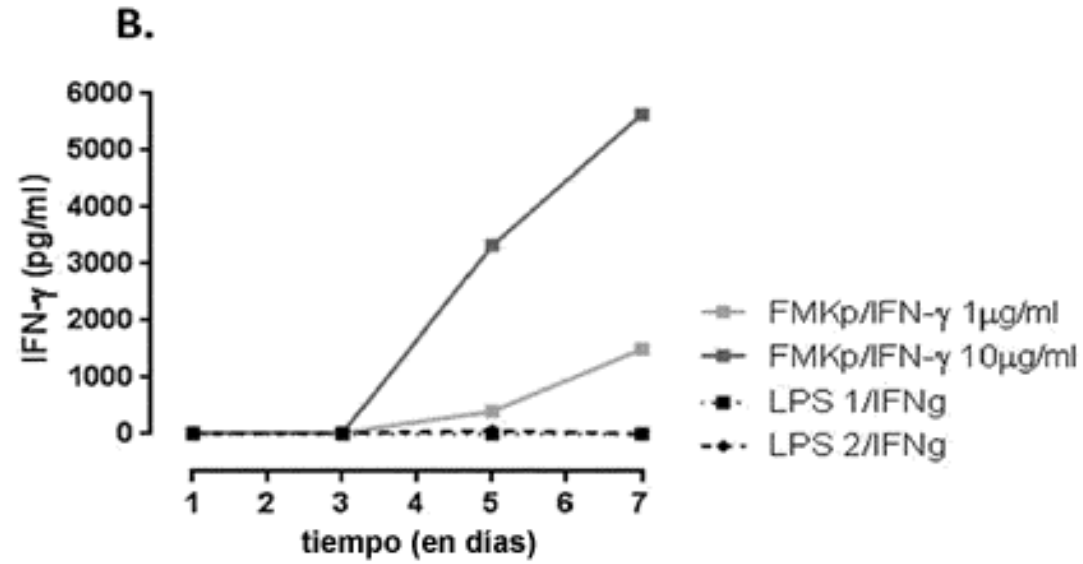
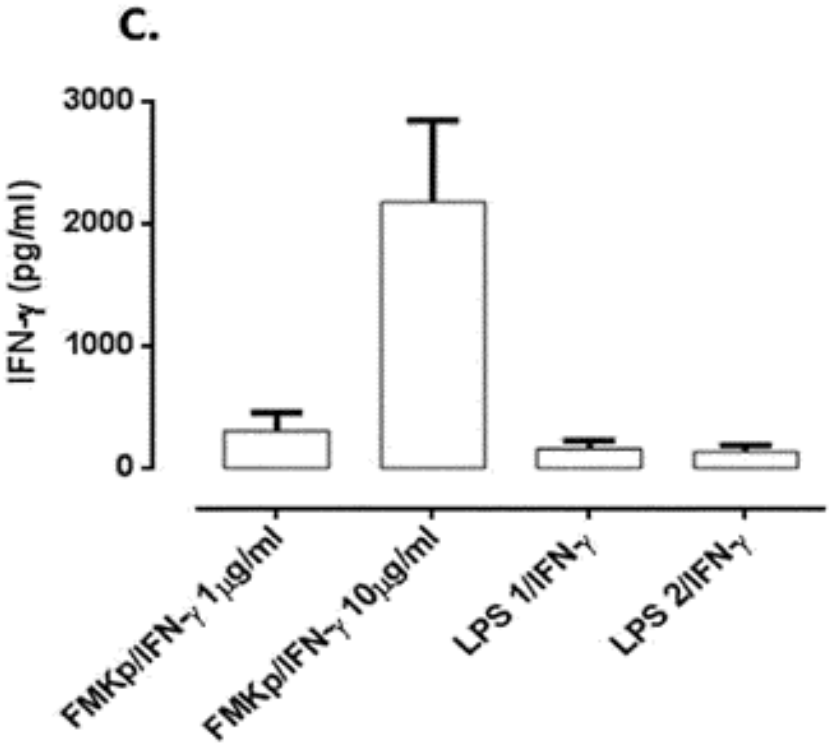

A.
IL-12 (pg/ml)
1500
1000
500
0
FMKp/IFN-γ (1μg/ml)
FMKp/IFN-γ (10μg/ml)
LPS 1/IFN-γ
LPS 2/IFN-γ
IL-10 (ng/ml)
200
150
100
50
0
FMKp/IFN-γ 1μg/ml
FMKp/IFN-γ 10μg/ml
LPS 1/IFNg
LPS 2/IFNg
IL-1β (pg/ml)
200
150
100
50
0
FMKp/IFN-γ 1μg/ml
FMKp/IFN-γ 10μg/ml
LPS 1/IFNg
LPS 2/IFNg

Figura 11


B.
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IFN-γ (pg/ml)
1
2
3
4
5
6
7
tiempo (en días)
FMKp/IFN-γ 1μg/ml
FMKp/IFN-γ 10μg/ml
LPS 1/IFNg
LPS 2/IFNg


C.
3000
2000
1000
0
IFN-γ (pg/ml)
FMKp/IFN-γ 1μg/ml
FMKp/IFN-γ 10μg/ml
LPS 1/IFN-γ
LPS 2/IFN-γ