

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2007.03.28	(73) Titular(es): HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH) INGOLSTÄDTER LANDSTRASSE 1 85764 NEUHERBERG	DE
(30) Prioridade(s): 2006.03.28 EP 06006373 2006.09.15 US 825822 P		
(43) Data de publicação do pedido: 2008.12.24		
(45) Data e BPI da concessão: 2015.03.04 097/2015	(72) Inventor(es): DOLORES J. SCHENDEL IRIS BIGALKE ANKE ZOBYWALSKI	DE NO DE
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES PARA A PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MADURAS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO ESTÁ RELACIONADA COM UM MÉTODO PARA A MATURAÇÃO IN VITRO DE PELO MENOS UMA CÉLULA DENDRÍTICA IMATURA, COMPREENDENDO A ESTIMULAÇÃO DA REFERIDA CÉLULA DENDRÍTICA IMATURA COM TNF, IL-1, IFN, UM AGONISTA DE TLR7/8 E PROSTAGLANDINA E2 (PG). AINDA, A INVENÇÃO ESTÁ RELACIONADA COM UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO OS REFERIDOS FACTORES ASSIM COMO COM CÉLULAS DENDRÍTICAS MADURAS PRODUZIDAS PELO MÉTODO DO INVENTO.

RESUMO**"COMPOSIÇÕES PARA A PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
MADURAS"**

A invenção está relacionada com um método para a maturação *in vitro* de pelo menos uma célula dendrítica imatura, compreendendo a estimulação da referida célula dendrítica imatura com TNF α , IL-1 β , IFN γ , um agonista de TLR7/8 e prostaglandina E2 (PG). Ainda, a invenção está relacionada com uma composição compreendendo os referidos factores assim como com células dendríticas maduras produzidas pelo método do invento.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES PARA A PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MADURAS"

A invenção está relacionada com novas composições para a preparação de células dendríticas maduras, assim como com métodos para a maturação *in vitro* de células dendríticas imaturas e com usos terapêuticos das células dendríticas obtidas pelo método da invenção.

As células dendríticas (DCs) possuem um elevado potencial como adjuvantes na indução de células assassinas e células auxiliares específicas de tumor no doente (Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. Curr Opin Immunol. 2003 Apr; 15(2): 138-47. Revisão. Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. Nat Rev Immunol. 2005 Apr; 5(4):296-306. Revisão., Salcedo M, Bercovici N, Taylor R, Vereecken P, Massicard S, Duriau D, Vernel-Pauillac F, Boyer A, Baron-Bodo V, Mallard E, Bartholeyns J, Goxe B, Latour N, Leroy S, Prigent D, Martiat P, Sales F, Laporte M, Bruyns C, Romet-Lemonne JL, Abastado JP, Lehmann F, VeIu T. Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. Cancer Immunol Immunother. 2005 Sep 27:1-11 [Epub ahead of print]).

Para este fim, as células dendríticas maduras, que foram maturadas *in vitro* a partir de células dendríticas imaturas derivadas do doente, são expostas a antigénios específicos de tumor e re-injectadas no corpo, de preferência antes dos nódulos linfáticos ou nestes. Dentro dos nódulos linfáticos as células dendríticas interagem com células T naïve, resultando em transdução de sinal activa durante a chamada sinapse imunológica e subsequente proliferação de células T efectoras, as quais, por sua vez, medeiam respostas anti-tumor, como seja citotoxicidade (linfócitos T citotóxicos = CTL), activação de macrófagos e reacções de hipersensibilidade do tipo retardado. As DCs regulam polarizações de células T auxiliares (h) positivas para CD4. As células Th1, por exemplo, suportam CTLs através da secreção de padrões de citocinas (e.g. Interferão gama e IL-2, TNF-beta). Por outro lado, as células Th2 induzem anticorpos assim como eosinófilos e desgranulação de mastócitos através de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. Nat Immunol. 2000 Oct; 1(4):311-6, O'Gara,A: Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity 1998, 8: 275-283, Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. Immunol Today. 2000 Oct; 21(10):479-83. Revisão).

Para a terapia com células dendríticas, é essencial que esteja disponível um número suficiente de DCs principais. Uma vez que, no doente, apenas 0,2% das células brancas totais são células dendríticas, é necessário ter um método eficiente para a produção *in vitro* de células dendríticas maduras.

Na arte, foram propostos vários métodos para a preparação de células dendríticas maduras partindo de células mononucleadas do sangue periférico, monócitos ou outras células progenitoras mielóides (Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH.: Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. Eur J Immunol. 1997 Dec; 27(12):3135-42.), Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Nair SK, Thomas EK, Morse MA, Lysterly HK. A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. Blood. 2000 Nov 15; 96(10):3499-504, Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, Kirkwood JM, Storkus WJ, Kalinski P.: alpha-type- 1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL- inducing activity. Cancer Res. 2004 Sep 1;64(17):5934-7, Napolitani G, Rinaldi A, Bertonni F, Sallusto F, Lanzavecchia A.: Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1 -polarizing program in dendritic cells. Nat Immunol. 2005 Aug;

6(8):769-76. Epub 2005 Jul 3. 2005 Aug; 6(8):769-76.2005, Gautier G, Humbert M, Deauvieu F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EE, Trinchieri G, Caux C, Garrone P.: A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. J Exp Med. 2005 May 2; 201(9):1435-46. 2005).

É aceite que a cultura de células mononucleadas do sangue periférico, monócitos ou outras células progenitoras mielóides, com GM-CSF e IL-4 ou IL-3 resulta na produção de células dendríticas imaturas *in vitro* (Ahn JS, Agrawal B. IL-4 is more effective than IL-13 for *in vitro* differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. Int Immunol. 2005 Oct; 17(10):1337-46. Epub 2005 Sep 2). No entanto, até agora não existe um método satisfatório para a maturação das células dendríticas imaturas. Jonuleit H. *et al.* (1997, *supra*) descreve tal processo de maturação usando uma composição compreendendo NF- α , IL-1, IL-6 e prostaglandina E2 (PG) (o chamado cocktail Jonuleit). As células dendríticas produzidas através da incubação das células dendríticas imaturas com esta composição mostram os marcadores de superfície das células dendríticas maduras e podem ser colhidas. No entanto, estas células não produzem IL-12p70 biologicamente activa, que é o factor mais importante para a indução de células Th1 nos nódulos linfáticos. Mailliard, R. *et al.* descrevem uma composição compreendendo TNF- α , IL-1, interferão α , interferão γ e poli I:C (Mailliard, R.

et al., 2004, *supra*). Contrariamente ao cocktail Jonuleit, a incubação das células dendríticas imaturas com este denominado cocktail Kalinski resulta em células dendríticas maduras (como demonstrado pelos respectivos marcadores de superfície) que produzem IL-12p70. No entanto estas células são muito aderentes ao fundo dos frascos de cultura e são, portanto, quase impossíveis de colher. É portanto muito difícil, senão impossível, obter células dendríticas maduras suficientes para a terapia de vacinação com este método.

WO 00/47719 descreve um composto (R848) que é proposto para a preparação de células dendríticas maduras. Nas experiências descritas neste pedido, as células dendríticas imaturas são estimuladas apenas com R848. No entanto, R848 como uma única substância de maturação não é capaz de conferir todas as características adequadas para as células dendríticas clínicas. Todas as experiências foram realizadas com FCS (soro fetal de vitela) e, portanto, não aplicáveis nas condições GMP ("good manufacturing process", processo de produção bom) devido à ausência de soro fetal bovino ser crucial para um processo GMP.

Assim, mantém-se a necessidade de melhores métodos para a preparação de células dendríticas maduras a partir de células dendríticas imaturas.

A invenção proporciona um método para a maturação

in vitro de pelo menos uma célula dendrítica imatura, compreendendo a estimulação da referida célula dendrítica imatura com TNF- α , IL-1 β , IFN γ , um agonista de TLR7/8 e prostaglandina E2 (PG).

A presente invenção baseia-se no dado surpreendente que a combinação de TNF- α , IL-1 β , IFN γ , um agonista de TLR7/8 e prostaglandina E2 (PG) é especialmente adequada para a promoção da maturação *in vitro* de células dendríticas. Especialmente, e como demonstrado no Exemplo, as células dendríticas maduras obtidas usando a referida combinação surpreendentemente expressam IL-12p70 em quantidades consideráveis e são admiravelmente fáceis de colher, o que permite a obtenção de células dendríticas maduras em quantidades consideráveis. Tais populações de células dendríticas maduras não puderam ser produzidas com os cocktails conhecidos na arte e, especialmente, nem com o cocktail Jonuleit nem com o cocktail Kalinski, como explicado atrás.

Na arte são conhecidas técnicas individuais para a preparação de células dendríticas maduras, e.g. começando com células mononucleadas do sangue periférico humano, monócitos ou outras células progenitoras mielóides e a partir das próprias DCs imaturas, as quais foram directamente isoladas a partir de sangue (Berger TG, Strasser E, Smith R, Carste C, Schuler-Thurner B, Kaempgen E, Schuler G. Efficient elutriation of monocytes within a closed system (Elutra) for clinical-scale generation of

dendritic cells. J Immunol Methods. 2005 Mar; 298(1 -2):61-72. Erratum in: J Immunol Methods. 2005 Aug; 303(1 -2):152, Strasser EF, Berger TG, Weisbach V, Zimmermann R, Ringwald J, Schuler-Thurner B, Zingsem J, Eckstein R. Comparison of two apheresis systems for the collection of CD 14+ cells intended to be used in dendritic cell culture. Transfusion. 2003 Sep; 43(9): 1309- 16. Erratum in: Transfusion. 2003 Oct;43(10):1502, Campbell JD, Piechaczek C, Winkels G, Schwamborn E, Micheli D, Hennemann S, Schmitz J. Isolation and generation of clinical-grade dendritic cells using the CliniMACS system. Methods Mol. Med. 2005; 109:55-70, Dubsky P, Ueno H, Piqueras B, Connolly J, Banchereau J, Palucka AK. Human dendritic cell subsets for vaccination. J Clin Immunol. 2005 Nov; 25(6):551-72).

Assim, na arte, são conhecidas técnicas básicas tais como períodos de incubação, meios usados, etc., para a produção de células dendríticas maduras a partir de células dendríticas imaturas. A presente invenção está relacionada com uma nova combinação de factores a serem usados no contexto destas técnicas conhecidas. O método da presente invenção pode, portanto, ser facilmente realizado pelos familiarizados com a arte, simplesmente através da execução de métodos conhecidos, mas usando a combinação de factores atrás identificada, durante a incubação de células dendríticas imaturas, de forma a obter células dendríticas maduras.

Ainda, uma vez que cada um dos componentes

individuais já foi individualmente usando na arte, os familiarizados com a arte podem facilmente determinar qual a concentração em que cada factor deverá ser usado. Ainda, os familiarizados com a arte serão capazes de adaptar a concentração individual de um determinado factor dependendo das composições do meio de cultura celular, especialmente dos factores de crescimento e componentes do soro.

Como orientação geral, TNF- α e IL-1 β deverão ser usados em concentrações entre 1 ng/ml e 50 ng/ml, mais de preferência entre 5 ng/ml e 40 ng/ml, e ainda mais de preferência a 10 ng/ml. PG deverá ser usada em concentrações de 50 ng/ml a 5000 ng/ml, de preferência de 50 ng/ml a 1000 ng/ml, ainda mais de preferência entre 50 ng/ml e 500 ng/ml ou a 100 ng/ml ou 250 ng/ml. IFN γ deverá ser usado numa concentração entre 500 U/ml e 10000 U/ml, de preferência entre 1000 e 5000 U/ml, e mais de preferência a 1000 ou a 5000 U/ml. Finalmente, o agonista de TLR7/8, de preferência R848, deverá ser usado numa concentração entre 0,2 e 5 μ g/ml, de preferência 0,5 μ g/ml a 2 μ g/ml, mais de preferência 1 μ g/ml.

De acordo com o invento, as células dendríticas imaturas são cultivadas com as combinações de factores acima. Isto pode ser realizado através da adição dos factores ao meio de cultura. Como alternativa, o meio de cultura em que as células dendríticas imaturas foram crescidas é substituído por um meio já contendo os factores. Numa outra realização, as substâncias atrás

referidas são parte de uma composição adicionada ao meio de cultura da referida célula dendrítica imatura.

O referido meio de cultura pode ser de qualquer tipo, *i.e.* pode conter ou não soro humano, pode ser suplementado com ou sem quaisquer outros suplementos animais, como sejam proteínas, aminoácidos ou antibióticos. Numa realização preferida, o meio é produzido e usado em condições GMP.

Após o período de maturação estar completo, as DCs podem ser colhidas pipetando para cima e para baixo, agitando (manualmente ou mecanicamente) e lavando com solução salina, componentes do meio (*e.g.* RPMI) ou meio completo sem citocinas. As células podem ser colhidas, centrifugadas e as citocinas podem ser removidas por lavagem através de uma ou mais ressuspensões das DCs sedimentadas.

As células dendríticas imaturas podem ainda ser tratadas com um ligando TLR3, de preferência Poli I:C, *e.g.* numa concentração entre 10 e 50 ng/ml, de preferência 20 ng/ml. O ligando TLR3 pode ser adicionado separadamente às células ou pode ser parte da composição compreendendo todos os outros factores.

Numa realização preferida do invento, o referido agonista de TLR7/8 é um composto modificador da resposta imune do tipo imidazoquinilona, mais de preferência 4-amino-2-etoximetil- α , α -dimetil-1H-imidazol[4,5-

c]quinolina-1-etanol (R848). A produção de tais compostos está descrita detalhadamente em WO 00/47719. No entanto, também podem ser usados outros agonistas de TLR7/8 tais como imiquimod (R837), o análogo da guanina loxoribina, agonistas de TLR7/8 como sejam RNAs de cadeia simples que se ligam a TLR7/8, e.g. ss poliU e ssRNA40 ou combinações de agonistas de TLR7/8.

Numa outra realização preferida, a célula dendrítica imatura usada como material de partida do método do invento é uma célula dendrítica imatura derivada de monócitos. De preferência, são usados os progenitores monocíticos obtidos a partir do sangue periférico ou leucaferese e enriquecidos por centrifugação em gradiente de densidade, elutriação ou simplesmente técnicas de aderência a plástico.

Como alternativa, é também possível obter células progenitores monocíticas a partir de células progenitoras positivas para CD34 através da diferenciação *in vitro* para células positivas para CD14, e.g. com FLT3L, SCF, TPO, IL-3 e/ou IL-6.

De preferência, a referida célula dendrítica imatura é obtida através de incubação de células mononucleadas de sangue periférico humano, monócitos ou outras células progenitoras mielóides com GM-CSF e IL-4 ou IL-13. Como já discutido atrás, métodos correspondentes são conhecidos na arte. Ainda, tais métodos estão descritos no Exemplo.

Pode ser usado qualquer meio adequado para condicionamento fisiológico de células de mamífero e.g. contendo aminoácidos, factores de crescimento, fonte de carbono, sistema tampão ou certos sais convencionais. A cultura de células pode ser realizada a 37°C, de acordo com a composição do meio em determinadas composições de CO₂.

Ainda, as DCs imaturas podem ser obtidas directamente a partir de sangue periférico, e.g. através de leucaferese.

Numa realização especialmente preferida, a célula dendrítica imatura é de origem humana, ainda que outras situações, e.g. pesquisa científica ou aplicações em medicina veterinária, possam ser susceptíveis do uso de células dendríticas imaturas com origem em mamíferos.

Consequentemente, uma outra realização preferida, o método do invento compreende os seguintes passos:

- a) preparação de células mononucleadas a partir de sangue periférico,
- b) incubação das células mononucleadas do passo a) com GM-CSF e IL-4 ou IL-13,
- c) incubação das células obtidas no passo b) com um cocktail compreendendo TNF α , IL-1 β , IFN γ , um agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) e, facultativamente, um agonista de TLR3, de preferência poli I:C e
- d) colheita da célula ou células dendríticas maduras.

No passo a), as células mononucleadas podem ser obtidas por leucaferese a partir de sangue periférico. Ainda, as células mononucleadas podem ser isoladas através de separação magnética ou por FACS, elutriação ou aderência a plástico ou centrifugação em gradiente de densidade (e.g. metrizamida).

De preferência, a incubação no passo b) leva 1 a 9, de preferência 2 a 9, mais de preferência 2 a 6 dias. No entanto, é também possível separar os passos a) ou b) caso se use DCs imaturas isoladas de fresco a partir de sangue periférico/leucaferese. Ainda, é possível que o passo b) dure apenas horas e possa ser realizado em combinação com o passo c).

A incubação no passo c) pode durar 12 horas a 72 horas, de preferência 24 horas ou 20 horas.

Como discutido atrás, os familiarizados com a área serão capazes de adaptar estes períodos de incubação caso seja necessário.

A incubação das células dendríticas imaturas e a colheita foram já descritas atrás.

Numa outra realização preferida do invento, a célula ou células dendríticas maduras e/ou são ainda expostas *in vitro* a um ou mais antigénios. A exposição das

células maduras aos referidos antígenos é descrita mais detalhadamente abaixo.

De preferência, o referido antígeno ou antígenos são supostos induzirem a maturação de células T efectoras dentro dos nódulos linfáticos.

Mais de preferência, e também descrito abaixo, a referida exposição é realizada através de incubação da célula ou células dendríticas maduras a pelo menos um péptido do referido antígeno ou através de transfecção da célula ou células dendríticas com RNA ou DNA codificador de antígenos.

O invento ainda está relacionado com uma população de células dendríticas maduras, obtida através do método do invento, em que a célula dendrítica imatura é de origem humana e em que TNF α é usado numa concentração de 1 ng/ml a 50 ng/ml, IL-1 β é usado numa concentração de 1 ng/ml a 50 ng/ml, IFN γ é usado numa concentração de 500 U/ml a 1000 U/ml, o agonista de TLR7/8 é usado numa concentração de 0,2 μ g a 5 μ g/ml, PGE2 é usado numa concentração de 50 ng/ml a 5000 ng/ml e o agonista de TLR3 é usado numa concentração de 10 ng/ml a 50 ng/ml.

Como discutido atrás, as células dendríticas maduras obtidas pelo método da invenção produz quantidades consideráveis de IL-12p70 e são fáceis de colher. Estes efeitos combinados não foram observados com o cocktail

Jonuleit ou Kalinski na experiência aqui apresentada (ver Exemplo).

Como demonstrado nos Exemplos e especialmente nas Figuras 7 e 8, a população de células dendríticas maduras do invento é capaz de estimular a produção de interferão gama em células assassinas naturais (Figura 8) assim como em células T específicas de péptidos (Figura 7).

Consequentemente, as células dendríticas obtidas pelo método do invento são especialmente adequadas no contexto de activação de células T *in vivo*, de modo a tratar doenças em que tal activação de células T seja necessária. Consequentemente, num outro aspecto, o presente invento também está relacionado com uma composição farmacêutica compreendendo a população de células dendríticas maduras. Ainda, o invento também está relacionado com a população de células dendríticas maduras para usar no tratamento de uma doença seleccionada do grupo consistindo em doenças tumorais e doenças infecciosas (e.g. provocadas por vírus, bactérias, bactérias intracelulares ou fungos).

Numa realização preferida, a referida população de células dendríticas imaturas é obtida através de um método do invento em que as células são incubadas também com poli I:C. Como indicado atrás, tais células dendríticas são especialmente capazes de estimularem células NK e são tão potentes como as células incubadas de acordo com o invento sem poli I:C na estimulação de células T específicas de péptidos.

De preferência, para o tratamento das doenças acima, as células dendríticas são carregadas *in vitro* com antígenos supostos induzirem a maturação de células T efectoras dentro dos nódulos linfáticos. Tais técnicas são conhecidas na arte (Dieckmann D, Schultz ES, Ring B, Chames P, Held G, Hoogenboom HR, Schuler G. Optimizing the exogenous antigen loading of monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol*. 2005 May; 17(5):621-35. Epub 2005 Apr 11, Kikuchi T, Akasaki Y, Abe T, Fukuda T, Saotome H, Ryan JL, Kufe DW, Ohno T. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother*. 2004 Nov-Dec; 27(6):452-9, Gong J, Koido S, Kato Y, Tanaka Y, Chen D, Jonas A, Galinsky I, DeAngelo D, Avigan D, Kufe D, Stone R. Induction of anti-leukemic cytotoxic T lymphocytes by fusion of patient-derived dendritic cells with autologous myeloblasts. *Leuk Res*. 2004 Dec; 28(12):1303-12, Grunebach F, Kayser K, Week MM, Muller MR, Appel S, Brossart P. Cotransfection of dendritic cells with RNA coding for HER-2/neu and 4-1BBL increases the induction of tumor antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Gene Ther*. 2005 Sep; 12(9):749-56, Kyte JA, Kvalheim G, Aamdal S, Saeboe-Larssen S, Gaudernack G. Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination. *Cancer Gene Ther*. 2005 Jun; 12(6):579-91, Navabi H, Croston D, Hobot J, Clayton A, Zitvogel L, Jasani B, Bailey-Wood R, Wilson K, Tabi Z, Mason MD, Adams M. Preparation of human ovarian cancer

ascites-derived exosomes for a clinical trial. *Blood Cells MoI Dis.* 2005 Sep-Oct; 35(2): 149-52, Escudier B, Dorval T, Chaput N, Andre F, Caby MP, Novault S, Flament C, Leboulleire C, Borg C, Amigorena S, Boccaccio C, Bonnerot C, Dhellin O, Movassagh M, Piperno S, Robert C, Serra V, Valente N, Le Pecq JB, Spatz A, Lantz O, Tursz T, Angevin E, Zitvogel L. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med.* 2005 Mar 2; 3(1): 10, Kawamura K, Kadowaki N, Suzuki R, Udagawa S, Kasaoka S, Utoguchi N, Kitawaki T, Sugimoto N, Okada N, Maruyama K, Uchiyama T. Dendritic cells that endocytosed antigen-containing IgG-liposomes elicit effective antitumor immunity. *J Immunother.* 2006 Mar-Apr; 29(2): 165-74, Griffioen M, Borghi M, Schrier PI, Osanto S, Schadendorf D. Analysis of T-cell responses in metastatic melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with tumor lysates. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Aug; 53(8):715-22. Epub 2004 Mar 3, Su Z, Dannull J, Yang BK, Dahm P, Coleman D, Yancey D, Sichi S, Niedzwiecki D, Boczkowski D, Gilboa E, Vieweg J. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol.* 2005 Mar 15; 174(6):3798-807).

O carregamento das células dendríticas com os respectivos antígenos poderá ser por deslocamento competitivo dos péptidos em solução da fenda de ligação de MHC ou, para antígenos mais complexos, como sejam

proteínas e lisados de tumores originais ou lisados de linhas celulares tumorais, através de fagocitose por DCs imaturas e processamento correcto. Os métodos de transfecção (lipofecção, electroporação ou simplesmente incubação dos ácidos nucleicos nus) são igualmente exequíveis e introduzem ácidos nucleicos, tais como plasmídeos codificadores de antigénios, RNA dos mesmos ou DNA e especialmente RNA dos tumores originais ou linhas celulares tumorais nas DCs. Poderá também haver outras combinações antigénicas com moléculas MHC originais, tais como fragmentos de membranas ou exossomas para usar como fontes de antigénios de qualquer tipo.

Como indicado atrás, a população de células dendríticas maduras pode ser administrada directamente ao organismo para produzir células T activas contra um tipo de célula seleccionado, e.g. cancerosa. A administração destas células, frequentemente com veículos aceitáveis em termos farmacêuticos, é através de qualquer uma das vias normalmente usadas para a introdução de uma célula em contacto último com sangue de mamífero ou células de tecidos.

Formulações adequadas para administração parentérica, como seja, por exemplo, através das vias intra-articular (nas articulações), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e subcutânea (de preferência intradérmica ou subcutânea) e veículos incluem soluções aquosas isotónicas para injeção, que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos e solutos que tornam a

formulação isotónica relativamente ao sangue do recipiente a que se destina, e suspensões aquosas e não aquosas estéreis que podem incluir agentes de suspensão, solubilizantes, agentes espessantes, estabilizadores e preservativos. A administração intravenosa ou intraperitoneal é o método preferido de administração para as células dendríticas da invenção.

A dose de células dendríticas administradas a um doente, no contexto da presente invenção deverá ser suficiente para efectuar uma resposta terapêutica benéfica no doente ao longo do tempo ou para inibir o crescimento de células cancerosas ou para inibir a infecção. Assim, as células são administradas a um doente numa quantidade suficiente para induzir uma resposta CTL eficaz contra o vírus ou antigénio tumoral e/ou aliviar, reduzir, curar ou pelo menos parcialmente parar os sintomas e/ou complicações da doença ou infecção. Uma quantidade adequada para conseguir isto é definida como uma "dose eficaz em termos terapêuticos". A dose será determinada pela actividade da célula dendrítica produzida e pela condição do doente, assim como pelo peso ou área da superfície corporal do doente a ser tratado. O tamanho da dose também será determinado pela existência, natureza e grau de quaisquer efeitos secundários adversos que acompanham a administração de uma célula particular num doente particular. Na determinação da quantidade eficaz da célula a ser administrada no tratamento ou profilaxia de doenças tais como cancro (e.g. melanoma metastático, cancro da próstata,

etc.), o médico necessita de avaliar os níveis circulantes no plasma, a toxicidade de CTLs, a progressão da doença e a indução de resposta imune contra qualquer tipo celular introduzido.

Antes da infusão, são obtidas amostras de sangue e guardadas para análise. De um modo geral, pelo menos 10^4 a 10^6 e tipicamente, entre 10^8 e 10^{10} células são infundidas intravenosamente ou intraperitonealmente num doente de 70 kg ao longo de 60-120 minutos. De preferência, são usados números de células de pelo menos 10^7 /ponto de vacinação. As injeções podem ser, e.g., repetidas 4 vezes com intervalos de 2 semanas e deverão ser dadas, de preferência, perto dos nódulos linfáticos através de injeções intradérmicas ou subcutâneas. As injeções de reforço podem ser dadas após uma pausa de 4 semanas. Sinais vitais e saturação de oxigénio por oximetria de pulso são estreitamente monitorizados. As amostras de sangue são colhidas 5 minutos e 1 hora após infusão e guardadas para análise. A infusão de células é repetida sensivelmente todos os meses num total de 10-12 tratamentos num período de um ano. Após o primeiro tratamento, as infusões podem ser feitas numa base de ambulatório segundo o critério do médico. Se a re-infusão for administrada a um doente externo, o participante é monitorizado durante pelo menos 4 horas após a terapia.

Para administração, as células da presente invenção podem ser administradas numa velocidade

determinada pelo LD-50 (ou outra medida de toxicidade) do tipo celular e pelos efeitos secundários do tipo celular a várias concentrações, em função da massa e saúde global do doente. As células desta invenção podem suplementar outros tratamentos de uma condição através de terapia convencional conhecida, incluindo agentes citotóxicos, análogos de nucleótidos e modificadores da resposta biológica. De forma semelhante, os modificadores da resposta biológica são facultativamente adicionados para tratamento através das células dendríticas. Por exemplo, as células são facultativamente administradas com um adjuvante, uma citocina como seja GM-CSF, IL-12 ou IL-2 ou com KLH.

Como indicado atrás, o invento também está relacionado com o uso combinado de TNF- α , IL-1 β , IFN γ , um agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) e, facultativamente, um agonista de TLR3, de preferência poli I:C para a preparação de pelo menos uma célula dendrítica madura. Ainda, o invento também está relacionado com uma composição compreendendo TNF- α , IL-1 β , IFN γ , um agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) e, facultativamente, um agonista de TLR3, de preferência poli I:C. Conforme indicado acima, em ambos os casos, de preferência, o referido agonista de TLR7/8 é um composto modificador da resposta imune tipo imidazoquinilona, de preferência 4-amino-2-ethoximetil- α,α -dimetil-1H-imidazol[4,5c]quinolina-1-etanol (R848).

Breve descrição das Figuras

Figura 1:

Geração de células dendríticas (DCs) maturadas de forma diferente

A. Recuperação de DCs colhidas após cultura de células primárias (6 dias de diferenciação + 24 h de maturação) calculada nas células totais semeadas (células mononucleadas) ou monócitos positivos para CD14 detectados através de contagem manual numa câmara Neubauer e análise FACS (CD14). A viabilidade detectada devido à incorporação quantitativa de 7AAD medida em FL-3 de FACScalibur. A linha a tracejado indica níveis de DCs maduras com o cocktail Jonuleit padrão de referência.

B. Expressão na superfície de moléculas específicas de DC para DCs após cultura primária de DCs. A expressão baixa de CD14 comparativamente com a expressão elevada da molécula CD83 específica de DC indica um estatuto maduro de DCs, como detectado por análise FACS (percentagem de todas as células sem separação, aquisição de 1000 células no total).

C. Expressão na superfície de moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86, após cultura primária de DCs, detectada por análise FACS. Expressão do receptor de quimiocina 7 (CCR7=CD197) como indicação do potencial

migratório de DCs para os nódulos linfáticos. A percentagem de positivos foi detectada de acordo com a sobreposição com o anticorpo controlo de isotipo.

DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IL-6 (15 ng/ml) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/ml)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IFN alfa (3000UI/ml) + IFN gama (1000 UI/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

DC3 = TNF-alfa (10ng/ml) + IL-1 beta (10ng/ml) + PGE2 (100 ng/ml) + IFN gama(1000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama (5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama 5000UI/ml) + R848 (1 µg/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

Figura 2:

Estabilidade da maturação (teste da remoção por lavagem) de DCs maturadas de forma diferente

Removeram-se citocinas de DCs por lavagem e estas foram cultivadas mais 40 h após a maturação em meio de cultura de DCs apenas com soro e gentamicina.

A. Viabilidade das DCs maturadas de forma diferente após lavagem e detecção da incorporação de 7AAD.

B. Expressão na superfície de CD14 com baixa indução comparativamente com níveis de expressão elevados de CD83 após remoção por lavagem.

C. Expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e CCR7 após remoção por lavagem.

DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IL-6 (15 ng/ml) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/ml)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IFN alfa (3000 UI/ml) + IFN gama (1000UI/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

DC3 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (100 ng/ml) + IFN gama (1000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama (5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama 5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

Figura 3:

Criopreservação de DCs maturadas de forma diferente

DCs foram congeladas e guardadas na fase gasosa de azoto líquido e analisadas após descongelação.

A. Viabilidade das DCs maturadas de forma diferente após remoção por lavagem e detecção da incorporação de 7AAD.

B. Expressão na superfície de CD14 com baixa indução comparativamente com níveis de expressão elevados de CD83 após congelação.

C. Expressão de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e CCR7 após congelação.

DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IL-6 (15 ng/ml) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/ml)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IFN alfa (3000 UI/ml) + IFN gama (1000UI/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

DC3 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (100 ng/ml) + IFN gama (1000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama (5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama 5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

Figura 4:

Análises da capacidade alostimuladora de DCs maturadas de formas diferentes numa reacção de linfócitos mistos

A. Controlo funcional da capacidade proliferativa de células T autólogas: células T apenas em meio, células T estimuladas com uma terceira parte (=cinco dadores de MNC misturados) (10e5/alvéolo irradiadas com 4000 rad, proporção de 1:1 de células estimuladoras:células responsivas), células T + IL-2 (5 UI/ml) e PHA 10 µg/ml durante 68h, células T estimuladas com 50 UI/ml IL-2. Números de células T 10e5/alvéolo. Cocultura durante 7 dias, proliferação medida através da incorporação de ³H-timidina nas últimas 24 h. Todos os valores foram calculados a partir de cinco alvéolos repetidos.

B. Controlo funcional da capacidade proliferativa de um exemplo de célula T responsiva alogénica.

C. Controlo negativo da proliferação das DCs

maturada de diferentes formas irradiadas (4000 rad) (10e4/alvéolo, de acordo com o número de células do ensaio, proporção 1:10, DCs:células responsivas)

D. Proliferação de células T autólogas estimuladas por diferentes DCs maduras (números de DCs 10e4/alvéolo, números de células T 10e5, proporção 1:10, DCs:células responsivas)

E. Proliferação de um exemplo de células T responsivas alogénicas estimuladas por diferentes DCs maduras (números de DCs 10e4/alvéolo, números de células T 10e5, proporção 1:10, DCs:células responsivas).

F. Sumário dos dados de proliferação de três células T responsivas independentes comparativamente com células T autólogas estimuladas por DCs maturadas de diferentes formas.

DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IL-6 (15 ng/ml) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/ml)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IFN alfa (3000 UI/ml) + IFN gama (1000UI/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

DC3 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (100 ng/ml) + IFN gama (1000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama (5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama 5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

Figura 5.

Produção de IL-12p70 e IL-10 por DCs maturadas através da utilização de diferentes cocktails

DCs imaturas foram cultivadas com diferentes cocktails de maturação e as quantidades de IL12p70 e IL-10 foram determinadas através de ELISA convencional. As barras a cheio indicam IL-12p70 e as barras brancas IL-10, respectivamente.

A: Meio sobrenadante de culturas primárias com maturação após 7 dias;

B: Meio sobrenadante de culturas de DCs maturadas lavadas e fibroblastos transfectados com CD40L após um período de cocultura de 24 hrs, representando um ensaio de sinal 3 como descrito em Materiais e Métodos.

C. Os quocientes de IL12p70/IL-10 foram determinados para as populações de DCs maturadas em diferentes cocktails, baseados nos valores de pg/ml do ensaio sinal-3.

Para o cálculo foi assumido que IL-12p70 e IL-10 possuem teoricamente igual potencial biológico. Os círculos a cheio indicam um quociente positivo entre 0 e 3, 5, as linhas a ponteadas representam diferenças acentuadas de DCs maturadas com cocktail Jonuleit ou Kalinski relativamente à secreção de IL-12p70.

DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IL-6 (15 ng/ml) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/ml)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IFN alfa (3000 UI/ml) + IFN gama (1000UI/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

DC3 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (100 ng/ml) + IFN gama (1000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama (5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama 5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

Figura 6: Expressão de EGFP em DCs transfectadas com RNA transcrito *in vitro* codificador de EGFP

As sobreposições dos histogramas de citometria de fluxo mostram DCs maduras com RNA de EGFP transfectado

(curvas a cheio) 24 h após electroporação e correspondentes DCs não transfectadas (curvas vazias) como controlos negativos. As DCs foram maturadas nos quatro cocktails indicados, o RNA foi introduzido por electroporação, as DCs voltaram para os meios respectivos contendo cocktails de maturação e foram colhidas para citometria de fluxo 24 h mais tarde. Os números indicam as percentagens de DCs positivas para EGFP e as suas intensidades médias de fluorescência. Estes dados são representativos de duas experiências com medições às 24 e 48 horas.

DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IL-6 (15 ng/ml) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/ml)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IFN alfa (3000 UI/ml) + IFN gama (1000UI/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama (5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama 5000 UI/ml) + R848 (1 µg/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

Figura 7: Resposta de linfócitos autólogos de um dador positivo HLA-A*0201 que respondem a DCs pulsadas com péptido viral

As respostas de células T foram avaliadas numa

experiência de IFN γ -ELISPOT usando linfócitos (fracção 3 de Elutra enriquecida em células T = 54,76% células positivas para CD3) que foram primeiro activados durante 7 dias com DCs maduras pulsadas com péptidos e depois novamente estimulados durante 24 h com monócitos mais péptidos CEF. Para as análises ELISPOT, 4 x10³ linfócitos autólogos activados *in vitro* foram estimulados com 2 x 10³ monócitos juntamente com um conjunto de cinco péptidos CEF. A média $\pm$ DP foi calculada para alvéolos em triplicado. Nota: Devido a recuperações insuficientes, os linfócitos activados pelas células DC2 não foram incluídos no ensaio.

DC1 = Jonuleit = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IL-6 (15 ng/ml) + Prostaglandina E2 (=PGE2, 1000 ng/ml)

DC2 = Kalinski = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IFN alfa (3000 UI/ml) + IFN gama (1000UI/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

DC3 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (100 ng/ml) + IFN gama (1000 UI/ml) + R848 (1 μ g/ml)

DC4 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama (5000 UI/ml) + R848 (1 μ g/ml)

DC5 = TNF-alfa (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN gama 5000 UI/ml) + R848 (1 μ g/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

Figura 8: Resposta de interferência gama de linfócitos autólogos estimulados com DCs maduras

Os linfócitos de um dador HLA-A*0201 foram estimulados com DCs autólogos maturados usando o cocktail Jonuleit, o cocktail Kalinski e três novos cocktails aqui descritos.

Linfócitos de sangue periférico (PBLs) foram separados através de elutriação estando contidos na fracção 3, em que 54,8% das células eram linfócitos T positivos para CD3 e 17,7% células positivas para CD56, o que é característico das células assassinas naturais (NK). (A) Os PBLs da fracção 3 da elutriação foram directamente incubados com as diferentes populações de DCs maturadas usando os diferentes cocktails e a sua secreção de interferência gama (IFN-gama) foi medida às 24 h num ensaio ELISPOT convencional.

DC1 = Jonuleit = TNF α (10 ng/ml) + IL-1 β (10 ng/ml) + IL-6 (15 ng/ml) + Prostaglandina E2 (=PGE2; 1000 ng/ml)

DC2 = Kalinski = TNF α (10 ng/ml) + IL-1 beta (10 ng/ml) + IFN α (3000 UI/ml) + IFN γ (1000UI/ml) + poli I:C (20 ng/ml)

DC3 = TNF α (10 ng/ml) + IL-1 β (10 ng/ml) + PGE2 (100 ng/ml) + IFN γ (1000 UI/ml) + R848 (1 μ g/ml)

DC4 = TNF α (10 ng/ml) + IL-1 β (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + IFN γ (5000 UI/ml) + R848 (1 μ g/ml)

DC5 = $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) + $\text{IL-1}\beta$ (10 ng/ml) + PGE2 (250 ng/ml) + $\text{IFN}\gamma$ (5000 UI/ml) + R848 (1 $\mu\text{g/ml}$) + poli I:C (20 ng/ml).

Exemplo

O exemplo que se segue representa a descrição de uma experiência como um exemplo representativo de pelo menos três experiências independentes, realizadas usando células de diferentes dadores.

1. Material e Métodos

Leucaferese e elutriação

Para se obter monócitos como uma população de células progenitoras para a geração de células dendríticas humanas, usámos um sistema fechado de elutriação através de ELUTRA (Gambro BCT, Lakewood, USA).

Após consentimento informado, dadores saudáveis não mobilizados foram sujeitos a 180 minutos de leucaferese com o separador de células COBE Spectra (Gambro BCT, Inc. Lakewood, USA.) usando um programa MNC modificado (V6.1): o factor de separação foi estabelecido a 700 com uma velocidade de colheita de 0,8 ml/min e um hematócrito alvo de apenas 1-2%. As células do sangue resultantes foram analisadas através do contador automático de sangue ACT Dif (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) para estabelecer as

condições do sistema ELUTRA. Os produtos de leucaferese foram processados através de ELUTRA (Gambro BCT, Lakewood, USA) de acordo com as instruções do fabricante, através de um método de elutriação centrífuga de contrafluxo usando uma velocidade de rotor fixa (2400 rpm) e ajuste gradual, controlado por computador, da velocidade do meio, seguido de colheita fora do rotor. Assim, preparou-se 5000 ml de tampão de corrida contendo solução salina tamponada de HANKs (Biochrom, Berlin, Germany) com 1% de albumina sérica humana (Octalbine®, Octapharma, Langen, Germany). O processo ELUTRA resultou em cinco fracções, com enriquecimento em monócitos na fracção fora do rotor. A composição celular das fracções foi caracterizada através do contador automático do sangue ACT Diff (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) e análise FACS.

Análise por FACS das fracções ELUTRA

As células do produto de leucaferese original e das cinco fracções ELUTRA foram incubadas durante 30 minutos com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE): controlos isotipo de IgG (clone X-40) anti-CD 14-FITC (clone: MΦP9), anti-CD 19-FITC (clone: 4G7), anti-HLA-DR-FITC (clone: L243) (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) e anti-CD3-PE (clone UCHT1), anti-CD56-PE (C5.9), anti-CD 16-PE (clone: DJ1 30c), e como um controlo adicional CD14-PE (TUK4) (Dako Diagnostics, Hamburg, Germany) e anti-CD67-FITC (clone: 80H3) (Immunotech, Marseille, France). As

células foram lavadas e ressuspensas em PBS + 2% soro fetal bovino (Biochrom, Berlin, Germany). A análise por citometria de fluxo foi realizada num dispositivo FACS Calibur usando o programa Cellquest Pro (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

Geração de células dendríticas imaturas derivadas de monócitos a partir de monócitos elutriados

As células da fracção fora do rotor ou a subsequentemente designada fracção 5 foram usadas directamente para a geração de DCs se as células positivas para CD14 representassem mais de 60% de todas as células detectadas por análise FACS. As células da fracção 5 foram colhidas a partir do saco de colheita ELUTRA e lavadas uma vez com PBS+0,5% de soro humano e semeadas a 35×10^6 /frasco de cultura celular de 175 cm² (NUNC, Wiesbaden, Germany) em 35 ml de meio DC contendo RPMI 1640 com teor de endotoxina muito baixo (Biochrom, Berlin, Germany), 1,5% de soro humano (lote de indivíduos do sexo masculino AB positivos) (Blood Bank, University of Tuebingen, Germany) e 10 µg/ml de Gentamicina (Biochrom, Berlin, Germany) e cultivadas durante seis dias a 37°C, 5% CO₂ numa atmosfera húmida. Nos dias 1, 3 e 6 as culturas celulares foram suplementadas com 100 ng/ml de GM-CSF (Leukine® by Berlex, Richmond, USA) e 20 ng/ml de IL-4 humana recombinante (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) em 7 ml de meio DC fresco por frasco.

Maturação de células dendríticas

Os processos de maturação foram induzidos através da adição de diferentes combinações de citocinas e outros reagentes, como indicado, a DCs imaturas no dia 6 juntamente com mais 7 ml de meio DC fresco aqui definido por frasco:

Cocktail Jonuleit: 10 ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IL-1- β , 15 ng/ml IL-6 (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) e 1 μ g/ml prostaglandina E2 (Minprostin®, Pharmacia/Pfizer, Erlangen, Germany),

Cocktail Kalinski: 1 0ng/ml TNF- α , 10 ng/ml IL-1- β (R&D Systems, Wiesbaden, Germany), 3000 UI/ml IFN α (Roferon A®, Roche, Welwyn Garden City, England), 1000 UI/ml IFN γ (ImukinR, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany) e 20 ng/ml de RNA de cadeia dupla (poli I:C, InVivogen, Toulouse, France).

Novo cocktail 1: 10 ng/ml TNF- α 10 ng/ml IL-1- β (R&D Systems, Wiesbaden, Germany), 5000 UI/ml IFN γ (Imukin®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany), 1 μ g/ml R848 (InVivogen, Toulouse, France) e 250 ng/ml prostaglandina E2

Como uma variação do cocktail 1, usámos os mesmos componentes, excepto a concentração de IFN γ ser reduzida para 1000 UI/ml e a prostaglandina E2 para 100 ng/ml.

Novo cocktail 2: semelhante ao cocktail 1 mais 20 ng/ml de RNA de cadeia dupla (poli I: C, InVivogen, Toulouse, France). Como controlo, um frasco recebeu apenas 7 ml de apenas meio fresco e serviu como DCs imaturas (dados não apresentados).

Colheita das células dendríticas

Após incubação das DCs com cocktails de maturação durante 24 h, as células foram colhidas através de duas lavagens com PBS + 0,5% de soro humano com agitação ligeira, as células foram contadas numa câmara Neubauer e preparadas para as análises.

Análise por citometria de fluxo (FACS)

Fenotipagem de DC:

As DCs foram marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais de murganho conjugados com fluorescência com especificidades para os controlos de isotipo (clone X-40), CD14 (FITC, MΦP9), CD19 (FITC, clone: 4G7), CD86 (FITC, clone: 2331 FUN-I), CD80 (PE, clone: L307.4) (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) e CD209 (PE, clone: DCN46) (Pharmingen, San Diego, USA) e CD3 (FITC, clone: UCHT1), CD56 (FITC, clone: C5.9a), CD1a (FITC, clone: NA1/34) (Dako, Hamburg, Germany) e HLA-DR (PE, clone: B8.12.2, CD40 (PE, clone: mAb89, CD83 (PE, clone: HB1 5a) (Immunotech, Marseille, France). A coloração de CCR7 foi realizada com

um hibridoma de rato BLR-2 (clone 8E8) (E.Kremmer, GSF) comparativamente com o controlo de isotipo para IgG2a do hibridoma EBNA-A2 (clone R3) através de incubação das DCs em sobrenadante de cultura durante 60 minutos e seguido de lavagem e detecção com anticorpo secundário de murganho contra IgG de rato conjugado com cianina 5 (Jackson Immuno, West Grove, USA).

Para testar a vitalidade, as DCs foram sedimentadas e ressuspensas durante 20 minutos em 7-amino-actinomicina D (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) em concentrações finais de 10 µg/ml em PBS + 2% de soro fetal bovino. Após lavagem, as células foram analisadas no terceiro canal da máquina FACS Calibur.

Validação da estabilidade da maturação (Teste de remoção por lavagem)

DCs maturadas colhidas e lavadas foram novamente semeadas a $2,5 - 3 \times 10^6/9\text{ml}$ de meio DC fresco, sem quaisquer citocinas, em frascos de cultura celular de 25cm² (NUNC, Wiesbaden, Germany). Após aproximadamente 44 h, as DCs foram colhidas e fenotipadas por análise FACS.

Ensaio do sinal 3

AS DCs foram cocultivadas com células que simulam células T como anteriormente descrito (Kalinski, 2004). Resumidamente, DCs maturadas colhidas e lavadas foram

novamente semeadas em placas de 96 alvéolos, em concentrações de 2×10^4 /alvéolo, e incubadas juntamente com fibroblastos de murganho estavelmente transfectados com CD40L humano (Garrone P, Neidhardt EM, Garcia E, Galibert L, van Kooten C, Banchereau J. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. JExp Med. 1995 Nov 1;182(5):1265-73) em concentrações de 5×10^4 /alvéolo. Para controlar a proliferação de cada população celular individual, foram testadas DCs sem adições e fibroblastos CD40L em meio convencional. Após 24 h, as placas foram centrifugadas e os sobrenadantes de 8 alvéolos replicados foram reunidos para análise de IL-10 e IL-12p70 através de ELISA.

ELISA (IL-12p70/IL-10)

A secreção de IL-12p70 e de IL-10, por DCs durante o processo de maturação (DCs primárias) e DCs dentro do ensaio de Sinal 3, foi detectada através de ELISA quantitativa convencional. ELISA foi realizada usando o duo de anticorpos pré-testado para detecção de IL-12p70 e IL-10 (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. A reacção de substrato colorimétrico com tetrametilbenzidina e H_2O_2 foi medida após paragem com H_3PO_4 a 450 nm e correcção do comprimento de onda para 620 nm e analisado com o programa Easy fit (SLT, Crailsheim, Germany).

Criopreservação de células dendríticas

Após colheita e lavagem, $20-15 \times 10^6$ DCs foram colhidas em 0,5 ml de albumina sérica humana a 20% (Octalbina®, Octapharma, Langen, Germany) e misturadas suavemente com 0,5 ml (quantidades iguais) de solução de congelação preparada de fresco contendo 10% de glucose Braun, Melsungen, Germany), 20 % DMSO (CryoSURE®, WAK-Chemie, Dessau-Thornau, Germany) em 20% de albumina sérica humana. Os criotubos (NUNC, Wiesbaden, Germany) foram guardados durante a noite a -80°C e transferidos para a fase gasosa de um contentor de azoto líquido.

Reacção de linfócitos mistos

DCs foram maturadas *in vitro* como indicado, lavadas 2 vezes em PBS + 0,5% de soro humano, irradiadas com 40Gy e semeadas em microplacas de 96 alvéolos de fundo redondo a 1×10^4 /alvéolo Nunc, Wiesbaden, Germany) em RPMI 1640 + 1,5% de soro humano. As células criopreservadas da fracção 3, após o procedimento ELUTRA a partir de diferentes dadores, foram usadas como fonte de células responsivas e semeadas a 1×10^5 /alvéolo para as DCs de dadores alogénicos.

Como controlo para a activação de células T via MHC foram usadas diferentes células terceiras partes como se segue: uma mistura de MNCs de 5 dadores independentes obtidos a partir de camadas leucoplaquetárias após

irradiação por 40Gy foi usada como células estimuladoras. O potencial inespecífico geral das células T para proliferar foi controlado através da incubação de células responsivas com IL-2 Proleukin® by Chiron, Emeryville, USA) a 50UI/ml e fito-hemaglutinina a 10µg/ml (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany).

Após 6 dias, as células foram pulsadas com 0,5 µCi/alvéolo de ³H-timidina (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Germany) e a incorporação de ³H-timidina foi determinada após 24 h usando um dispositivo de contador β (Wallac, Freiburg, Germany).

Transfecção de DCs com EGFP-RNA

EGFP-RNA foi produzido *in vitro* e electroporado em DCs maduras às 24 h, como descrito anteriormente (Nair, S. K., Boczkowski, D., Morse, M., dimming, R. L, Lysterly, H. K. and Gilboa, E. (1998). Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes *in vitro* using human dendritic cells transfected with RNA. Nat Biotechnol. 16:364-369, Javorovic, M., Pohla, H., Frankenberger, B., Wolfel, T. and Schendel, DJ. (2005). RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis. Mol Ther. 12: 734-743), com excepção de cada cuvete de electroporação de 0,4 cm conter um volume total de 300 µl, incluindo 8 µg de EGFP-RNA e 3 x10⁶ DCs. Após

electroporação, as DCs voltaram para o seu meio de maturação original e foram incubadas numa placa de 24 alvéolos a 37°C e 5% CO₂ durante 24 ou 48 h antes da análise por citometria de fluxo.

Ensaio ELISPOT da activação de células T específicas de vírus

Para activação, os linfócitos da fracção 3 de ELUTRA foram semeados a 1×10^6 células/alvéolo com 1×10^5 DCs expostas a péptido viral em placas de 24 alvéolos, em meio RPMI 1640 com 10% de soro humano; 30 UI/ml de IL-2 foi adicionado em d3 e os linfócitos colhidos em d7. Os péptidos de ligação a HLA-A*0201 incluíram: CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV), EBV-BMLF1₂₈₀₋₂₈₈ (GLCTLVAML), proteína M1₅₈₋₆₆ da gripe (GILGFVFTL) ou o conjunto CEF (PANATecs GmbH, Tuebingen, Germany) contendo dois péptidos adicionais, EBV-LMP-₂₄₂₆₋₄₃₄ (CLGGLLTMV) e RNA-polimerase do vírus da gripe PA₄₆₋₅₄ (FMYSDFHFI). As células T activadas *in vitro* e monócitos autólogos mais péptidos CEF foram incubados em meio RPMI 1640 contendo L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, penicilina/estreptomicina (100 U/ml), 10% de soro AB humano (BioWhittaker, Venders, Belgium) e 20 UI/ml de IL-2 a 37°C, com 5% CO₂, durante 24 h. A análise IFN γ -ELISPOT foi realizada como descrito (Becker, C., *et. al.* (2001). Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN γ capture assay. *Nat Med.* 7: 1159-1162, Pohla, H., *et al.* (2000). Allogeneic vaccination for renal cell carcinoma: Development and monitoring. *Bone Marrow*

Transplant. 25: 83-87), com a excepção das placas de PVDF pré-revestidas com anticorpo (Mabtech AB, Nacka, Sweden) e estreptavidina-fosfatase alcalina e uma solução de substrato pronta a usar BCIP/NBT-plus (Mabtech) serem usados na detecção. As manchas foram contadas usando o sistema de leitura AID RLR03 com o programa 3.2.3 (AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany).

2. Resultados e discussão

Cultura primária de DCs

A fracção5 de ELUTRA do exemplo descrito (DC034) continha: 80,6% células positivas para CD14 e os seguintes contaminantes, 2,89% células positivas para CD3, 2,2% para CD56, 1,47% para CD19 e 7,7% para CD67 e era portanto adequada para gerar células dendríticas.

A recuperação mais elevada de células dendríticas, baseado nas células totais semeadas assim como nos monócitos (células positivas para CD14), foi encontrada usando o cocktail Jonuleit, enquanto a mais baixa foi encontrada usando o cocktail Kalinski (Figura 1A). Números de células baixos representam fraca capacidade de colheita das DCs sem usar raspadores de células ou digestão enzimática. Este resultado representa uma grande desvantagem do cocktail Kalinski no nosso sistema que deve ser devida a um grau mais elevado de aderência e alongação fina dos veios dendríticos das DCs maturadas com este cocktail. A

viabilidade das células dendríticas colhidas determinada por coloração com 7AAD mostrou mais de 97% de células vivas usando o cocktail Jonuleit, enquanto as células maturadas com o cocktail Kalinski atingiram apenas 79,5%, o nosso novo cocktail variou entre estes dois valores (Figura 1A).

A expressão de moléculas co-estimuladoras, tipo CD80 e CD86, reflectiu a presença de células apresentadoras de antígeno, particularmente células dendríticas. A Figura 1B mostra um elevado nível de expressão destas moléculas em todas as DCs maturadas com diferentes cocktails. CD14 é uma molécula monocítica, mas sob a influência de GM-CSF/IL-4 e cocktails de maturação desaparece rapidamente das superfícies das células dendríticas. Aqui, mostramos que as DCs geradas com todos os cocktails perdem a expressão de CD14, como evidência clara de uma diferenciação na direcção de DCs em vez da diferenciação também possível na direcção dos macrófagos.

CD83, por outro lado, serve como o marcador mais importante para indicar o estatuto de maturação das DCs. A expressão de CD83, em combinação com a expressão quase indetectável de CD14, demonstrou que nas cinco populações de DCs maturadas, as células eram de identidade DC e altamente maduras (Figura 1B).

O receptor de quimiocinas 7 (CD197) indica um potencial migratório de DCs no sentido dos nódulos linfáticos juntamente com gradientes de quimiocinas de

CCL19 e CCL121 dentro das vénulas endoteliais. Todas as populações de DCs diferencialmente maturadas expressaram CCR7 em níveis elevados (Figura 1C).

***DCs após remoção das citocinas de maturação
(teste da remoção por lavagem)***

A estabilidade do estatuto de maturação é uma característica importante de DCs aplicáveis em clínica, devido aos doentes com doenças malignas frequentemente mostrarem títulos séricos elevados de citocinas inibidoras (e.g., IL-10, TGF-beta, IL-6). Estas citocinas podem influenciar as DCs injectadas revertendo-as para um estatuto imaturo e tornando o sistema imune do doente tolerante aos antigénios tumorais usados como vacina.

Para testar se os novos cocktails induziam maturação estável, testámos moléculas marcadoras de DCs importantes após remoção por lavagem de todas as citocinas e incubação das DCs pelo menos 40 h após nova sementeira em apenas meio. Encontrou-se viabilidade substancialmente mais baixa em DCs maturadas com o cocktail Kalinski (Figura 2A). A figura 2A mostra, como esperávamos, que a viabilidade é perdida ao longo do tempo, devido às DCs estarem exaustas e as células nessas condições, após mais de 60 h após incubação com cocktail de maturação, deixarem de ser adequadas para terapia. Apenas por motivos de ensaio testámos a expressão na superfície de certas moléculas, tipo re-indução de CD14, que indicaria uma reversão para

DCs imaturas. Como a Figura 2B mostra, as cinco DCs maturadas de forma diferente expressam níveis muito baixos (menos de 1%) de CD14 ao mesmo tempo que mantêm níveis elevados do marcador de maturação de DCs CD83. Novamente as DCs maturadas com o cocktail Kalinski, mostraram valores de CD83 ligeiramente mais baixos que as DCs maturadas com os outros cocktails.

A Figura 2C mostrou estabilidade dos níveis de expressão elevados de moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86, e de manutenção do potencial migratório através da expressão de CCR7.

DCs após congelação e descongelação

Neste passo, procurámos um método para a geração de um número elevado de DCs que foram então criopreservadas.

Pode-se conceber congelar monócitos ou, em alternativa, congelar DCs totalmente maduras, mesmo após a exposição a antigénios. A Figura 3 mostra os marcadores de viabilidade e maturação das DCs maturadas de forma diferente após o procedimento de congelação, armazenamento dentro da fase gasosa do azoto líquido e descongelação. É aceitável uma viabilidade acima dos 80%, que se obtém para as DCs maturadas com Jonuleit e com os nossos novos cocktails (Figura 3A), mas não para as DCs maturadas com Kalinski e com o cocktail 5 (ambos contendo poli I:C). Os

marcadores de DCs CD83 e CCR7 foram expressos em níveis elevados e apenas números muito baixos de células CD14 foram detectados em todas as populações de DCs descongeladas (Figura 3B e C).

Capacidade alo-estimuladora de DCs

Para testar as capacidades funcionais de DCs, usámos uma reacção de linfócitos mistos com DCs como células estimuladoras contra células T alogénicas. Para controlar capacidades vitais das células T, testámos a indução de proliferação contra um número máximo de diferentes moléculas MHC (terceira parte = 5 dadores de MNC mistos), um estímulo mitogénico (PHA) e a citocina estimuladora de células T IL-2. A Figura 4 mostra estes controlos para as células T autólogas (4A) e um exemplo de células T alogeneicas responsivas (4B). A Figura 4C mostra DCs irradiadas sem quaisquer células responsivas e verificou-se que o ensaio apenas determinou a proliferação pelas células responsivas. A Figura 4D indica baixa indução de células T autólogas comparativamente com um indivíduo responsivo alogénico (Figura 4E).

Na Figura 4F, resumimos a proliferação de 3 células T responsivas alogénicas independentes após coincubação com DCs maturadas de forma diferente comparativamente com células T autólogas dos dadores de DCs. Como esperado a partir das diferenças de MHC entre as 3 células T responsivas respectivas e DCs observamos uma

elevada capacidade estimuladora. Novamente, DCs maturadas com cocktail Kalinski falharam em mostrar níveis de estimulação comparáveis com as outras DCs maturadas, os quais podem ser devidos a viabilidade mais baixa e uma maior percentagem de células a morrer durante o procedimento do ensaio.

IL-12p70 e IL-10 libertadas por DCs

Durante os processos de diferenciação e maturação, as DCs secretam citocinas para o sobrenadante de cultura. A Figura 5A mostra a secreção de IL-12p70 (barras a cheio) e IL-10 (barras brancas) biologicamente activas pelas culturas de DCs primárias. As DCs maturadas com o cocktail Jonuleit não secretam quantidades detectáveis de IL-12p70, enquanto o cocktail Kalinski assim como os nossos novos cocktails induziram IL-12p70 nas gamas de ng/ml. Estes resultados indicam uma capacidade da composição para induzir a produção de citocinas em DCs. Na Figura 5B, é visível que, após simulação do encontro de DCs com potenciais células T dentro dos nódulos linfáticos através do ligando CD40, é ainda possível voltar a induzir IL-12p70 a partir de DCs maturadas no cocktail Kalinski e em menor grau também usando os nossos novos cocktails.

IL-10, como potencial citocina Th2, contra-regula a polarização de Th1. Para ter este efeito em conta, calculámos os valores destas citocinas reguladoras importantes como tendo teoricamente igual potencial

biológico e determinámos um quociente de IL-12p70/IL-10. A Figura 5C representa resultados que mostram que o cocktail Kalinski é superior ao Jonuleit, tal como descrito na literatura, mas os nossos novos cocktails também revelaram quocientes positivos para a nova indução por IL-12 após 24 h de ligação de CD40 e assim secretam mais IL-12p70 que DCs maturadas com o cocktail Jonuleit.

Para resumir os resultados, divulgamos aqui uma nova combinação de substâncias, incluindo um ligando TLR7/8 e outras citocinas e suplementos, que é capaz de induzir a maturação total de DCs e induzir capacidades reguladoras Th1 nestas células. Comparativamente com a maturação de DCs com o cocktail de Jonuleit, os nossos cocktails também mostraram elevadas viabilidades celulares após colheita e congelação, elevados níveis de maturação através da expressão de CD83, moléculas co-estimuladoras e potencial migratório através da expressão de CCR7 assim como estabilidade da maturação. Ao contrário do cocktail Jonuleit, o nosso cocktail é capaz de induzir a secreção de IL-12p70 pela cultura primária assim como após simulação da interacção de células T através da ligação de CD40. As DCs maduras geradas com o nosso novo cocktail combinam as melhores características do cocktail Jonuleit para além de ganharem capacidades indutoras de Th1 através de IL-12p70. Contrariamente às DCs obtidas após maturação com o cocktail Kalinski, o nosso novo cocktail resulta em DCs com secreção de IL-12p70 sem o impacto negativo da perda de números celulares causada por processos de morte celular prolongados.

Os nossos procedimentos para gerar células dendríticas humanas estão em conformidade com as regulamentações das boas práticas de produção (GMP) e portanto são úteis para aplicação clínica para gerar vacinas, as quais promovem a polarização Th1 das células T efectoras contra estruturas antigénicas tumorais.

Expressão de proteína após transferência de RNA para DCs por electroporação

Várias fontes de antigénios foram consideradas para usar em vacinas contra tumores baseadas em DCs. O RNA é um candidato atraente para oferecer proteínas totais em DCs para processamento e apresentação, ultrapassando assim a necessidade de conhecer péptidos de ligação a MHC específicos. Para testar a capacidade das DCs para expressarem proteína após exposição a RNA transcrito *in vitro*, analisámos a expressão de EGFP através de citometria de fluxo após transferência do correspondente RNA. As células DC3 não foram incluídas devido ao cocktail 3 ser idêntico ao cocktail 4, excepto as quantidades mais reduzidas de IFN γ e PGE2 (ver, e.g., legenda da fig. 1). Encontrou-se anteriormente que a expressão de EGFP atingia um pico 12-24 h após transfecção de células DC1 com RNA e a expressão era estável durante 48 h (Javorovic, M., Pohla, H., Frankenberger, B., Wolfel, T. and Schendel, D.J. (2005). RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis. Mol.

Ther. 12: 734- 743), portanto, as percentagens de células positivas para EGFP e intensidades médias de fluorescência (MFI) foram medidas 24 e 48 h após electroporação. Células DC1 e DC4 expressavam EGFP enquanto as células DC2 não expressavam EGFP e as células DC5 não expressavam (Fig. 6) ou expressavam níveis muito baixos de EGFP (dados não apresentados). O ligando TLR3, poli (I:C), estava presente no cocktail Kalinski e no cocktail 5 (células DC2 e DC5, respectivamente) mas não existia no cocktail Junoleit (células DC1) e no cocktail 4 (células DC4). O cocktail Kalinski também continha IFN α , o qual não estava presente em qualquer outro cocktail. É interessante termos encontrado na literatura que DCs maturadas apenas com IFN α também falhavam a expressão da proteína EGFP após transferência de RNA (Frankenberger, B., et al. (2005). Cell-based vaccines for metastatic renal cell carcinoma: genetically-engineered tumor cells and monocyte-derived dendritic cells. World J Urol. 3:166-174).

Indução da secreção de IFN γ pelas células T com DCs pulsadas com péptidos

Devido às células DC5 não puderem ser carregadas com RNA, a sua capacidade para apresentar péptidos foi testada como uma alternativa (Fig. 7). Linfócitos autólogos da fracção ELUTRA 3 de um dador positivo para HLA-A*0201 foram estimulados durante 7 dias com DCs pulsadas com péptidos maturadas nos cocktails 3-5 comparativamente com o cocktrail Jonuleit. As células foram então re-estimuladas durante 24 h com monócitos autólogos mais péptidos CEF e

analisadas num ensaio IFN γ -ELISPOT. Foram encontradas respostas específicas de péptidos com todas as populações de DCs, demonstrando que as células DC5 podiam apresentar péptidos para activação de células T.

Assim, encontrámos que a presença de poli (I:C) nos cocktails de maturação evitavam que as DCs fossem capazes de expressar proteínas após carregamento com RNA exógeno, presumivelmente através de mecanismos de activação de TLR3 para proteger as células do RNA estranho (Kato *et al.*, (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441: 101-105). Assim, DCs maturadas em meio Kalinski ou cocktail 5 não podem ser usadas para vacinas baseadas em RNA, se bem que ambos sejam adequados para usar com péptidos, como aqui se mostra para o cocktail 5 e anteriormente publicado para o cocktail Kalinski (Mailliard, R. B. *et al.* (2004). α -type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.* 64: 5934-5937). Pelo contrário, os cocktails 3 e 4 seriam bem adequados para a geração de DCs produtoras de IL-12p70 usando péptidos ou RNA como fontes de antígenos associados a tumores para desenvolvimento de vacinas contra o cancro.

Resposta de interferão gama de linfócitos autólogos estimulados com DCs maduras

Os linfócitos de um dador HLA-A*0201 foram estimulados com DCs autólogos maturados usando o cocktail

Jonuleit, o cocktail Kalinski e três novos cocktails descritos na patente.

Linfócitos do sangue periférico (PBLs) foram separados por elutriação estando contidos na fracção 3, em que 54,8% das células eram linfócitos T positivos para CD3 e 17,7% células positivas para CD56, que é característico das células assassinas naturais (NK). Os PBLs na fracção 3 da elutriação foram directamente incubados com as diferentes populações de DCs maturadas usando diferentes cocktails e a sua secreção de interferão gama (IFN-gama) foi medida, após 24 h, num ensaio de ELISPOT convencional.

Para análise por ELISPOT, PBLs da fracção 3 ELUTRA foram semeados em 50 µl por alvéolo em triplicados em placas de PVDF pré-revestidas com anticorpo (Mabtech AB, Nacka, Sweden), seguindo-se incubação das placas durante 2 h, a 37°C, em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, penicilina/estreptomicina (100 U/ml) e 10% de soro humano AB (BioWhittaker, Verviers, Belgium) para bloquear a ligação inespecífica. O anticorpo de captura foi o clone específico de IFNγ 1-DIK (Mabtech). As populações de DCs foram cuidadosamente adicionadas aos alvéolos. Para avaliação do fundo, as DCs e os linfócitos foram semeados sozinhos. O volume total de cultura foi 150 µl e as placas foram incubadas numa incubadora com atmosfera húmida, a 37°C, com 5% CO₂ durante 24 h. Após remoção das células e lavagem extensiva com PBS/0,5% Tween20, a incubação com o anticorpo

de detecção biotinilado, clone 7-B6-1 (Mabtech) e a revelação das manchas foram realizadas como anteriormente descrito (1,2), com a excepção de serem usadas estreptavidina-fosfatase alcalina e a solução de substrato pronta a usar BCIP/NBT-plus. As manchas foram contadas usando o sistema de leitura AID ELR03 com o programa informático 3.2.3(AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany).

Para activação, os linfócitos da fracção 3 ELUTRA foram semeados a 1×10^6 células/alvéolo com 1×10^5 DCs carregadas com péptido em placas de 24 alvéolos, em meio RPMI 1640 com 10% de soro humano; 30 UI/ml de IL-2 foram adicionadas em d3 e os linfócitos colhidos em d7. Os péptidos de ligação a HLA-A*0201 incluíram: CMVpp65495-503 (NLVPMVATV), EBV-BMLF1280-288 (GLCTLVAML), proteína M1 do vírus da gripe 58-66 (GILGFVFTL) ou o lote de CEF (PANATecs GmbH, Tuebingen, Germany) contendo dois outros péptidos, EBV-LMP-2426-434 (CLGGLLTMV) e RNA polimerase do vírus da gripe PA46-54 (FMYSDFHFI). As células T activadas *in vitro* e os monócitos autólogos com ou sem péptidos CEF foram incubados em meio RPMI 1640 contendo L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM, penicilina/estreptomicina (100 UI/ml), 10% soro humano AB (BioWhitaker, Verviers, Belgium) e 20 UI/ml IL-2 a 37°C com 5% CO₂ durante 24 h. A análise por IFN γ -ELISPOT foi realizada como descrito (Becker, C., et. al. (2001). Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN γ capture assay. Nat Med 7: 1159-1162; Pohla, H., et al. (2000). Allogeneic vaccination for renal cell carcinoma: Development and

monitoring. Bone Marrow Transplant. 25: 83-87), com excepção de serem usadas na detecção placas de PVDF pré-revestidas com anticorpo e estreptavidina-fosfatase alcalina e a solução de substrato pronta a usar BCIP/NBT-plus (Mabtech). As manchas foram contadas usando o sistema de leitura AID ELR03 com o programa informático 3.2.3 (AID Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg, Germany).

As células produtoras de interferão gama dominantes detectadas neste ponto de tempo precoce (ver Figura 8) são células NK activadas, contrariamente às experiências acima, onde as respostas representam as células T específicas de péptidos estimuladas pelas DCs durante o período de activação de 7d (ver Figura 7). Esta análise demonstrou que a activação de células NK era estimulada cerca de três vezes usando DCs maturadas no cocktail DC5, comparativamente com os cocktails DC1, DC3 e DC4.

Em conjunto, estes estudos mostram que as DCs e, particularmente, as do cocktail 5 são capazes de activar as células assassinas naturais (Figura 8) assim como re-estimar eficazmente as células T efectoras específicas de péptido que reconhecem epitopos derivados de citomegalovírus, vírus Epstein-Barr e vírus da gripe.

3. Resumo do exemplo

Vacinas baseadas em células dendríticas (DC)

frequentemente utilizam DCs derivadas de monócitos maturadas com um cocktail de citocinas (Jonuleit) de IL-1 β , TNF α , IL-6 e prostaglandina E2 (PG). Para obter DCs que dirigem as células T para resposta Th1, pensámos em cocktails que originam DCs que produzem IL-12p70 biologicamente activa. Após elutriação dos produtos de aferese por ELUTRA, cultivámos monócitos enriquecidos com GM-CSF e IL-4 durante 6 dias em meio GMP com soro humano. As DCs imaturas foram maturadas durante 24 h com vários cocktails, contendo ligandos TLR7/8 com ou sem poli I:C e interferão γ , PG, IL-1 β e TNF α . As DCs maturadas expressavam >80% CD83, CD86, CD80 e HLA-DR, CD40, >60% CD209 (dados não apresentados), <2% CD14 e >60% de CCR7 receptor das quimiocinas residentes nos nódulos linfáticos. As Dcs mativeram a totalidade da maturidade e expressaram marcadores de superfície típicos após criopreservação e após remoção das citocinas por lavagem e continuação da cultura durante 44 h.

IL-12p70 e IL-10 estavam presentes nos sobrenadantes de DCs maturadas com os cocktails contendo os ligandos TLR7/8. Um cocktail de IFN γ , IL-1 β , TNF α , PG e o ligando de TLR7/8 R848 deram DCs que secretavam IL-12p70 após colheita e 24 de cocultura com fibroblastos transfectados com CD40L, simulando o encontro com células T nos nódulos linfáticos. Calculámos as quantidades relativas de IL-12p70 versus IL-10 e encontrámos que as nossas DCs revelavam apenas um quociente ligeiramente inferior de IL-12 relativamente a IL-10 como descrito por Kalinski (IL-1 β , TNF α , IFN α , IFN β , poli I:C).

A funcionalidade das DCs maturadas com os nossos novos cocktails foi testada através da cultura de linfócitos mistos e ensaios de ELISPOT. As nossas DCs induziram alo-respostas e estimularam as células T específicas de antígenos virais de forma comparável às Dcs geradas pelo cocktail Jonuleit (dados não apresentados).

Resumindo, este novo cocktail para maturação de DCs combina características de boa colheita, recuperações razoáveis, estabilidade dos marcadores de maturação e capacidade de indução de Th1 com procedimentos GMP necessários às vacinas de DCs de elevada qualidade.

Lisboa, 21 de abril de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Um método para a maturação *in vitro* de pelo menos uma célula dendrítica imatura, compreendendo a estimulação da referida célula dendrítica imatura com $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, um agonista de TLR7/8 e prostaglandina E_2 (PG).

2. O método da reivindicação 1, compreendendo ainda a estimulação da referida célula dendrítica imatura com um agonista de TLR3, de preferência poli I:C.

3. O método de qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, em que as referidas substâncias são parte de uma composição adicionada ao meio de cultura da referida célula dendrítica imatura.

4. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o referido agonista de TLR7/8 é um composto modificador da resposta imune tipo imidazoquinilona, de preferência em que o referido composto modificador da resposta imune tipo imidazoquinilona é 4-amino-etoximetil- α , α -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolina-1-etanol (R848).

5. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a referida célula dendrítica imatura é uma célula dendrítica imatura derivada de monócito, de preferência derivada de células mononucleadas do sangue periférico humano, monócitos, outras células progenitoras

mielóides ou a partir de células progenitoras CD34 através de diferenciação *in vitro* para células positivas para CD14 ou em que a referida célula dendrítica imatura é obtida directamente a partir de sangue periférico.

6. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que a célula dendrítica imatura é obtida através da incubação de células mononucleadas de sangue periférico, monócitos ou outras células progenitoras mielóides com GM-CSF e IL-4 ou IL-13.

7. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a célula dendrítica imatura é de origem humana.

8. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 7, compreendendo os seguintes passos:

- a) preparação de células mononucleadas de sangue periférico, de preferência em que as referidas células mononucleadas são obtidas através de leucoferese de sangue periférico,
- b) incubação das células mononucleadas do passo a) com GM-CSF e IL-4 ou IL-13, de preferência em que a referida incubação tem a duração de 1 a 9, de preferência 2 a 9, mais de preferência 2 a 6 dias,
- c) incubação das células obtidas no passo b) com um cocktail compreendendo TNF α , IL-1 β , IFN γ , um agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) e, facultativamente, um agonista de TLR3, de preferência poli I:C, de preferência

em que a referida incubação tem a duração de 12 h a 72 h, de preferência 20 h ou 24 h e

d) colheita da célula ou células dendríticas maduras.

9. O método de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que célula(s) dendrítica(s) madura(s) é/são ainda carregada(s) *in vitro* com um ou mais antigénios, de preferência em que o referido antigénio ou antigénios são supostos induzir a maturação de células T efectoras dentro dos nódulos linfáticos, mais de preferência em que o referido carregamento é realizado através da incubação da(s) células dendrítica(s) imatura(s) com pelo menos um péptido do referido antigénio ou através da transfecção da(s) células dendrítica(s) com RNA ou DNA codificador de antigénio.

10. Uma população de células dendríticas maduras, obtida através do método de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, 8 ou 9, em que a célula dendrítica imatura é de origem humana e em que TNF α é usado numa concentração de 1 ng/ml a 50 ng/ml, IL-1 β é usada numa concentração de 1 ng/ml a 50 ng/ml, IFN γ é usado numa concentração de 500 U/ml a 1000 U/ml, o agonista de TLR7/8 é usado numa concentração de 0,2 μ g/ml a 5 μ g/ml, PGE2 é usado numa concentração de 50 ng/ml a 5000 ng/ml e o agonista de TLR3 é usado numa concentração de 10 ng/ml a 50 ng/ml.

11. Uma composição farmacêutica compreendendo a população de células dendríticas imaturas da reivindicação 10.

12. A população de células dendríticas maduras da reivindicação 10 para usar no tratamento de uma doença seleccionada do grupo consistindo em doenças tumorais e doenças infecciosas.

13. O uso combinado *in vitro* de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, um agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) e, facultativamente, um agonista de TLR3, de preferência poli I:C, para a preparação de pelo menos uma célula dendrítica madura.

14. O uso da reivindicação 13, em que o referido agonista de TLR7/8 é um composto modificador da resposta imune tipo imidazoquinilona, de preferência 4-amino-etoximetil- α , α -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolina-1-etanol (R848).

15. Uma composição compreendendo $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, um agonista de TLR7/8, prostaglandina E2 (PG) e, facultativamente, um agonista de TLR3, de preferência poli I:C, de preferência em que o referido agonista de TLR7/8 é um composto modificador da resposta imune tipo imidazoquinilona, de preferência 4-amino-etoximetil- α , α -dimetil-1H-imidazol[4,5-c]quinolina-1-etanol (R848).

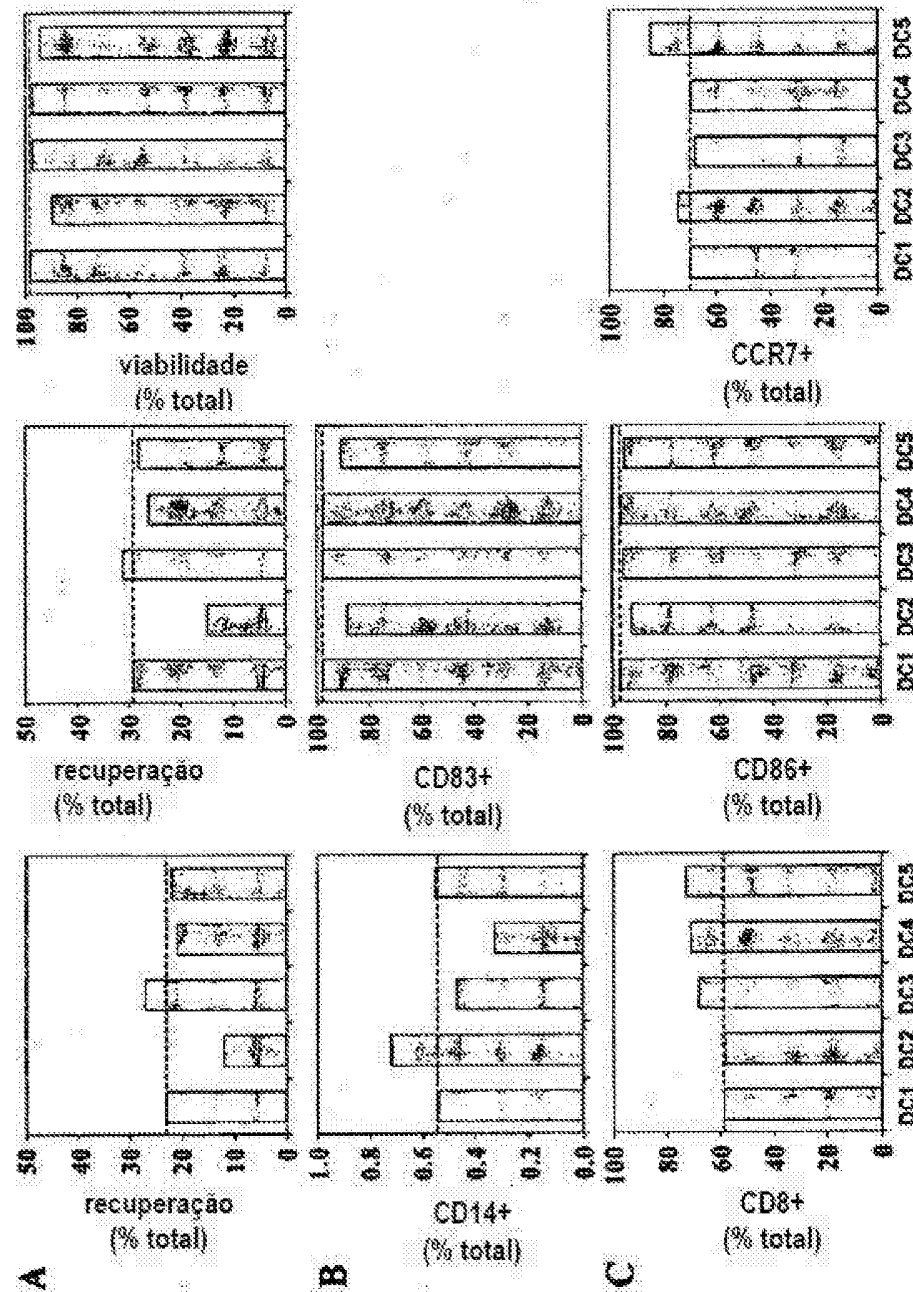


Figura 1

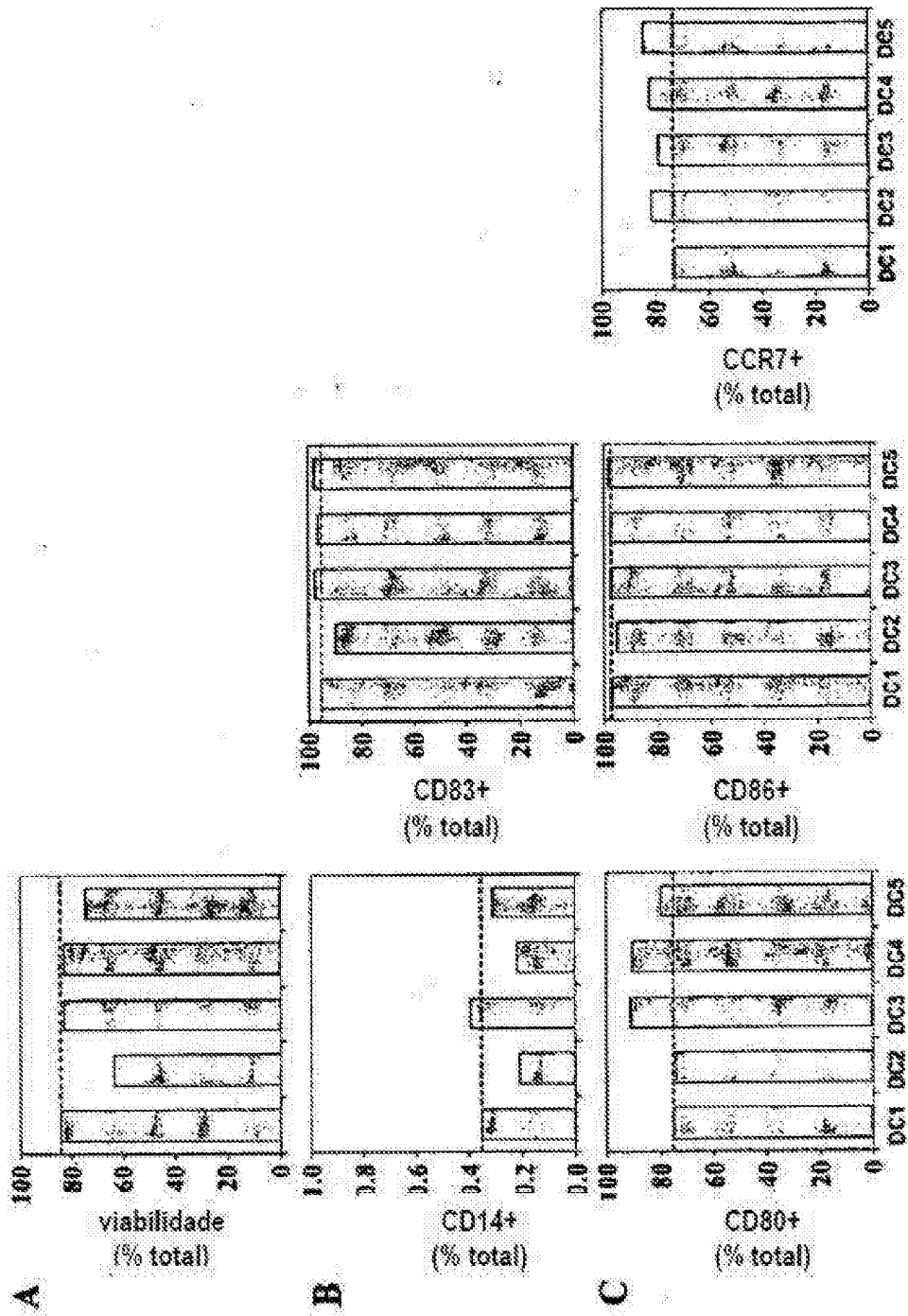


Figura 2

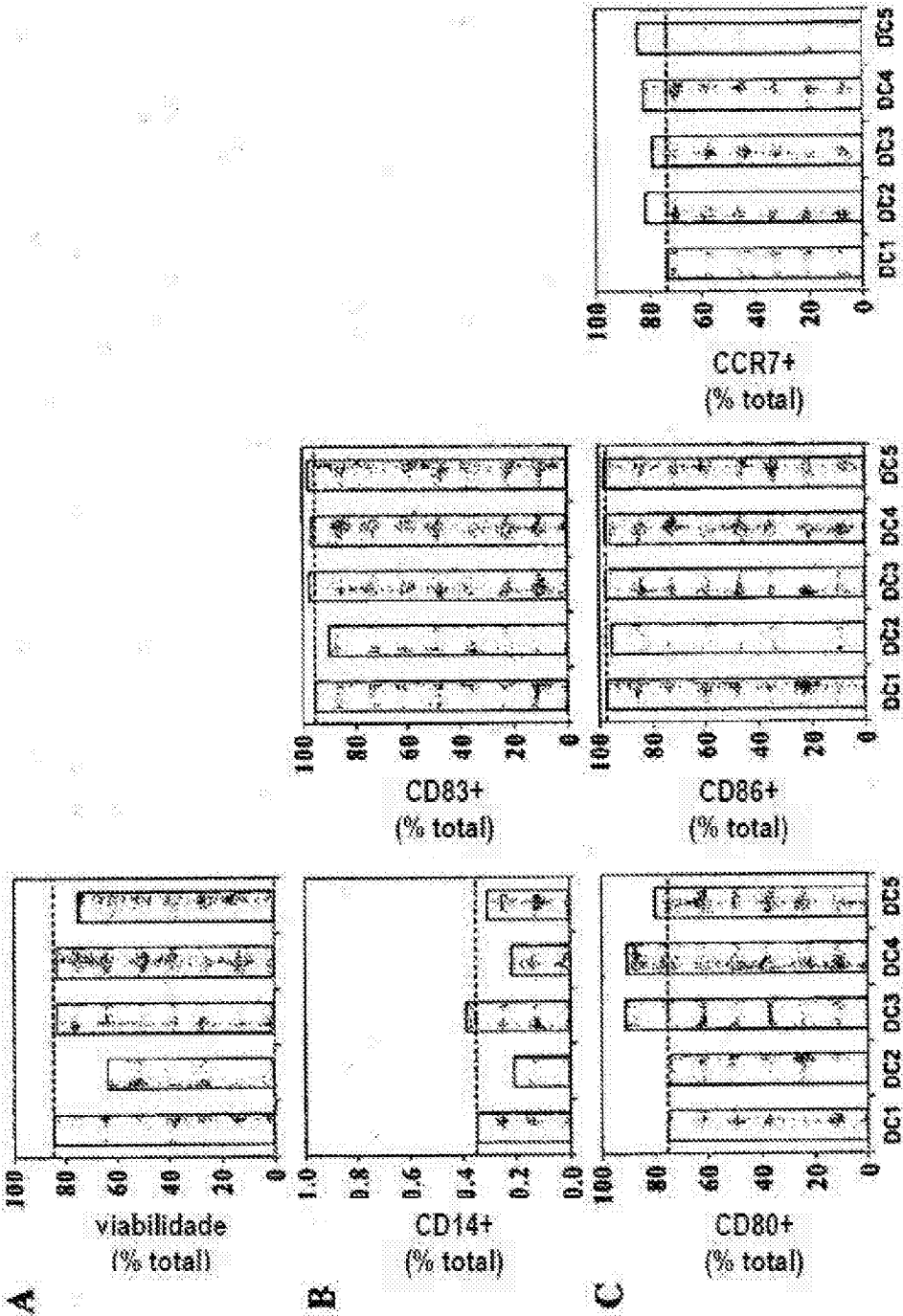
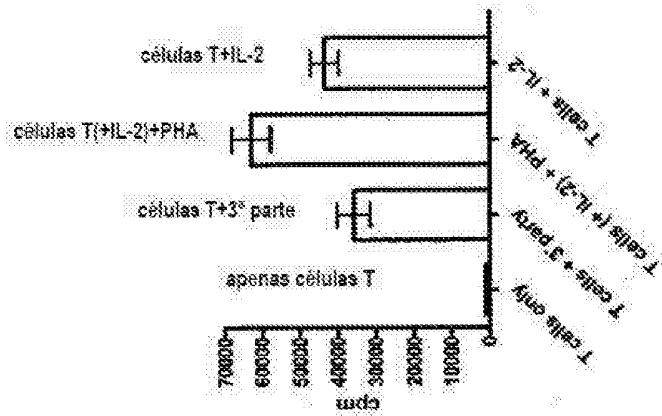
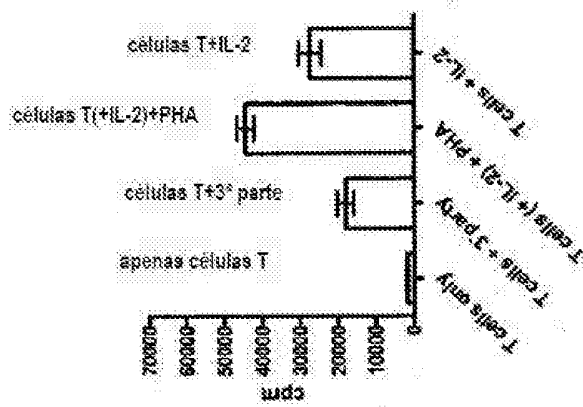


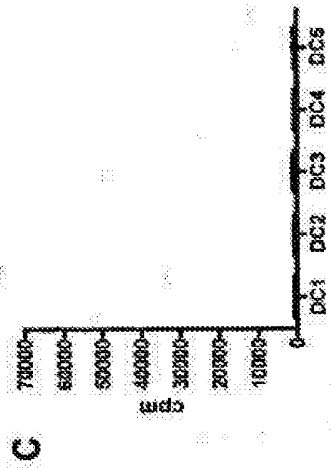
Figura 3



B



A



C

Figura 4/A-C

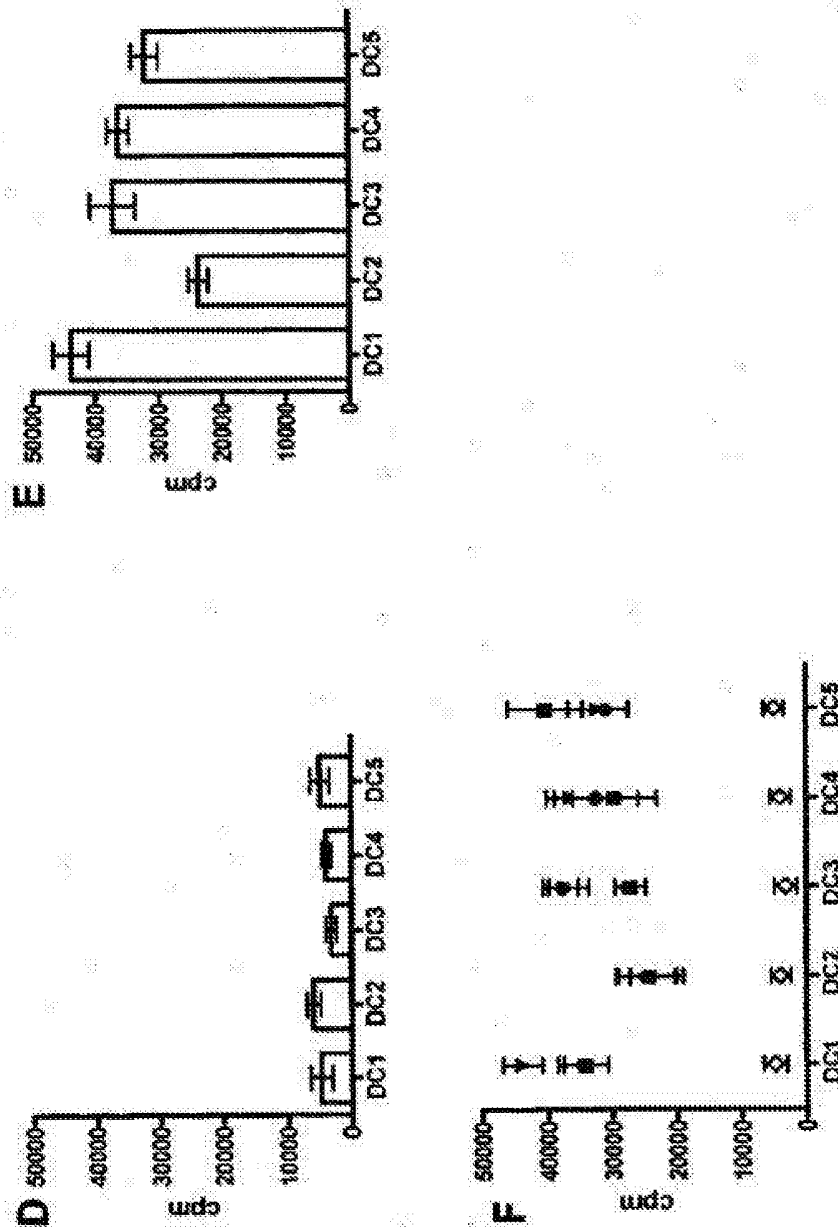


Figura 4/D-F

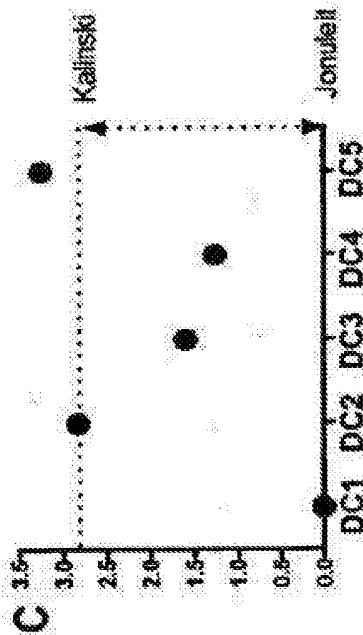
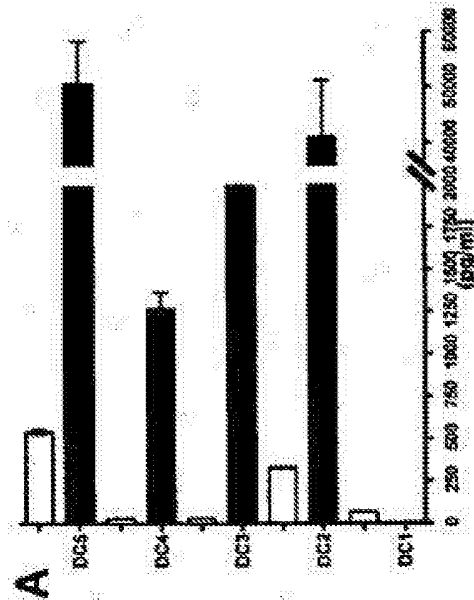
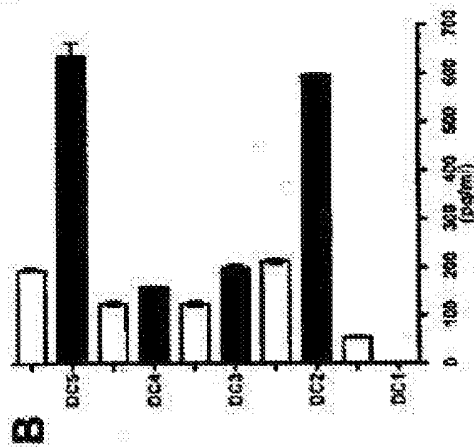


Figure 5

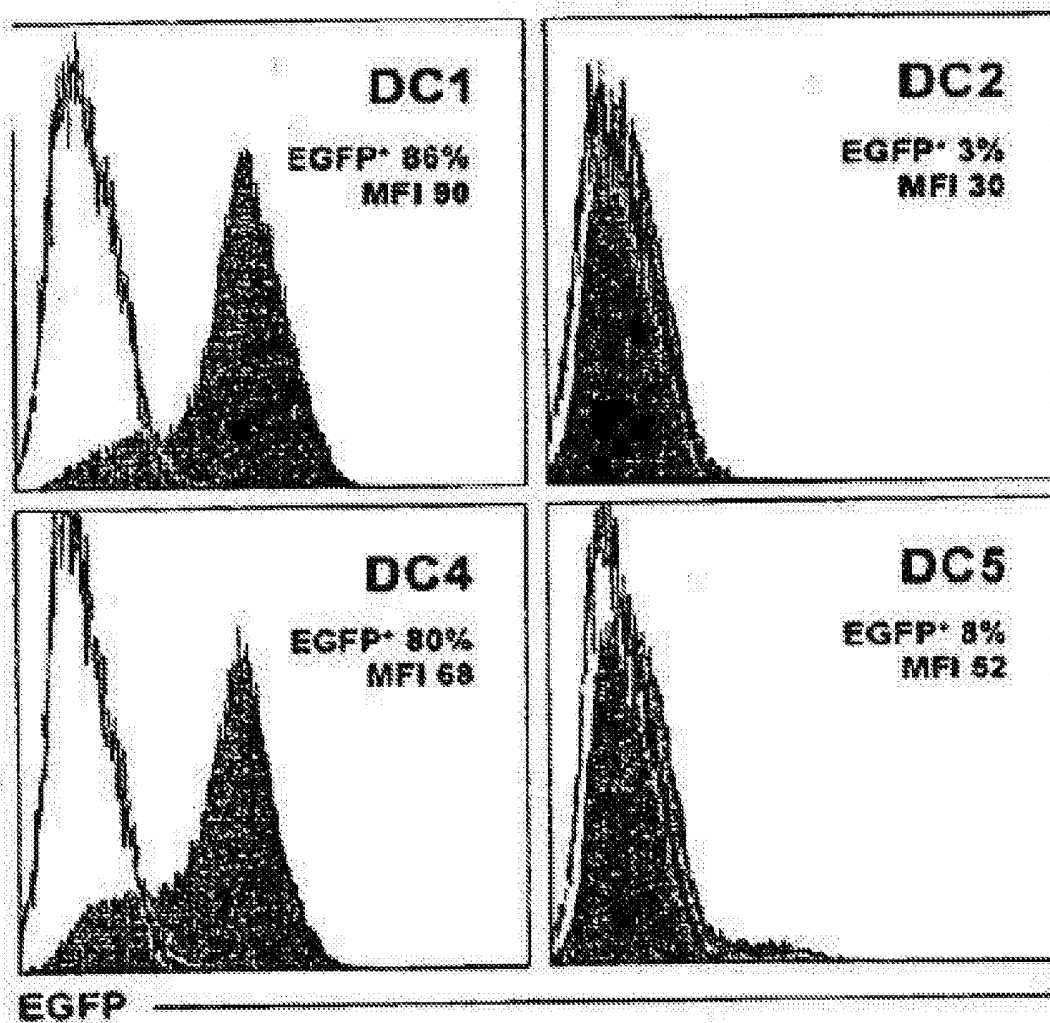


Figura 6

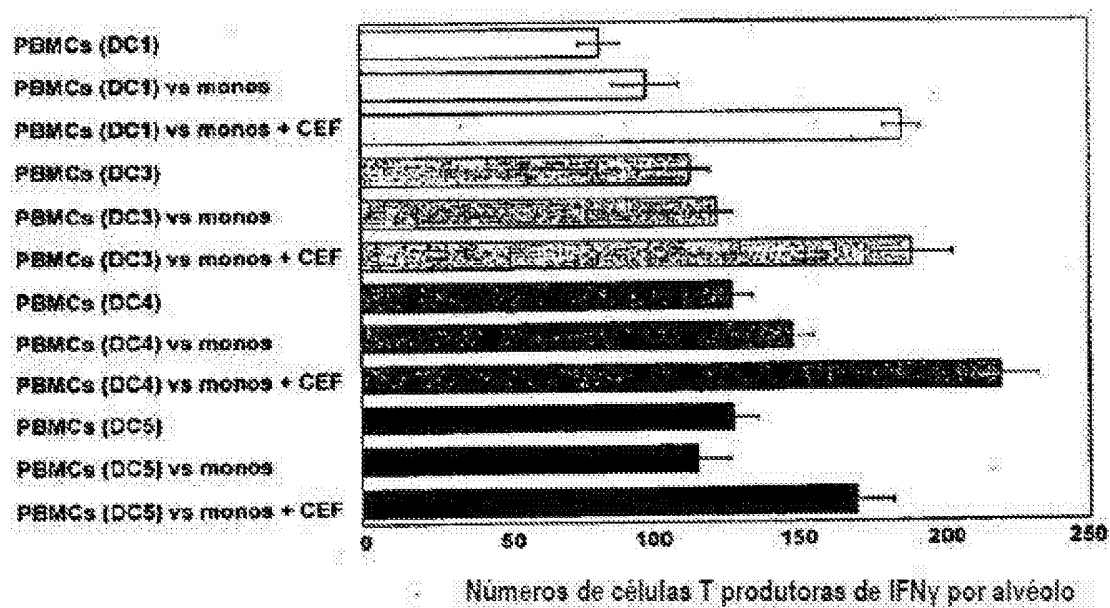


Figura 7

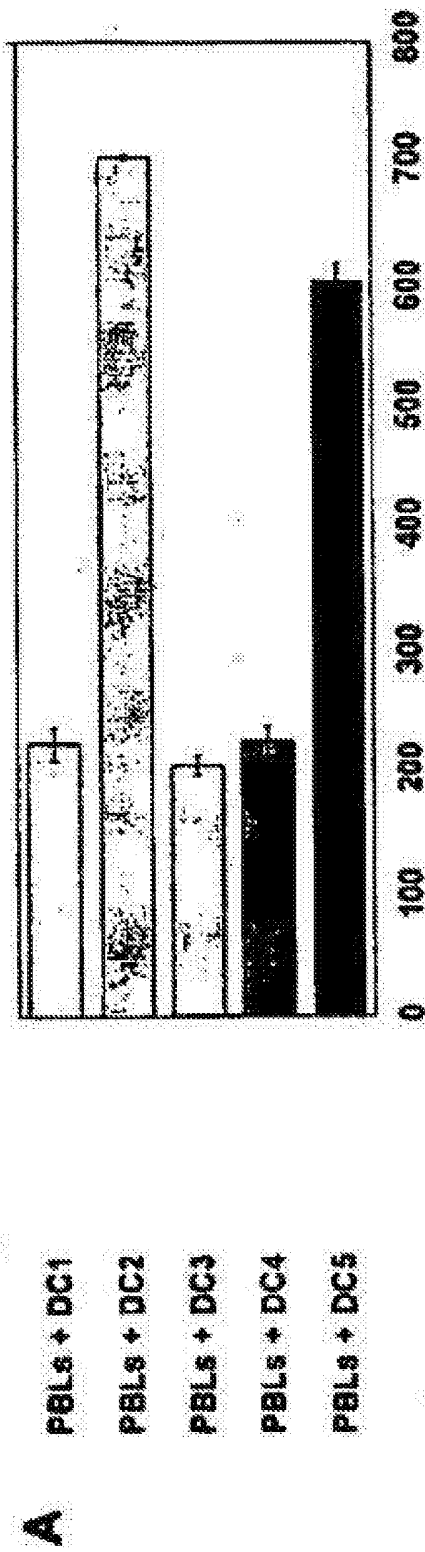


Figura 8

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 0047719 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- SCHULER G; SCHULER-THURNER B; STEINMAN RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.*, April 2003, vol. 15 (2), 138-47
- BANCHEREAU J; PALUCKA AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol.*, April 2005, vol. 5 (4), 296-306
- SALCEDO M; BERCOVICI N; TAYLOR R; VEREECKEN P; MASSICARD S; DUBIAU D; VERNEL-PAULLAC F; BOYER A; BARON-BOUDO V; MALLARD E. Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunol Immunother.*, 27 September 2005, 1-11
- LANGENKAMP A; MESSI M; LANZAVECCHIA A; SALLUSTO F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.*, October 2000, vol. 1 (4), 311-6
- O'GARA A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 1998, vol. 8, 275-283
- RENGARAJAN J; SZABO SJ; GLIMCHER LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunity Today*, October 2000, vol. 21 (10), 478-83
- JONULEIT H; KUHN U; MULLER G; STEINBRINK K; PARAGNIK L; SCHMITT E; KNOP J; ENK AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.*, December 1997, vol. 27 (12), 3135-42
- MOSCA PJ; HOBEIKA AC; CLAY TM; NAIR SK; THOMASEK J; MORSE MA; LYERLY HK. A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. *Blood*, 15 November 2000, vol. 96 (10), 3499-504
- MAILLIARD RB; WANKOWICZ-KALINSKA A; CAI Q; WESA A; HILKENS CM; KAPSENBERG ML; KIRKWOOD JM; STORKUS WJ; KALINSKI P. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.*, 01 September 2004, vol. 64 (17), 5934-7
- NAPOLITANI G; RINALDI A; BERTONI F; SALLUSTO F; LANZAVECCHIA A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.*, 03 July 2005, vol. 6 (8), 769-76 [0005]
- GAUTIER G; HUMBERT M; DEAUVIEAU F; SCHILLER M; HISCOTT J; BATES EE; TRINCHIERI G; CAUX C; GARRONE P. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med.*, 02 May 2005, vol. 201 (9), 1435-46
- AHN JS; AGRAWAL B. IL-4 is more effective than IL-13 for in vitro differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunol.*, 02 September 2005, vol. 17 (10), 1337-46
- BERGER TG; STRASSER E; SMITH R; CARSTE C; SCHULER-THURNER B; KAEMPGEN E; SCHULER G. Efficient elutriation of monocytes within a closed system (Elutra) for clinical-scale generation of dendritic cells. *J Immunol Methods*, March 2005, vol. 298 (1-2), 61-72
- ERRATUM. *J Immunol Methods*, August 2005, vol. 303 (1-2), 152
- STRASSER EF; BERGER TG; WEISBACH V; ZIMMERMANN R; RINGWALD J; SCHULER-THURNER B; ZINGSEM J; ECKSTEIN R. Comparison of two spheresis systems for the collection of CD 14+ cells intended to be used in dendritic cell culture. *Transfusion*, September 2003, vol. 43 (9), 1309-16
- ERRATUM. *Transfusion*, October 2003, vol. 43 (10), 1502

- CAMPBELL JD ; PIECHACZEK C ; WINKELS G ; SCHWAMBORNE E ; MICHELID ; HENNEMANN S ; SCHMITZ J. Isolation and generation of clinical-grade dendritic cells using the ClinMACS system. *Methods Mol Med.*, 2005, vol. 109, 55-70
- DUBSKY P ; UENO H ; PIQUERAS B ; CONNOLLY J ; BANCHEREAU J ; PALUCKA AK. Human dendritic cell subsets for vaccination. *J Clin Immunol.*, November 2005, vol. 25 (6), 551-72
- DIECKMANN D ; SCHULTZ ES ; RING B ; CHAMESP ; HELDG ; HOOGENBOOM HR ; SCHULER G. Optimizing the exogenous antigen loading of monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol.*, 11 April 2005, vol. 17 (5), 621-35
- KIKUCHI T ; AKASAKI Y ; ABET ; FUKUDAT ; SAOTOME H ; RYAN JL ; KUFFE DW ; OHNO T. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J Immunother.*, November 2004, vol. 27 (6), 452-9
- GONG J ; KOIDO S ; KATO Y ; TANAKA Y ; CHEN D ; JONAS A ; GALINSKY I ; DEANGELO D ; AVIGAND ; KUFFE D. Induction of anti-leukemic cytotoxic T lymphocytes by fusion of patient-derived dendritic cells with autologous myeloblasts. *Leuk Res.*, December 2004, vol. 28 (12), 303-12
- GRUNEBACH F ; KAYSER K ; WEEK MM ; MULLER MR ; APPEL S ; BROSSART P. Cotransfection of dendritic cells with RNA coding for HER-2/neu and 4-1BBL increases the induction of tumor antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Gene Ther.*, September 2005, vol. 12 (9), 749-56
- KYTE JA ; KVALHEIM G ; AAMDAL S ; SAEBOE-LARSEN S ; GAUDERNACK G. Preclinical full-scale evaluation of dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA for melanoma vaccination. *Cancer Gene Ther.*, June 2005, vol. 12 (6), 579-91
- NAVABI H ; CROSTON D ; HOBOT J ; CLAYTON A ; ZITVOGEL L ; JASANI B ; BAILEY-WOOD R ; WILSON K ; TABI Z ; MASON MD. Preparation of human ovarian cancer ascites-derived exosomes for a clinical trial. *Blood Cells Mol Dis.*, September 2005, vol. 35 (2), 149-52
- ESCUDIER B ; DORVAL T ; CHAPUT N ; ANDRE F ; CABY MP ; NOVAULT S ; FLAMENT C ; LEBOULAIRE C ; BORG C ; AMIGORENA S. Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial. *J Transl Med.*, 02 March 2005, vol. 3 (1), 10
- KAWAMURA K ; KADOWAKI N ; SUZUKI R ; UDAGAWA S ; KASAOKA S ; UTOGUCHI N ; KITAWAKI T ; SUGIMOTO N ; OKADA N ; MARIYAMA K. Dendritic cells that endocytosed antigen-containing IgG-liposomes elicit effective antitumor immunity. *J Immunother.*, March 2006, vol. 29 (2), 165-74
- GRIFFIOEN M ; BORGHIM ; SCHRIER PI ; OSANTO S ; SCHADENDORF D. Analysis of T-cell responses in metastatic melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with tumor lysates. *Cancer Immunol Immunother.*, 03 March 2004, vol. 53 (8), 715-22
- SU Z ; DANNUL J ; YANG BK ; DAHM P ; COLEMAN D ; YANCEY D ; SICH I ; NIEDZWIECKI D ; BOCZKOWSKI D ; GILBOA E. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol.*, 15 March 2006, vol. 174 (6), 3798-807
- GARRONE P ; NEIDHARDT EM ; GARCIA E ; GALIBERT L ; VAN KOOTEN C ; BANCHEREAU J. Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med.*, 01 November 1995, vol. 182 (5), 1265-73
- NAIR, S. K. ; BOCZKOWSKI, D. ; MORSE, M. ; CUMMING, R. I. ; LYERLY, H. K. ; GILBOA, E. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol.*, 1998, vol. 16, 364-369
- JAVOROVIC, M. ; POHLA, H. ; FRANKENBERGER, B. ; WOLFEL, T. ; SCHENDEL, D.J. RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis. *Mol Ther.*, 2005, vol. 12, 734-743
- BECKER, C. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN γ capture assay. *Nat Med.*, 2001, vol. 7, 1158-1162
- POHLA, H. et al. Allogeneic vaccination for renal cell carcinoma: Development and monitoring. *Bone Marrow Transplant.*, 2000, vol. 25, 83-87
- FRANKENBERGER, B. et al. Cell-based vaccines for metastatic renal cell carcinoma: genetically-engineered tumor cells and monocyte-derived dendritic cells. *World J Urol.*, 2005, vol. 3, 166-174
- KATO, H. et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 2006, vol. 441, 101-105
- MAILLIARD, R. B et al. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res.*, 2004, vol. 64, 5934-5937