

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 346**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/0784** (2010.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2014 E 20160435 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024 EP 3741843**

54 Título: **Método para obtener células dendríticas inmunoestimuladoras**

30 Prioridad:

**03.01.2013 GB 201300049**

**03.01.2013 US 201361748546 P**

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

**14.11.2024**

73 Titular/es:

**TRANSIMMUNE AG (50.0%)**

**Königsallee 90**

**40212 Düsseldorf, DE y**

**YALE UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HENCO, KARSTEN;**

**BAUER, GÜNTER;**

**DUCKWORTH, JUSTIN;**

**HAYDAY, ADRIAN;**

**EDELSON, RICHARD;**

**TIGELAAR, ROBERT y**

**GIRARDI, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 987 346 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para obtener células dendríticas inmunoestimuladoras

## 5 Descripción

## CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La presente invención se refiere a métodos para producir células dendríticas inmunoestimuladoras. La presente invención en particular se refiere a un método para producir células dendríticas inmunoestimuladoras con preferencia sobre células dendríticas inmunosupresoras.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] Las células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) están reconocidas como potentes células presentadoras de antígeno para la iniciación y el control de respuestas inmunológicas celulares en humanos. Dado que las DC pueden ser, bien inmunoestimuladoras, bien inmunosupresoras, dependiendo de qué conjunto de sus propiedades potenciales expresen en el momento de la interacción con clones específicos sensibles de células T, se consideran participantes fundamentales sumamente importantes en las reacciones inmunitarias mediadas por células T. A modo de  
20 generalización amplia, pero muy extendida, las DC inmaduras son más "tolerogénicas" que sus homólogas más maduras, mientras que las DC maduras se cree que son más "inmunógenas" que sus precursoras inmaduras. La capacidad de las DC, generadas *ex vivo* a partir de monocitos y armadas con antígeno específico, de funcionar eficazmente en cualquiera de las dos direcciones inmunológicas depende de su viabilidad y su vigor una vez devueltas al paciente. Se concluye lógicamente que el equilibrio entre DC inmunoestimuladoras e inmunosupresoras contrarias  
25 será un determinante muy importante tanto de la dirección como de la potencia de las respuestas inmunitarias terapéuticas dependientes de las DC.

[0003] El objetivo de esta invención es facilitar la producción de poblaciones de DC particularmente conducentes a la generación de respuestas inmunitarias potentes y clínicamente pertinentes. A pesar de lo enormemente prometedora que es la terapia basada en DC, tal como los esfuerzos para mejorar la inmunidad anticancerosa, los resultados  
30 clínicos han sido en general decepcionantes. Por ejemplo, Provenge, la primera inmunoterapia para un tumor sólido aprobada recientemente por la FDA y que adapta el método convencional de la producción *ex vivo* de DC a partir de monocitos de la sangre, ha brindado simplemente una mejora de cuatro meses en la supervivencia de pacientes con cáncer de próstata avanzado. Ese método convencional para inducir DC, así como la Fotoféresis Extracorpórea (FEC),  
35 una terapia aprobada por la FDA para la malignidad "líquida" Linfoma Cutáneo de Células T (CTCL, por sus siglas en inglés), se ven gravados por la producción de poblaciones de DC relativamente heterogéneas en condiciones que perjudican el vigor *in vivo*, y la viabilidad, de las DC resultantes. Empleando condiciones más fisiológicas para la producción de DC terapéuticas, la presente invención posibilita la producción de DC sincronizadas de una manera más madurativa, cuya supervivencia y cuyo vigor no se ven inhibidos por factores inherentes al método mediante el  
40 cual se producen. Además, este método es aplicable a leucocitos tanto de seres humanos como de animales.

[0004] Las DC ceban respuestas tanto de células T citotóxicas (CTL, por sus siglas en inglés) CD8<sup>+</sup> como de células T colaboradoras (Th1) CD4<sup>+</sup>. Las DC son capaces de capturar y procesar antígenos y migrar a los ganglios linfáticos regionales para presentar los antígenos capturados e inducir respuestas de células T. En los seres humanos, las DC  
45 son un componente relativamente poco frecuente de la sangre periférica (<1 % de leucocitos). Sin embargo, mediante procedimientos de laboratorio pueden diferenciarse grandes cantidades de DC a partir de precursores CD34<sup>+</sup> o monocitos de la sangre.

[0005] Por las propiedades antes descritas, las DC se han identificado como importantes agentes celulares para provocar respuestas inmunitarias antitumorales eficaces. La idea es generar DC que presenten antígenos específicos de tumor en su complejo CPH de clase I y CPH de clase II y puedan (re)introducirse en un paciente para, así, lanzar un ataque inmunitario contra el tumor. Sin embargo, la generación de tales DC inmunoestimuladoras requiere normalmente una diferenciación de precursores CD34<sup>+</sup> o monocitos de la sangre utilizando cócteles de citocinas complejos y bastante caros. En esos métodos estándar, las citocinas se emplean en concentraciones mucho mayores  
50 (a menudo en órdenes de magnitud) que las que se hallan *in vivo* en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, una razón que se da para los resultados clínicos en conjunto decepcionantes de la inmunomodulación basada en DC es que las DC producidas mediante el método de citocinas común pueden no funcionar eficazmente en las concentraciones de

citocinas bastante menores que se encuentran realmente en los pacientes. Las DC producidas *ex vivo* en concentraciones marcadamente suprafiológicas de factores de crecimiento, tales como las citocinas, se seleccionan para que dependan de condiciones reproducidas en el entorno *in vivo* en los pacientes.

5 **[0006]** La fotoféresis extracorpórea (FEC) clásica se ha utilizado con éxito para tratar el linfoma cutáneo de células T (CTCL) en subconjuntos de pacientes. En la FEC, los pacientes que padecen CTCL reciben el compuesto fotoactivable 8-metoxipsoraleno (8-MOP). Luego, se somete a los pacientes a una leucoféresis para obtener capas leucocitarias y se hacen pasar estas capas leucocitarias a través de un dispositivo de exposición a radiación ultravioleta en circuito cerrado continuo para irradiar las capas leucocitarias obtenidas por leucoféresis y, así, dañar letalmente los linfocitos expuestos. De esta manera, se induce al 8-MOP a reticular de forma covalente pares de bases de ADN. El concepto de la FEC es destruir células T metastásicas proliferantes del CTCL y luego reintroducir por vía intravenosa las células moribundas en el paciente. Se ha aprendido que este proceso conduce adicionalmente a la conversión en DC de monocitos de la sangre que se han hecho pasar, sin necesidad de estimulación mediante adición de citocinas exógenas. Estas DC inducidas por FEC se supone además que internalizan, procesan y muestran antígenos a partir de las células tumorales que se destruyeron mediante la combinación de 8-MOP e irradiación UV. Se ha planteado la hipótesis de que la reintroducción de estas células dendríticas cargadas en el paciente explica al menos parte del éxito de la FEC a la hora de tratar el CTCL. De hecho, también se ha supuesto que los procesos similares a la FEC en los que no se utilizan 8-MOP ni irradiación con luz UV, pero en los que una muestra de sangre extracorpórea que comprende monocitos se hace pasar bajo esfuerzo de cizallamiento a través de un dispositivo de FEC, inician una diferenciación de monocitos en DC.

**[0007]** Sin embargo, se ha descubierto también que la FEC o los procesos similares a la FEC conducen a DC truncadas, es decir, inmunosupresoras o tolerogénicas, que probablemente contribuyen en gran medida a la eficacia clínica de la FEC en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped que frecuentemente aparece después de alotrasplantes de células madre de la médula ósea. Los aspectos mecanicistas exactos de la FEC en la diferenciación de monocitos en DC, bien inmunoestimuladoras, bien inmunosupresoras, siguen siendo inaprensibles (para un recordatorio del proceso de la FEC, véase Girardi et al. (2002), *Transfusion and Apheresis Science*, 26, 181-190).

30 **[0008]** El documento WO 2011/137365 describe métodos para tratar monocitos de la sangre para producir células dendríticas presentadoras de antígeno funcionales. Una cantidad extracorpórea de la sangre de un individuo se trata con un agente fotoactivable y se hace pasar a través de un dispositivo de tratamiento de plástico, que permite la transmisión de luz al interior del dispositivo de plástico. Una fuente de luz produce después luz de una longitud de onda seleccionada para activar el agente fotoactivable.

35 **[0009]** Berger et al. (2010, *Blood*, 116, 4838-4847) describen que la FEC induce un alto porcentaje de monocitos procesados que entran en la vía de diferenciación en células dendríticas presentadoras de antígeno en un solo día según lo determinado por expresión mejorada de diferentes genes.

40 **[0010]** Hoffmann et al. (2007, *Journal of Investigative Dermatology*, S117) describen la inducción de células dendríticas inmunomoduladoras mediante transinmunización.

45 **[0011]** Engberg et al. (2007, *Journal of Investigative Dermatology*, S117) se refieren a la generación de respuestas de células T antimelanoma específicas de tumor mediante células dendríticas inducidas por fotoquimioterapia extracorpórea.

**[0012]** Khalil et al. (2012, *Journal of investigative dermatology*, S101) se refieren a la conversión de monocitos en células dendríticas mediante señalización plaquetaria.

50 **[0013]** Durazzo et al. (2012, *Journal of investigative dermatology*, S121) describen que se induce maduración de células dendríticas mediante plaquetas.

55 **[0014]** Salskov-Iversen et al. (2005, *Journal of immune based therapies and vaccines*, 3:4, 8518-3-4) se refieren a la producción de células dendríticas a partir de monocitos que en primer lugar se diferencian en células dendríticas inmaduras mediante adherencia y liberación desde una superficie de plástico y luego se siguen madurando durante la noche en presencia de células T malignas apoptóticas.

**[0015]** Por lo tanto, los procesos de FEC y similares a la FEC actuales están concebidos para conducir a mezclas complejas de DC inmunoestimuladoras e inmunosupresoras. Por supuesto, desde un punto de vista clínico, entre otros, sería importante entender cómo pueden modificarse los procesos de FEC y similares a la FEC para superar estas limitaciones y cómo pueden obtenerse intencionada y selectivamente DC inmunoestimuladoras con preferencia sobre las inmunosupresoras y viceversa. Además, el proceso de FEC clásico es, en principio, un método *in vivo*, dado que las mezclas de células dendríticas obtenidas se vuelven a introducir por infusión en el paciente. Sin embargo, sería deseable disponer de métodos que permitiesen una producción de DC inmunoestimuladoras con preferencia sobre las inmunosupresoras y viceversa fuera del cuerpo humano o animal.

**[0016]** Por lo tanto, existe una necesidad continuada de métodos que permitan una producción predecible y reproducible de células dendríticas inmunoestimuladoras específicas del individuo, es decir, autólogas, que luego puedan cargarse con antígenos específicos de enfermedad y que tras la reintroducción permitan un tratamiento de, por ejemplo, enfermedades hiperproliferativas tales como el cáncer.

## **OBJETIVOS Y COMPENDIO DE LA INVENCION**

**[0017]** Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras.

**[0018]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir células presentadoras de antígeno autólogas inmunoestimuladoras, preferiblemente células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras.

**[0019]** Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para producir células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras en una cantidad extracorpórea de sangre obtenida de un paciente.

**[0020]** Un objetivo más de la presente invención es proporcionar métodos para producir células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras en una cantidad extracorpórea de sangre obtenida de un paciente sin necesidad de cócteles de citocinas.

**[0021]** Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar métodos para producir células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras en una cantidad extracorpórea de sangre obtenida de un individuo tal como un paciente con preferencia sobre células dendríticas inmunosupresoras.

**[0022]** Estos y otros objetivos que se harán evidentes a partir de la descripción que sigue a continuación se logran mediante la materia de las reivindicaciones independientes. Algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención constituyen la materia de las reivindicaciones dependientes. Otras realizaciones más de la presente invención pueden extraerse de la descripción que sigue.

**[0023]** La presente invención está basada en cierta medida en datos presentados posteriormente en la presente memoria, que para un dispositivo miniaturizado y redimensionable permitieron (i) imitar algunos aspectos del procedimiento de FEC clásico, (ii) aclarar el mecanismo celular, molecular y las condiciones biofísicas de inducción de diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras en una cantidad extracorpórea de sangre. Estos datos demuestran que la activación de plaquetas y la unión de monocitos a tales plaquetas activadas en condiciones de fuerza de cizallamiento son esenciales para obtener células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. Como muestran los experimentos descritos posteriormente, estas células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras pueden caracterizarse por una expresión de marcadores moleculares indicativos de células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. Los datos también demuestran que las condiciones que conducen a una expresión aumentada de Cremallera de Leucina inducida por Glucocorticoide (GILZ, por sus siglas en inglés) permitirán favorablemente una diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunosupresoras. Estos hallazgos permiten por lo tanto un enfoque racionalizado para obtener células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras seleccionando así cuidadosamente las propiedades de los dispositivos que se han de utilizar y los parámetros del proceso. Los hallazgos de la presente invención permiten producir células dendríticas inmunoestimuladoras con preferencia sobre células dendríticas inmunosupresoras y, por lo tanto, superar las limitaciones del procedimiento de FEC clásico, porque, en el procedimiento de FEC clásico, la falta de comprensión de qué tipo de células dendríticas se producen y cómo puede manipularse en cierta medida su producción impide ampliar el uso de este método para otras que no sean las aplicaciones autorizadas (véase Girardi et al. (2002), *Transfusion and Apheresis Science*, 26, 181-190). Además, a diferencia del procedimiento de FEC clásico tal como

se usa en el dispositivo obtenible de Therakos, la presente invención permite obtener tales células dendríticas inmunoestimuladoras en un entorno experimental, donde la cantidad extracorpórea de sangre no está en conexión continua con el cuerpo. Los datos sugieren, entre otras cosas, que el proceso de obtención de células dendríticas inmunoestimuladoras parece incluir una etapa de activación global de monocitos y una etapa subsiguiente de diferenciación de monocitos en células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras (por ejemplo, células dendríticas). Estas etapas parecen depender inicialmente de la activación física de monocitos, siendo suficientes para la activación las fuerzas físicas que se dan durante, por ejemplo, la purificación o el enriquecimiento iniciales de monocitos, aunque el paso de, por ejemplo, monocitos activados inicialmente a través de dispositivos como se describe en la presente memoria puede permitir mejorar la activación y la diferenciación. Además, si la activación y la diferenciación tienen lugar en ausencia de agentes fotoactivables y UV-A (tal como se utilizan y se utilizaban en procesos de FEC), la formación de células dendríticas inmunosupresoras parece reducirse favorablemente, al reducirse la expresión de GILZ. Los datos presentes arrojan además luz sobre la naturaleza de marcadores moleculares que pueden utilizarse para identificar células dendríticas inmunoestimuladoras.

**[0024]** Algunas de las realizaciones, que están basadas en estos datos, se describen posteriormente de forma más detallada.

**[0025]** La presente invención está relacionada con un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas inmunoestimuladoras, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

- a) someter dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a una fuerza de cizallamiento haciéndola pasar a través de una cámara de flujo;
- b) realizándose el método en ausencia de agentes fotoactivables tales como 8-MOP y UVA; e
- c) identificándose la diferenciación de monocitos procedentes de dicha muestra de sangre en células dendríticas inmunoestimuladoras mediante una expresión aumentada de al menos un marcador molecular HLA-DR, CD83, CD86, ICAM-1 o PLAUR cuando se comparan las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras con los monocitos dentro de la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero.

**[0026]** Posteriormente se describen marcadores moleculares adicionales, que se desprenden, por ejemplo, de la Tabla 1. Estos marcadores moleculares pueden agruparse según su función conocida como, por ejemplo, marcadores moleculares de células presentadoras de antígeno, marcadores moleculares de adhesión celular, etc. Los marcadores moleculares cuya expresión se considera indicativa de células dendríticas inmunoestimuladoras incluyen PLAUR, NEU1, CD80, CCR7, LOX1, CD83, Decisina ADAM, FPRL2, GPNMB, ICAM-1, HLA-DR y/o CD86. Los marcadores como HLA-DR, PLAUR e ICAM-1 pueden considerarse indicativos de una activación global de monocitos, mientras que una expresión aumentada de, por ejemplo, CD83 y Decisina ADAM parece indicativa de una diferenciación de monocitos en células dendríticas.

**[0027]** La activación de monocitos se logra, entre otras cosas, sometiendo dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a una fuerza física haciendo pasar o sometiendo a ciclo dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a través de una cámara de flujo de un dispositivo, que permita ajustar el caudal de dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a través de dicha cámara de flujo de dicho dispositivo de tal manera que se aplique una fuerza de cizallamiento a dichos monocitos contenidos dentro de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero.

**[0028]** Por lo tanto, es posible lograr e influir en la activación de monocitos y la inducción de diferenciación en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras variando las fuerzas de flujo de la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero a través de la cámara de flujo de tal dispositivo, variando la geometría de la vía de flujo de la cámara de flujo, variando las dimensiones de la cámara de flujo, variando la temperatura de la cámara de flujo y, por lo tanto, de la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero, cambiando las propiedades superficiales geométricas y biofísicas de la vía de flujo, etc.

**[0029]** Como se muestra posteriormente, la activación de monocitos y la inducción de diferenciación en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras pueden optimizarse dependiendo de una interacción de monocitos con plaquetas activadas y/o componentes plasmáticos específicos en una situación en la que los monocitos experimentan una fuerza física que puede proporcionarse mediante un dispositivo como se describe posteriormente.

5 **[0030]** La presente divulgación describe por lo tanto la activación de monocitos, que experimentan una fuerza física y que interactúan con plaquetas activadas y/o componentes plasmáticos tales como fibrinógeno o fibronectina. La activación puede ser un proceso de etapas consecutivas, incluyendo las etapas de (i) inmovilizar componentes plasmáticos tales como fibrinógeno o fibronectina, bien como componentes aislados, bien como parte de la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero, en la cámara de flujo de dicho dispositivo, (ii) hacer pasar plaquetas, que pueden haberse obtenido como una fracción purificada a partir de la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero o como parte de la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero, a través de la cámara de flujo de tal manera que las plaquetas puedan interactuar con y ser activadas por los componentes plasmáticos y (iii) hacer pasar monocitos, que pueden haberse obtenido como una fracción purificada a partir de la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero o como parte de la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero, a través de la cámara de flujo de tal manera que los monocitos puedan interactuar con y ser activados por las plaquetas activadas y/o los componentes plasmáticos.

15 **[0031]** Así, adicionalmente y/o como alternativa a los parámetros antes descritos y la modificación de la arquitectura del dispositivo y las condiciones en las que éste se hace funcionar, es posible lograr e influir en la activación de monocitos y la inducción de diferenciación en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras variando la naturaleza, la pureza y las concentraciones de los componentes plasmáticos, la naturaleza, la pureza y la concentración de las plaquetas, el orden de las etapas mediante las cuales los componentes plasmáticos y/o las plaquetas se hacen pasar a través de la cámara de flujo y/o se disponen en la misma, la densidad con la que la cámara de flujo se reviste con los componentes plasmáticos y/o las plaquetas, las fuerzas de flujo con las que la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero y en particular las plaquetas y/o los monocitos se hacen pasar a través de la cámara de flujo de tal dispositivo, la temperatura y/o el tiempo aplicados para hacer pasar la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero y en particular las plaquetas y/o los monocitos a través de la cámara de flujo de tal dispositivo, etc.

30 **[0032]** Sin embargo, debe entenderse que, aunque tales dispositivos pueden ser particularmente eficaces a la hora de inducir la activación de monocitos y la diferenciación en células dendríticas, las fuerzas físicas que los monocitos experimentan durante la purificación o el enriquecimiento iniciales, tal como durante un enriquecimiento por Ficoll-Hypaque como se describe posteriormente, pueden ya ser suficientes para activar monocitos y para inducir su diferenciación en células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras, tales como células dendríticas. De manera similar, aunque las plaquetas activadas y/o los componentes plasmáticos específicos pueden ser útiles para aumentar la activación de monocitos y la diferenciación en células dendríticas inmunoestimuladoras, pueden no ser absolutamente necesarios. Con el fin de efectuar la activación de monocitos y la diferenciación en células dendríticas inmunoestimuladoras, la invención contempla por lo tanto como requisito mínimo la aplicación de fuerzas físicas. Con el fin de dejar que este proceso se desarrolle de la manera menos influida posible, la invención siempre considera no aplicar cócteles moleculares para lograr la maduración y la diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras y evitar condiciones que conduzcan a, por ejemplo, una expresión aumentada de GILZ tales como la aplicación conjunta de agentes fotoactivables y UV-A.

40 **[0033]** En los aspectos y las realizaciones anteriores y siguientes, la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero y en particular los monocitos pueden por lo tanto haberse obtenido o no mediante aféresis tal como leucoféresis.

45 **[0034]** Adicionalmente, la invención se refiere también a tales métodos que se llevan a cabo en condiciones que evitan una expresión aumentada de GILZ y/o un número aumentado de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> y/o una regulación negativa de CD80, CD86 y CD83. Por lo tanto, la invención se refiere a, por ejemplo, métodos que se llevan a cabo en ausencia de un agente fotoactivable tal como 8-MOP y sin exposición a luz tal como UV-A.

50 **[0035]** La presente divulgación también se refiere a métodos, como se describe posteriormente, para obtener células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras autólogas, que pueden usarse, por ejemplo, en la inmunización contra antígenos del cáncer, antígenos víricos, antígenos bacterianos o antígenos fúngicos.

55 **[0036]** Otra realización se refiere a métodos, como se describe posteriormente, para producir células dendríticas inmunoestimuladoras, que pueden ser células de mamífero. Aunque la invención se refiere a la producción de células dendríticas alogénicas inmunoestimuladoras humanas, la presente invención considera también el uso de los métodos para producir células dendríticas inmunoestimuladoras animales, tal como para ratones, ratas, etc. Estas realizaciones

de la invención proporcionan modelos animales útiles y, por lo tanto, la capacidad de redimensionar los métodos y los resultados descritos en la presente memoria de, por ejemplo, ratones a seres humanos. Además, dado que están disponibles líneas genéticamente idénticas de animales tales como ratones, las células dendríticas inmunoestimuladoras animales, tales como las células dendríticas inmunoestimuladoras de ratones, pueden, bien introducirse en el individuo del que se tomó la cantidad extracorpórea de muestra de sangre y por lo tanto ser autólogas en el sentido estricto, bien introducirse en un individuo genéticamente idéntico. Esto permitirá, por ejemplo, realizar ensayos en cuanto a cualesquiera efectos inesperados de estas células.

**[0037]** Debe entenderse que se ha demostrado que los métodos descritos posteriormente producen células inmunoestimuladoras que, debido a sus marcadores moleculares, parecen estar relacionadas con, si no corresponder a, células que se denominan comúnmente células dendríticas inmunoestimuladoras. Así pues, las células inmunoestimuladoras según la invención se han denominado células dendríticas inmunoestimuladoras.

**[0038]** La presente divulgación también describe células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras autólogas obtenibles mediante un método, como se describe posteriormente, para el uso en la inmunización contra antígenos del cáncer, antígenos víricos, antígenos bacterianos o antígenos fúngicos.

**[0039]** Posteriormente se describirán realizaciones adicionales.

## LEYENDAS DE LAS FIGURAS

### [0040]

Figura 1 Efecto de densidad plaquetaria en el número de interacciones monocito-plaqueta y fenotipo monocítico subsiguiente. Se hicieron pasar monocitos a través de placas paralelas revestidas con plaquetas con una densidad baja, media o alta. (A) El número de interacciones monocito-plaqueta aumentó sustancialmente en las placas revestidas con mayores densidades de plaquetas. (B) Después de una incubación durante la noche, los monocitos que se expusieron a altos niveles de plaquetas tenían una probabilidad significativamente mayor de desarrollar un fenotipo que concordaba con la diferenciación en DC, según se evaluó mediante la expresión de CD83 y HLA-DR de membrana (densidad alta versus media o baja:  $p < 0.0001$ ; densidad media versus baja:  $p < 0.005$ ). Los datos mostrados son las medias (+/- DE) de al menos 6 experimentos independientes. lpf, campo de baja potencia (*low power field*).

Figura 2 Expresión génica después de exposición a plaquetas. Los monocitos se expusieron a niveles altos o bajos de plaquetas en flujo. Después de una incubación durante la noche, se evaluaron las células en cuanto a diferencias en la expresión génica utilizando RT-PCR. La Figura 2 muestra cambios de la expresión génica en monocitos expuestos a altos niveles de plaquetas en relación con los expuestos a bajos niveles. Se hallaron siete genes asociados con la diferenciación en DC y/o función de DC que estaban regulados positivamente, mientras que tres estaban regulados negativamente. De los genes regulados negativamente, GPNMB y FPRL2 tienen las funciones conocidas de disminuir la producción de citocina e inhibir la maduración de DC, respectivamente. De los genes regulados positivamente, todos tienen, bien funciones proinmunitarias, bien papeles variados en la biología de las DC. Véase el texto para una descripción específica de los genes. Los datos mostrados son las medias (+/- DE) de 2 experimentos independientes.

Figura 3 Influencia de las plaquetas en la diferenciación de monocitos en condiciones estáticas. Los monocitos se cocultivaron durante 18 horas con concentraciones bajas, medias o altas de plaquetas en condiciones estáticas en ausencia de flujo. En estas condiciones, no hubo influencia observable de las plaquetas en la diferenciación en DC; todas las condiciones tuvieron como resultado niveles base bajos de células que expresaban marcadores de DC. Además, la activación de plaquetas con trombina en cultivo (línea azul) no provocó una diferencia apreciable en la diferenciación de monocitos en relación con los cultivos que contenían plaquetas no activadas mediante trombina (línea roja).

Figura 4 Influencia de proteína plasmática en la adhesión plaquetaria a placas. Se hicieron pasar plaquetas a través de placas revestidas con fibrinógeno, plasma, fibronectina o RMPI con el nivel de esfuerzo de cizallamiento indicado por el eje x. Las plaquetas en flujo se adhirieron óptimamente a la fibronectina. Para todas las proteínas, la adhesión plaquetaria tuvo lugar al máximo entre 0.5 y 1.0 dinas/cm<sup>2</sup> lpf, campo de baja potencia. Los datos mostrados son las medias (+/- DE) de al menos 2 experimentos independientes.

- Figura 5      Influencia de proteína plasmática en la adhesión plaquetaria a placas revestidas con fibrinógeno (A) o fibronectina (B). Las plaquetas se dejaron sin tratar (base) o bien se trataron previamente, bien con fragmentos RGD (+RGD), bien con fragmentos gamma (+Gamma), y se evaluó su adhesión subsiguiente a fibrinógeno (serie izquierda) y fibronectina (serie derecha). La unión plaquetaria a fibrinógeno estaba disminuida por fragmentos gamma ( $p < 0.05$ ), mientras que la unión a fibronectina estaba disminuida por péptidos RGD ( $p < 0.001$ ). lpf, campo de baja potencia. Los datos mostrados son las medias (+/- DE) de al menos 2 experimentos independientes.
- Figura 6      Proteínas involucradas en interacciones monocito-plaqueta. Se hicieron pasar monocitos entre placas revestidas con plaquetas con un esfuerzo de cizallamiento de pared de 0.5 dinas/cm<sup>2</sup> en las condiciones indicadas por el eje x: las plaquetas se trataron previamente, bien con anti-P-selectina (P-), bien con un control de isotipo (P+); los monocitos se trataron previamente, bien con péptidos RGD (RGD-), bien con un fragmento de control (RGD+). Las interacciones monocito-plaqueta se cuantificaron en cada conjunto de condiciones utilizando microscopía digital y se expresan en la figura como una fracción del máximo observado en condiciones de P+/RGD+. Las interacciones se dividieron en las que duraban menos de 3 segundos (corta duración, barras negras) y las que duraban más de 3 segundos, incluyendo una unión estable (larga duración, barras grises). Todas las condiciones que implicaban un bloqueo con anti-P-selectina (P-) tuvieron como resultado una disminución significativa de las interacciones tanto de corta como de larga duración (\*\*,  $p < 0.01$ ); el bloqueo sólo de RGD (RGD-) tuvo como resultado una disminución significativa de las interacciones de larga duración (\*,  $p < 0.05$ ), pero ningún cambio en las interacciones de corta duración. Los datos mostrados son las medias (+/- DE) de 3 experimentos independientes.
- Figura 7      Efecto de exposición a p-selectina sobre integrinas monocíticas. Se revistieron placas de plástico con plaquetas con la densidad relativa indicada por el eje x. Luego, las plaquetas se trataron previamente con anti-p-selectina (línea discontinua) o un control de isotipo (línea gris), o no recibieron tratamiento previo (línea negra). Se hicieron pasar monocitos a través de las placas a 0.5 dinas/cm<sup>2</sup> y luego se evaluaron éstos inmediatamente mediante citometría de flujo en cuanto a la expresión de integrinas  $\beta 1$  activas. El eje y indica el porcentaje de monocitos que se unieron a un anticuerpo dirigido a un epítipo expuesto sólo cuando la integrina está en la conformación abierta. Los datos mostrados son las medias (+/- DE) de 3 experimentos independientes.
- Figura 8      Efecto de exposición a P-selectina sobre el fenotipo monocítico después de una incubación durante la noche. Unas placas revestidas con plaquetas, bien no se trataron (primera columna), bien se trataron previamente con un control de isotipo (segunda columna) o anti-P-selectina (tercera columna). Se hicieron pasar monocitos a través de las placas a 0.5 dinas/cm<sup>2</sup> y luego se incubaron éstos durante la noche. El eje y indica el porcentaje de monocitos que desarrollaron un fenotipo que concordaba con la diferenciación en DC, es decir, HLA-DR+/CD83+ de membrana. Los datos mostrados son las medias (+/- DE) de 3 experimentos independientes.
- Figura 9      Mecanismo propuesto para la inducción de diferenciación de monocitos en DC. Sobre la base de los datos presentados en este manuscrito, se postula la siguiente secuencia de acontecimientos: (1) el fibrinógeno plasmático reviste la superficie de plástico de la cámara de flujo; (2) a través de su receptor  $\alpha IIb\beta 3$ , las plaquetas no activadas se unen al componente gamma del fibrinógeno inmovilizado; (3) las plaquetas se activan y expresan instantáneamente P-selectina preformada y otras proteínas de superficie; (4) los monocitos que se han hecho pasar se unen de manera transitoria a P-selectina a través de PSGL-1, provocando una activación parcial de los monocitos y cambios de conformación en el receptor de integrina; (5) los monocitos parcialmente activados, ahora capaces de interacciones adicionales, se unen a ligandos adicionales expresados por plaquetas, incluyendo los que contienen dominios RGD; (6) finalmente, así influidos, los monocitos entran eficazmente en la vía madurativa de DC en un plazo de 18 horas. Cabe señalar que, *in vivo*, la etapa (1) anterior puede verse sustituida fisiológicamente por señales inflamatorias procedentes de la acción de tejido sobre el endotelio local, haciendo que reclute y active plaquetas de una manera similar.
- Figura 10:    La expresión de GILZ se regula negativamente con rapidez a medida que los monocitos se diferencian en MoDC inmaduras, y se regula positivamente después de una exposición a dexametasona. A.) La

expresión de ARNm de GILZ en CD11c+ MoDC se presenta como un cambio múltiplo (*fold change*) en relación con monocitos recién aislados. B.) Intensidades medias de fluorescencia para marcadores intracelulares y de superficie celular después de 0 y 36 hr. C.) La expresión de ARNm de GILZ en CD11c+ MoDC después de 24 hr. se presenta como un cambio múltiplo en relación con MoDC que no recibieron dexametasona. D.) La expresión de ARNm de GILZ en CD11c+ MoDC se presenta como un cambio múltiplo en relación con MoDC en el momento 0 hr. E.) La expresión de ARNm de GILZ en CD11c+ MoDC después de 24 hr. se presenta como un cambio múltiplo en relación con MoDC no tratadas. F.) La expresión de ARNm de GILZ en CD11c+ MoDC se presenta como un cambio múltiplo en relación con MoDC no tratadas. Todos los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar para un mínimo de 3 experimentos independientes. Para la expresión génica diferencial: \* cambio múltiplo  $\geq 2.5$  y  $p < 0.05$ , \*\* cambio múltiplo  $\geq 2.5$  y  $p < 0.01$ , \*\*\* cambio múltiplo  $\geq 2.5$  y  $p < 0.001$

Figura 11: El 8-MOP más luz UVA regulan positivamente GILZ en MoDC inmaduras de una manera dependiente de la dosis. A.) La expresión de GILZ se presenta como una función de la concentración de 8-MOP a 1 J/cm<sup>2</sup> y 2 J/cm<sup>2</sup> de luz UVA. La expresión de ARNm de GILZ en CD11c+ MoDC 24 hr. después del tratamiento con PUVA se presenta como un cambio múltiplo en relación con MoDC que no recibieron 8-MOP. B.) La expresión de GILZ se presenta como una función de la concentración de 8-MOP multiplicada por la dosis de UVA. C.) El porcentaje de células CD11c+ apoptóticas tempranas después de 24 hr. D.) El porcentaje de células CD11c+ apoptóticas tardías después de 24 hr. E.) Se muestran gráficos de puntos de células seleccionadas CD11c+ para dosis de UVA de 1 J/cm<sup>2</sup> y 2 J/cm<sup>2</sup> para 1 experimento representativo de 4. Se indica el porcentaje de células CD11c+ que presentan fenotipos Anexina-V+/7-AAD- o Anexina-V+/7-AAD+. El porcentaje de F.) células CD11c+ y G.) células CD3+ que expresaban marcadores apoptóticos tempranos y tardíos se cuantificó 24 hr. después del tratamiento con 8-MOP (100 ng/mL) y luz UVA (1 J/cm<sup>2</sup>). Todos los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de al menos 4 experimentos independientes. Para la expresión génica diferencial: \* cambio múltiplo  $\geq 2.5$  y  $p < 0.05$ , \*\* cambio múltiplo  $\geq 2.5$  y  $p < 0.01$

Figura 12: El 8-MOP más luz UVA regulan negativamente CD83, CD80 y CD86 y regulan positivamente HLA-DR en MoDC inmaduras de una manera dependiente de la dosis. Las intensidades relativas de fluorescencia para expresión de membrana de A.) HLA-DR y CD83, y B.) CD80 y CD86, se presentan como una función de la concentración de 8-MOP (0 a 200 ng/mL) multiplicada por la dosis de UVA (1 o 2 J/cm<sup>2</sup>) 24 hr. después del tratamiento con PUVA. Como controles sirvieron MoDC no tratadas, a las que se asignó un valor RFI de 1. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 4 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

Figura 13: Las MoDC inmaduras expuestas a linfocitos apoptóticos regulan positivamente GILZ. A.) La expresión de ARNm de GILZ en CD11c+ MoDC 24 hr. después de un cocultivo se presenta como un cambio múltiplo en relación con MoDC no tratadas que se cultivaron solas. B.) La expresión de ARNm de GILZ en CD11c+ MoDC 24 hr. después de un cocultivo se presenta como un cambio múltiplo en relación con MoDC no tratadas que se cultivaron solas. C.) Intensidad relativa de fluorescencia para GILZ intracelular 24 hr. después de un cocultivo. Las intensidades relativas de fluorescencia posteriores con respecto a previas a la estimulación con LPS para D.) CD80 y CD86 y E.) HLA-DR y CD83 se calcularon de la siguiente manera: (MFItratadas después de LPS – MFItratadas antes de LPS) / (MFI no tratadas después de LPS – MFI no tratadas antes de LPS). Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar para al menos 4 experimentos independientes. Para la expresión génica diferencial: \* cambio múltiplo  $\geq 2.5$  y  $p < 0.05$

Figura 14: Las MoDC que expresan GILZ aumentan la producción de IL-10 y disminuyen la producción de diversas citocinas y quimiocinas proinflamatorias. 24 hr. después de una estimulación con LPS, se cosecharon sobrenadantes de cultivo para una cuantificación de las citocinas mediante inmunoensayos multiplex con perlas magnéticas para A.) IL-10 y las citocinas proinflamatorias B.) IL-12p70 e IFN- $\gamma$ , C.) IL-6 y TNF- $\alpha$ . El mismo análisis se realizó para las quimiocinas proinflamatorias D.) IL-8, y E.) MCP-1, MIP-1 $\beta$  y RANTES. Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  en comparación con el grupo de MoDC no tratadas.

Figura 15: El silenciamiento de GILZ mediado por ARNi<sup>p</sup> anula la relación IL-10 a IL-12p70 aumentada característica de DC tolerogénicas. A.) La expresión de ARNm de GILZ se presenta como cambio

múltiplo en comparación con MoDC no tratadas que se habían cultivado solas. \* cambio múltiplo  $\geq 2.5$  y  $p < 0.05$ . B.) Cuantificación de niveles de proteínas IL-10 e IL-12p70 en sobrenadantes de cultivo después de una estimulación con LPS. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , en comparación con MoDC tratadas de forma idéntica no transfectadas con ARNip.

Figura 16: Representa el flujo de monocitos en un proceso de FEC clásico en presencia de UVA y 8-MOP. Los monocitos del centro experimentan menos exposición a UVA que los monocitos hacia las superficies de los canales.

Figura 17: Representa el diseño de los canales del dispositivo utilizado en un proceso de FEC clásico.

Figura 18: a) a d) representan diferentes geometrías de la cámara de flujo de un dispositivo que puede utilizarse para los métodos de la invención.

Figura 19: A) representa la geometría de un dispositivo utilizado en algunos de los ejemplos. B) representa la geometría de un dispositivo alternativo.

Figura 20: Representa el aumento de la expresión de HLA-DR tras la activación física de monocitos a través de un dispositivo de la Figura 19.

Figura 21: Representa el aumento de la complejidad FSC/SSC tras la activación física de monocitos a través de un dispositivo de la Figura 19.

Figura 22: Representa el aumento de la complejidad FSC/SSC tras la activación física de monocitos mediante un paso a través de un dispositivo de la Figura 19.

Figura 23: Representa el aumento de la expresión de HLA-DR, CD86, ICAM-1, PLAUR y/o la complejidad FSC/SSC tras la activación física de monocitos a través de un dispositivo de la Figura 19.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

**[0041]** Antes de describir la invención en detalle con respecto a algunas de sus realizaciones preferidas, se proporcionan las siguientes definiciones generales.

**[0042]** La presente invención, como se describe a continuación de forma ilustrativa, puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualesquiera elemento o elementos, limitación o limitaciones no divulgados específicamente en la presente memoria.

**[0043]** La presente invención se describirá con respecto a realizaciones concretas y con referencia a ciertas figuras, pero la invención no está limitada a las mismas, sino sólo por las reivindicaciones.

**[0044]** Donde se utilice la expresión "que comprende" en la presente descripción y las reivindicaciones, dicha expresión no excluye otros elementos. Para los fines de la presente invención, la expresión "que consiste en" se considera una realización preferida de la expresión "que comprende". Si posteriormente un grupo se define como que comprende al menos cierto número de realizaciones, esto debe entenderse también que divulga un grupo que preferiblemente consiste sólo en estas realizaciones.

**[0045]** Para los fines de la presente invención, el término "obtenido" se considera una realización preferida del término "obtenible". Si posteriormente, por ejemplo, un anticuerpo se define como obtenible de una fuente específica, esto debe entenderse también que divulga un anticuerpo que se obtiene de esta fuente.

**[0046]** Donde se use un artículo indefinido o definido a la hora de referirse a un sustantivo en singular, por ejemplo, "un", "una", "el" o "la", esto incluye un plural de ese sustantivo, a no ser que se indique específicamente otra cosa. La expresión "alrededor de" o el término "aproximadamente" en el contexto de la presente invención indican un intervalo de precisión que el experto en la técnica entenderá que aún asegura el efecto técnico de la característica en cuestión.

La expresión y el término indican típicamente una desviación del valor numérico indicado de  $\pm 20\%$ , preferiblemente  $\pm 15\%$ , más preferiblemente  $\pm 10\%$  y aun más preferiblemente  $\pm 5\%$ .

5 **[0047]** Además, los términos "primero", "segundo", "tercero" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)" o "(i)", "(ii)", "(iii)", "(iv)" etc. y similares en la descripción y en las reivindicaciones se utilizan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Debe entenderse que los términos así utilizados son intercambiables en las circunstancias adecuadas y que las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria pueden funcionar en secuencias distintas a las descritas o ilustradas en la presente memoria.

10 **[0048]** En caso de que los términos "primero", "segundo", "tercero" o "(a)", "(b)", "(c)", "(d)" o "(i)", "(ii)", "(iii)", "(iv)" etc. se refieran a etapas de un método o uso o ensayo, no existe coherencia de tiempo o intervalos de tiempo entre las etapas, a no ser que se indique lo contrario, es decir, las etapas pueden llevarse a cabo simultáneamente o puede haber intervalos de tiempo de segundos, minutos, horas, días, semanas, meses o incluso años entre tales etapas, a no ser que se indique lo contrario en la solicitud tal como se expone anterior o posteriormente en la presente memoria.

15 **[0049]** Los términos técnicos se utilizan con su sentido común. Si se da un significado específico a ciertos términos, se proporcionarán a continuación definiciones de los términos en cuyo contexto se utilizan los términos.

20 **[0050]** Como ya se ha mencionado, la presente invención está basada en cierta medida en datos presentados posteriormente en la presente memoria, que para un dispositivo miniaturizado permitieron (i) imitar algunos aspectos del procedimiento de FEC clásico, (ii) aclarar el mecanismo celular y molecular de inducción de diferenciación de monocitos en células dendríticas inmunoestimuladoras en una cantidad extracorpórea de sangre. Como se muestra mediante los experimentos descritos posteriormente, estas células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras pueden caracterizarse por una expresión de marcadores moleculares indicativos de células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. Los datos también demuestran que las condiciones que conducen a una expresión aumentada de Cremallera de Leucina inducida por Glucocorticoide (GILZ) permitirán favorablemente una diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunosupresoras. Para los fines de la presente invención, tales células dendríticas autólogas inmunosupresoras se denominan también células dendríticas autólogas inmunoinhibidoras, células dendríticas autólogas tolerogénicas o células dendríticas autólogas truncadas. Estos datos demuestran que la activación de plaquetas y la unión de monocitos a tales plaquetas activadas en condiciones de fuerza de cizallamiento realizadas de manera secuencial son esenciales para obtener células dendríticas inmunoestimuladoras. Además, estos hallazgos permiten inmediatamente un enfoque racionalizado para obtener células dendríticas inmunoestimuladoras. Dado que es posible imitar y analizar minuciosamente la serie de acontecimientos moleculares que conduce a la formación de células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras y células dendríticas autólogas inmunosupresoras obtenidas en el proceso de FEC clásico, ahora es posible diseñar dispositivos y, más en particular, cámaras de flujo que permitan analizar minuciosamente en mayor medida los acontecimientos moleculares que conducen a la diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras a una escala adecuada para fines de investigación, pero también que permitan obtener tales células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras para fines terapéuticos. Esto se explicará más detalladamente.

40 **[0051]** En el procedimiento de FEC clásico, típicamente se obtienen de 2.5 L a 6 L de sangre de pacientes que padecen CTLC mediante aféresis, tal como leucoféresis. Esta cantidad extracorpórea de sangre, que típicamente se procesa mediante aféresis, tal como leucoféresis, para obtener un volumen final de aproximadamente 200 ml a 500 ml que comprende leucocitos, incluyendo monocitos, así como componentes plasmáticos, plaquetas y células T cancerosas, se hace pasar luego bajo esfuerzo de cizallamiento a través de un dispositivo de fotoféresis que tiene canales de plástico transparentes junto con el fármaco fotoactivable 8-MOP. Esta cantidad extracorpórea de sangre que comprende 8-MOP se irradia entonces exponiendo los canales transparentes a UV-A con una longitud de onda de 315 a 380 nm. La cantidad extracorpórea de sangre irradiada se reintroduce después en el paciente. Originalmente se planteó la hipótesis de que los efectos beneficiosos de este procedimiento en el curso del CTLC en algunos de los pacientes tratados eran el resultado de la destrucción de células T cancerosas. Basándose en esta hipótesis, se supuso que los pacientes tendrían que someterse a ciclos repetidos de FEC. Sin embargo, para algunos de los pacientes se observaron efectos beneficiosos a largo plazo que volvían superfluo el tratamiento repetido y, posteriormente, se hallaron efectos interesantes y parcialmente no conciliables, que podrían explicar algunos de los resultados positivos de la FEC para el tratamiento del CTLC.

55 **[0052]** Por ejemplo, como se describe en el documento US 6,524,855, se observó una inducción de DC en la cantidad extracorpórea de sangre y se planteó la hipótesis de que algunos de los efectos beneficiosos de la FEC en el CTLC

eran el resultado de antígenos específicos de cáncer expulsados por células T cancerosas como consecuencia de la apoptosis inducida por 8-MOP de estas células y una carga de DC, que habían empezado a diferenciarse, con estos antígenos. Se supuso que la reintroducción de la cantidad extracorpórea de sangre que comprendía tales DC autólogas cargadas con antígeno de cáncer proporcionaba un efecto terapéutico duradero a largo plazo similar a una vacunación. Sin embargo, al mismo tiempo se observó que se formaban, así llamadas, DC “truncadas” durante el procedimiento de FEC, que no proporcionaban un efecto inmunoestimulador, sino más bien el opuesto, concretamente un efecto inmunosupresor. La inducción de tales tipos diferentes de DC con efectos opuestos mediante el mismo proceso era desconcertante y, desde un punto de vista práctico, ponía barreras en cuanto a un uso racionalizado de la FEC para obtener DC inmunoestimuladoras o inmunosupresoras. Además, la necesidad de aféresis, tal como leucoféresis, para obtener una cantidad suficiente de sangre extracorpórea es otro factor que afecta negativamente la calidad del tratamiento para los pacientes.

**[0053]** Los datos presentados posteriormente en la presente memoria sugieren que el esfuerzo de cizallamiento es en principio responsable de la activación global de monocitos y la inducción de DC. Utilizando, por ejemplo, el modelo miniaturizado de dispositivo descrito posteriormente, se demostró que la inducción de DC inmunoestimuladoras ocurre aunque se usen cantidades sustancialmente menores de sangre extracorpórea, que no se ha obtenido mediante aféresis, tal como leucoféresis, aunque no se añada 8-MOP a la cantidad extracorpórea de sangre y aunque no tenga lugar una irradiación con UV-A. Así pues, la inducción de DC ocurrió a pesar de la omisión de etapas fundamentales del procedimiento de FEC clásico. Sin embargo, el esfuerzo de cizallamiento parece ser un factor crucial para obtener DC inmunoestimuladoras. Otras etapas con una influencia positiva en la inducción de la formación de DC parecen ser la activación de plaquetas mediante componentes plasmáticos y la activación de monocitos mediante tales plaquetas activadas. Los datos sugieren además que, si tiene lugar una inducción de formación de DC inducida por esfuerzo de cizallamiento en presencia de 8-MOP e irradiación con UVA, la expresión de la Cremallera de Leucina inducida por Glucocorticoide (GILZ) aumenta, lo que a su vez activa una vía que conduce a la formación de DC truncadas, es decir DC tolerogénicas inmunosupresoras (véase el Ejemplo 2). El hecho de que la inducción de DC inmunoestimuladoras inducida por esfuerzo de cizallamiento pudiera lograrse aplicando esfuerzo de cizallamiento sin la adición de 8-MOP y sin irradiación con UV-A sugiere además que en el procedimiento de FEC clásico, debido a las dimensiones de los canales de plástico, parte de las DC inducidas inicialmente por esfuerzo de cizallamiento no se irradiaban eficazmente, con la consecuencia de que estas DC podrían desarrollarse posteriormente en DC inmunoestimuladoras (véase la Figura 16). Estos datos previos se obtuvieron utilizando un dispositivo que tenía la arquitectura general de la Figura 17. Sin embargo, en la FEC clásica y los procedimientos similares a la FEC, se obtenían mezclas de células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras y autólogas inmunosupresoras. Sobre la base de los datos presentados posteriormente en la presente memoria, ahora es posible, por ejemplo, prescindir de algunos de los requisitos de la FEC y los procesos similares a la FEC de la técnica anterior, por ejemplo, utilizar grandes cantidades de sangre que necesita ser procesada mediante aféresis, tal como leucoféresis. Además, ahora es posible adaptar deliberadamente los parámetros de proceso y el diseño del dispositivo, que se utiliza para ejercer una fuerza física sobre los monocitos, para obtener deliberadamente células dendríticas, bien autólogas inmunoestimuladoras, bien autólogas inmunosupresoras.

**[0054]** El método descrito posteriormente se realiza sin necesidad de cócteles moleculares para lograr la maduración y la diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. Además, dado que la invención está basada en inducir una diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero, el proceso de diferenciación no está limitado a los acontecimientos moleculares que pueden desencadenarse mediante cócteles de citocinas típicos. Más bien, las células dendríticas obtenibles con los métodos descritos posteriormente parecen tener patrones moleculares más complejos, aunque sincronizados, que parecen representativos de una funcionalidad más amplia de estas células dendríticas.

**[0055]** La presente invención se refiere a un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas inmunoestimuladoras, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

- a) someter dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a una fuerza de cizallamiento haciéndola pasar a través de una cámara de flujo;
- b) realizándose el método en ausencia de agentes fotoactivables tales como 8-MOP y UVA; e
- c) identificándose la diferenciación de monocitos procedentes de dicha muestra de sangre en células dendríticas inmunoestimuladoras mediante una expresión aumentada de al menos un marcador molecular HLA-DR, CD83, CD86, ICAM-1 o PLAUR cuando se comparan las células dendríticas autólogas

inmunoestimuladoras con los monocitos dentro de la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero. a)

5 **[0056]** Debe entenderse que la invención, así como todas las realizaciones descritas posteriormente, pueden utilizarse preferiblemente para proporcionar células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, concretamente si las células dendríticas inmunoestimuladoras obtenidas se reintroducen posteriormente en el mismo donante. Esto puede realizarse de una manera continua o discontinua, donde las células dendríticas se cultivan durante periodos de tiempo prolongados antes de reintroducirlas en el donante. Dado que ésta será la aplicación preferida, todas las realizaciones expuestas posteriormente se refieren a células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. Sin embargo, debe entenderse que la exposición de tales realizaciones incluye siempre el escenario en el que la invención se usa para hacer células dendríticas inmunoestimuladoras como tales y en el que sólo la posterior administración de estas células las convertirá en células dendríticas autólogas potencialmente inmunoestimuladoras.

15 **[0057]** Como ya se ha mencionado, se ha demostrado que los métodos descritos posteriormente producen células inmunoestimuladoras e inmunosupresoras que, debido a sus marcadores moleculares, parecen estar relacionadas con, si no corresponder a, células que se denominan comúnmente células dendríticas. Así pues, las células inmunoestimuladoras según la invención se han denominado células dendríticas inmunoestimuladoras.

20 **[0058]** La expresión "células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras" se refiere por lo tanto a células que pueden obtenerse de monocitos tratando los monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero como se describe en la presente memoria e identificadas mediante al menos uno de los marcadores moleculares HLA-DR, CD83, CD86, ICAM-1 o PLAUR como se describe posteriormente. Estos marcadores moleculares se han expuesto en la bibliografía para células dendríticas que pueden presentar antígenos a modo de CPH I y CPH II. Debe entenderse que las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras obtenibles mediante los métodos descritos en la presente memoria e identificadas mediante los marcadores moleculares descritos en la presente memoria pueden considerarse como células dendríticas que ya se han diferenciado suficientemente y han internalizado e incluso presentan, por ejemplo, antígenos específicos de tumor de células apoptóticas tales como células T citotóxicas, que están contenidos en la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre respectiva de un individuo mamífero, o, por ejemplo, antígenos víricos o bacterianos, que están contenidos en la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre respectiva de un individuo mamífero, de tal manera que pueden considerarse células dendríticas presentadoras de antígeno autólogas inmunoestimuladoras. Sin embargo, el proceso también puede realizarse de tal manera que las células dendríticas expresen marcadores moleculares indicativos de células dendríticas inmunoestimuladoras que no hayan internalizado o presenten aún antígenos. Debe entenderse que, donde se mencionen células dendríticas en la presente memoria, esto se refiere a células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras que tienen la capacidad de presentar, por ejemplo, antígenos específicos de enfermedad en sus superficies después de que estas células se hayan puesto en contacto con tales antígenos.

35 **[0059]** La presente invención permite la producción preferencial de DC inmunoestimuladoras en relación con DC inmunosupresoras. La producción de células dendríticas inmunoestimuladoras con preferencia sobre las células dendríticas inmunosupresoras significa que, partiendo de una cantidad extracorpórea de muestra de sangre, es posible obtener selectivamente más células dendríticas inmunoestimuladoras que DC inmunosupresoras en comparación con una situación en la que, por ejemplo, la misma cantidad extracorpórea de muestra de sangre se sometiese a un procedimiento de FEC clásico. Aunque la producción de DC inmunoestimuladoras se producirá de manera preferente sobre la producción de DC inmunosupresoras, aún pueden estar presentes DC inmunosupresoras después de que se hayan realizado los métodos según la invención. Sin embargo, la presente invención proporciona los parámetros y variables que pueden manipularse para sesgar la producción de una población de células dendríticas sobre la otra. La producción de células dendríticas inmunoestimuladoras se logra no utilizando 8-MOP y UVA y cultivando las células dendríticas inmunoestimuladoras obtenidas durante periodos de tiempo prolongados, tales como 1, 2, 3 o 4 días. De esta manera, la formación de células dendríticas inmunosupresoras puede reducirse a un nivel clínicamente aceptable. Además, las células dendríticas inmunosupresoras finalmente remanentes pueden eliminarse mediante, por ejemplo, purificación por afinidad contra marcadores moleculares indicativos de células dendríticas inmunosupresoras.

50 **[0060]** Como se describe en los ejemplos, los marcadores moleculares indicativos de células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras obtenibles mediante los métodos descritos en la presente memoria se identificaron sometiendo monocitos contenidos en la cantidad extracorpórea de muestras de sangre de individuos mamíferos obtenidas de voluntarios sanos al proceso, utilizando un dispositivo miniaturizado (véanse marcadores 88 a 99 de la Tabla 1). Además, como también se describe en el ejemplo, los marcadores moleculares indicativos de células dendríticas

5 autólogas inmunoestimuladoras se identificaron sometiendo monocitos contenidos en la cantidad extracorpórea de muestras de sangre de individuos mamíferos obtenidas, bien de voluntarios sanos, bien de pacientes que padecían CTCL o enfermedad de ICH (EICH), a un proceso de FEC (véanse los marcadores 1 a 87 de la Tabla 1). Luego, se aislaron las células dendríticas y se analizó la expresión regulada positivamente de marcadores moleculares de los cuales se sabe o se sospecha que desempeñan un papel en las células dendríticas inmunoestimuladoras. Algunos de los marcadores identificados para el proceso de FEC, que se supone que conduce a una mezcla compleja de células dendríticas inmunoestimuladoras e inmunosupresoras, son los mismos que los observados para las células dendríticas obtenidas mediante el proceso con el dispositivo miniaturizado, que debería conducir a células dendríticas inmunoestimuladoras solamente. Así pues, en la medida en que el proceso de FEC conduce a una regulación positiva de marcadores moleculares que pueden asociarse a la función de las células dendríticas, parece justificado suponer que estos marcadores también serán adecuados para identificar células dendríticas inmunoestimuladoras tal como pueden obtenerse mediante los procesos descritos en la presente memoria, por ejemplo, con el dispositivo miniaturizado. Se identificó un conjunto de, en total, 99 marcadores moleculares como regulados positivamente para células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras obtenibles mediante los métodos descritos en la presente memoria. Este conjunto puede ampliarse con marcadores moleculares adicionales en el futuro a través de un análisis comparable.

15 [0061] Así pues, los datos de los ejemplos 1 y 3 condujeron a un conjunto de 99 marcadores, que se consideran indicativos de células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. Estos marcadores están resumidos en la Tabla 1.

20

Tabla 1

Nro.	Marcador	ID de gen NCBI nro.	ARNm REF	SEQ ID nro.
1	ABCA1	19	NM_005502.3	1
2	ACVR1B	91	NM_004302.4	2
3	ANPEP	290	NM_001150.2	3
4	AQP9	366	NM_020980.3	4
5	ATP6V0B	533	NM_001039457.1	5
6	BASP1	10409	NM_001271606.1	6
7	BEST1	7439	NM_001139443.1	7
8	CD63	967	NM_001257389.1	8
9	CD68	968	NM_001040059.1	9
10	CDCP1	64866	NM_022842.3	10
11	CPM	1368	NM_001005502.2	11
12	CRK	1398	NM_005206.4	12
13	CSF2RA	1438	NM_001161529.1	13
14	CTNND1	1500	NM_001085458.1	14
15	CTSB	1508	NM_001908.3	15
16	CXCL16	58191	NM_001100812.1	16
17	EMP1	2012	NM_001423.2	17
18	ENG	2022	NM_000118.2	18
19	EPB41L3	23136	NM_012307.2	19
20	FLOT1	10211	NM_005803.2	20
21	GNA15	2769	NM_002068.2	21
22	GPNUMB	93695	NM_053110.4	22
23	GPR137B	83924	NM_031999.2	23
24	GPR157	269604	NM_177366.3	24
25	HEXB	3074	NM_000521.3	25
26	HOMER3	9454	NM_001145721.1	26
27	ICAM1	3383	NM_000201.2	27
28	IL1R1	3554	NM_000877.2	28
29	IRAK1	3654	NM_001025242.1	29
30	ITGA5	3678	NM_002205.2	30
31	ITGB8	3696	NM_002214.2	31
32	KCTD11	147040	NM_001002914.2	32

ES 2 987 346 T3

33	LAMP2	3920	NM_001122606.1	33
34	LEPROT	54741	NM_001198681.1	34
35	LGALS3	3958	NM_001177388.1	35
36	LILRB4	11006	NM_001081438.1	36
37	MARCKSL1	65108	NM_023009.6	37
38	MCOLN1	57192	NM_020533.2	38
39	MFAP3	4238	NM_001135037.1	39
40	MGAT4B	11282	NM_014275.4	40
41	MR1	3140	NM_001194999.1	41
42	MRAS	22808	NM_001085049.2	42
43	MSR1	4481	NM_002445.3	43
44	NEU1	4758	NM_000434.3	44
45	NPC1	4864	NM_000271.4	45
46	OLR1 (LOX1)	4973	NM_001172632.1	46
47	OMG	4974	NM_002544.4	47
48	P2RX4	5025	NM_001256796.1	48
49	PI4K2A	55361	NM_018425.2	49
50	PLAUR	5329	NM_001005376.2	50
51	PMP22	5376	NM_000304.2	51
52	PPAP2B	8613	NM_003713.4	52
53	PSEN1	5663	NM_000021.3	53
54	PVRL2	5819	NM_001042724.1	54
55	RAB13	5872	NM_002870.2	55
56	RAB8B	51762	NM_016530.2	56
57	RAB9A	9367	NM_001195328.1	57
58	RALA	5898	NM_005402.3	58
59	RHEB	6009	NM_005614.3	59
60	RNASE1	6035	NM_002933.4	60
61	SC5DL	6309	NM_001024956.2	61
62	SDC2	6383	NM_002998.3	62
63	SEMA6B	10501	NM_032108.3	63
64	SIRPA	140885	NM_001040022.1	64
65	SLC17A5	26503	NM_012434.4	65
66	SLC1A4	6509	NM_001193493.1	66
67	SLC22A4	6583	NM_003059.2	67
68	SLC31A1	1317	NM_001859.3	68
69	SLC35E3	55508	NM_018656.2	69
70	SLC39A6	25800	NM_001099406.1	70
71	SLC6A6	6533	NM_001134367.1	71
72	SLC6A8	6535	NM_001142805.1	72
73	SLC7A11	23657	NM_014331.3	73
74	STX3	6809	NM_001178040.1	74
75	STX6	10228	NM_005819.4	75
76	TM9SF1	10548	NM_001014842.1	76
77	TMBIM1	64114	NM_022152.4	77
78	TMEM33	55161	NM_018126.2	78
79	TNFRSF10B	8795	NM_003842.4	79
80	TNFRSF11A	8792	NM_001270949.1	80
81	TNFRSF1A	7132	NM_001065.3	81
82	TNFRSF1B	7133	NM_001066.2	82
83	TNFSF14	8740	NM_003807.3	83
84	TNFSF9	8744	NM_003811.3	84
85	TRIP10	9322	NM_004240.2	85
86	TRIP6	7205	NM_003302.2	86

## ES 2 987 346 T3

87	YKT6	10652	NM_006555.3	87
88	DC-LAMP (LAMP3)	27074	NM_014398.3	88
89	CLEC5A	23601	NM_013252.2	89
90	SPC2 (PCSK2)	5126	NM_002594.3	90
91	THBS1	7057	NM_003246.2	91
92	CD14	929	NM_000591.3	92
93	CD40	958	NM_001250.4	93
94	CD80	941	NM_005191.3	94
95	CCR7	1236	NM_001838.3	95
96	CD83	9308	NM_001251901.1	96
97	Decisina ADAM	27299	NM_014479.3	97
98	FPRL2 (FPR3)	2359	NM_002030.3	98
99	CD86	942	NM_006889.4	99

**[0062]** De los 87 genes (marcadores 1 a 87 de la Tabla 1) que representan marcadores de superficie/mediadores funcionales de la función de las DC inmunoestimuladoras, 66 resultaron estar identificados de manera única en las células dendríticas del proceso inducido por FEC (paso en placas, cultivo durante la noche, véase el ejemplo), después de una comparación con bases de datos de expresión de células dendríticas "clásicas". Éstos son: ABCA1, ACVR1B, ATP6V0B, BASP1, BEST1, CPM, CRK, CSF2RA, CTNND1, CTSB, CXCL16, ENG, FLOT1, GNA15, GPR137B, GPR157, HEXB, HOMER3, ICAM1, IRAK1, ITGA5, ITGB8, KCTD11, LAMP2, LEPROT, MARCKSL1, MCOLN1, MFAP3, MGAT4B, MR1, MRAS, MSR1, NEU1, OLR1, OMG, PI4K2A, PLAUR, PMP22, PVRL2, RAB13, RAB8B, RAB9A, RALA, RNASE1, SC5DL, SEMA6B, SIRPA, SLC1A4, SLC22A4, SLC31A1, SLC35E3, SLC39A6, SLC6A6, SLC6A8, STX3, STX6, TM9SF1, TMBIM1, TMEM33, TNFRSF10B, TNFRSF11A, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFSF14, TNFSF9, YKT6.

**[0063]** Por lo tanto, las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras se identifican determinando la expresión de al menos un marcador molecular de HLA-DR, CD83, CD86, ICAM-1 o PLAUR para las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras obtenibles mediante los métodos descritos en la presente memoria y comparando su expresión para monocitos contenidos en la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero. Si se observa una expresión aumentada para células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras versus monocitos, esto es indicativo de la diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras.

**[0064]** Según la presente divulgación, las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras pueden identificarse determinando la expresión para al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más marcadores moleculares adicionales seleccionables de la Tabla 1. Por ejemplo, pueden identificarse células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras determinando la expresión para al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 marcadores moleculares adicionales seleccionables del grupo que comprende PLAUR, NEU1, CTSB, CXCL16, ICAM1, MSR1, OLR1, SIRPA, TNFRSF1A, TNFSF14, TNFSF9, PMB22, CD40, LAMP3, CD80, CCR7, LOX1, CD83, decisina ADAM, FPRL2, GPNMB y/o CD86. Más preferiblemente, pueden identificarse células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras según la presente divulgación determinando la expresión para al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 marcadores moleculares seleccionables del grupo que comprende PLAUR, NEU1, CD80, CCR7, LOX1, CD83, decisina ADAM, FPRL2, GPNMB y/o CD86. Los marcadores más preferidos que se consideran indicativos de células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras según la presente divulgación son PLAUR, NEU1, CD80, CD83 y/o CD86.

**[0065]** Los datos y las conclusiones presentados en la presente memoria sugieren que el proceso de obtener células dendríticas inmunoestimuladoras parece incluir una etapa de activación global de monocitos y una etapa de diferenciación de monocitos en células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras (por ejemplo, células dendríticas). Estas diferentes etapas parecen ser rastreables mediante marcadores moleculares como se ha descrito anteriormente y mediante Complejidad de Dispersión Frontal/Dispersión Lateral (Complejidad FSC/SSC, por sus siglas en inglés) que puede determinarse mediante análisis FACS. Los marcadores moleculares pueden además agruparse según su función conocida como, por ejemplo, marcadores moleculares de presentación de antígeno, marcadores moleculares de adhesión celular, etc. HLA-DR, CD86 y CD 80 pueden considerarse representativos de presentación de antígeno. PLAUR e ICAM-1 pueden considerarse representativos de adhesión celular. Los marcadores como HLA-DR, PLAUR e ICAM-1, así como la complejidad FSC/SSC, pueden considerarse además indicativos de activación

global de monocitos, mientras que la expresión aumentada de, por ejemplo, CD83, decisina ADAM, CD40, CD80, LAMP-3 y CCR7 parece indicativa de diferenciación de monocitos en células dendríticas.

5 **[0066]** Como se ha descrito en la presente memoria, si los métodos se realizan para permitir una expresión aumentada de GILZ (SEQ ID nro.: 100),IDO (indolamina) (SEQ ID nro.: 101), KMO (quinurenina 3-hidroxilasa) (SEQ ID nro.: 102), factor de crecimiento transformador beta (TGFB) (SEQ ID nro.: 103) y/o IL-10 (interleucina 10) (SEQ ID nro.: 104), los monocitos contenidos en la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero no se diferenciarán en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, sino más bien en células dendríticas inmaduras, así llamadas truncadas o inmunosupresoras. Según la presente divulgación, las células dendríticas autólogas  
10 inmunoestimuladoras pueden identificarse no sólo determinando la expresión de los marcadores moleculares antes mencionados, sino también determinando si la expresión de GILZ, IDO, KMO, TGFB y/o IL-10 no está aumentada para células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras versus monocitos. Si se ha determinado una expresión de GILZ, IDO, KMO, TGFB y/o IL-10 aumentada, esto se consideraría indicativo de que se han formado al menos algunas células dendríticas inmunosupresoras. El marcador molecular preferido que se considera indicativo de células  
15 dendríticas inmunosupresoras es actualmente GILZ.

**[0067]** Como se ha mencionado anteriormente, el método, como se describe posteriormente, se realiza sin necesidad de cócteles moleculares para lograr la maduración y la diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas  
20 inmunoestimuladoras. Tales cócteles pueden comprender factores tales como, por ejemplo, IL-4, GM-CSF, LPS, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

**[0068]** Según la presente divulgación, las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, tal como pueden obtenerse mediante los métodos descritos en la presente memoria, pueden por lo tanto identificarse positivamente no sólo mediante marcadores moleculares que son indicativos de células dendríticas inmunoestimuladoras, tales como  
25 PLAUR, CD80 y CD83, sino también mediante la ausencia de una regulación positiva de marcadores moleculares que son indicativos de células dendríticas inmunosupresoras, tales como GILZ. Además, estos dos tipos de células, es decir, células dendríticas inmunoestimuladoras e inmunosupresoras, pueden distinguirse de los monocitos, que se someten a una fuerza de cizallamiento para inducir el proceso de diferenciación de los mismos, determinando la expresión de marcadores moleculares que se consideran indicativos de monocitos, tales como CD33, CD36 y/o  
30 FCGR1a (receptor para el fragmento 1A de IgGfC). Si se halla que la expresión de estos factores está regulada negativamente en comparación con la expresión de los monocitos, antes de que se hayan sometido a una fuerza de cizallamiento y al proceso descrito en la presente memoria, esto se considera entonces indicativo de que los monocitos han entrado en la vía de maduración y diferenciación hacia células dendríticas inmunoestimuladoras y/o inmunosupresoras. Según la presente divulgación, la distinción entre estas, posteriormente, dos poblaciones de  
35 células dendríticas puede hacerse entonces determinando la expresión de marcadores moleculares tales como PLAUR, ICAM-1, CD80, CD83 y GILZ.

**[0069]** Dado que ahora se dispone de la comprensión y correspondientemente de las herramientas, por ejemplo, los marcadores moleculares, para distinguir entre células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras y células dendríticas  
40 autólogas inmunosupresoras, ahora es posible variar deliberadamente tanto el diseño del dispositivo y la cámara de flujo a través de la cual se hacen pasar la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero y, por lo tanto, los monocitos para que experimenten una fuerza de cizallamiento, como los parámetros con los cuales se realiza el proceso de inducir diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, para posibilitar intencionadamente una diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas  
45 inmunoestimuladoras.

**[0070]** Como se ha mencionado anteriormente, una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero se hace pasar a través de una cámara de flujo de un dispositivo, de tal manera que se aplique una fuerza de cizallamiento a dichos monocitos contenidos en dicha muestra de sangre de un individuo mamífero. Las  
50 modificaciones del diseño del dispositivo y la cámara de flujo que influyen en la diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras incluyen una variación de las fuerzas de flujo, una variación de la geometría de la vía de flujo de la cámara de flujo, una variación de las dimensiones de la cámara de flujo, la posibilidad de ajustar la temperatura, la posibilidad de exponer la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero en la cámara de flujo a luz visible, etc. La aplicación de una fuerza de cizallamiento puede lograrse no sólo,  
55 por ejemplo, haciendo pasar una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre a través de una cámara de flujo, sino también colocando tal cantidad extracorpórea de una muestra de sangre en, por ejemplo, una bolsa de plástico

EVA como la obtenible de Macopharma y moviendo o agitando suavemente esta bolsa llena con la muestra de sangre (véase, por ejemplo, Andreu et al., (1994), Trans. Sci., 15(4), 443-454)

5 **[0071]** Como también se ha mencionado anteriormente y se muestra posteriormente, la activación de monocitos y la inducción de diferenciación en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras dependen de la interacción de monocitos con plaquetas activadas y/o componentes plasmáticos específicos en una situación en la que los monocitos experimenten una fuerza de cizallamiento, que puede proporcionarse mediante un dispositivo como se describe posteriormente. Por lo tanto, la variación de los parámetros de proceso incluye variar la naturaleza, la pureza y las concentraciones de componentes plasmáticos; la naturaleza, la pureza y la concentración de plaquetas; el orden de 10 las etapas en el que los componentes plasmáticos y/o las plaquetas se hacen pasar a través de y/o se disponen en la cámara de flujo; la densidad con la que la cámara de flujo se reviste con componentes plasmáticos y/o plaquetas, las fuerzas de flujo con las que la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero y en particular las plaquetas y/o los monocitos se hacen pasar a través de la cámara de flujo de tal dispositivo, la temperatura y/o el tiempo aplicados para hacer pasar la cantidad extracorpórea de la muestra de sangre de un individuo mamífero y en 15 particular las plaquetas y/o los monocitos a través de la cámara de flujo de tal dispositivo, etc.

**[0072]** Ahora se expondrán con más detalle los factores relativos al diseño del dispositivo y la cámara de flujo, así como a los parámetros de proceso, por lo que se refiere a su relevancia para la diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. Debe entenderse que para cualesquiera de las realizaciones expuestas a continuación se logra la diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, identificándose las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras mediante una determinación de la expresión de marcadores moleculares descritos anteriormente. Además, para todas las realizaciones expuestas a continuación, debe entenderse que los monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero se someten a una fuerza de cizallamiento con el fin de permitirles diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, por ejemplo, tras una interacción con plaquetas activadas y/o 20 componentes plasmáticos.

**[0073]** La invención se refiere a un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, en donde, según la reivindicación 1, dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero se somete a una fuerza física haciendo pasar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a través de una cámara de flujo de un dispositivo, que permite ajustar el caudal de dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a través de dicha cámara de flujo de dicho dispositivo de tal manera que se aplique una fuerza de cizallamiento a dichos monocitos contenidos en dicha muestra de sangre de un individuo mamífero. 30 35

**[0074]** En una realización, la invención de la reivindicación 1 se refiere a un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, en donde dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero se somete a una fuerza física haciendo pasar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a través de una cámara de flujo de un dispositivo, que permite ajustar el caudal de dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a través de dicha cámara de flujo de dicho dispositivo de tal manera que se aplique una fuerza de cizallamiento a dichos monocitos contenidos en dicha muestra de sangre de un individuo mamífero, y en donde dicha cámara de flujo de dicho dispositivo tiene un diseño que permite aplicar una fuerza de cizallamiento a dichos monocitos contenidos en dicha muestra de sangre de un individuo mamífero. 40 45

**[0075]** En otra realización, la invención de la reivindicación 1 se refiere a un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, en donde dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero se somete a una fuerza física haciendo pasar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a través de una cámara de flujo de un dispositivo, que permite ajustar el caudal de dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a través de dicha cámara de flujo de dicho dispositivo de tal manera que se aplique una fuerza de cizallamiento a dichos monocitos contenidos en dicha muestra de sangre de un individuo mamífero, y en donde dicho dispositivo permite adicionalmente ajustar al menos un parámetro seleccionado del grupo que comprende temperatura y exposición a luz. 50 55

5 [0076] En otra realización, la invención de la reivindicación 1 se refiere a un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, en donde dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero se somete a una fuerza de cizallamiento haciendo pasar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a través de una cámara de flujo de un dispositivo como se ha mencionado anteriormente y en donde dichos monocitos se activan y se inducen a diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras a través de una interacción con plaquetas activadas y/o componentes plasmáticos.

10 [0077] Por ejemplo, en una realización, la invención de la reivindicación 1 se refiere a un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

- 15 a) aplicar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos a un dispositivo, que está configurado para proporcionar una cámara de flujo a través de la cual puede hacerse pasar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero,
- 20 b) activar plaquetas, que pueden estar comprendidas en dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero o que pueden proporcionarse por separado de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos,
- 25 c) tratar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos en dicho dispositivo aplicando una fuerza física a los monocitos contenidos en dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero de tal manera que dichos monocitos sean activados e inducidos a diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras mediante una unión a dichas plaquetas activadas obtenidas en la etapa b).

30 [0078] En otra realización, la invención de la reivindicación 1 se refiere a un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

- 35 a) aplicar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos a un dispositivo, que está configurado para proporcionar una cámara de flujo a través de la cual puede hacerse pasar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero,
- 40 b) hacer pasar componentes plasmáticos, que pueden estar comprendidos en dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero o que pueden proporcionarse por separado de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero,
- 45 c) tratar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos en dicho dispositivo aplicando una fuerza física a los monocitos contenidos en dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero de tal manera que dichos monocitos sean activados e inducidos a diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras mediante una unión a dichos componentes plasmáticos obtenidos en la etapa b).

45 [0079] En otra realización más, la invención de la reivindicación 1 se refiere a un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

- 50 a) aplicar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos a un dispositivo, que está configurado para proporcionar una cámara de flujo a través de la cual puede hacerse pasar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero,
- 55 b) hacer pasar componentes plasmáticos, que pueden estar comprendidos en dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero o que pueden proporcionarse por separado de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero,
- c) activar plaquetas, que pueden estar comprendidas en dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero o que pueden proporcionarse por separado de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos,

d) tratar dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos en dicho dispositivo aplicando una fuerza física a los monocitos contenidos en dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero de tal manera que dichos monocitos sean activados e inducidos a diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras mediante una unión a dichas plaquetas activadas y/o componentes plasmáticos obtenidos en las etapas b) y c).

**[0080]** En otra realización más, la invención de la reivindicación 1 se refiere a un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:

a) opcionalmente, hacer pasar plasma rico en plaquetas a través de un dispositivo, que está configurado para proporcionar una cámara de flujo a través de la cual puede hacerse pasar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero,

b) aplicar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos a un dispositivo, que está configurado para proporcionar una cámara de flujo a través de la cual puede hacerse pasar dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero,

c) tratar dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos en dicho dispositivo aplicando una fuerza física a los monocitos contenidos en dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero de tal manera que dichos monocitos sean activados e inducidos a diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras opcionalmente mediante una unión a dicho plasma rico en plaquetas de la etapa a).

**[0081]** Como se desprende del experimento descrito en la presente memoria, el método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras funciona óptimamente, si las plaquetas que están comprendidas en dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero se activan y si la cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos y se halla en dicho dispositivo se trata aplicando una fuerza de cizallamiento a los monocitos contenidos en dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero de tal manera que dichos monocitos sean activados e inducidos a diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras mediante una unión a dichas plaquetas activadas. Sin embargo, la activación de monocitos también puede lograrse mediante una interacción directa con componentes plasmáticos, es decir, sin interacción con plaquetas activadas.

**[0082]** Las etapas de activar plaquetas y las subsiguientes activación y diferenciación de monocitos en DC se expondrán a continuación para la realización en la que (i) se hacen pasar componentes plasmáticos, tales como proteínas plasmáticas, a través de la cámara de flujo del dispositivo de manera que estos componentes se adhieran a las paredes de la cámara de flujo, en la que (ii) se hacen pasar plaquetas a través de la cámara de flujo y se activan las mismas mediante una unión a los componentes plasmáticos y en la que (iii) se hacen pasar fracciones que contienen monocitos, tales como una cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos, a través de la cámara de flujo y se activan las mismas para una diferenciación en DC mediante una unión a las plaquetas activadas. Sin embargo, debe entenderse que estas actividades suceden también si la fracción de plasma o las proteínas plasmáticas o los fragmentos de las mismas, la fracción de plaquetas y la fracción que contiene monocitos se hacen pasar simultáneamente a través de los canales o estructuras similares a canales, como es el caso para una fracción de sangre completa si se ha obtenido de la cantidad extracorpórea de sangre como se describe posteriormente. Debe entenderse además que el proceso puede realizarse, aunque no con la misma eficacia, adhiriendo sólo componentes plasmáticos a las paredes de la cámara de flujo y dejando que los monocitos interactúen con los componentes plasmáticos. No obstante, a continuación este aspecto se expondrá para una realización preferida, es decir, en la que se realizan las etapas (i), (ii) y (iii).

**[0083]** Por lo que se refiere a la primera etapa, los componentes plasmáticos, que incluyen proteínas como fibrinógeno o fibronectina, o fragmentos de las mismas como el componente gamma de fibrinógeno, pueden proporcionarse, bien como fracciones obtenidas de la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre, bien en forma purificada a partir de otros recursos, por ejemplo, en forma de proteínas expresadas de manera recombinante. Aunque parece que la activación de plaquetas mediante proteínas plasmáticas tales como el fibrinógeno y la fibronectina es suficiente, de modo que las formas expresadas de manera recombinante de estas proteínas son suficientes, puede preferirse utilizar fracciones de plasma obtenidas de la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre y que comprendan estas

proteínas, dado que estas fracciones de plasma tienen una composición más compleja y pueden comprender todos los componentes plasmáticos que proporcionan una activación óptima de las plaquetas.

5 **[0084]** Las fracciones de proteínas plasmáticas, las proteínas plasmáticas o los fragmentos de las mismas pueden hacerse pasar a través de la cámara de flujo, que puede estar hecha de plástico o materiales no plásticos, tales como  
10 vidrio, con el fin de que se adhieran a las paredes de los canales o estructuras similares a canales. No existe el requisito de que las fracciones de plasma o las proteínas plasmáticas se hagan pasar a través de la cámara de flujo con una fuerza de cizallamiento específica, tal como, por ejemplo, una presión específica. Sin embargo, con el fin de racionalizar el proceso, está previsto hacer pasar las fracciones de plasma o las proteínas plasmáticas a través de la  
15 cámara de flujo con un esfuerzo de cizallamiento comparable, si no idéntico, al esfuerzo de cizallamiento requerido para la activación de monocitos que se describe posteriormente con más detalle. En general, las fracciones de plasma o las proteínas plasmáticas se bombean en primer lugar a través de la cámara de flujo para revestir las superficies de la misma con proteínas plasmáticas, incluyendo fibronectina y fibrinógeno. El caudal de las fracciones de proteínas plasmáticas, de las proteínas plasmáticas o de los fragmentos de las mismas a través de la cámara de flujo se controla para conseguir un nivel deseado de adherencia a las superficies de plástico. Si se desea, el flujo se puede detener durante un periodo de tiempo y el componente plasmático puede "empapar" las superficies de la cámara de flujo. Controlando la velocidad y la regulación del tiempo de la bomba que impulsa los componentes plasmáticos a través de la cámara de flujo, puede controlarse el grado de revestimiento. En una estrategia, las fracciones de plasma o las proteínas plasmáticas se exponen a las superficies de las estructuras de la cámara de flujo durante un periodo  
20 entre aproximadamente 1 y 60 min, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 min, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 min, o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 min. Para mejorar la adherencia de las proteínas plasmáticas a las superficies de la cámara de flujo, el flujo se puede interrumpir temporalmente (durante un tiempo de hasta aproximadamente 60 min), antes de la reanudación, o el caudal puede disminuirse a partir de la velocidad de llenado (hasta 100 ml/minuto) hasta sólo 5 ml/minuto, durante esta fase del procedimiento.

25 **[0085]** Es imaginable también un escenario en el que se utilice un dispositivo con una cámara de flujo para el cual las superficies de la cámara de flujo se hayan revestido previamente con, por ejemplo, proteínas plasmáticas purificadas o fragmentos de las mismas, tal como el componente gamma de fibrinógeno. Tales dispositivos previamente revestidos pueden utilizarse si la totalidad del proceso se realiza en un dispositivo de mano que comprenda un cartucho que proporcione la cámara de flujo, que esté configurado, por ejemplo, para un solo uso. Es imaginable también un  
30 escenario en el que se utilice un dispositivo con una cámara de flujo para el cual las superficies de la cámara de flujo se hayan revestido previamente con, por ejemplo, plasma rico en plaquetas.

35 **[0086]** Una vez que las fracciones de plasma o las proteínas plasmáticas o los fragmentos de las mismas se han hecho pasar a través de los canales o estructuras similares a canales y se han revestido las superficies de los mismos con proteínas plasmáticas, la fracción de plaquetas se hace pasar, por ejemplo, mediante bombeo al interior y a través de los canales o estructuras similares a canales. El caudal y el tiempo de permanencia de las plaquetas dentro de los canales o estructuras similares a canales se seleccionan para permitir que las plaquetas se unan a los componentes plasmáticos o las proteínas o los fragmentos de las mismas que se han adherido antes a las superficies de los canales o estructuras similares a canales y así se activen.

40 **[0087]** Los datos presentados en la presente memoria sugieren que la activación de plaquetas mediante componentes plasmáticos es un proceso secuencial en el que las plaquetas inactivadas se unen en primer lugar al componente gamma de fibronectina, se activan así y pueden entonces unirse al motivo RGD (arginina, glicina, ácido aspártico) que se encuentra en muchas proteínas plasmáticas, tales como fibronectina o fibrinógeno. Si se utilizan proteínas plasmáticas purificadas y/o expresadas de manera recombinante o fragmentos de las mismas para la activación de plaquetas, puede preverse por lo tanto revestir previamente los canales o estructuras similares a canales con al menos el componente gamma de fibrinógeno y opcionalmente de forma adicional con péptidos RGD. Estos fragmentos de proteínas plasmáticas y péptidos pueden permitir una activación eficaz de plaquetas y, al mismo tiempo, un control  
45 óptimo del proceso de revestimiento de las superficies de los canales o estructuras similares a canales. Por supuesto, todos estos componentes están presentes si se utiliza para el revestimiento y la activación una fracción de plasma obtenida de la cantidad extracorpórea de sangre.

50 **[0088]** Para lograr una unión eficaz de las plaquetas a los componentes plasmáticos y, de este modo, una activación, el caudal puede ajustarse hacia arriba o hacia abajo en comparación con la etapa de revestimiento de los componentes plasmáticos, o el flujo puede detenerse durante un periodo de tiempo, para conseguir el nivel deseado de plaquetas unidas a los componentes plasmáticos. Los caudales para la activación por plasma estarán típicamente en el intervalo

de aproximadamente 5 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, de aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 150 ml/min, de aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 100 ml/min, o de aproximadamente 5 ml/min a aproximadamente 50 ml/min. Típicamente, será deseable dejar entre aproximadamente 1 y 60 min, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 min, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 min, o entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 min para que las plaquetas se unan a los componentes plasmáticos.

**[0089]** Aunque el esfuerzo de cizallamiento parece no tener la misma importancia para la activación de plaquetas que para la activación de monocitos, puede preferirse hacer pasar la fracción de plaquetas a través de la cámara de flujo bajo una fuerza de cizallamiento de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20.0 dinas/cm<sup>2</sup>, de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 15.0 dinas/cm<sup>2</sup>, de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 10.0 dinas/cm<sup>2</sup>, tal como de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 0.4, a aproximadamente 0.5, a aproximadamente 0.6, a aproximadamente 0.7, a aproximadamente 0.8, a aproximadamente 0.9, a aproximadamente 1, a aproximadamente 2, a aproximadamente 3, a aproximadamente 4, a aproximadamente 5 o a aproximadamente 6 dinas/cm<sup>2</sup>. Los caudales típicos de la fracción que contiene plaquetas pueden estar en el intervalo de aproximadamente 5 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, de aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 150 ml/min, de aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 100 ml/min o de aproximadamente 5 ml/min a aproximadamente 50 ml/min. Los caudales dependerán en cierta medida del tamaño y la geometría de la cámara de flujo y pueden utilizarse en particular si se utilizan cámaras de flujo con las dimensiones mencionadas posteriormente. En general, se seleccionarán caudales para alcanzar los valores de esfuerzo de cizallamiento antes mencionados.

**[0090]** Así pues, se contempla hacer pasar la fracción que contiene plaquetas a través de los canales o estructuras similares a canales con un caudal de aproximadamente 10 ml/minuto a aproximadamente 200 ml/minuto para producir una fuerza de cizallamiento de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10.0 dinas/cm<sup>2</sup>.

**[0091]** Una vez que las plaquetas se han hecho pasar a través de los canales o estructuras similares a canales y se han activado mediante las proteínas plasmáticas o fragmentos de las mismas, que se han dispuesto sobre las superficies de los canales o estructuras similares a canales, la fracción que contiene monocitos, por ejemplo, la cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero o la fracción de leucocitos o de capas leucocitarias mencionada posteriormente, que se ha obtenido de la cantidad extracorpórea de muestra de sangre, se hace pasar, por ejemplo, mediante bombeo al interior y a través de los canales o estructuras similares a canales, aplicando una fuerza de cizallamiento. Debe entenderse que la activación de plaquetas a través de una interacción con componentes plasmáticos conducirá a una adhesión de plaquetas a componentes plasmáticos.

**[0092]** Debe entenderse también que tendrán lugar los mismos acontecimientos que los descritos anteriormente si se hace pasar una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero que comprenda plaquetas y componentes plasmáticos a través de la cámara de flujo. En este caso, los componentes plasmáticos se adherirán a las paredes de la cámara de flujo y luego activarán plaquetas. Sin embargo, en este escenario, el proceso puede ser menos controlable y esto puede tenerse en cuenta aumentando el tiempo de permanencia de la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende plaquetas y componentes plasmáticos en la cámara de flujo.

**[0093]** Cabe señalar además que, en lugar de plaquetas activadas, pueden utilizarse factores obtenidos de plaquetas que sean suficientes para activar monocitos. Estos factores incluyen, por ejemplo, fibronectina y pueden incluir también factores tales como P-selectina, integrina  $\alpha 5\beta 1$ , el receptor de lectina tipo C, CD61, CD36, CD47 e inhibidores de complemento tales como CD55 y CD59, o transcrito-1 similar a TREM. Tales factores obtenidos de plaquetas pueden también disponerse directamente sobre las superficies de la cámara de flujo, bien, por ejemplo, como mezclas de componentes purificados, bien como mezclas de componentes obtenidos, por ejemplo, mediante lisis de plaquetas contenidas en la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero. En este caso, puede evitarse la necesidad de, por ejemplo, revestir las superficies de la cámara de flujo con componentes plasmáticos.

**[0094]** Los datos presentados en la presente memoria sugieren que, una vez activadas las plaquetas, las plaquetas activadas expresan proteínas tales como P-selectina y ligandos que contienen RGD y entonces pueden interactuar con monocitos y activar su diferenciación en células dendríticas inmunoestimuladoras. Además, se halló que la activación de monocitos y la inducción de células dendríticas mediante plaquetas activadas no ocurren en condiciones estáticas. Más bien, es necesario hacer pasar los monocitos a través de los canales o estructuras similares a canales bajo aplicación de una fuerza de cizallamiento. Dado que las plaquetas, tras la activación, necesitan entre aproximadamente 60 y aproximadamente 120 min para expresar factores tales como la P-selectina, que entonces

activa monocitos, el paso de los monocitos puede aplazarse hasta que las plaquetas hayan empezado a expresar estos factores, por ejemplo, durante un tiempo de aproximadamente 60 a aproximadamente 120 min. Si se hace pasar a través de la cámara de flujo una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero que comprenda monocitos, plaquetas y componentes plasmáticos, este periodo de tiempo puede tener que ajustarse a tiempos más largos.

**[0095]** Debe entenderse que la interacción de monocitos con plaquetas activadas, factores obtenidos de plaquetas o componentes plasmáticos no es suficiente para la activación y la diferenciación de monocitos sin la aplicación de una fuerza de cizallamiento al mismo tiempo.

**[0096]** La aplicación de una fuerza física para mover la fracción que contiene monocitos a través de la cámara de flujo significa preferiblemente que una fracción que contiene monocitos, tal como la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero, se mueve a través de la cámara de flujo bajo esfuerzo de cizallamiento. Típicamente, la fracción que contiene monocitos puede hacerse pasar a través de la cámara de flujo bajo una fuerza de cizallamiento de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20.0 dinas/cm<sup>2</sup>, de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 10.0 dinas/cm<sup>2</sup>, tal como de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 0.3, a aproximadamente 0.4, a aproximadamente 0.5, a aproximadamente 0.6, a aproximadamente 0.7, a aproximadamente 0.8, a aproximadamente 0.9, a aproximadamente 1, a aproximadamente 1.5 o a aproximadamente 2 dinas/cm<sup>2</sup>. Los caudales típicos de la fracción que contiene monocitos pueden estar en el intervalo de aproximadamente 5 ml/min a aproximadamente 200 ml/min, de aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 150 ml/min, de aproximadamente 10 ml/min a aproximadamente 100 ml/min o de aproximadamente 5 ml/min a aproximadamente 50 ml/min. Los caudales dependerán en cierta medida del tamaño y la geometría de la cámara de flujo y pueden utilizarse en particular si se utilizan canales o estructuras similares a canales con las dimensiones mencionadas posteriormente. En general, se seleccionarán caudales para alcanzar los valores de esfuerzo de cizallamiento antes mencionados.

**[0097]** Así pues, se contempla hacer pasar la fracción que contiene monocitos a través de los canales o estructuras similares a canales con un caudal de aproximadamente 10 ml/minuto a aproximadamente 200 ml/minuto para producir una fuerza de cizallamiento de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 dinas/cm<sup>2</sup>. En cualquier caso, hay que asegurarse de que se genere una fuerza de cizallamiento que permita la unión de monocitos a plaquetas activadas y la diferenciación de tales monocitos activados en DC inmunoestimuladoras.

**[0098]** Los datos presentados en la presente memoria sugieren que la interacción monocito-plaqueta puede dividirse en interacciones de acción corta, que se definen arbitrariamente como un contacto que tiene lugar durante menos de 3 segundos mediante detección con un microscopio óptico, e interacciones de acción larga, definidas como un contacto que dura más de 3 segundos mediante una detección con un microscopio óptico. Parece que las interacciones de acción corta iniciales están mediadas por P-selectina que se expresa en plaquetas activadas. Estos contactos iniciales pueden desencadenar entonces posteriormente interacciones de acción larga mediadas por proteínas que contienen RGD expresadas por las plaquetas activadas.

**[0099]** Es posible influir positivamente en la activación de monocitos y la diferenciación en DC inmunoestimuladoras permitiendo que los monocitos establezcan contactos de acción larga con plaquetas, por ejemplo, dando a los monocitos y las plaquetas suficiente tiempo para interactuar. A medida que los monocitos fluyen a través de los canales o estructuras similares a canales, se unen a y se desunen de las plaquetas alternativamente por la fuerza de cizallamiento inducida por el flujo a través de los canales o estructuras similares a canales. El tiempo de permanencia de la interacción monocito/plaqueta puede controlarse variando el caudal, por ejemplo, controlando la velocidad de la bomba. Por ejemplo, la bomba puede hacerse funcionar inicialmente a una velocidad baja/un caudal bajo para mejorar la interacción monocito/plaqueta y luego puede aumentarse la velocidad/el caudal para facilitar la desunión y la recogida de los monocitos tratados del dispositivo de tratamiento. Parece que la adhesión de los monocitos a las plaquetas puede lograrse mejor a entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 2 dinas/cm<sup>2</sup>, entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 1 dinas/cm<sup>2</sup> y preferiblemente entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 0.5 dinas/cm<sup>2</sup>, mientras que la desunión y la recogida de los monocitos puede lograrse mejor a niveles de cizallamiento aumentados.

**[0100]** Debe entenderse que la activación de monocitos conduce a la inmovilización, por ejemplo, por interacción con plaquetas activadas, factores obtenidos de plaquetas o componentes plasmáticos. Para cosechar las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras inducidas, se puede aumentar el esfuerzo de cizallamiento a, por ejemplo, 20 dinas/cm<sup>2</sup> y/o se pueden tratar las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras con factores que permitan la

desunión de las plaquetas activadas, los factores obtenidos de plaquetas o los componentes plasmáticos, añadiendo factores tales como Plaviv, Aspirina u otros diluyentes de la sangre.

5 **[0101]** La temperatura es otro factor que influye en la activación de monocitos y su diferenciación en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. Los métodos según la invención pueden realizarse en un intervalo de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 42 °C, preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 22 °C a aproximadamente 41 °C y más preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 41 °C.

10 **[0102]** Un parámetro que también puede variarse para afinar la activación de monocitos es la densidad con la que la cámara de flujo se reviste con componentes plasmáticos y, por lo tanto, con plaquetas que se unen a los componentes plasmáticos. En general, cuanto más densamente se revistan las superficies de la cámara de flujo con componentes plasmáticos y plaquetas, tanto más eficaz será la activación de monocitos.

15 **[0103]** Se ha mencionado anteriormente que las plaquetas se activan mediante una unión a componentes plasmáticos. La expresión "plaquetas activadas" según la invención se utiliza para referirse a plaquetas que muestran una expresión aumentada de P-selectina, integrina  $\alpha\text{IIb-}\beta\text{3}$  y/o proteínas que contienen RGD tales como fibronectina, fibrinógeno o vitronectina, como consecuencia de unir plaquetas a componentes plasmáticos tales como fibronectina y/o fibrinógeno. La expresión puede determinarse mediante métodos convencionales tales como RT-PCR, transferencia Western o análisis FACS. La expresión "plaquetas no activadas" según la invención se utiliza para referirse a plaquetas para las  
20 que la unión a proteínas plasmáticas tales como fibronectina o fibrinógeno no puede reducirse mediante una incubación previa de las plaquetas con el componente gamma de fibrinógeno.

25 **[0104]** Se ha mencionado anteriormente que los monocitos se activan y empiezan a diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras uniéndose a plaquetas activadas en condiciones de esfuerzo de cizallamiento. La expresión "monocitos activados" según la invención se utiliza para referirse a monocitos que, tras la unión a plaquetas activadas, en condiciones de esfuerzo de cizallamiento, expresan niveles aumentados de la conformación abierta de integrina  $\beta\text{1}$  y comienzan a expresar marcadores de DC en maduración tales como HLA-DR<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup>. Como control para determinar si la interacción de monocitos con plaquetas activadas conduce a la activación y diferenciación de DC, puede compararse la expresión de HLA-DR<sup>+</sup>/CD83<sup>+</sup> después de la unión de  
30 monocitos a plaquetas activadas en condiciones de esfuerzo de cizallamiento, bien en ausencia de anticuerpos anti-P-selectina (activación), bien en presencia de anticuerpos anti-P-selectina (control). La expresión puede determinarse mediante métodos convencionales tales como RT-PCR, transferencia Western o análisis FACS.

35 **[0105]** Una vez activados los monocitos mediante un método según la invención, éstos empiezan a diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. La expresión "células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras" según la invención se utiliza como se ha mencionado anteriormente. Estas células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras pueden identificarse mediante la expresión de marcadores descritos anteriormente. Las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras pueden distinguirse además de células dendríticas autólogas inmunosupresoras o, así llamadas, truncadas en que no se observa ningún cambio en la expresión de GILZ cuando se obtienen células dendríticas autólogas mediante un método según la invención.  
40

**[0106]** Los hallazgos experimentales descritos en la presente memoria sugieren además inmediatamente diversas realizaciones de este primer aspecto que pueden proporcionar diferentes ventajas.

45 **[0107]** El hallazgo de que la activación de monocitos y la subsiguiente inducción de diferenciación de estos monocitos en DC autólogas inmunoestimuladoras pueden lograrse en un dispositivo miniaturizado permite llevar a cabo el proceso con menores cantidades de una muestra de sangre extracorpórea. Como se ha mencionado anteriormente, el procedimiento de FEC clásico requiere procesar de 2.5 L a 6 L de sangre, que típicamente se obtiene de pacientes mediante aféresis, tal como leucoféresis, para obtener un volumen final de aproximadamente 200 ml a 500 ml que  
50 comprende leucocitos, incluyendo monocitos, así como componentes plasmáticos y plaquetas.

**[0108]** Sin embargo, los métodos según la invención pueden requerir una cantidad sustancialmente menor de muestras de sangre, evitando así la necesidad de aféresis, tal como leucoféresis, u otros procesos, que suponen una considerable carga para los pacientes.  
55

**[0109]** Así pues, la presente invención puede realizarse sin la necesidad de aféresis, tal como leucoféresis, y todo el proceso de obtener tales células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras puede realizarse en un dispositivo de mano.

5 **[0110]** Así pues, en una realización del primer aspecto de la invención, que puede combinarse con las realizaciones anteriormente descritas, se contempla realizar el método según el primer aspecto, en donde dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero no se ha obtenido mediante aféresis, tal como leucoféresis.

10 **[0111]** Dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero puede estar entre aproximadamente 5 ml y aproximadamente 500 ml, entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 450 ml, entre aproximadamente 20 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 30 ml y aproximadamente 350 ml, entre aproximadamente 40 ml y aproximadamente 300 ml, o entre aproximadamente 50 ml y aproximadamente 200 ml, o entre aproximadamente 50 ml y aproximadamente 100 ml, de sangre extracorpórea de dicho individuo mamífero para obtener un volumen final entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 100 ml, entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 50 ml, entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 40 ml o entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 30 ml de cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de mamífero.

20 **[0112]** La cantidad de sangre extracorpórea extraída y aplicada al dispositivo puede ser sangre completa. Como alternativa, dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero puede obtenerse aislando leucocitos de entre aproximadamente 5 ml y aproximadamente 500 ml, entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 450 ml, entre aproximadamente 20 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 30 ml y aproximadamente 350 ml, entre aproximadamente 40 ml y aproximadamente 300 ml, o entre aproximadamente 50 ml y aproximadamente 200 ml o entre aproximadamente 50 ml y aproximadamente 100 ml de sangre completa extracorpórea de dicho individuo mamífero.

25 **[0113]** Dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero también puede obtenerse aislando capas leucocitarias de entre aproximadamente 5 ml y aproximadamente 500 ml, entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 450 ml, entre aproximadamente 20 ml y aproximadamente 400 ml, entre aproximadamente 30 ml y aproximadamente 350 ml, entre aproximadamente 40 ml y aproximadamente 300 ml, o entre aproximadamente 50 ml y aproximadamente 200 ml o entre aproximadamente 50 ml y aproximadamente 100 ml de sangre completa extracorpórea de dicho individuo mamífero.

30 **[0114]** En todos los casos antes mencionados (sangre completa, fracción de leucocitos, capas leucocitarias), dicha cantidad extracorpórea de sangre comprenderá típicamente entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y aproximadamente  $1 \times 10^8$ , tal como aproximadamente  $5 \times 10^6$ , células mononucleares/ml.

40 **[0115]** El experto en la técnica está familiarizado con cómo obtener sangre completa, una fracción de leucocitos de la misma o una fracción de capa leucocitaria de la misma (véase, por ejemplo, Bruil et al., Transfusion Medicine Reviews (1995), IX (2), 145-166), incluyendo filtrado, centrifugación diferencial. Un método preferido se basa en filtros, tales como los disponibles, por ejemplo, en Pall. Tales filtros pueden incorporarse al dispositivo de manera que en el dispositivo de mano pueda realizarse el procesamiento de la muestra extracorpórea. Como fuente también es posible utilizar, por ejemplo, sangre del cordón umbilical.

45 **[0116]** Si se utiliza centrifugación, se puede obtener sangre completa a través de una jeringa con, por ejemplo, una aguja de calibre 17 o 18. Tal muestra de sangre completa puede centrifugarse para eliminar residuos y otros componentes. Después, la muestra de sangre completa puede filtrarse a través de filtros comunes, tales como los disponibles en Pall.

50 **[0117]** Para obtener una fracción de leucocitos mononucleares, se puede obtener una muestra de sangre completa como se ha descrito y luego colocar en capas tal muestra sobre, por ejemplo, Ficoll-Hypaque. Posteriormente se realiza una etapa de centrifugación a, por ejemplo, entre aproximadamente 100 g y aproximadamente 200 g, tal como 180 g, y luego la fracción de leucocitos mononucleares puede recogerse de la interfase y lavarse con tampones comunes, tales como HBSS. La fracción de leucocitos mononucleares lavada puede entonces resuspenderse en medio de cultivo celular libre de suero, tal como medio RPMI-1640 (GIBCO). Otros métodos para obtener fracciones de leucocitos mononucleares incluyen elutriación, filtrado, centrifugación por densidad, etc.

55

5 [0118] Como se ha señalado anteriormente, las etapas cruciales para la inducción de la formación de DC parecen implicar la activación de plaquetas mediante componentes plasmáticos y la activación de monocitos mediante tales plaquetas activadas. En principio, podría hacerse pasar una muestra de sangre completa a través del dispositivo bajo esfuerzo de cizallamiento. Los componentes plasmáticos de tal muestra se unirán entonces a las superficies de la cámara de flujo y permitirán la adhesión y activación de plaquetas dentro de tal muestra mediante componentes plasmáticos. Los monocitos de tal muestra se unirán luego a las plaquetas activadas y serán activados ellos mismos.

10 [0119] De manera similar, pueden obtenerse combinaciones de los diversos componentes tales como una fracción que contenga plasma rico en plaquetas, que puede obtenerse centrifugando una muestra de sangre completa que se haya obtenido como se ha descrito anteriormente a entre aproximadamente 100 g y aproximadamente 180 g, tal como aproximadamente 150 g, durante un tiempo entre aproximadamente 10 min y aproximadamente 20 min, tal como aproximadamente 15 min, para separar el residuo de la muestra de sangre completa. A continuación, la capa de plasma rico en plaquetas se recoge y se recentrifuga a entre aproximadamente 700 g y aproximadamente 1000 g, tal como aproximadamente 900 g, durante un tiempo entre aproximadamente 3 min y aproximadamente 10 min, tal como aproximadamente 5 min. El sedimento resultante se resuspende luego en medio de cultivo celular libre de suero.

20 [0120] Sin embargo, con el fin de tener el mejor control sobre el proceso, puede ser deseable hacer pasar en primer lugar componentes plasmáticos a través de la cámara de flujo y dejar que se adhieran, luego plaquetas y luego la fracción que contiene monocitos. Para esta estrategia, puede ser deseable obtener una fracción de leucocitos que comprenda una fracción de capa de monocitos o leucocitaria que comprenda monocitos, que no comprenda componentes plasmáticos y que no comprenda plaquetas. Tales fracciones libres de plasma y de plaquetas y que contienen monocitos pueden obtenerse como se ha descrito en la técnica. Si se obtienen leucocitos o fracciones de capa leucocitaria como se ha descrito anteriormente, estarán suficientemente libres de plasma o plaquetas para los fines de la invención. Para esta estrategia también puede ser deseable tener fracciones de plaquetas y/o de plasma.

25 [0121] Así pues, la invención contempla el uso de plaquetas que hayan sido separadas de la cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero antes de que dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero se haya aplicado a dicho dispositivo. Estas plaquetas pueden entonces hacerse pasar a través de la cámara de flujo, que se ha revestido con componentes plasmáticos tales como fibronectina.

30 [0122] En otra realización, la invención considera el uso de componentes plasmáticos que hayan sido separados de la cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero antes de que dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero se haya aplicado a dicho dispositivo. Estos componentes plasmáticos pueden entonces hacerse pasar a través de la cámara de flujo para que puedan adherirse.

35 [0123] En lugar de utilizar componentes plasmáticos que hayan sido obtenidos de la cantidad extracorpórea de sangre, también pueden utilizarse componentes plasmáticos que hayan sido aislados de otras fuentes, tales como, por ejemplo, mediante expresión de proteínas recombinantes. Tales componentes plasmáticos incluyen fibrinógeno, fibronectina, P-selectina y fragmentos de los mismos, tales como el componente gamma de fibrinógeno.

40 [0124] Aunque puede preferirse utilizar una cantidad extracorpórea de sangre que no haya sido obtenida mediante aféresis, tal como leucoféresis, la invención no excluye utilizar una cantidad extracorpórea de sangre que haya sido obtenida mediante aféresis, tal como leucoféresis.

45 [0125] Así pues, en otra realización del primer aspecto de la invención, se contempla realizar el método como se ha descrito anteriormente, en donde dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero haya sido obtenida mediante aféresis, tal como leucoféresis.

50 [0126] La aféresis, tal como leucoféresis, puede realizarse como es conocido en la técnica. Así pues, una cantidad extracorpórea de sangre, tal como 2.5 L a 6 L, puede obtenerse de un individuo y tratarse mediante leucoféresis convencional para obtener tres fracciones, concretamente el plasma, las plaquetas y las capas leucocitarias. El plasma, que contiene proteínas tales como fibronectina y fibrinógeno, es la fracción de sangre más ligera y, por lo tanto, es la primera porción de la sangre que se retira selectivamente de la centrifuga y se hace pasar a través de canales o estructuras similares a canales. Una vez que se ha bombeado el plasma a través de los canales o estructuras similares a canales y se han revestido las superficies de los mismos con proteínas plasmáticas, se bombea el segundo componente más ligero de la centrifuga de leucoféresis, la fracción de plaquetas, al interior y a través de los canales o estructuras similares a canales. La tercera fracción más ligera que se ha de eluir de la centrifuga de leucoféresis es

la capa leucocitaria, que contiene los glóbulos blancos, incluyendo los monocitos de la sangre. La capa leucocitaria que incluye los monocitos se bombea entonces a través de los canales o estructuras similares a canales. La muestra de sangre puede obtenerse utilizando el dispositivo Therakos, el separador de células Spectra (véase Andreu et al., (1994), Transf. Sci., 15(4), 443-454), o el dispositivo Theraflex de Macopharma.

5  
[0127] Así pues, la invención, en una realización de la invención, considera el uso de plaquetas que hayan sido separadas de la cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero obtenidas mediante aféresis, tal como leucoféresis, antes de que dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero que comprende monocitos se haya aplicado a dicho dispositivo.

10  
[0128] En otra realización, la invención considera el uso de componentes plasmáticos que hayan sido separados de la cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero obtenidos mediante aféresis, tal como leucoféresis, antes de que dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero que comprende monocitos y/o plaquetas se haya aplicado a dicho dispositivo.

15  
[0129] En lugar de utilizar componentes plasmáticos que hayan sido obtenidos de la cantidad extracorpórea de sangre, también pueden utilizarse componentes plasmáticos que hayan sido aislados de otras fuentes, tales como, por ejemplo, mediante expresión de proteínas recombinantes. Tales componentes plasmáticos incluyen fibrinógeno, fibronectina o P-selectina. También pueden utilizarse fragmentos de proteínas plasmáticas tales como el componente  
20 gamma de fibrinógeno, que corresponde a los aminoácidos 400-411 (SEQ ID NRO.: 105, His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val). Los datos presentados en la presente memoria muestran que este componente gamma puede activar plaquetas. Por lo tanto, puede preferirse utilizar fracciones de plasma que comprendan al menos, si no de forma predominante, fibronectina. De manera similar, puede preferirse utilizar, por ejemplo, fibronectina purificada y/o expresada de manera recombinante o el componente gamma de la misma para activar plaquetas.

25  
[0130] Para ambas realizaciones del primer aspecto de la invención en donde la cantidad extracorpórea de sangre se ha obtenido o no se ha obtenido mediante aféresis, tal como leucoféresis, puede considerarse hacer pasar las tres fracciones, concretamente componentes plasmáticos, plaquetas y la fracción que contiene monocitos, a la vez, por ejemplo, incluso en forma de una muestra de sangre completa o utilizando sólo fracciones previamente purificadas de  
30 sangre completa, a través de la cámara de flujo, aunque el paso secuencial antes descrito de estas fracciones a través de la cámara de flujo puede proporcionar un mejor control sobre el proceso. Las fracciones previamente purificadas de sangre completa pueden obtenerse, por ejemplo, centrifugando una bolsa de sangre y apretando ésta para sacar el sobrenadante, que estaría enriquecido con glóbulos blancos y plaquetas.

35  
[0131] Como se ha mencionado, el caudal a través de la cámara de flujo y, por lo tanto, el esfuerzo de cizallamiento resultante efectuarán la diferenciación de los monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras. Aparte del caudal, pueden variarse el diseño y las dimensiones de la cámara de flujo para manipular e incluso mejorar la aplicación de una fuerza de cizallamiento a los monocitos.

40  
[0132] Un dispositivo que tenga una cámara de flujo con canales o estructuras similares a canales puede ser adecuado. En la Figura 17 está representada una cámara de flujo de este tipo con la arquitectura general, aunque con menores dimensiones, de un dispositivo utilizado para el procedimiento de FEC clásico.

45  
[0133] Sin embargo, también pueden utilizarse otras geometrías, tales como las representadas en la Figura 18 a) a d). Así pues, los hallazgos descritos en la presente memoria permiten considerar cámaras de flujo con una geometría significativamente simplificada, que también permite tener un mejor control sobre el proceso en términos de las turbulencias y el esfuerzo de cizallamiento que se presentan durante el proceso.

50  
[0134] Un dispositivo con múltiples cámaras de flujo puede ser adecuado. En la Fig. 17 está representada una cámara de flujo de este tipo con la arquitectura general, aunque con menores dimensiones, de un dispositivo utilizado para el procedimiento de FEC clásico.

55  
[0135] Típicamente, se creará un gradiente de flujo en la cámara de flujo, tal como canales, cuando se hace pasar a través de la misma la fracción que contiene monocitos. Los monocitos se unirán a y se desunirán de las plaquetas y/o los componentes plasmáticos alternativamente. Mediante esta interacción se mejora enormemente la maduración de monocitos en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, proporcionando así una exposición aumentada a las plaquetas y/o los componentes plasmáticos una señalización aumentada de este proceso de maduración.

5 [0136] Con el fin de obtener la población más homogénea posible de células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, es por lo tanto deseable que el diseño y las dimensiones de la cámara de flujo, tal como canales, se seleccionen para evitar diferentes zonas de flujo en la cámara de flujo.

10 [0137] La cámara de flujo, tal como canales, puede en principio tener cualquier forma en sección transversal adecuada para los fines anteriormente descritos. Por lo tanto, puede tener una forma rectangular, redonda, elíptica u otra forma en sección transversal. Aunque las dimensiones de tal cámara de flujo se expondrán posteriormente principalmente con respecto a una sección transversal rectangular, puede preferirse la utilización de una cámara de flujo, tal como canales, con una sección transversal elíptica o redonda, dado que tales secciones transversales deberían permitir, por ejemplo, un revestimiento más homogéneo con componentes plasmáticos y/o propiedades de flujo más continuo con menos turbulencias.

15 [0138] Si tiene una sección transversal rectangular, la cámara de flujo, tal como canales, puede tener unas dimensiones de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  de altura y de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  de anchura. Los canales o estructuras similares a canales también pueden tener unas dimensiones de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  inclusive de altura y de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  inclusive de anchura, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  inclusive de altura y de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  inclusive de anchura, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  inclusive de altura y de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  inclusive de anchura, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  inclusive de altura y de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  inclusive de anchura, o de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  inclusive de altura y de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  inclusive de anchura.

25 [0139] Si se utilizan cámaras de flujo, tales como canales, de sección transversal elíptica, las dimensiones antes mencionadas de altura y anchura tendrían que adaptarse correspondientemente para permitir un volumen comparable.

30 [0140] Si se utilizan cámaras de flujo, tales como canales, de sección transversal redonda, el diámetro puede estar típicamente en el intervalo de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 500  $\mu\text{m}$  inclusive, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  inclusive, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  inclusive, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  inclusive, de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  inclusive, o de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  inclusive.

35 [0141] Generalmente se prefieren dimensiones menores para las cámaras de flujo, con una particular preferencia por alturas, anchuras o diámetros de menos de 100  $\mu\text{m}$ , tal como 50  $\mu\text{m}$ , por la razón de que se supone que para tales dimensiones menores la interacción de monocitos con plaquetas es más eficaz y uniforme y las propiedades de flujo en las superficies y en el centro de la cámara de flujo son más comparables.

40 [0142] La longitud de la cámara de flujo, tal como canales o estructuras similares a canales, se selecciona normalmente de tal manera que la cámara de flujo permita el paso del volumen de sangre extracorpórea. Por ejemplo, la cámara de flujo y el dispositivo pueden configurarse para permitir el paso de un volumen total de entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 50 ml, entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 40 ml o entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 30 ml.

45 [0143] La cámara de flujo puede tener subestructuras internas para aumentar el área superficial o hacer las condiciones de flujo menos heterogéneas.

50 [0144] La cámara de flujo puede llenarse con partículas para aumentar el área superficial o hacer las condiciones de flujo menos heterogéneas.

[0145] El material de la cámara de flujo puede ser plástico o no plástico.

[0146] Si se consideran los materiales no plásticos, se puede utilizar vidrio.

55 [0147] La superficie de la cámara puede revestirse de manera covalente o a través de adsorción.

**[0148]** Los materiales para las válvulas, cámaras, tuberías auxiliares etc. pueden seleccionarse para que tengan interacciones reducidas con componentes de la sangre.

5 **[0149]** Las superficies de las válvulas, cámaras, tuberías auxiliares, etc. pueden tratarse/revestirse para que tengan interacciones reducidas con componentes de la sangre.

10 **[0150]** Si se consideran los materiales plásticos, pueden utilizarse acrílicos, policarbonato, polieterimida, polisulfona, polifenilsulfona, estirenos, poliuretano, polietileno, teflón o cualquier otro plástico de calidad médica apropiado. En una realización preferida de la presente invención, la cámara de flujo está hecha de un plástico acrílico.

15 **[0151]** La cámara de flujo puede estar hecha de un material que proporcione un grado de transparencia tal que la muestra que se halla dentro de la cámara de flujo, tal como las fracciones que contienen monocitos, pueda irradiarse con luz visible o UV, preferiblemente con UV-A. Como se muestra mediante los experimentos, la exposición a UV-A y 8-MOP conduce a una expresión aumentada de GILZ y, por lo tanto, a la activación y diferenciación de monocitos en células dendríticas autólogas inmunosupresoras. Así pues, la exposición a luz, tal como UV-A, y agentes de reticulación de ADN, tales como 8-MOP, debería en general evitarse cuando se produzcan células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras.

20 **[0152]** Sin embargo, una vez que los monocitos se han embarcado en la vía de maduración el tiempo suficiente para que se hayan formado células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, como puede determinarse mediante los marcadores moleculares mencionados anteriormente, puede preverse administrar agentes de reticulación de ADN, tales como 8-MOP, y exponer las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras a, por ejemplo, UV-A para volver apoptóticas otras células presentes en la muestra de sangre extracorpórea. Tales células pueden ser células T citotóxicas, células infectadas por virus o células bacterianas. La apoptosis de tales células puede conducir a la expulsión de antígenos. Las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras pueden entonces recoger y procesar estos antígenos, de modo que se forman células presentadoras de antígeno autólogas inmunoestimuladoras. Estas células presentadoras de antígeno autólogas inmunoestimuladoras pueden entonces, por ejemplo, reintroducirse en el individuo respectivo para producir una respuesta inmunitaria contra los antígenos tumorales, víricos o bacterianos respectivos. Una vez que se han formado células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras, también se pueden introducir por separado células tumorales, células bacterianas o células infectadas por virus de tal individuo en la cámara de flujo y volver apoptóticas estas células, por ejemplo, añadiendo adicionalmente agentes de reticulación de ADN, tales como 8-MOP, e irradiar la mezcla de células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras y células tumorales, células bacterianas o células infectadas por virus para volver apoptóticas las células tumorales, las células bacterianas o las células infectadas por virus, de tal manera que se puedan formar células presentadoras de antígeno autólogas inmunoestimuladoras. Es para estas realizaciones para las que se contempla un diseño de la cámara de flujo que permita una exposición a luz, tal como UV-A.

40 **[0153]** Una cámara de flujo típica puede tener la geometría representada en la Fig. 19A). La vía de flujo tiene unas dimensiones de 20 mm por 80 mm. La cámara está hecha de poliestireno, PET (tereftalato de polietileno), PMMA (poli (metil metacrilato)) y silicio. Una muestra de sangre puede hacerse girar a baja velocidad a través de un gradiente de Ficoll para obtener, por ejemplo, 8 ml de muestra con una concentración de glóbulos blancos de, por ejemplo,  $10^{10}$  células/ml. La cámara puede revestirse previamente con plasma rico en plaquetas. La muestra puede hacerse pasar a través de la cámara a aproximadamente 0.028 Pa durante aproximadamente ... min. Luego, la cámara puede lavarse con aproximadamente 3 ml de RPMI a 0.028 Pa. Un segundo lavado con 30-55 ml de RPMI puede realizarse a aproximadamente 1.2 Pa. Los monocitos activados recogidos pueden entonces combinarse y utilizarse para un análisis posterior.

50 **[0154]** Una vez que se han obtenido células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras mediante métodos según la invención, éstas pueden por lo general procesarse posteriormente para fines específicos. Estas células dendríticas inmunoestimuladoras recién formadas pueden, por ejemplo, incubarse en condiciones estándar para permitir que completen su maduración. El cultivo de estas células dendríticas inmunoestimuladoras puede realizarse en condiciones estándar, por ejemplo, a 37 °C y con un 5 % de CO<sub>2</sub> en medios estándar para el cultivo de células humanas, tal como en medio RPMI-1640 (obtenible, por ejemplo, de GIBCO), suplementados con un 15 % de suero AB (obtenible, por ejemplo, de Gemini Bio-Products).

55 **[0155]** De esta manera, pueden obtenerse células dendríticas inmunoestimuladoras maduras sin necesidad de cócteles de citocinas, que son bastante caros, para la inducción de monocitos a una diferenciación en DC. Aunque no

es necesario, puede considerarse cultivar tales células dendríticas inmunoestimuladoras en un medio de cultivo tamponado con una o más citocinas, tales como GM-CSF e IL-4, durante el periodo de incubación. También pueden añadirse cócteles de maduración (típicamente consistentes en combinaciones de ligandos tales como CD40L, citocinas tales como interferón gamma, TNF alfa, interleucina 1 o prostaglandina E2 o los factores mencionados anteriormente). En un aspecto, se producen células dendríticas inmunoestimuladoras con preferencia sobre células dendríticas inmunosupresoras cultivando las células dendríticas durante periodos de tiempo prolongados tales como, por ejemplo, al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 días. Esto puede ayudar a que las células dendríticas inmunoestimuladoras inicialmente formadas se embarquen aun más en su vía de maduración. Sin embargo, según la invención, las células dendríticas inmunoestimuladoras se obtienen sin cócteles de citocinas para la inducción de monocitos a la diferenciación en DC.

**[0156]** Las células dendríticas inmunoestimuladoras según la presente invención pueden ensayarse en cuanto a la funcionalidad en ensayos como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, se puede adaptar el ensayo descrito en Bioley et al., *The Journal of Immunology* 2006), 177:6769-6779. En tal ensayo adaptado, las células dendríticas inmunoestimuladoras, que se han obtenido mediante los métodos divulgados en la presente memoria, por ejemplo, haciendo pasar glóbulos blancos como se ha descrito anteriormente a través de un dispositivo representado en la Fig. 19, se coincuban con células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> del mismo donante y el péptido Melan-A/MART-1<sub>26-35</sub>, descrito por Bioley et al. La detección de células CD4<sup>+</sup> y células CD8<sup>+</sup> positivas para Melan-A/MART-1<sub>26-35</sub> permite una confirmación de células dendríticas inmunoestimuladoras funcionales obtenidas según la presente invención.

**[0157]** Posteriormente, tales células dendríticas inmunoestimuladoras pueden manipularse *ex vivo*, antes de la readministración al individuo, para adaptarlas al fin terapéutico deseado.

**[0158]** Así pues, antes de la readministración al individuo, tales células dendríticas inmunoestimuladoras pueden, por ejemplo, procesarse *ex vivo*, tal como cargándolas con antígenos inmunógenos, por ejemplo, los expresados en células tumorales apoptóticas o agentes infecciosos patógenos, o mejorando su maduración con el fin de aumentar su eficacia en la inmunoterapia del cáncer. Esto conducirá a células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras que presentan el antígeno en sus superficies. Una de las realizaciones más preferidas de la presente invención contempla separar tanto como sea posible la generación de células dendríticas inmunoestimuladoras como se describe en la presente memoria, la generación de antígenos de enfermedad y la carga de estas células presentadoras de antígeno con los antígenos de enfermedad. Así pues, a diferencia de, por ejemplo, la FEC, estos diferentes procesos no se producen de manera continua, por ejemplo, evitando la aplicación de agentes fotoactivables, tales como 8-MOP, y UVA. Más bien, las células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras, tales como las células dendríticas, se producen a partir de monocitos aplicando fuerzas de cizallamiento en ausencia de, por ejemplo, 8-MOP y UVA y/o cócteles de citocinas. Estas células dendríticas inmunoestimuladoras pueden entonces coincubarse con antígenos de enfermedad obtenidos por separado para efectuar una carga eficaz de las células dendríticas inmunoestimuladoras y la presentación de los antígenos en su superficie. El discernimiento proporcionado por los hallazgos de la presente memoria es lo que permite separar los múltiples procesos que se producen durante la FEC y ajustar finamente la generación de células dendríticas inmunoestimuladoras, por ejemplo, evitando o reduciendo la formación de células dendríticas inmunosupresoras.

**[0159]** Las células dendríticas inmunoestimuladoras pueden, en particular, cargarse con agentes efectores de enfermedad para producir células dendríticas presentadoras de antígeno, que, tras la reintroducción en el individuo, pueden iniciar una respuesta inmunitaria contra los genes efectores de enfermedad.

**[0160]** Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "agentes efectores de enfermedad" se refiere a agentes que son claves para causar un estado patológico en un individuo. Por ejemplo, las células dendríticas inmunoestimuladoras pueden cargarse con antígenos de los cuales se sepa que se expresan en tejido canceroso. Con este fin, tales antígenos pueden expresarse en células dendríticas inmunoestimuladoras de tal modo que se presenten en las moléculas de CPH clase 1 y CPH clase 2. Cebando células dendríticas inmunoestimuladoras con tales antígenos, es posible vacunar a individuos contra la posterior presencia de, por ejemplo, un cáncer o una infección. Si se utiliza un antígeno que ya sea expresado por tejido canceroso obtenido del individuo del que se ha extraído la cantidad extracorpórea de sangre para generar células dendríticas inmunoestimuladoras, las células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras reintroducidas, cargadas con antígeno, pueden iniciar una respuesta inmunitaria contra el cáncer.

5 [0161] En ciertas circunstancias, estos agentes efectores de enfermedad son células causantes de enfermedad que pueden estar circulando en el torrente sanguíneo, haciéndolas así fácilmente accesibles para manipulaciones y tratamientos extracorpóreos. Los ejemplos de tales células causantes de enfermedad incluyen, por ejemplo, células T malignas, células B malignas y glóbulos blancos o rojos infectados por virus o bacterias que pueden contener o expresar péptidos o proteínas microbianos (por ejemplo, víricos, bacterianos, fúngicos, micobacterianos, protozoarios) u otras moléculas asociadas con patógenos. Las categorías de enfermedad ejemplares que dan lugar a células causantes de enfermedad incluyen trastornos linfoproliferativos tales como leucemia, linfoma y mieloma, así como infecciones que incluyen paludismo, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de Epstein-Barr (VEB), citomegalovirus (CMV), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), enfermedad de Lyme, lepra, tuberculosis y otros patógenos transmisibles por la sangre.

15 [0162] Otras células causantes de enfermedad incluyen las aisladas de muestras escindidas quirúrgicamente de tumores sólidos, tales como cánceres de pulmón, colon, cerebro, riñón o piel. Estas células pueden manipularse de forma extracorpórea de una manera similar a los leucocitos de la sangre, después de haberlas puesto en suspensión o multiplicado en cultivo tisular. Como alternativa, en algunos casos, se ha demostrado que la sangre circulante de pacientes con tumores sólidos puede contener células malignas que se han desprendido de los tumores y entrado en la circulación. Estas células tumorales circulantes pueden proporcionar una fuente fácilmente accesible de células cancerosas, que pueden aislarse, volverse apoptóticas y ser tragadas por las células dendríticas según el método descrito y reivindicado en la presente memoria.

20 [0163] También pueden obtenerse agentes efectores de enfermedad de tales células causantes de enfermedad, que se hayan vuelto apoptóticas mediante, por ejemplo, agentes citotóxicos. Debe entenderse que las células apoptóticas pueden enviar diferentes señales a través de agentes efectores dependiendo de si proceden de células normales o anormales, tales como células sanas o malignas. También se pueden utilizar una combinación y un cultivo de células dendríticas inmunoestimuladoras con tales células apoptóticas para cargar células dendríticas inmunoestimuladoras con antígenos causantes de enfermedad y generar células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras.

25 [0164] Además de células causantes de enfermedad, los agentes efectores de enfermedad que entran dentro del alcance de la invención incluyen microbios tales como bacterias, hongos y virus que expresan antígenos asociados con enfermedad. Debe entenderse que los virus pueden modificarse para que sean "incompletos", es decir, produzcan antígenos causantes de enfermedad distintivos sin ser capaces de funcionar como un agente infeccioso real, y que tales virus "incompletos" entran dentro del significado de la expresión "agentes efectores de enfermedad" tal como se utiliza en la presente memoria.

30 [0165] También pueden obtenerse antígenos inmunógenos tratando muestras de cáncer o células cancerosas con agentes de los que se sepa que inducen antígenos inmunógenos tales como Bortezomib.

35 [0166] Los cánceres que en particular pueden ser tratables mediante las estrategias anteriormente descritas incluyen CTLC, melanoma, cáncer de próstata o HNSCC, dado que, por ejemplo, se conocen antígenos de enfermedad para algunas de estas enfermedades o dado que, por ejemplo, pueden utilizarse inicialmente modelos animales de algunas de estas enfermedades.

40 [0167] Como se ha mencionado anteriormente, cargar células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras obtenibles mediante los métodos descritos en la presente memoria con antígenos permite producir células presentadoras de antígeno autólogas inmunoestimuladoras.

45 [0168] Con el fin de evitar, por ejemplo, una degradación de proteínas del antígeno suministrado y un procesamiento ineficaz de antígenos solubles por parte de células dendríticas, que conduzcan a malas respuestas de células T, se contempla mejorar la formación de células presentadoras de antígeno autólogas inmunoestimuladoras mediante una encapsulación de antígenos en nanopartículas (NP) poliméricas, que pueden estar hechas de polímeros biodegradables tales como ácido poliláctico (Waeckerle-Men et al., Adv Drug Deliv Rev (2005), 57:475-82). Tales NP pueden modificarse además con restos guiados para DEC-205 tales como un anticuerpo DEC-205 para mejorar la endocitosis mediada por receptor y la presentación de antígeno.

50 [0169] Así pues, la presente divulgación contempla utilizar una encapsulación de antígenos en nanopartículas poliméricas para mejorar opcionalmente aun más la formación de células dendríticas presentadoras de antígeno autólogas inmunoestimuladoras.

5 [0170] Las células dendríticas inmunoestimuladoras obtenidas según la invención y los agentes efectores de enfermedad se incuban durante un periodo de tiempo suficiente para maximizar el número de células dendríticas presentadoras de antígeno funcionales en la población celular incubada. Típicamente, el concentrado de células sanguíneas tratadas y los agentes efectores de enfermedad se incuban durante un periodo de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 24 horas, extendiéndose el tiempo de incubación preferido a lo largo de un periodo de entre aproximadamente 12 y aproximadamente 24 horas. Puede ser necesario un tiempo de incubación adicional para madurar por completo las células presentadoras de antígeno inmunoestimuladoras cargadas antes de la reintroducción en el individuo. Preferiblemente, el concentrado de células sanguíneas y los agentes efectores de enfermedad se incuban a una temperatura de entre 35 °C y 40 °C. En una realización particularmente preferida, la incubación se realiza a aproximadamente 37 °C.

15 [0171] La inducción de diferenciación de monocitos según el método descrito anteriormente proporciona células dendríticas inmunoestimuladoras en números que son iguales o superiores a los números de células dendríticas obtenidas mediante un cultivo caro y laborioso de leucocitos en presencia de citocinas, tales como GM-CSF e IL-4, durante un par de días. Los grandes números de células dendríticas funcionales generados mediante el método descrito anteriormente proporcionan un medio fácil de presentar material seleccionado, tal como, por ejemplo, células apoptóticas, agentes patológicos, antígenos, plásmidos, ADN o una combinación de los mismos, y son de este modo conducentes a una inmunoterapia eficaz. Las preparaciones de antígenos seleccionadas para producir una respuesta inmunitaria concreta pueden obtenerse, por ejemplo, de tumores, células no malignas causantes de enfermedad, o microbios tales como bacterias, virus y hongos. Las células dendríticas cargadas con antígeno pueden utilizarse como inmunógenos reintroduciendo por infusión las DC en el individuo o administrando de otro modo las células según métodos conocidos para producir una respuesta inmunitaria, tales como inyección subcutánea, intradérmica o intramuscular. Como se describirá posteriormente, también es posible generar células dendríticas cargadas con antígeno tratando y coincubando monocitos y agentes efectores de enfermedad capaces de expresar antígenos asociados con enfermedad.

25 [0172] Como se ha mencionado anteriormente, las células dendríticas inmunoestimuladoras pueden obtenerse mediante un método según la invención en ausencia de un agente fotoactivable y sin exposición a luz, tal como luz visible y preferiblemente UV-A.

30 [0173] Así pues, la presente invención tiene el objetivo de obtener células dendríticas inmunoestimuladoras autólogas específicas del individuo sincronizadas funcionalmente y en cuanto a la maduración.

35 [0174] En un segundo aspecto, la presente divulgación se refiere a células dendríticas inmunoestimuladoras autólogas obtenibles mediante un método descrito en la presente memoria, preferiblemente para el uso en la inmunización contra antígenos del cáncer, antígenos víricos, antígenos bacterianos o antígenos fúngicos.

40 [0175] La invención se describe ahora con respecto a algunos ejemplos específicos que, no obstante, son con fines ilustrativos y no deben interpretarse de una manera limitativa.

## Experimentos

### 45 Experimento 1 – Esfuerzo de cizallamiento y activación de plaquetas para inducir activación de monocitos

#### Materiales y Métodos

##### *Obtención de leucocitos y plaquetas*

50 [0176] Todas las muestras se adquirieron de individuos jóvenes y sanos que no tomaban medicaciones, incluyendo aspirina, que se sabe que influyen en la función plaquetaria. Las muestras se obtuvieron bajo las directrices de la Yale Human Investigational Review Board y se proporcionó un consentimiento informado según la Declaración de Helsinki. Se recogieron muestras de sangre periférica a través de una aguja de calibre 19 de la vena antecubital en jeringas que contenían heparina, luego se colocaron dichas muestras en capas sobre Ficoll-Hypaque (Gallard-Schlessinger, Carle Place, N.Y.). Después de una centrifugación a 180 g, la interfase que contenía la fracción de leucocitos mononucleares se recogió y se lavó dos veces en HBSS, luego se resuspendió en medio RPMI-1640 (GIBCO) hasta

una concentración final de  $5 \times 10^6$  células mononucleares/ml. Las células se utilizaron en el plazo de una hora después de su adquisición.

#### *Preparación de Plasma rico en Plaquetas*

5 **[0177]** Se centrifugó sangre completa a 150 g durante 15 min a temperatura ambiente. La capa de plasma rico en plaquetas (PRP) se recogió y se centrifugó a 900 g durante 5 min y el sedimento de plaquetas se resuspendió en RPMI 1640 hasta la concentración deseada.

#### *Preparación de Placas Paralelas*

10 **[0178]** Se utilizaron dos cámaras de flujo de placas paralelas semejantes para modelar la dinámica de flujo de la FEC. Se realizaron experimentos que implicaban la evaluación del fenotipo celular posterior al flujo utilizando el sistema Glycotech más grande (Glycotech, Rockville, MD). Este sistema consistía en una vía de flujo volumétrico que medía  $20\ 000 \times 10\ 000 \times 254$  micras (longitud  $\times$  anchura  $\times$  altura). La placa inferior de este sistema se componía de una  
15 placa de Petri de 15 mm (BD Biosciences, Durham, NC) separada por una junta y conectada en vacío a una cubierta de flujo acrílica, que formaba la placa superior. Para los experimentos que requerían revestir previamente con plaquetas las placas, antes de ensamblar la cámara de flujo se colocaron 20 gotas con la concentración deseada de PRP en el centro de la placa de Petri y se dejó que las plaquetas se asentasen durante 20 minutos a temperatura ambiente. La placa de Petri se lavó dos veces con 2 ml de RPMI y luego se ensambló la cámara de flujo.

20 **[0179]** Para los experimentos que no implicaban la recogida y la fenotipificación de células posteriores al flujo, se utilizaron biochips Vena8 (Cellix Ltd, Dublín, Irlanda) para generar flujo laminar. La vía de flujo volumétrico para un canal de los biochips Vena8 medía  $20\ 000 \times 400 \times 100$  micras (longitud  $\times$  anchura  $\times$  altura). El revestimiento con proteínas de estos chips se describe en la sección apropiada posteriormente.

#### *Experimentos utilizando Placas Paralelas*

30 **[0180]** La cámara de flujo de placas paralelas se montó en la platina de un microscopio óptico con contraste de fase (CK40, Olympus, Japón) con un objetivo 10x. Todas las pasadas se realizaron a temperatura ambiente. Se simuló un campo de flujo laminar uniforme utilizando una bomba de jeringa (KD Scientific, New Hope, PA) capaz de generar caudales volumétricos casi constantes. Los componentes de la configuración se concibieron para minimizar las tuberías. Antes de introducir por infusión suspensiones celulares a través de las placas, el sistema se lavó con 5 ml de RPMI con un caudal que producía un esfuerzo de cizallamiento de pared de aproximadamente  $1\ \text{dina/cm}^2$ . Luego,  
35 las suspensiones celulares de interés se hicieron pasar a través de la cámara con un caudal y un esfuerzo de cizallamiento de pared fijos.

**[0181]** Todos los experimentos se vieron en tiempo real, se grabaron a 15.2 fotogramas por segundo utilizando una cámara digital DP 200 y *software* (DeltaPix, Maalov, Dinamarca) y se analizaron utilizando *software* Image J (NIH).

#### *Cultivo durante la noche*

40 **[0182]** Cuando fue necesario un cultivo durante la noche, las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (GIBCO), suplementado con un 15 % de suero AB (Gemini Bio-Products) hasta una concentración final de  $5 \times 10^6$  células/ml. Las células se cultivaron durante la noche durante 18 horas en placas de cultivo tisular de poliestireno de 12 pocillos (2 ml por pocillo) a  $37\ ^\circ\text{C}$  en un 5 % de  $\text{CO}_2$ .

#### *Inmunofenotipificación*

50 **[0183]** Los anticuerpos monoclonales para la inmunofenotipificación incluían CD14 (receptor de LPS; monocitos), CD11c (subunidad de integrina; monocitos y DC), HLA- DR (molécula de CPH de clase II), CD83 (marcador de DC), CD62p (P-selectina; plaquetas activadas) y CD61 (subunidad de integrina; plaquetas). Los anticuerpos se obtuvieron de Beckman Coulter (CD14, CD11c, HLADR, CD83) o Sigma (CD62p, CD61) y se utilizaron en sus diluciones óptimas predeterminadas. Se estableció una tinción de fondo con controles de isotipo apropiados y se analizó la inmunofluorescencia utilizando un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter). Se realizó una tinción de membrana  
55 de dos colores añadiendo las concentraciones óptimas predeterminadas de ambos anticuerpos directamente conjugados a FITC o PE e incubando durante 20 min a  $4\ ^\circ\text{C}$ , a lo que siguió un lavado para eliminar anticuerpos no

unidos. Se realizó una tinción de membrana y citoplasmática combinada siguiendo las instrucciones del fabricante para permeabilización y fijación celular (Intraprep kit, Beckman Coulter).

#### *PCR cuantitativa en tiempo real*

5  
 [0184] Se comparó la expresión génica entre células expuestas durante el flujo a través de las placas paralelas con niveles bajos ( $10 \pm 5$ /campo de baja potencia [lpf]) versus altos ( $102 \pm 32$ /lpf) de plaquetas, a lo que siguió un cultivo durante la noche. Se aisló ARN celular utilizando columnas RNeasy Mini Kit con tratamiento por ADNasa I en columna (QIAGEN). La pureza y la producción de ARN se midieron utilizando un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer y un Agilent 2100 Bioanalyzer. El ARN se sometió a una transcripción inversa a ADNc utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). La transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador de 96 pocillos (MJ Research PTC-200) en las condiciones siguientes: 25 °C, 10 minutos, 37 °C, 120 minutos, 85 °C, 5 segundos. Se utilizó PCR en tiempo real TaqMan para detectar transcritos de DC-LAMP, CD40, decisina ADAM, Lox1, CCR7, CD80, CD83, CD86, FPRL2 y GPNMB. Los cebadores y las sondas para cada secuencia se obtuvieron como Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) inventariados. Se utilizó HPRT1 como gen de referencia.

#### *Cocultivos de Plaquetas con Monocitos*

20  
 [0185] Los experimentos que implicaban cocultivos de monocitos con plaquetas adicionales se realizaron como se describe en la sección de Cultivo Durante la Noche, con algunas modificaciones necesarias. Tras una separación Ficoll-Hypaque, las células mononucleares se resuspendieron en un 30 % de suero AB/RPMI hasta una concentración final de  $10 \times 10^6$  células/ml, de lo cual 1 ml se asignó a cada pocillo de una placa de 16 pocillos. Luego se añadió a cada pocillo 1 ml adicional de plaquetas (suspendido en RPMI, a 2x la concentración final deseada) o RPMI sin plaquetas. Para activar las plaquetas, se añadieron a la mitad de los pocillos 500  $\mu$ l que contenían 2 unidades de trombina, y se añadieron 500  $\mu$ l de RPMI a los demás para equilibrar el volumen. Luego, las células se incubaron como se ha descrito anteriormente.

#### *Estudios de Adhesión Plaquetaria*

30  
 [0186] Se realizaron experimentos de adhesión plaquetaria utilizando la cámara de flujo Vena8 descrita anteriormente. Se disolvieron fibrinógeno y fibronectina (Sigma) en PBS hasta una concentración final de 200 mcg/ml. Los canales de los chips Vena8 se incubaron a temperatura ambiente en una cámara humidificada durante 2 horas con la solución de proteínas, plasma autólogo o PBS sola. Los canales se lavaron con 5x el volumen de RPMI. Luego se perfundió plasma rico en plaquetas a través del canal revestido con proteínas con la fuerza de cizallamiento indicada, que se mantuvo constante. Para cada canal, se adquirieron imágenes fijas exactamente a 90 segundos del inicio del experimento en 4 campos de baja potencia predefinidos situados a lo largo de la vía de flujo (los campos estaban centrados a 2500, 7500, 12 500 y 17 500 micras del punto de inicio de infusión).

40  
 [0187] Algunos experimentos implicaban tratar previamente plasma rico en plaquetas con fragmentos de proteína antes de la infusión a través de los canales. Se incubaron péptidos RGD pequeños, que contenían la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp-Ser; péptidos DRG, que contenían la secuencia de aminoácidos Ser-Asp-Gly-Arg; o el fragmento 400-411 de fibrinógeno, que contenía la secuencia de aminoácidos His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, en una concentración de 2 mM con PRP durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, el PRP se perfundió a través de los canales como se ha descrito previamente.

#### *Estudios Receptor-Ligando*

50  
 [0188] Se trataron previamente canales Vena8 revestidos con plaquetas, bien con 40  $\mu$ g/ml de anti-P-selectina (R&D Systems), bien con 40  $\mu$ g/ml de un control de isotipo, durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron con 5x el volumen de RPMI. Unas suspensiones de células mononucleares se trataron previamente con péptidos RGD o bien DGR en una concentración de 2.5 mM. Se grabaron muestras de vídeo que duraban 400 fotogramas (26.3 segundos) 60 segundos después de comenzar el flujo utilizando un campo de menor potencia de visión que abarcaba 400 micras y centrado a 7500 micras del punto de inicio de flujo.

55  
 [0189] La conformación de integrina  $\beta$ -1 se evaluó utilizando la cámara de flujo Glycotech. Se trataron previamente placas de Petri de 15 mm revestidas con plaquetas (descritas anteriormente) con 40  $\mu$ g/ml de anti-P-selectina o un control de isotipo durante 20 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron con 5x el volumen de RPMI.

Inmediatamente después de la perfusión a través de las plaquetas, las células se inmunofenotipificaron con anti-CD29 HUTS-21 (BD Biosciences), un anticuerpo que se une específicamente a la conformación activa (abierta) de integrinas  $\beta 1$ .

## 5 Resultados

### *Los monocitos en flujo interactúan transitoriamente con plaquetas inmovilizadas*

[0190] La FEC se desarrolló inicialmente como un medio para posibilitar la exposición quimioterápica extracorpórea de leucocitos patógenos a 8-metoxipsoraleno (8-MOP), un fármaco de reticulación de ADN, activado por ultravioleta A (UVA). Por lo tanto, la FEC implica el flujo de sangre sometida a leucoféresis entre grandes placas paralelas de plástico transparentes, separadas 1 mm. Para permitir un análisis detallado de la dinámica de flujo involucrada durante la FEC, independiente de la exposición a UVA/8-MOP, se reprodujeron las condiciones de flujo de la FEC utilizando placas paralelas miniatura con un área superficial de sólo 0.8 mm<sup>2</sup>, separadas 100 micras. Este modelo permitió la visualización utilizando microscopía digital. Los estudios que utilizaron el modelo revelaron la siguiente secuencia (determinada mediante análisis de vídeo): adhesión inicial de plaquetas procedentes de la corriente de flujo a la placa, seguida de unión transitoria a plaquetas inmovilizadas de monocitos que se habían hecho pasar.

### *La inducción de DC tiene correlación con el número de interacciones monocito-plaqueta*

[0191] Basándose en las observaciones cualitativas iniciales descritas anteriormente, se planteó la hipótesis de que las plaquetas inducían la diferenciación de monocitos en DC en condiciones de flujo. Para ensayar la influencia de las plaquetas en la diferenciación de monocitos en DC, se hicieron pasar monocitos entre placas paralelas revestidas previamente con plaquetas autólogas con densidades bajas ( $10 \pm 5$ /campo de baja potencia [lpf]), medias ( $44 \pm 20$ /lpf) y altas ( $102 \pm 32$ /lpf). Las células se hicieron pasar a través de las placas con un caudal que producía un esfuerzo de cizallamiento de pared de 0.5 dinas/cm<sup>2</sup>, análogo al esfuerzo de cizallamiento de pared en las vénulas postcapilares. El número de interacciones monocito-plaqueta por unidad de tiempo aumentó en proporción a la densidad aumentada de plaquetas (determinado mediante análisis de vídeo). Con la placa de alta densidad se observó un promedio de  $52.3 \pm 15$  interacciones monocito-plaqueta por lpf por segundo, que disminuyó a  $18.3 \pm 14$  y  $3.4 \pm 1$  interacciones por segundo con las placas de media y baja densidad, respectivamente (Figura 1a).

[0192] Después de una incubación durante la noche, se halló una correlación entre el porcentaje de células que desarrollaron un fenotipo de DC y la frecuencia de las interacciones físicas monocito-plaqueta observadas el día anterior (Figura 1b). Un número creciente de interacciones monocito-plaqueta tenía correlación con una proporción creciente de células que expresaban marcadores que concuerdan con la diferenciación en DC, CD83 y HLA-DR de membrana. Un promedio de un 14.2 % de monocitos expuestos a la placa revestida con una alta densidad de plaquetas eran HLA-DR+/ CD83+ después de la incubación durante la noche, en comparación con un 4.9 % y un 0.8 % de monocitos expuestos a placas revestidas con niveles medio y bajo de plaquetas, respectivamente.

### *La exposición de monocitos a plaquetas tiene como resultado cambios en la expresión génica*

[0193] Para complementar los cambios descritos en el fenotipo de monocitos observado después de la exposición a plaquetas, se realizó una RT-PCR para evaluar cambios en la expresión génica. Se hicieron pasar monocitos a través de placas paralelas revestidas con densidades altas o bajas de plaquetas como se ha descrito en la sección anterior. Después de una incubación durante la noche, se extrajo ARN y se realizó una RT-PCR para determinar el nivel de expresión para 10 genes asociados con DC (Figura 2). Se halló que CD40, una molécula coestimuladora con expresión conocida en DC maduras (Cella et al., 1996, véase lista de referencias), estaba regulada positivamente en más de un 567 % en monocitos expuestos a altas densidades de plaquetas en relación con los monocitos expuestos a bajos niveles. LAMP3, un marcador específico de la diferenciación en DC (de Saint-Vis et al., 1998, véase lista de referencias), estaba regulado positivamente en un 398 %. CD80 es una molécula coestimuladora de la que se sabe que está regulada positivamente tras una activación de APC (Slavik et al., 1999, véase lista de referencias), regulada positivamente en un 220 % en monocitos expuestos a altos niveles de plaquetas. CCR7, un receptor de quimiocina del que se sabe que desempeña un papel en la migración de DC a órganos linfoides, estaba regulado positivamente en un 376 %. LOX1, CD83, CCR7 y decisina ADAM, todos ellos genes asociados con DC (Berger et al., 2010, véase lista de referencias), estaban también regulados positivamente en los monocitos expuestos a altos niveles de plaquetas. FPRL2, GPNMB y CD86 estaban todos ellos regulados negativamente en monocitos expuestos a altos niveles de plaquetas. FPRL2 es un receptor del que se sabe que, cuando está activado, inhibe la maduración de DC

(Kang et al., 2005, véase lista de referencias). GPNMB es una proteína implicada en disminuir la producción de citocina (Ripoll et al., 2007, véase lista de referencias); CD86 es una molécula coestimuladora expresada por APC.

*La inducción de DC en presencia de plaquetas no ocurre en condiciones estáticas*

5  
 [0194] Las plaquetas podrían influir potencialmente en monocitos a través de una interacción receptor-ligando directa, o a través de citocinas y otros mediadores secretados. Para determinar si la inducción por plaquetas de diferenciación de monocitos en DC requiere dinámica de flujo, ensayamos el papel de las plaquetas en condiciones estáticas. Se cocultivaron monocitos con concentraciones bajas (<50 000/mm<sup>3</sup>), medias (100-200 000/mm<sup>3</sup>) y altas (>400 000/mm<sup>3</sup>) de plaquetas, con plaquetas en estado, bien inactivo, bien activo (inducido mediante la adición de trombina). Después de una incubación durante la noche en condiciones estáticas (esfuerzo de cizallamiento = 0), hallamos que ni las plaquetas activadas ni las plaquetas no activadas eran capaces de inducir diferenciación en DC de monocitos en ausencia de flujo (véase la Figura 3).

15 *Las plaquetas suspendidas en flujo se unen a proteínas séricas adsorbidas en la placa*

[0195] Es bien sabido que algunas proteínas abundantemente presentes en el plasma, incluyendo la fibronectina y el fibrinógeno, se adsorben en superficies de vidrio y plástico; por lo tanto, se evaluó la contribución de las proteínas plasmáticas adherentes a la adhesión y activación de las plaquetas. Se revistieron previamente placas paralelas con fibrinógeno, fibronectina, plasma, o bien con solución salina. Luego se hicieron pasar a través de éstas plaquetas no activadas a velocidades de cizallamiento que producían esfuerzos de cizallamiento de pared que oscilaban entre 0.2 y 6.0 dinas/cm<sup>2</sup>. Las mayores concentraciones de plaquetas se adhirieron a placas revestidas con fibrinógeno (Figura 4). También se observó adhesión a placas revestidas con fibronectina, revestidas con plasma y no revestidas, pero en una medida significativamente menor ( $p < 0.05$ ). En ausencia de flujo, la adhesión de las plaquetas era equivalente en todos los sustratos de proteína.

[0196] Tanto el fibrinógeno como la fibronectina contienen segmentos con la secuencia de aminoácidos arginina(R)-glicina(G)-aspartato(D), RGD. Es bien sabido que los segmentos RGD interactúan con muchos receptores de integrina, en particular el dominio I/A de subunidades beta, que se exponen cuando las integrinas están en la conformación activa (Xiong et al., 2002, véase referencias). En experimentos que utilizaban placas revestidas con fibrinógeno, la adhesión de las plaquetas no se veía alterada significativamente por la incubación previa de las plaquetas con péptidos RGD; sin embargo, la adhesión se veía significativamente disminuida ( $p < 0.05$ ) por una incubación previa de las plaquetas con fragmentos peptídicos correspondientes a los aminoácidos 400-411 del fibrinógeno, el componente gamma de la proteína (Figura 5 a). En experimentos que utilizaban placas revestidas con fibronectina, la incubación previa de las plaquetas con péptidos RGD disminuyó significativamente la adhesión, mientras que la incubación previa de las plaquetas con fragmentos peptídicos correspondientes a los aminoácidos 400-411 del fibrinógeno no tuvo ningún efecto (Figura 5b). Curiosamente, cabe señalar que, a diferencia del dominio I/A de integrinas, del que se sabe que interactúa con dominios RGD de proteínas, la región de la integrina de la que se ha descubierto que interactúa con el componente gamma del fibrinógeno está expuesta en el estado inactivo de la integrina (Weisel et al., 1992, véase referencias). Por lo tanto, estos datos sugieren que las plaquetas no activadas en flujo se unen al componente gamma de las placas revestidas con fibrinógeno. La posibilidad de que las plaquetas en el estado no activado se unan al fibrinógeno puede explicar el mayor nivel de adhesión plaquetaria observado en las placas revestidas con fibrinógeno explicado en el párrafo anterior.

45 *Las plaquetas se activan mediante adhesión a la placa*

[0197] Las plaquetas circulan fisiológicamente en un estado inactivo, con una matriz de proteínas almacenadas en gránulos intracelulares. Tras encontrarse con estímulos, tales como endotelio dañado o trombina, las plaquetas se activan y casi instantáneamente desplazan estas proteínas intracelulares a la membrana plasmática (Kaplan et al., 1979, véase referencias). Se postuló que la adhesión de plaquetas a la placa de plástico/las proteínas absorbidas causó una activación de las plaquetas similar a la causada por estímulos bien conocidos. Para ensayar esta hipótesis, se evaluó la expresión en la superficie de P-selectina, un marcador bien conocido de la activación plaquetaria, antes y después de la adhesión. Antes de la adhesión, se halló que un  $6 \pm 3$  % de las plaquetas expresaban P-selectina, con una intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de  $12.4 \pm 6.9$ ; después de la adhesión, la P-selectina aumentó positivamente a un  $64 \pm 13$  % (MFI  $98.2 \pm 14$ ). El control positivo, plaquetas activadas con trombina, fue de un  $71 \pm 18$  % de positivas para P-selectina (MFI  $108.3 \pm 23$ ). La expresión de P-selectina se evaluó además a los 30, 60 y 90 minutos después de la adhesión plaquetaria; la expresión de P-selectina permaneció estable

en todos los momentos, con un  $72 \pm 11$  % de plaquetas positivas para P-selectina 90 minutos después de la adhesión, lo que indicaba que las plaquetas permanecían en un estado activo durante todo el procedimiento. Se hallaron tendencias similares en una evaluación de  $\alpha$ IIb- $\beta$ 3, una integrina de unión a fibrinógeno, con la expresión en la superficie de esta proteína aumentando de un  $4 \pm 3$  % antes de la adhesión a un  $49 \pm 18$  % después de la adhesión.

5

*Los monocitos interactúan con P-selectina y ligandos que contienen RGD expresados en plaquetas activadas*

[0198] Las interacciones monocito-plaqueta observadas en vídeo se dividieron en dos categorías: (1) de acción corta, definidas arbitrariamente como un contacto que dura menos de 3 segundos (46 fotogramas) y (2) de acción larga, definidas como un contacto de más de 3 segundos, incluyendo una unión estable. Dado que se había determinado previamente que las plaquetas en el sistema FEC estaban en un estado activado y que las plaquetas activadas expresan una matriz de proteínas, incluyendo P-selectina y proteínas que contienen RGD (por ejemplo, fibronectina, fibrinógeno y vitronectina), se buscó determinar la implicación, si es que había alguna, de estas proteínas en interacciones, bien de corta duración, bien de larga duración. Se revistieron previamente placas con plaquetas y se ensayaron cuatro condiciones: (1) plaquetas tratadas previamente con un control de isotipo irrelevante, y monocitos no tratados (P+RGD+); (2) plaquetas tratadas previamente con un control de isotipo irrelevante, y monocitos incubados previamente con péptidos RGD (P+RGD-); (3) plaquetas tratadas previamente con anti-P-selectina, y monocitos no tratados (P-RGD+); (4) plaquetas tratadas previamente con anti-P-selectina, y monocitos tratados previamente con péptidos RGD (P-RGD-). Se supuso que el tratamiento previo de monocitos con péptidos RGD tendría como resultado una disminución en el número de receptores que reconocen RGD libres disponibles para interactuar con proteínas que contienen RGD expresadas por las plaquetas. Así pues, las cuatro condiciones ensayadas representan toda permutación de interacción potencial con dos ligandos plaquetarios, P-selectina y proteínas que contienen RGD. Como muestra la Figura 6, tanto las interacciones de acción corta como las de acción larga fueron máximas cuando no estaban bloqueados ni el RGD ni la P-selectina (P+RGD+); el nivel de interacción en todas las demás condiciones se expresó como un porcentaje de este máximo. El bloqueo con anti-P-selectina sola (P-RGD+) tuvo como resultado una disminución de las interacciones monocito-plaqueta tanto cortas como largas a casi cero ( $p < 0.01$ ; Figura 6, también confirmado mediante análisis de vídeo). En cambio, el bloqueo de RGD solo (P+RGD-) no alteró significativamente el número de interacciones de corta duración, pero disminuyó las interacciones monocito-plaqueta de larga duración en un 44 % ( $p < 0.05$ ; Figura 6). El bloqueo tanto de P-selectina como de RGD simultáneamente (P-RGD-) tuvo como resultado un patrón similar al observado cuando sólo estaba bloqueada la P-selectina, con las interacciones tanto de larga como de corta duración reducidas a casi cero. Las conclusiones más apropiadas, sobre la base del patrón de interacciones observado en cada una de las cuatro condiciones, son las siguientes: (1) la P-selectina es predominantemente responsable de las interacciones de corta duración; (2) las proteínas que contienen RGD expresadas por las plaquetas están implicadas en interacciones de larga duración, pero no interacciones de corta duración; (3) la interacción de monocitos con P-selectina debe ocurrir aguas arriba de la interacción de monocitos con proteínas que contienen RGD expresadas por plaquetas. Esta última conclusión está basada en la observación de que las condiciones de P-RGD+ disminuyeron las interacciones tanto de corta como de larga duración a casi cero, mientras que las condiciones de P+RGD- sólo disminuyeron las interacciones de larga duración. Si las interacciones no fueran secuenciales, las condiciones de P-RGD+ deberían haber producido resultados similares a P+RGD+ en términos de interacciones de larga duración. Además, el ordenamiento de las interacciones, es decir, que la P-selectina actúe aguas arriba de las interacciones RGD, queda patente por el hallazgo de que las condiciones de P+RGD- sólo influyeron en las interacciones de larga duración, mientras que las condiciones de P-RGD+ produjeron resultados similares a los de P-RGD-.

45 *La exposición de monocitos a P-selectina tiene como resultado una activación de integrina de monocitos aguas abajo*

[0199] Se sabe que los receptores de integrinas, en su conformación abierta, interactúan con ligandos que contienen RGD (Ruoslati et al., 1996, véase referencias). Utilizando un anticuerpo que reconoce un epítipo expuesto sólo cuando la integrina  $\beta$ 1 está en su conformación abierta, evaluamos la conformación de integrinas de monocitos antes y después del flujo a través del modelo. La Figura 7 muestra que, a medida que aumentó el número de interacciones monocito-plaqueta de acción corta, hubo un aumento correspondiente en el porcentaje de monocitos que expresaban integrinas en su conformación abierta inmediatamente después del flujo. La línea negra muestra que un promedio del 71 % de los monocitos que habían recibido un alto número de interacciones con plaquetas ( $> 61 + 19/\text{lpf} \times \text{seg}$ ) expresaron  $\beta$ 1 en la forma activa, en comparación con el 9 % de monocitos que habían recibido un bajo número de interacciones con plaquetas ( $< 5.1 + 2/\text{lpf} \times \text{seg}$ ). Estos resultados no se vieron afectados significativamente por un tratamiento previo de las plaquetas adherentes con un control de isotipo irrelevante (línea gris). En cambio, un tratamiento previo de las plaquetas con anti-P-selectina redujo las interacciones monocito-plaqueta a casi cero y los

55

monocitos que salían del flujo en estas condiciones (línea discontinua) presentaron bajos niveles de integrinas  $\beta 1$  activas, independientemente de la densidad de plaquetas a la que hubieran estado expuestos. Cabe destacar que todas las poblaciones de células antes de pasar a través de las placas mostraron niveles bajos similares de activación base de integrina (<10 %); por lo tanto, las diferencias observadas en interacciones monocito-plaqueta de corta duración no fueron el resultado de diferencias en la conformación de la integrina antes del flujo.

*La exposición de monocitos a P-selectina es necesaria para la diferenciación en DC*

[0200] Dada la dependencia de las interacciones monocito-plaqueta de la P-selectina plaquetaria, nos propusimos determinar si existía una relación entre la exposición de los monocitos a P-selectina en el tiempo 0 y el fenotipo desarrollado posteriormente por el monocito después de una incubación durante la noche, tiempo 18 horas (Figura 8). Se hicieron pasar monocitos a través de placas paralelas revestidas con densidades altas ( $108 \pm 36$ /lpf) de plaquetas que, bien no habían recibido tratamiento (sin bloqueo), bien habían recibido un tratamiento previo con anti-P-selectina o con un control de isotipo. El  $15.5 \pm 4$  % de los monocitos expuestos a plaquetas no bloqueadas se volvieron HLA-DR+/CD83+ de membrana (marcadores de DC en maduración) después de una incubación durante la noche, y el  $13 \pm 4$  % de los expuestos a plaquetas bloqueadas con el control de isotipo irrelevante. En cambio, sólo el  $3 \pm 2$  % de los monocitos expuestos a plaquetas bloqueadas con anti-P-selectina se volvieron HLA-DR+/CD83+ después de una incubación durante la noche.

## 20 Experimento 2 – Identificación de marcadores moleculares para células dendríticas inmunosupresoras

### Materiales y Métodos

#### *Recogida de Muestras y Enriquecimiento de Monocitos*

[0201] Se adquirieron muestras de sangre periférica de individuos sanos bajo las directrices de la Yale Human Investigational Review Board y se proporcionó consentimiento informado según la Declaración de Helsinki. Se aislaron CMSP mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Isolymp, CTL Scientific). Se enriquecieron los monocitos a partir de CMSP recién aisladas mediante: 1) adherencia a plástico para experimentos de titulación de dosis de dexametasona (pureza:  $71.6 \pm 5.6$  % CD14<sup>+</sup>); 2) selección positiva por perlas magnéticas de CD14 (Miltenyi Biotec) para experimentos de titulación de dosis de PUVA (pureza:  $88.1 \pm 3.5$  % CD14<sup>+</sup>) y; 3) Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) para experimentos de estimulación con LPS (pureza:  $83.8 \pm 3.8$  % CD14<sup>+</sup>).

#### *Generación de DC Obtenidas de Monocitos (MoDC)*

[0202] Se cultivaron monocitos con una densidad de  $5 \times 10^6$  células/mL en placas de cultivo tisular de poliestireno de 6 y 12 pocillos a 37 °C y con un 5 % de CO<sub>2</sub> en RPMI-1640 (Gibco) suplementado con un 15 % de suero AB inactivado por calor (Gemini) y un 1 % de penicilina/estreptomicina (ahora denominado 'medio completo'). Se añadieron a los cultivos 800 UI/mL de GM-CSF recombinante humano (R&D Systems) y 1000 UI/mL de IL-4 recombinante humano (R&D Systems) durante 36 hr. para inducir una diferenciación de monocitos en DC como se ha descrito.

#### *Tratamiento con 8-MOP y Luz UVA*

[0203] Los cultivos se incubaron con 8-MOP (Uvadex, 20 µg/mL) durante 30 min a oscuras y luego se irradiaron con una caja de luz UVA de sobremesa que contenía una serie de 12 tubos fluorescentes lineales. Los tubos emitían luz UVA en un intervalo de 320 a 400 nm. La irradiancia UVA (potencia, W/m<sup>2</sup>) se midió utilizando un fotiododo. Dada una irradiancia medida y las propiedades de absorción de los diversos componentes del sistema, fue posible determinar el tiempo (seg) necesario para exponer las células para suministrar una dosis dada de radiación UVA (J/cm<sup>2</sup>).

#### *Cocultivos de MoDC/Linfocitos*

[0204] Las células no adherentes (pureza:  $66.0 \pm 4.5$  % CD3<sup>+</sup>) retiradas durante la adherencia a plástico se denominarán ahora en general 'linfocitos'. Los linfocitos se trataron con 8-MOP (100 ng/mL) y UVA (1 J/cm<sup>2</sup>), se lavaron con PBS y se cocultivaron en medios completos a 37 °C y con un 5 % de CO<sub>2</sub> con MoDC, bien tratadas con PUVA, bien no tratadas, en una relación de 5 o 10 linfocitos a 1 MoDC. Como grupo de control positivo se utilizaron MoDC tratadas durante 24 hr. con 100 nM de dexametasona (Sigma). Después de 24 hr., las células se cosecharon y las MoDC se repurificaron. Para garantizar que no se aislase ARN de los linfocitos en cantidades significativas, era

crítico repurificar las MoDC de todos los cultivos utilizando una selección positiva con perlas magnéticas de CD11c (Miltenyi Biotec) (pureza:  $96.4 \pm 1.0$  % CD11c<sup>+</sup>). Las CD11c<sup>+</sup> MoDC se volvieron a extender en placas a  $0.5-1.0 \times 10^6$  células/mL en medios completos y se estimularon con 100 ng/mL de LPS (Sigma). 24 hr. después de la estimulación con LPS, las células se cosecharon para un aislamiento de ARN y una inmunofenotipificación y los sobrenadantes se recogieron para una cuantificación de citocinas. Como controles negativos, unos grupos paralelos no recibieron LPS.

#### *Experimentos con ARNip*

**[0205]** Se utilizó ARNip de GILZ validado y prediseñado Silencer select (Invitrogen), con algoritmos de predicción de efecto no intencionado, para silenciar la expresión de GILZ. Se transfectaron Mo-DC utilizando Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen). El ARN<sub>i</sub> dúplex y el reactivo lipofectamina se incubaron juntos durante 20 min, luego se añadieron a cultivos de MoDC y se incubaron durante 2 hr. a 37 °C y con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Las MoDC transfectadas se trataron de manera idéntica a como se ha descrito para los cocultivos de MoDC/linfocitos. Las MoDC también se transfectaron con ARNip aleatorizado.

#### *Inmunofenotipificación*

**[0206]** Los anticuerpos monoclonales incluían HLA-DR, CD80, CD83, CD3, CD86, CD14, CD11c y GILZ. Los anticuerpos se obtuvieron de Beckman-Coulter y eBioscience y se utilizaron en sus diluciones óptimas predeterminadas. Se evaluó la apoptosis utilizando el Annexin-V Apoptosis Detection Kit (eBioscience), con la Anexina-V reconociendo fosfatidilserina (PS, por sus siglas en inglés) en la superficie de células apoptóticas. 7-AAD sustituyó a PI como el colorante de viabilidad celular. Las células que presentaban un fenotipo Anexina-V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> se clasificaron como células apoptóticas tempranas, y las células que presentaban un fenotipo Anexina-V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup> se clasificaron como células apoptóticas tardías. Se realizó una tinción doble de membrana e intracitoplasmática utilizando el equipo de reactivos de fijación y permeabilización IntraPrep (Beckman-Coulter). Se estableció una tinción de fondo con controles de isotipo y de fluorescencia menos uno apropiados. La inmunofluorescencia se analizó utilizando un FACSCalibur L (BD Biosciences) en un plazo de 2 hr. desde la fijación con un 2 % de paraformaldehído. Se recogieron un mínimo de 10 000 resultados por cada grupo.

#### *PCR Cuantitativa en Tiempo Real*

**[0207]** Se aisló ARN de CD11c<sup>+</sup> MoDC utilizando columnas QIAShredder (QIAGEN) y el RNeasy Mini Kit (QIAGEN) con tratamiento de ADNasa I en columna (QIAGEN). La pureza y la producción de ARN se evaluaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Se obtuvo ADNc utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) en un termociclador de 96 pocillos (MJ Research PTC-200). Se utilizó PCR en tiempo real TaqMan para detectar transcritos de GILZ, CD80 y CD86. Los cebadores y la sondas se obtuvieron como Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) validados y prediseñados. Se utilizó PCR en tiempo real SYBR green (Applied Biosystems) para detectar transcritos de IL-12, IL-10, IL-6, TNF-alfa y TGF-β. Los cebadores se diseñaron para abarcar empalmes de intrones utilizando Primer3Plus. Se obtuvieron curvas de fusión de cebador para confirmar un solo producto. Como genes de referencia se utilizaron HPRT-1 y GAPDH. Las muestras se procesaron por triplicado en un 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Se utilizó el método delta-delta C(t) para calcular el cambio múltiplo.

#### *Cuantificación de Citocinas*

**[0208]** Se analizaron sobrenadantes de cultivo en un formato multiplex utilizando perlas magnéticas para IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN-γ, TNF-α, RANTES, MCP-1 y MIP-1β (BioRad Laboratories). Para los experimentos con ARNip, se analizaron los sobrenadantes con equipos de reactivos de ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) para IL-10 (R&D Systems) e IL-12p70 (Enzo Life Science). Todas las muestras y estándares se procesaron por duplicado y se analizaron utilizando el LUMINEX 200 (LUMINEX) o el BioTek EL800 (BioTek).

#### *Análisis Estadístico*

**[0209]** Se utilizaron pruebas t de Student para comparaciones estadísticas entre grupos, con valores  $p < 0.05$  considerados estadísticamente significativos. La expresión génica diferencial se consideró estadísticamente significativa con un cambio múltiplo  $\geq 2.5$  y un valor  $p < 0.05$ .

## Resultados

*La expresión de GILZ se regula negativamente con rapidez a medida que los monocitos se diferencian en MoDC inmaduras*

5

[0210] Los monocitos CD14<sup>+</sup> recién aislados expresan GILZ, pero regulan negativamente GILZ con rapidez en más de un 99 % a medida que se diferencian en MoDC inmaduras (Figura 10A). Una reducción en ARNm de GILZ se confirmó por un 61 % de disminución en los niveles de proteína GILZ (Figura 10B). La regulación negativa de GILZ tenía correlación con una expresión reducida de CD14 (marcador específico de monocitos, véase Zhou et al., referencias) y una expresión aumentada de CD83 citoplasmático (marcador de MoDC inmaduras, véase Klein et al., referencias). Es importante señalar que las MoDC permanecieron inmaduras, expresando un CD83 de membrana bajo (marcador de DC maduras, véase Renzo et al., referencias,  $p = 0.16$ ). Las MoDC regulan positivamente GILZ después de un tratamiento con dexametasona (dex) de una manera dependiente de la dosis (Figura 10C). Se seleccionó un tratamiento con 100 nM de dex durante 24 hr. como control positivo para inducir la expresión de GILZ en MoDC (Dex-DC) (Figura 10D).

15

[0211] Un tratamiento con 8-MOP o UVA solos no logró la expresión de GILZ (Figura 10E). Sin embargo, cuando se trataron MoDC con la combinación de 8-MOP y luz UVA (PUVA-DC), la expresión de GILZ aumentó 5.5 veces. La inducción de GILZ mostró un curso lento en el tiempo, con un máximo 24 hr. después del tratamiento y permaneciendo significativamente elevada durante 72 hr. (Figura 10F). En comparación, Dex-DC reguló positivamente GILZ tan sólo 2 hr. después del tratamiento.

20

*Las MoDC inmaduras tratadas con la combinación de 8-MOP y luz UVA regulan positivamente GILZ y adoptan un fenotipo inmunosupresor tolerogénico*

25

[0212] A continuación se investigó si existía un efecto dependiente de la dosis de PUVA en la expresión de GILZ. Las MoDC tratadas con 1 J/cm<sup>2</sup> de UVA y 100 o 200 ng/mL de 8-MOP regularon positivamente GILZ 2.9 y 4.4 veces respectivamente (Figura 11A). Se observó un fenómeno dependiente de la dosis similar con 2 J/cm<sup>2</sup>, comenzando con una concentración de 8-MOP de 50 ng/mL. Un tratamiento con 0.5 J/cm<sup>2</sup> no tuvo efecto en la expresión de GILZ hasta que la concentración de 8-MOP alcanzó 200 ng/mL, y un tratamiento con 4 J/cm<sup>2</sup> tuvo como resultado altos niveles de muerte celular no específica (datos no mostrados). El número de fotoaductos formados por 10<sup>6</sup> pares de bases está relacionado directamente con el producto de la concentración de 8-MOP y la dosis de UVA, véase Gasparro et al., referencias. Cuando el producto de 8-MOP y UVA alcanzó 100, GILZ estaba regulada positivamente 3 veces, y cuando el producto aumentó a 200 y 400, GILZ estaba regulada positivamente 4.8 y 8.6 veces respectivamente (Figura 11B).

30

35

[0213] El porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> apoptóticas tempranas era mínimamente ( $p > 0.05$ ) mayor a 2 J/cm<sup>2</sup> en comparación con 1 J/cm<sup>2</sup> para todas las dosis de 8-MOP ensayadas (Figura 11C). A 2 J/cm<sup>2</sup> y 200 ng/mL, hubo un aumento en el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> apoptóticas tempranas en comparación con las MoDC no tratadas (Figura 11C). El porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> apoptóticas tardías permaneció inferior al 13 % a 1 J/cm<sup>2</sup> e inferior al 16 % a 2 J/cm<sup>2</sup> para todas las dosis de 8-MOP ensayadas (Figura 11D). Además, los gráficos de puntos destacan la resistencia relativa de las MoDC al efecto proapoptótico del aumento escalonado de las dosis de PUVA (Figura 11E). El número de células recuperadas de cultivos no difería estadísticamente en ningún grupo tratado con 1 o 2 J/cm<sup>2</sup> (datos no mostrados), y después del tratamiento se cosecharon más de un 90 % de células CD11c<sup>+</sup> (intervalo 91.0-97.5 %).

45

[0214] En cambio, los linfocitos presentan Anexina-V tan sólo 2 hr. después de un tratamiento con 1 J/cm<sup>2</sup> y 100 ng/mL (datos no mostrados). A diferencia de las MoDC tratadas con 100 ng/mL y 1 J/cm<sup>2</sup> (Figura 11F), 24 hr. después de un tratamiento con la misma dosis de PUVA, el porcentaje de linfocitos apoptóticos tempranos aumentó de un 6.6 % en las MoDC no tratadas a un 44.3 % en las PUVA-DC, y el porcentaje de linfocitos apoptóticos tardíos aumentó de un 4.5 % a un 33.7 % (Figura 11G). Dado que un  $64.3 \pm 3.2$  % de los linfocitos eran Anexina-V<sup>+</sup> 24 hr. después del tratamiento, los linfocitos tratados con PUVA se denominan a continuación linfocitos apoptóticos (ApoL).

50

[0215] La inducción de GILZ dependiente de la dosis de PUVA tenía correlación con una disminución en la expresión en la superficie celular de CD80, CD86 y CD83 (Figura 12A, 3B). La regulación negativa de estos marcadores ocurrió paralelamente a la inducción de GILZ (véase la Figura 11B), comenzando con concentraciones de 8-MOP de 100 ng/mL tanto para 1 como para 2 J/cm<sup>2</sup>. Cuando el producto de 8-MOP y UVA fue mayor de 100, la expresión de CD83,

55

CD80 y CD86 se había reducido en un 31 %, 30 % y 54 % respectivamente y la expresión de HLA-DR había aumentado en un 38 %.

*Las MoDC expuestas a linfocitos apoptóticos regulan positivamente GILZ y son resistentes a la maduración completa inducida por LPS*

5  
10  
15  
[0216] Para analizar minuciosamente las contribuciones individuales de PUVA y la exposición a células apoptóticas, en primer lugar se cocultivaron MoDC con proporciones variables de ApoL. GILZ se regulaba positivamente de una manera dependiente de la dosis de ApoL (Figura 13A). Cuando se expusieron PUVA-DC a ApoL, GILZ se expresó a niveles mayores que en PUVA-DC cultivadas solas (Figura 13B). PUVA-DC expuestas a ApoL también expresaron GILZ a niveles mayores que en MoDC no tratadas expuestas a ApoL (6.7 veces y 3.6 veces mayores, respectivamente). Hubo un aumento de 1.5 veces correspondiente en el nivel de proteína GILZ en todos los grupos en los que el ARNm de GILZ estaba regulado positivamente (Figura 13C). La inducción de GILZ no estaba relacionada con un aumento en el número de células CD11c<sup>+</sup> apoptóticas tempranas o tardías, dado que había < 12 % de células CD11c<sup>+</sup> apoptóticas tempranas (intervalo 3.8-11.4 %) y apoptóticas tardías (intervalo 6.3-11.5 %) en todos los grupos que mostraron regulación positiva de GILZ.

20  
25  
[0217] Las MoDC que expresaban GILZ más de 2.5 veces por encima de las MoDC no tratadas eran resistentes a la maduración completa por LPS y presentaban un fenotipo tolerogénico semimaduro. La estimulación con LPS aumentó la expresión de CD80 en las MoDC que regulaban positivamente GILZ a sólo un 50 % de los niveles observados después de la estimulación con LPS en MoDC no tratadas (Figura 13D, intervalo 0.48-0.57 %), y aumentó la expresión de CD86 a sólo un 45 % de las MoDC no tratadas (Figura 13D, intervalo 0.42-0.47 %). Se obtuvieron resultados similares para HLA-DR y CD83 (Figura 14E, intervalo 47-65 % y 23-57 % de las MoDC no tratadas después de LPS respectivamente). Además, las MoDC que regulaban positivamente GILZ expresaron un 6 % del ARNm de CD80 de las MoDC no tratadas (intervalo 4.5-7.5 %), y expresaron un 50 % del ARNm de CD86 de las MoDC no tratadas (intervalo 12.4-85.1 %), según se evaluó mediante qRT-PCR.

*Las MoDC que expresan GILZ muestran un perfil de citocinas tolerogénico y el silenciamiento de GILZ reduce la relación IL-10 a IL-12p70*

30  
35  
40  
[0218] Se cosecharon sobrenadantes de cocultivos como se describe en la Figura 13B. Las Dex-DC regularon positivamente GILZ 4.29 veces (véase la Figura 13B), aumentaron la producción de IL-10 (Figura 14A) y disminuyeron la producción de todas las citocinas (Figura 14B, 14C) y quimiocinas (Figura 14D, 14E) proinflamatorias ensayadas. En comparación, las PUVA-DC regularon positivamente GILZ 2.78 veces (véase la Figura 13B), aumentaron la producción de IL-10 y disminuyeron la producción de todas las citocinas y quimiocinas proinflamatorias ensayadas, excepto TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Las PUVA-DC o las MoDC no tratadas, expuestas a ApoL, expresaron GILZ a niveles mayores que las PUVA-DC cultivadas solas (3.6 y 6.7 veces mayores, respectivamente; véase la Figura 13B). Estos dos grupos aumentaron la producción de IL-10 y disminuyeron la producción de todas las citocinas y quimiocinas proinflamatorias ensayadas. Los niveles de citocinas se confirmaron a nivel del ARN, mostrando las MoDC que regulaban positivamente GILZ también una regulación positiva de ARNm de IL-10 8 veces mayor que las MoDC no tratadas (intervalo 5.5-11.8,  $p < 0.01$ ). Las reducciones en IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-6 se confirmaron también a nivel del ARN (datos no mostrados). TGF- $\beta$  estaba regulado positivamente 2.5 veces en MoDC que regulaban positivamente GILZ (datos no mostrados). TGF- $\beta$  no estaba incluido en el análisis multiplex y, por lo tanto, se analizó sólo a nivel del ARNm.

45  
50  
[0219] La relación IL-10 a IL-12p70 es un indicador útil de tolerogenicidad, dado que las DC tolerogénicas se caracterizan por una relación IL-10 a IL-12p70 aumentada, véase Steinman et al., referencias). La relación de IL-10 a IL-12p70 aumentó de 6.7 en MoDC no tratadas a 67.7 en Dex-DC. De manera similar, la relación IL-10 a IL-12p70 aumentó a 38.7 en PUVA-DC y a 89.4 y 114.9 en MoDC no tratadas y PUVA-DC expuestas a ApoL, respectivamente ( $p < 0.05$ ).

55  
[0220] Para evaluar si la inducción de GILZ mediaba en el perfil de citocinas tolerogénico, se transfectaron MoDC con ARNip para silenciar la expresión de GILZ. La transfección con ARNip de GILZ redujo la expresión de GILZ en Mo-DC en un 68 % (Figura 15A, intervalo 59-79 %). La transfección con ARNip aleatorizado no cambió significativamente la expresión de GILZ. Tampoco hubo ninguna diferencia significativa en el número de células recuperadas de cualesquiera grupos transfectados con ARNip en comparación con grupos no transfectados (datos no mostrados).

[0221] Las MoDC tratadas que regularon positivamente GILZ 2.5 veces más que las MoDC no tratadas produjeron niveles mayores de IL-10 (Figura 15B), y el silenciamiento de GILZ redujo la producción de IL-10 en un 39 % (intervalo 34-48 %,  $p < 0.05$ ). Las MoDC tratadas que regularon positivamente GILZ 2.5 veces más que las MoDC no tratadas también produjeron cantidades menores de IL-12p70 (Figura 15C), y el silenciamiento de GILZ aumentó la producción de IL-12p70 en un 188 % (intervalo 149-214 %,  $p < 0.05$ ). El tratamiento con ARNip aleatorizado no tuvo un efecto apreciable en la producción de IL-10 o IL-12p70. El silenciamiento de GILZ redujo la relación IL-10 a IL-12p70 que había sido elevada después de la inducción de GILZ. Las Dex-DC tratadas con ARNip de GILZ mostraron una reducción en la relación IL-10 a IL-12p70 de 15.3 en MoDC no transfectadas a 3.9 en Dex-DC transfectadas. En las PUVA-DC, la relación disminuyó de 8.4 en MoDC no transfectadas a 2.9 en PUVA-DC, y, en MoDC no tratadas y PUVA-DC expuestas a ApoL, se observaron reducciones en la relación de 18.1 a 7.8 y 28.4 a 8.3, respectivamente.

[0222] Estos resultados demuestran que, al igual que otros mediadores inmunosupresores, PUVA induce la expresión de GILZ y genera células dendríticas inmunosupresoras tolerogénicas, caracterizadas por una baja expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, y el marcador de maduración CD83. La inducción de GILZ es necesaria para la polarización hacia un perfil de citocinas tolerogénico, caracterizado por una producción aumentada de IL-10, y la producción disminuida de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, incluyendo IL-12p70. Estos resultados implican además que GILZ es el conmutador molecular que media en los efectos inmunosupresores de células apoptóticas.

### Experimento 3 – Identificación de marcadores moleculares adicionales para células dendríticas inmunoestimuladoras

#### Materiales y Métodos

##### *Muestras de pacientes*

[0223] Se obtuvieron leucocitos de pacientes que se estaban sometiendo a FEC utilizando el UVAR XTS Photopheresis System (Therakos) bajo las directrices de la Yale Human Investigational Review Board. Se proporcionó consentimiento informado según la Declaración de Helsinki. Se obtuvieron alícuotas en 3 momentos: antes del tratamiento (Pre FEC), inmediatamente después de una exposición a 8-MOP/ultravioleta A (UVA) (FEC Día 0) o después de una incubación de 18 horas de leucocitos mononucleares de sangre tratada (FEC Día 1) en una bolsa de almacenamiento de plaquetas de 1-L (PL-2410; Baxter).

##### *Individuos normales*

[0224] Para determinar si la FEC induce a los monocitos de individuos sanos a convertirse en DC, se examinaron leucocitos mononucleares de individuos normales de 2 maneras. Unos leucocitos obtenidos por leucoféresis de individuos normales (N = 3) se estudiaron antes del tratamiento (pre-FEC), inmediatamente después de la FEC (FEC Día 0) y 18 horas después de la FEC (FEC Día 1). Un aparato de sobremesa, que incluía una fuente de luz UVA y una placa de exposición de plástico, permitió una reproducción en laboratorio del sistema de FEC clínico y un acceso a muestras para el aislamiento de ARN paralelo, la inmunofenotipificación y estudios funcionales. Como alternativa, se extrajo una unidad de sangre de individuos normales a una bolsa de transferencia y se hizo pasar dicha unidad de sangre a través del aparato de tratamiento de FEC de manera idéntica a la de los pacientes tratados (N = 3). Las células obtenidas de la unidad de sangre normal se utilizaron para ensayos de presentación de antígeno y micromatrices.

##### *Adición de psoraleno*

[0225] Como se hace de forma rutinaria durante la FEC, la solución concentrada de 8-MOP estándar (Therakos) se añadió directamente al aparato de FEC clínico y al sistema del modelo de laboratorio. Ese modo de introducción permitió concentraciones exactas de 100-200 ng/mL a lo largo de toda la duración de los procedimientos clínicos y la experimentación.

##### *Cultivo durante la noche*

[0226] En la FEC no es posible examinar cambios fenotípicos y funcionales en monocitos tratados, porque esas células se reintroducen por infusión inmediatamente en los pacientes. Por lo tanto, después de la FEC, las células se cultivaron durante 18 horas (RPMI 1640/15 % de suero autólogo) para estudiar la activación génica, la maduración y la función de los monocitos inducidas. Antes (pre-FEC) e inmediatamente después de la FEC (FEC Día 0), se aislaron muestras

de pacientes y de individuos normales mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque. Las células se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Gibco), suplementado con un 7.5 % de suero AB, un 7.5 % de suero autólogo (Gemini Bio-Products), y se cultivaron (para los pacientes) en placas de cultivo tisular de poliestireno de 6 pocillos con una densidad de  $5 \times 10^6$  células/mL y en bolsas de almacenamiento de plaquetas Baxter (para los individuos normales 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Después del cultivo durante la noche (FEC Día 1), las células se cosecharon antes de someterlas a un enriquecimiento de monocitos. Para generar DC para análisis fenotípicos comparativos, las células se cultivaron en RPMI 1640 15 % de suero en presencia de 1 mL de GMCSF e IL4 (25 ng/mL; R&D Systems) durante 6 días.

#### *Enriquecimiento por perlas magnéticas de la población de monocitos*

**[0227]** Para posibilitar la determinación de si la FEC activa genes que dirigen a los monocitos a la vía madurativa de las células dendríticas, fue necesario desarrollar un método de enriquecimiento de monocitos negativo moderado que elimine la contribución de los linfocitos al análisis transcriptómico, minimizando al mismo tiempo la perturbación de membrana celular o física de los monocitos. Los monocitos se enriquecieron a partir del conjunto de células mononucleares mediante un solo paso a través de columnas de afinidad. Este método de selección negativa limitó la perturbación física, mientras que los linfocitos adherentes a microperlas magnéticas (Miltenyi Biotec), conjugados con anticuerpos monoclonales relevantes (anti-CD4, CD8, CD19), se empobrecían. Sin embargo, el enriquecimiento de monocitos de FEC Día 1 más allá de un 60 %-80 % resultaba difícil, porque la presentación en superficie disminuida de marcadores de linfocitos por parte de los linfocitos dañados por la FEC permitió que una fracción de células T y B escapase a la retención en las columnas. Repetir pasadas a través de la columna de afinidad, para mejorar aun más la pureza de los monocitos, no era una opción, porque esa estrategia agrava la perturbación física de los monocitos filtrados de forma pasiva. Fortuitamente, una serie de análisis reveló que el daño preferencial de la FEC a los linfocitos excluía la necesidad de una purificación completa de los monocitos para una evaluación precisa del nivel de activación génica de DC. Debido a su extrema sensibilidad al 8-MOP activado por UVA, el 99 % de los linfocitos procesados por FEC eran apoptóticos después de una incubación durante la noche (como se determinó mediante tinción con APO2-PE, azul de tripano y/o anexina-isotiocianato de fluoresceína FITC/ioduro de propidio). Debido a que la FEC causa una apoptosis global de linfocitos, el 90 %-95 % de los leucocitos mononucleares viables en la fracción de FEC día 1 eran monocitos. Este fenómeno explica la observación de que la eliminación de linfocitos apoptóticos por perlas magnéticas de múltiples etapas, realizada como se explica posteriormente y que produce una pureza de monocitos de más del 95 %, no altera los niveles de la expresión génica observada en las poblaciones de células estudiadas. Para efectuar esa comparación, modificamos el procedimiento de purificación de monocitos adaptando un protocolo de selección negativa utilizando perlas magnéticas y el imán EasySep. Se centrifugaron células mononucleares de sangre periférica a baja velocidad (120 g durante 10 minutos) para eliminar las plaquetas. Luego, las células se marcaron utilizando el Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) siguiendo el procedimiento del fabricante con las siguientes modificaciones: (1) el tampón consistía en solución salina tamponada con fosfato helada que contenía un 2 % de suero autólogo y 1mM de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); (2) el tiempo de bloqueo se aumentó a 10 minutos; (3) el marcado con el Biotin-Antibody Cocktail se aumentó a 20 minutos; y (4) las células se lavaron una vez entre el marcado con el Biotin-Antibody Cocktail y las Anti-Biotin Microbeads. Para evitar estimular los monocitos haciéndolos pasar por una columna, las células marcadas magnéticamente se separaron en lugar de ello de los monocitos no marcados utilizando el imán EasySep (StemCell Technologies). Las células, en 2 ml de tampón en un tubo de poliestireno de 5-ml, se colocaron en el imán durante 10 minutos y luego las células no marcadas se vertieron cuidadosamente en un nuevo tubo. Este procedimiento se repitió 2 veces para mejorar al máximo la pureza de los monocitos. En este punto, debido a que la pureza era aún insuficiente, las células se marcaron de nuevo con los reactivos del Monocyte Isolation Kit II y se colocaron en el imán EasySep durante 10 minutos más, y los monocitos no marcados se eluyeron. La pureza final ( $X=96 \text{ \%}+4.5$ ) se evaluó mediante análisis citométrico de flujo de tinción de CD14.

#### *Inmunofenotipificación*

**[0228]** Los anticuerpos monoclonales específicos para monocitos y células dendríticas incluían: CD14 (receptor de lipopolisacárido [LPS], monocitos); CD36 (receptor para células apoptóticas, monocitos); antígeno leucocitario humano DR-1 (HLA-DR; molécula de complejo principal de histocompatibilidad [CPH] clase II); CD83 (marcador de células dendríticas); proteína de membrana asociada a lisosoma de célula dendrítica citoplasmática (DC-LAMP, por sus siglas en inglés; marcador de células dendríticas); y CD80 y CD86 (moléculas coestimuladoras de B7.1 y B7.2). Los anticuerpos se obtuvieron de Beckman Coulter y se utilizaron en sus diluciones óptimas predeterminadas. Se estableció una tinción de fondo con controles de isotipo apropiados y se analizó la inmunofluorescencia utilizando un

citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter). Se realizó una tinción de membrana y citoplasmática combinada siguiendo las instrucciones del fabricante para permeabilización y fijación celular (Intraprep kit; Beckman Coulter).

#### Ensayo de presentación de antígeno

5 [0229] Se añadieron poblaciones de CD4<sup>+</sup> que habían estado en contacto previamente con el antígeno, enriquecidas por perlas magnéticas, recién aisladas de voluntarios (2\*10<sup>6</sup>/mL, 50 µL/pocillo) a monocitos (2\*10<sup>6</sup>/mL, 50 µL/pocillo) en presencia de toxoide tetánico (10 µg/mL, 100 µL/pocillo) y medio RPMI 1640/15 % de suero autólogo. Después de 10 5 días de cultivo, las células recibieron 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina y se incubaron durante la noche, se cosecharon y se contaron en un contador de centelleo líquido Beta (PerkinElmer). Los resultados se presentan como la media y desviación estándar de 5 cultivos duplicados.

#### Ensayo MLR/CML

15 [0230] Para evaluar si los monocitos procesados por FEC son funcionalmente capaces de estimular la citotoxicidad restringida por CPH clase I por parte de células T CD8, se estudiaron leucocitos mononucleares de 3 individuos normales. Se utilizó una unidad de sangre anticoagulada, recién obtenida de cada uno de los 3 voluntarios positivos para HLA-A2, como fuente de monocitos estimuladores/células dendríticas, antes y después de su procesamiento a través del aparato de FEC clínico de manera idéntica al procedimiento de FEC real. Se aislaron fracciones 20 mononucleares de la sangre inmediatamente antes del procesamiento por FEC (pre-FEC) e inmediatamente después de la FEC (FEC D0). Después de una irradiación gamma (3000 rad, fuente de cesio) para asegurar una estimulación unidireccional de células T, la fracción Pre FEC se diluyó en serie en RPMI 1640/15 % de suero autólogo, y se extendieron 100 µL, que contenían entre 25 000 y 250 células, en pocillos de placa de microtitulación de fondo redondo, en 5 réplicas. La fracción FEC D0 se incubó durante 18 horas en placas de pocillos grandes y se cosechó 25 raspando los pocillos para liberar las células adherentes. Luego, las células resuspendidas se diluyeron en serie y se extendieron en placas como se ha indicado antes. Se utilizó un donante normal negativo para A-2 como fuente de células T CD8 y CD4 respondedoras, purificadas mediante selección positiva en columnas de perlas magnéticas Miltenyi (pureza media 98 %). Las células T respondedoras (50 000/pocillo en 100 µL) se añadieron luego a los pocillos que contenían estimuladores Pre-FEC o bien FEC-D0, y las placas se cultivaron durante 7 días a 37 °C en un 30 incubador de CO<sub>2</sub>. Para las células objetivo, la línea de linfoblastos de hibridoma T-B positiva para A-2, 174 × CWM.T1, se marcó con <sup>51</sup>Cr y se añadió a los cultivos de MLR a 10<sup>4</sup> células/pocillo. Después de una incubación de 4 horas, las placas se centrifugaron y se retiraron 100 µL de sobrenadante de cada pocillo para el recuento en un contador gamma. "Lisis específica porcentual" se definió como 100 veces la fracción siguiente:

35 Media cpm (muestra) - Media cpm (células T sólo)  
Media cpm (liberación máxima detergente) - media cpm (células T sólo)

#### Aislamiento de ARN e hibridación de micromatrices

40 [0231] Se aisló ARN total utilizando columnas RNeasy Mini Kit con tratamiento por ADNasa I en columna (QIAGEN). La pureza y la producción de ARN se midieron utilizando el NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer y el Agilent 2100 Bioanalyzer. Se hibridaron ARNc fragmentados en chips humanos Affymetrix HG U133 Plus 2.0, y el Yale University W. M. Keck Resource Laboratory realizó un cribado para aproximadamente 47 400 genes humanos y EST. Los resultados de las micromatrices están disponibles en Gene Expression Omnibus con el número de entrada GSE23604.

#### 45 Análisis de datos

[0232] Se analizaron datos en bruto sin normalización generados a partir del Affymetrix GeneChip Operating Software Version 1.2 (GCOS 1.2; Affymetrix) utilizando *software* GeneSpring 7.2 (Agilent Technologies-Silicon Genetics). Los 50 datos se normalizaron utilizando Robust Multi-Array. En el análisis se incluyeron sólo conjuntos de sondas con un cambio múltiplo mínimo de >2.0 combinado con una intensidad media de señal de 500 o mayor en muestras, bien de leucofóresis, bien tratadas. La expresión génica diferencial se consideró como un cambio múltiplo  $\geq 2$  y  $P \leq .05$ . Se realizó mediante metodología estándar un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) de los transcriptomas inducidos. Se identificó la implicación de la vía de transducción de señal con MetaCore Software 55 Version 1.0 (GeneGo).

#### PCR cuantitativa en tiempo real

[0233] La expresión en micromatrices de genes seleccionados se confirmó en alícuotas de las mismas muestras de ARN, utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) cuantitativa en tiempo real. El ARN se sometió a una transcripción inversa a ADNc utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). La transcripción inversa se llevó a cabo en un termociclador de 96 pocillos (MJ Research PTC-200) en las siguientes condiciones: 25 °C, 10 minutos, 37 °C, 120 minutos, 85 °C, 5 segundos. Se utilizó PCR en tiempo real TaqMan para detectar transcritos de DC-LAMP, CCR7, CD80, CD86 y CD14. Los cebadores y las sondas para cada secuencia se obtuvieron como Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) inventariados. Se utilizó HPRT1 como gen de referencia.

**Resultados**

*Cambios grandes inducidos por FEC en expresiones génicas individuales*

[0234] La estimulación por FEC de la activación de genes individuales en monocitos se expresó como la relación de la expresión de FEC Día 1 a pre-FEC para el gen pertinente. Para excluir una inducción génica no buscada durante el enriquecimiento de monocitos, se utilizó un método de purificación en columna negativa, en donde los linfocitos se retenían y los monocitos se filtraban de manera pasiva. Los resultados revelaron que los monocitos procesados por FEC procedentes tanto de pacientes como de individuos normales seguían siendo suficientemente viables para expresar de manera reproducible una firma transcriptómica compartida.

[0235] Los genes se consideraron significativamente regulados positiva o negativamente por la FEC si el cambio múltiplo era  $\geq 2$  y la significación era  $P \leq .05$  en comparación con pre FEC. Los niveles de transcritos de ARN de aproximadamente 3000 genes estaban significativamente cambiados en cada grupo de pacientes y en individuos normales (Tabla 2). En total, 1129 genes estaban regulados positiva o negativamente en común por monocitos procesados por FEC procedentes de pacientes tanto de CTCL como de EICH y de individuos normales, lo que indicaba una comunidad en la activación génica inducida por FEC.

Tabla 2: Número de Genes de Monocito con Expresión Alterada después de FEC.

Fuente de Monocitos	Total	Regulados positivamente	Regulados negativamente
Individuos Normales (solos): N=6	3666	1494 (41 %)	2172 (59 %)
CTCL (solos): N=3	4315	2613 (61 %)	1702 (38 %)
EICH (solos): N=3	4350	2658 (61 %)	1692 (39 %)

Número de genes significativamente inducidos o suprimidos por FEC.

[0236] La expresión aumentada de numerosos genes asociados con la diferenciación, adhesión y función de las células dendríticas (Tabla 3) respalda adicionalmente la estimulación por FEC de la entrada de monocitos en esa vía.

Tabla 3: Expresión Aumentada por FEC de Genes Marcadores de DC, Relación\* de Niveles Post-FEC/Pre-FEC

Gen	Atributos	Relación de Expresión Inducida en CTCL y EICH (N=6)	Relación de Expresión Inducida en Individuos Normales (N=6)
DC-LAMP	Proteína Lisomal de DC	27.6 $p=1.2 \times 10^{-09}$	17.2 $p=1.4 \times 10^{-07}$
GPNMB	Glucoproteína Transmembrana	205.7 $p=9.6 \times 10^{-15}$	123.3 $p=2.8 \times 10^{-14}$
CD80	Molécula coestimuladora, B7.1	13.4 $p=2.3 \times 10^{-13}$	NC
CD86	Molécula coestimuladora, B7.2 <sup>s</sup>	NC	5.0 $p=1.4 \times 10^{-05}$
CD40	Implicado en la supervivencia de DC	2.3 $p=5.7^{-04}$	NC
Decisina	Similar a ADAM, Expresada en DC maduras por LPS	26.5 $p=1.0 \times 10^{-09}$	7.1 $p=5.6 \times 10^{-04}$

CCR7	Molécula buscadora de ganglios linfáticos	2.6 $p=7.0 \times 10^{-03}$	NC
CD83	Molécula de maduración de DC	NC	2.3 $p=0.03$
OLR1	Lox1, receptor similar a lectina	13.6 $p=3.3 \times 10^{-05}$	100.1 $p=8.3 \times 10^{-08}$
CLEC5A	MDL-1	10.9 $p=9.5 \times 10^{-07}$	45.5 $p=1.6 \times 10^{-08}$
FPRL2	Similar a receptor de péptido formilo 2	33.9 $p=2.1 \times 10^{-08}$	43.2 $p=1.9 \times 10^{-08}$
SDC2	Sindecano, proteoglicano de superficie celular	21.7 $p=9.3 \times 10^{-08}$	98.9 $p=3.3 \times 10^{-09}$
THBS1	Trombospondina 1	6.2 $p=7.8 \times 10^{-08}$	10.4 $p=4.7 \times 10^{-09}$

\*Relación = (Expresión Génica Pre-FEC) a (Expresión Génica Post-FEC), aumento múltiplo en expresión de múltiples genes implicados en la maduración y función de las DC inducidas por FEC. El impacto del tratamiento en la expresión génica se muestra como una *Relación de Expresión Inducida* (relación de expresión post-FEC a pre-FEC para el gen pertinente). Se aisló ARN de 3 pacientes de CTCL y 3 pacientes de EICH y 6 individuos normales en los momentos pertinentes.

[0237] En la Tabla 1 están representados genes adicionales, cuya expresión se halló aumentada y que pueden considerarse marcadores moleculares de células dendríticas inmunoestimuladoras.

- 5 [0238] Como sería de esperar durante la maduración de monocitos a células dendríticas, la expresión de CD14 (marcador de monocitos) estaba disminuida, según se evaluó midiendo la intensidad media de fluorescencia en las poblaciones de monocitos de todos los pacientes e individuos normales, después de un cultivo durante la noche de monocitos procesados por FEC. Este resultado se confirmó en estudios por RT-PCR de las células post-FEC de los pacientes (resultados no mostrados). En la Tabla 4 se muestran factores adicionales, cuya expresión estaba reducida
- 10 indicando una maduración de monocitos a células dendríticas.

Tabla 4: Expresión Reducida por FEC de Genes Marcadores de Monocitos, Relación\* de Niveles Post-FEC/Pre-FEC

Gen	Atributos	Relación de Expresión Inducida en CTCL y EICH (N=6)	Relación de Expresión Inducida en Individuos Normales (N=6)
CD33	Proteína de superficie celular expresada en monocitos	-2.2 $p=4.5 \times 10^{-04}$	NC
CD36	Receptor para células apoptóticas	-7.4 $p=7.9 \times 10^{-05}$	NC
FCGR1A	Receptor para fragmento 1A de IgGfc	-6.9 $p=6.6 \times 10^{-05}$	-4.4 $p=2.1 \times 10^{-03}$

\*Relación = (Expresión Génica Pre-FEC) a (Expresión Génica Post-FEC), disminución múltiplo en expresión de genes distintivos de monocitos inducidos por FEC, a medida que los monocitos se diferencian en DC. El impacto del tratamiento en la expresión génica se muestra como una *Relación de Expresión Inducida* (relación de expresión post-FEC a pre-FEC para el gen pertinente). Se aisló ARN de 3 pacientes de CTCL y 3 pacientes de EICH y 6 individuos normales en los momentos pertinentes.

- 15 [0239] En la Tabla 5 se muestran factores adicionales, cuya expresión estaba reducida y, por lo tanto, indicaban una maduración de monocitos a células dendríticas inmunosupresoras.

Tabla 5: Expresión Aumentada por FEC de Genes Asociados con Inmunosupresión, Relación\* de Niveles Post-FEC/Pre-FEC.

Gen	Atributos Normal	Relación de Expresión Inducida en CTCL y EICH (N-6)	Relación de Expresión Inducida en Individuos Normales (N-6)
IDO	Indolamina	27.8 $p=4.0 \times 10^{-10}$	9.4 $p=1.1 \times 10^{-06}$
KMO	quinurenina 3-hidroxilasa	6.0 $p=2.5 \times 10^{-06}$	NC
IL10	Interleucina 10	6.3 $p=9.2 \times 10^{-06}$	8.6 $p=5.7 \times 10^{-06}$

\*Relación = (Expresión Génica Pre-FEC) a (Expresión Génica Post-FEC), aumento múltiplo inducido por FEC en expresión de genes que contribuyen a la capacidad de las DC de suprimir reacciones inmunológicas mediadas por células T. El impacto del tratamiento en la expresión génica se muestra como una *Relación de Expresión Inducida* (relación de expresión post-FEC a pre-FEC para el gen pertinente). Se aisló ARN de 3 pacientes de CTCL y 3 pacientes de EICH y 6 individuos normales en los momentos pertinentes.

#### 5 Experimento 4 – Marcadores moleculares de superficie y mediadores funcionales de DC inmunoestimuladoras.

[0240] Se realizó un análisis adicional del transcriptoma de células dendríticas inducidas por FEC para identificar un subconjunto de productos génicos moleculares de superficie como marcadores y mediadores funcionales de células dendríticas inmunoestimuladoras. De 466 genes regulados positivamente en células dendríticas inducidas por FEC, se realizó una referencia cruzada con aproximadamente 2000 genes transmembrana humanos de longitud completa conocidos o supuestos para identificar 87 proteínas de superficie compartidas.

#### Materiales y Métodos

##### 15 *Obtención de leucocitos y plaquetas*

[0241] Todas las muestras se adquirieron de individuos jóvenes y sanos que no tomaban medicaciones, incluyendo aspirina, que se sabe que influyen en la función plaquetaria. Las muestras se obtuvieron bajo las directrices de la Yale Human Investigational Review Board y se proporcionó un consentimiento informado según la Declaración de Helsinki. Se recogieron muestras de sangre periférica a través de una aguja de calibre 19 de la vena antecubital en jeringas que contenían heparina, luego se colocaron dichas muestras en capas sobre Ficoll-Hypaque (Gallard-Schlessinger, Carle Place, N.Y.). Después de una centrifugación a 180 g, la interfase que contenía la fracción de leucocitos mononucleares se recogió y se lavó dos veces en HBSS, luego se resuspendió en medio RPMI-1640 (GIBCO) hasta una concentración final de  $5 \times 10^6$  células mononucleares/ml. Las células se utilizaron en el plazo de una hora después de su adquisición.

##### *Preparación de Plasma rico en Plaquetas*

[0242] Se centrifugó sangre completa a 150 g durante 15 min a temperatura ambiente. La capa de plasma rico en plaquetas (PRP) se recogió y se centrifugó a 900 g durante 5 min, y el sedimento de plaquetas se resuspendió en RPMI 1640 hasta la concentración deseada.

##### *Preparación de Placas*

[0243] El paso en placas se realizó utilizando un sistema Glycotech (Glycotech, Rockville, MD). Este sistema consistía en una vía de flujo volumétrico que medía  $20\ 000 \times 10\ 000 \times 254$  micras (longitud  $\times$  anchura  $\times$  altura). La placa inferior de este sistema se componía de una placa de Petri de 15 mm (BD Biosciences, Durham, NC) separada por una junta y conectada en vacío a una cubierta de flujo acrílica, que formaba la placa superior. Para el revestimiento previo con plaquetas, antes de ensamblar la cámara de flujo, se colocaron 20 gotas con la concentración deseada de PRP en el centro de la placa de Petri y se dejó que las plaquetas se asentasen durante 20 minutos a temperatura ambiente. La placa de Petri se lavó dos veces con 2 ml de RPMI y luego se ensambló la cámara de flujo.

*Cultivo durante la noche*

5 [0244] Cuando fue necesario un cultivo durante la noche, las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio RPMI-1640 (GIBCO), suplementado con un 15 % de suero AB (Gemini Bio-Products) hasta una concentración final de  $5 \times 10^6$  células/ml. Las células se cultivaron durante la noche durante 18 horas en placas de cultivo tisular de poliestireno de 12 pocillos (2 ml por pocillo) a 37 °C en un 5 % de CO<sub>2</sub>.

*Inmunofenotipificación*

10 [0245] Los anticuerpos monoclonales para la inmunofenotipificación incluían CD14 (receptor de LPS; monocitos), CD11c (subunidad de integrina; monocitos y DC), HLA-DR (molécula de CPH de clase II), CD83 (marcador de DC), CD62p (P-selectina; plaquetas activadas) y CD61 (subunidad de integrina; plaquetas). Los anticuerpos se obtuvieron de Beckman Coulter (CD14, CD11c, HLADR, CD83) o Sigma (CD62p, CD61) y se utilizaron en sus diluciones óptimas predeterminadas. Se estableció una tinción de fondo con controles de isotipo apropiados y se analizó la inmunofluorescencia utilizando un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter). Se realizó una tinción de membrana de dos colores añadiendo las concentraciones óptimas predeterminadas de ambos anticuerpos directamente conjugados a FITC o PE e incubando durante 20 min a 4 °C, a lo que siguió un lavado para eliminar anticuerpos no unidos. Se realizó una tinción de membrana y citoplasmática combinada siguiendo las instrucciones del fabricante para permeabilización y fijación celular (Intraprep kit, Beckman Coulter).

**Resultados**

25 [0246] Las poblaciones pasadas por placas y/o de CMSP D1 mostraron una regulación positiva significativa de la expresión en superficie analizada de SIRPa, ICAM1, CXCL16, LIGHT, PLAUR (CD87, activador de plasminógeno, receptor de urocinasa), MSR1, Neu1 (sialidasa), CD137L y CATB (CTSB, catepsina B).

**Experimento 5 – Determinación de la expresión de marcadores moleculares y complejidad FSC/SSC tras el paso de monocitos a través de la cámara de flujo****Materiales y Métodos**

30 [0247] Se hicieron pasar monocitos a través de un dispositivo representado en la Fig. 19. En resumen, se hizo girar una muestra de sangre a baja velocidad a través de un gradiente de Ficoll para obtener, por ejemplo, 8 ml de una muestra con una concentración de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de, por ejemplo,  $10^{10}$  células/ml. La cámara se revistió previamente con plaquetas. La muestra se hizo pasar a través de la cámara a aproximadamente 0.028 Pa y luego se lavó con aproximadamente 3 ml de RPMI a 0.028 Pa. Un segundo lavado con 30-55 ml de RPMI se realizó a aproximadamente 1.2 Pa. Los monocitos activados recogidos se combinaron, se incubaron durante un día y se utilizaron para un análisis posterior (PP D1 CMSP). Como control, unas CMSP no se hicieron pasar a través del dispositivo y se incubaron durante un día (D1 CMSP). Como otro control, se obtuvieron DC rápidas inmaduras cultivando directamente CMSP en presencia de GM-CSF e IL-4 (DC Rápidas inmaduras). Además, se analizaron CMSP directamente después de la cosecha a través de un gradiente de Ficoll (CMSP (Ficoll) Recientes).

45 [0248] Luego, las células y los controles se analizaron en cuanto a la expresión de HLA-DR, CD86, ICAM-1 y PLAUR. Se analizaron adicionalmente en cuanto a la complejidad FSC/SSC. Los resultados están representados para HLA-DR en la Figura 20 y para la complejidad FSC/SSC en las Figuras 21 y 22. En la Figura 23 se muestra un resumen.

**Resultados**

50 [0249] Los resultados muestran que las células sometidas a centrifugación a través de un gradiente de Ficoll parecen experimentar ya suficientes fuerzas físicas para comenzar a diferenciarse, como queda patente a partir de la incubación de estas células durante un día (D1 CMSP). Sin embargo, la activación y la diferenciación son más pronunciadas tras un paso en placas a través del dispositivo (PP D1 CMSP). Las células dendríticas obtenidas mediante métodos según la invención en ausencia de, por ejemplo, 8-MOP y UV-A tienen además un patrón más complejo y definido que las DC Rápidas inmaduras obtenidas con cócteles de citocinas.

## Referencias:

**[0250]**

- 5 1. Berger C, Hoffmann K, Vasquez JG, ManeS, Lewis J, Filler Retal. Rapid generation of maturationally synchronized human dendritic cells: contribution to the clinical efficacy of extracorporeal photochemotherapy. *Blood* 2010; 116(23): 4838-4847.
- 10 2. Celia M, Scheidegger D, PalmerLehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 184(2): 747-752.
- 15 3. de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* 1998; 9(3): 325-336.
- 20 4. Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD80 and CD86 are not equivalent in their ability to induce the tyrosine phosphorylation of CD28. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(5): 3116-3124.
- 25 5. Kang HK, Lee HY, Kim MK, Park KS, Park YM, Kwak JY et al. The synthetic peptide Trp- Lys-Tyr-Met-Val-D-Met inhibits human monocyte-derived dendritic cell maturation via formyl peptide receptor and formyl peptide receptorlike 2. *Journal of Immunology* 2005; 175(2): 685-692.
6. Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, Sweet MJ, Hume DA. Gpnmb is induced in macrophages by IFN-gamma and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. *Journal of Immunology* 2007; 178(10): 6557-6566.
7. Chen SQ, Springer TA. Selectin receptor-ligand bonds: Formation limited by shear rate and dissociation governed by the Bell model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(3): 950-955.
8. Thomas WE. Understanding the counterintuitive phenomenon of catch bonds. *Current Nanoscience* 2007; 3: 63-83.
9. Xiong JP, Stehle T, Zhang RG, Joachimiak A, Freeh M, Goodman SL et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002; 296(5565): 151-155.
10. Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS. Examination of the Platelet Membrane Glycoprotein-IIB-IIIa Complex and its Interaction with Fibrinogen and Other Ligands by Electron-Microscopy. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(23): 16637-16643.
11. Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, Lesznik GR, Drillings M. Platelet alpha-granule proteins - studies on release and subcellular-localization. *Blood* 1979; 53(4): 604-618.
12. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 1996; 12: 697-715.
13. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93(6):2588-2592.
14. Klein E. CD83 localization in a recycling compartment of immature human monocyte-derived dendritic cells. *International Immunology*. 2005;17(4):477-487.
15. Renzo MD, Rubegni P, Pasqui AL, et al. Extracorporeal photopheresis affects interleukin (IL)-10 and IL-12 production by monocytes in patients with chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol.* 2005; 153(1 ):59-65.
16. Gasparro FP, Bevilacqua PM, Goldminz D, et al. Repair of 8-MOP photoadducts in human lymphocyte. In *DNA Damage and Repair in Human Tissues* (edited by B. M. Sutherland and A.D. Woodhead). Plenum Press, New York.

17. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:685-711.

REIVINDICACIONES

1. Un método para inducir diferenciación de monocitos contenidos en una cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero en células dendríticas inmunoestimuladoras, comprendiendo dicho método al menos las etapas de:
  - a) someter dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero a una fuerza de cizallamiento haciendo pasar la muestra a través de una cámara de flujo;
  - b) realizándose el método en ausencia de agentes fotoactivables tales como 8-MOP y UVA; e
  - c) identificándose la diferenciación de monocitos procedentes de dicha muestra de sangre en células dendríticas inmunoestimuladoras mediante una expresión aumentada de al menos un marcador molecular HLA-DR, CD83, CD86, ICAM-1 o PLAUR cuando se comparan las células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras con los monocitos dentro de la cantidad extracorpórea de una muestra de sangre de un individuo mamífero.
2. Método según la reivindicación 1, realizándose el método en ausencia de un cóctel molecular que comprenda citocinas.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde la cámara de flujo permite un ajuste fijo o regulable del caudal.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cámara de flujo permite ajustar al menos un parámetro seleccionado del grupo que comprende temperatura y exposición a luz.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dichos monocitos se activan y se inducen a diferenciarse en células dendríticas inmunoestimuladoras a través de una interacción con plaquetas activadas y/o componentes plasmáticos.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo dicho método adicionalmente,
  - (i) antes de la etapa a) del método, la etapa de hacer pasar plaquetas a través de la cámara de flujo, que pueden estar comprendidas dentro de dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero o que pueden proporcionarse por separado de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero que comprende al menos monocitos; o
  - (ii) antes de la etapa a) del método, la etapa de hacer pasar componentes plasmáticos a través de la cámara de flujo, que pueden estar comprendidos dentro de dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero o que pueden proporcionarse por separado de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero; o
  - (iii) antes de la etapa a) del método, las etapas de (i) y (ii).
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde se puede influir en la activación de dichos monocitos y la diferenciación en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras mediante el diseño y las dimensiones de la cámara de flujo, el caudal con el que los monocitos se hacen pasar a través de la cámara de flujo, la temperatura a la que los monocitos, las plaquetas, los factores obtenidos de plaquetas y/o los componentes plasmáticos se hacen pasar a través de la cámara de flujo, la exposición de los monocitos a luz, el orden en el que los monocitos, las plaquetas, los factores obtenidos de plaquetas y/o los componentes plasmáticos se hacen pasar a través de la cámara de flujo, la densidad con la que las superficies de la cámara de flujo se revisten con componentes plasmáticos, la densidad con la que las plaquetas y/o los factores obtenidos de plaquetas se adhieren a las superficies y/o a los componentes plasmáticos de la cámara de flujo, y/o la densidad con la que los monocitos se adhieren a las plaquetas y/o a los factores obtenidos de plaquetas y/o los componentes plasmáticos adheridos a las superficies de la cámara de flujo.
8. Método según las reivindicaciones 1 o 7, en donde dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero no se ha obtenido mediante aféresis, en donde preferiblemente:
  - i) dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero está entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 500 ml de sangre completa extracorpórea de dicho individuo mamífero; y/o

- ii) dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero se obtiene aislando leucocitos de entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 500 ml de sangre completa extracorpórea de dicho individuo mamífero; y/o
- 5 iii) dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero se obtiene aislando capas leucocitarias de entre aproximadamente 10 ml y aproximadamente 500 ml de sangre completa extracorpórea de dicho individuo mamífero; y/o
- iv) dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero no comprende componentes plasmáticos; y/o
- 10 v) dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero no comprende plaquetas, habiéndose separado preferiblemente dichas plaquetas de dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero antes de que dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero se haya aplicado a dicha cámara de flujo.
9. Método de las reivindicaciones 1 u 8,
- 15 en donde dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero se ha obtenido mediante aféresis, en donde preferiblemente:
- i) dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero se obtiene aislando leucocitos mediante aféresis; y/o
- 20 ii) dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero se obtiene aislando capas leucocitarias mediante aféresis; y/o
- iii) dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero no comprende componentes plasmáticos; y/o
- iv) dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero no comprende plaquetas,
- 25 habiéndose separado preferiblemente dichas plaquetas de dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero antes de que dicha cantidad extracorpórea de dicha sangre de un individuo mamífero se haya aplicado a dicha cámara de flujo.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha cámara de flujo tiene unas dimensiones de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  de altura y de aproximadamente
- 30 1  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 400  $\mu\text{m}$  de anchura;
- en donde, preferiblemente, dicha cámara de flujo tiene unas dimensiones de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  inclusive de altura y de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  inclusive de anchura;
- en donde, más preferiblemente, dicha cámara de flujo tiene unas dimensiones de aproximadamente
- 35 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  inclusive de altura y de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  inclusive de anchura; en donde, aun más preferiblemente, dicha cámara de flujo tiene unas dimensiones de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  inclusive de altura y de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  inclusive de anchura; y en donde, aun más preferiblemente, dicha cámara de flujo tiene unas dimensiones de
- 40 aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  inclusive de altura y de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  inclusive de anchura.
11. Método de la reivindicación 10, en donde dicha cámara de flujo está configurada para admitir un volumen de entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 50 ml de dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de
- 45 sangre de un individuo mamífero.
12. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde
- i) el material de dicha cámara de flujo no es plástico; y en donde preferiblemente dicho material no plástico es vidrio; o
- 50 ii) el material de dicha cámara de flujo es plástico; en donde preferiblemente dicho material plástico se selecciona del grupo que consiste en acrílicos, policarbonato, polieterimida, polisulfona, polifenilsulfona, estirenos, poliuretano, polietileno, teflón o cualquier otro plástico de calidad médica apropiado.
- 55 13. Método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en donde la activación de dichas plaquetas se logra disponiendo componentes plasmáticos, que están comprendidos dentro de dicha cantidad extracorpórea de dicha muestra de sangre de un individuo mamífero, sobre la superficie de dicha cámara de flujo de tal manera

que al menos algunas de dichas plaquetas puedan interactuar con dichos componentes plasmáticos y se inmovilicen sobre la superficie de dicha cámara de flujo; en donde, preferiblemente:

- i) la activación de dichas plaquetas se logra disponiendo proteínas seleccionadas del grupo de que comprende fibrinógeno, fibronectina y el componente gamma de fibrinógeno sobre la superficie de dicha cámara de flujo de tal manera que al menos algunas de dichas plaquetas puedan interactuar con dichas proteínas y se inmovilicen sobre la superficie de dicha cámara de flujo; y en donde, más preferiblemente, la activación de dichas plaquetas se logra disponiendo fibrinógeno sobre la superficie de dicha cámara de flujo de tal manera que al menos algunas de dichas plaquetas puedan interactuar con dicha fibronectina y se inmovilicen sobre la superficie de dicha cámara de flujo; y/o
- ii) dichas plaquetas se hacen pasar a través de dicha cámara de flujo bajo una fuerza de cizallamiento de 0.1 a 10.0 dinas/cm<sup>2</sup>, preferiblemente en un intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2.0 dinas/cm<sup>2</sup>; y/o
- iii) la activación de plaquetas puede monitorizarse mediante la expresión de P-selectina y/o integrina αIIb-β3.

14. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde

- i) dichos monocitos se hacen pasar a través de dicha cámara de flujo con un caudal de aproximadamente 10 ml/minuto a aproximadamente 200 ml/minuto para producir una fuerza de cizallamiento de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20.0 dinas/cm<sup>2</sup>; y/o
- ii) dichos monocitos se activan y se inducen a diferenciarse en células dendríticas autólogas inmunoestimuladoras haciendo pasar dichos monocitos a través de dicha cámara de flujo bajo una fuerza de cizallamiento de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10.0 dinas/cm<sup>2</sup>, preferiblemente una fuerza de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1.0 dinas/cm<sup>2</sup>, de tal manera que dichos monocitos puedan unirse a dichas plaquetas activadas.

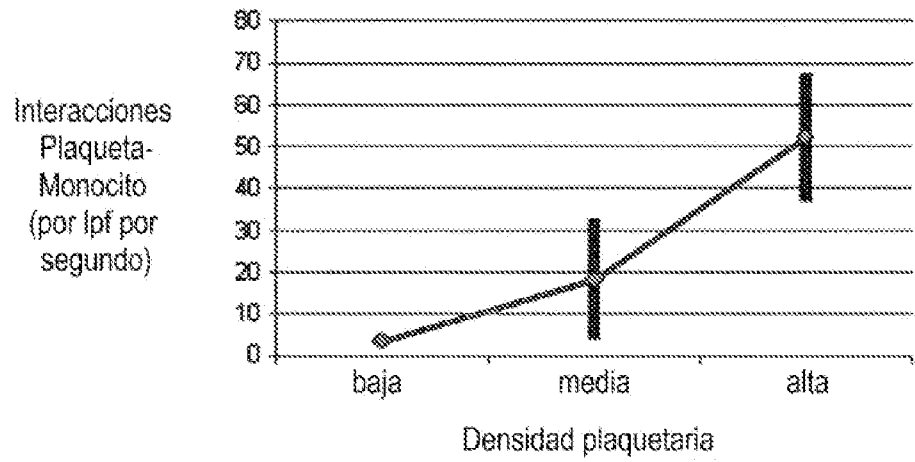
15. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para obtener células dendríticas inmunoestimuladoras autólogas.

16. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para obtener células dendríticas inmunoestimuladoras alogénicas.

17. Método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para obtener células dendríticas inmunoestimuladoras autólogas específicas del individuo sincronizadas funcionalmente y en cuanto a la maduración.

Figura 1

a)



b)

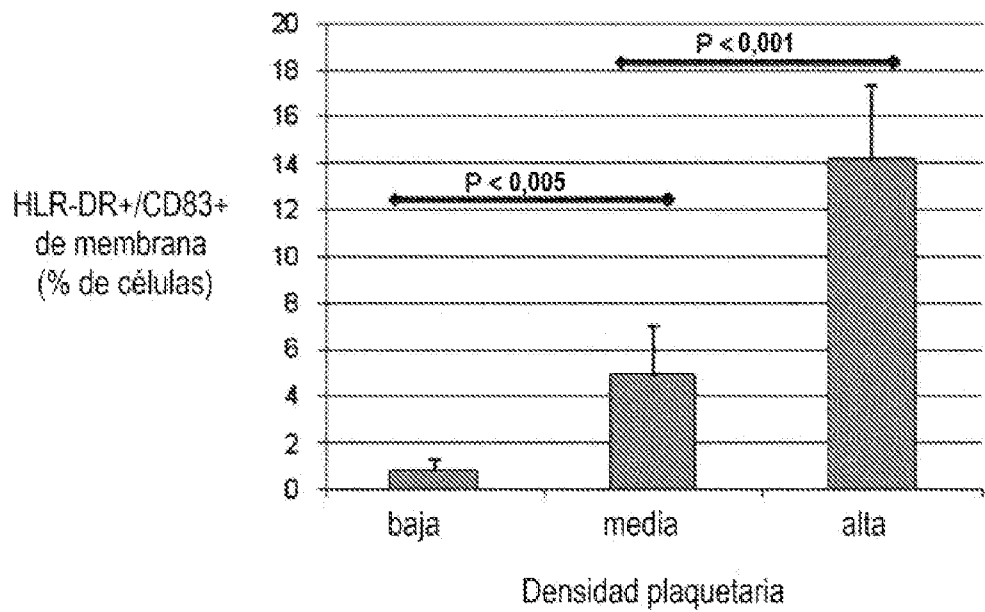


Figura 2

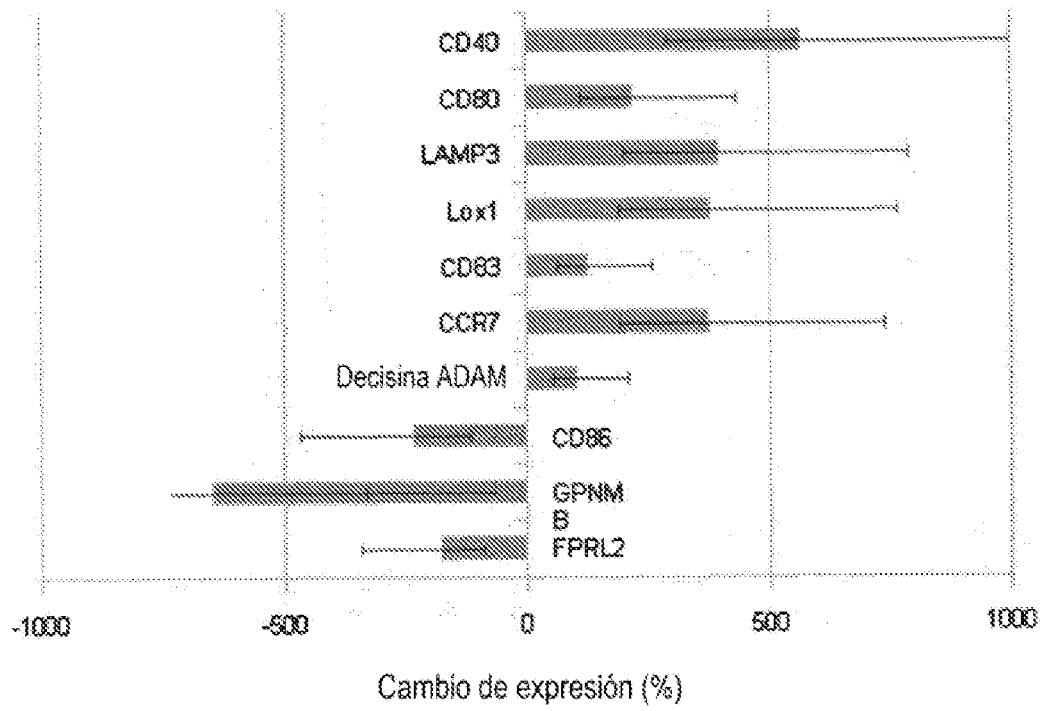


Figura 3

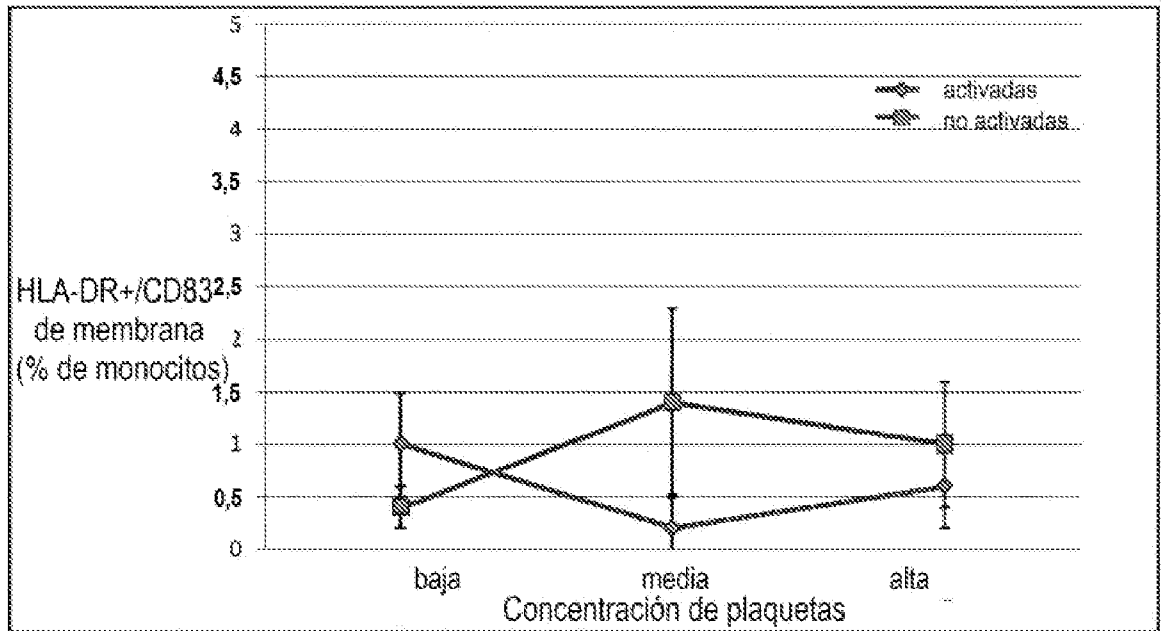


Figura 4

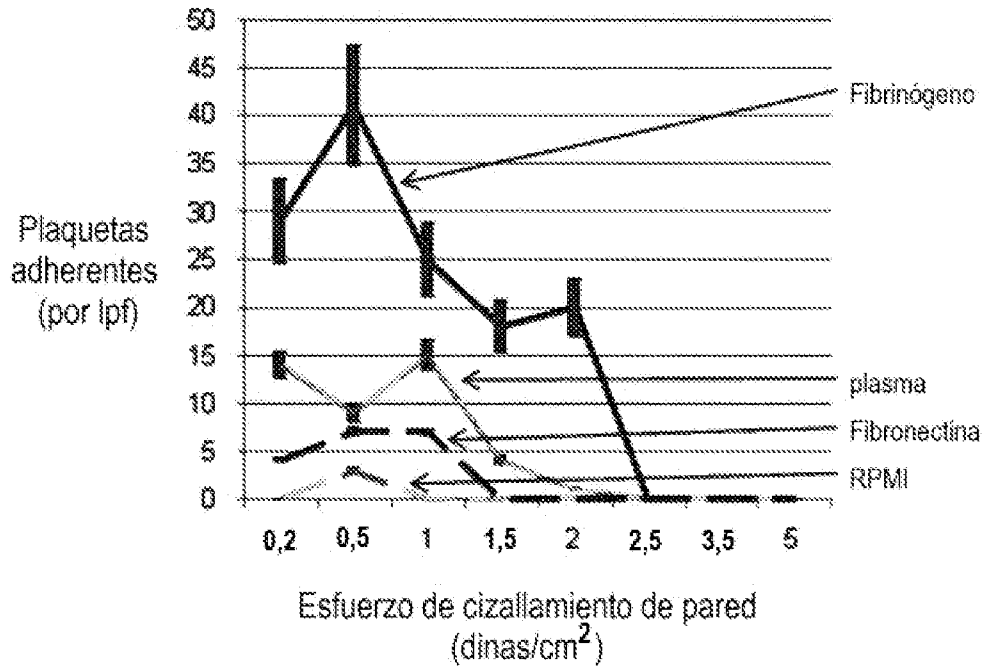
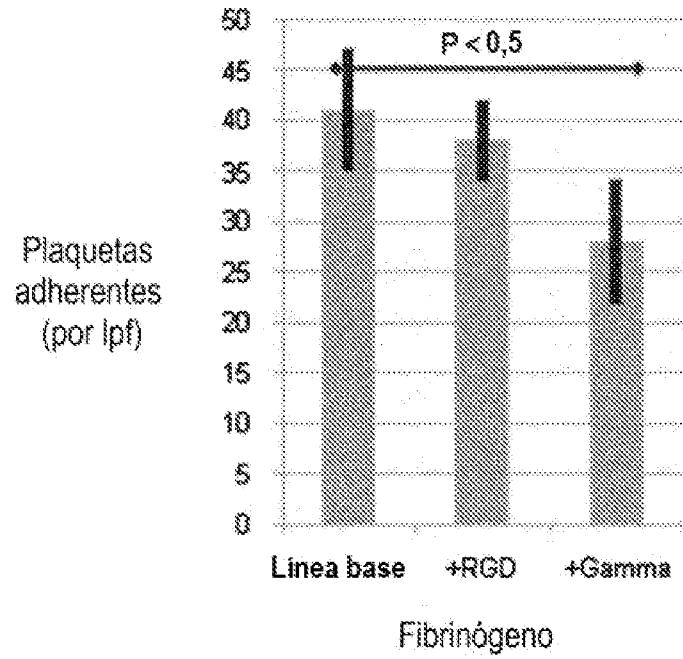


Figura 5

a)



b)

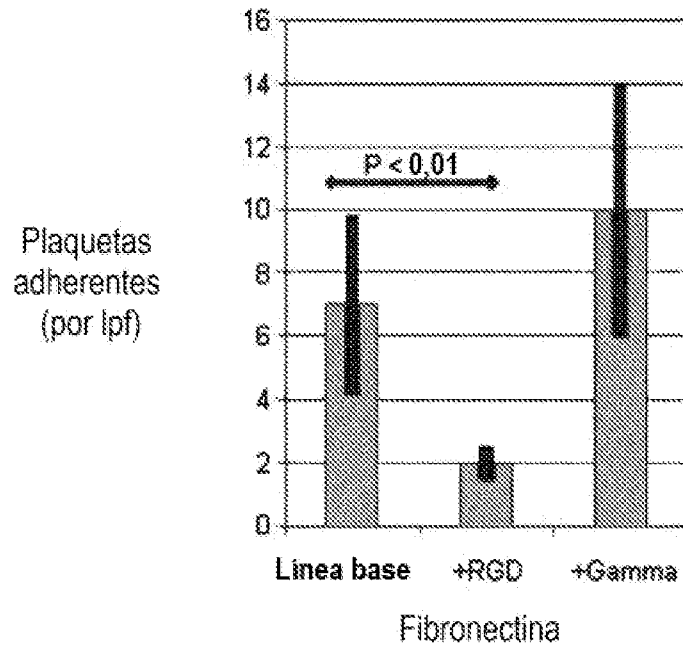


Figura 6

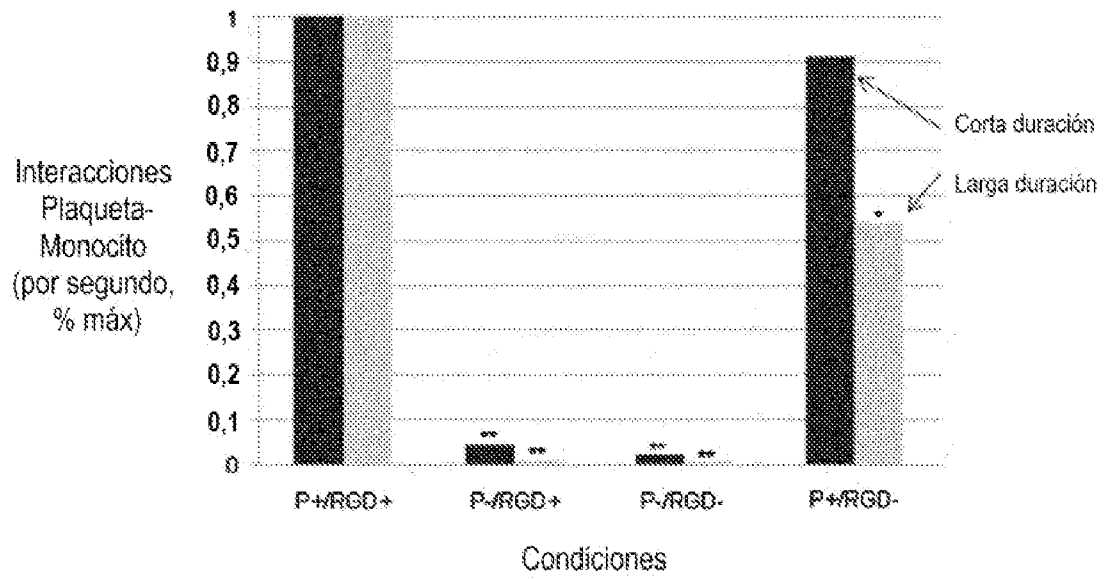


Figura 7

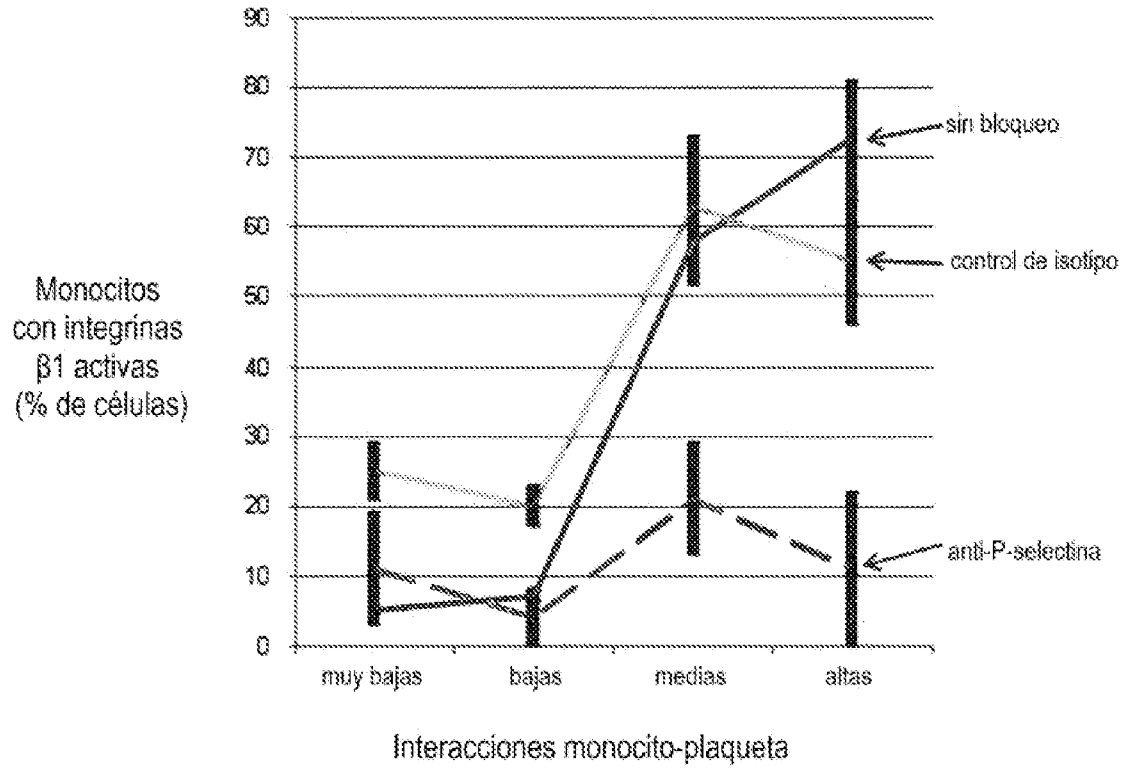


Figura 8

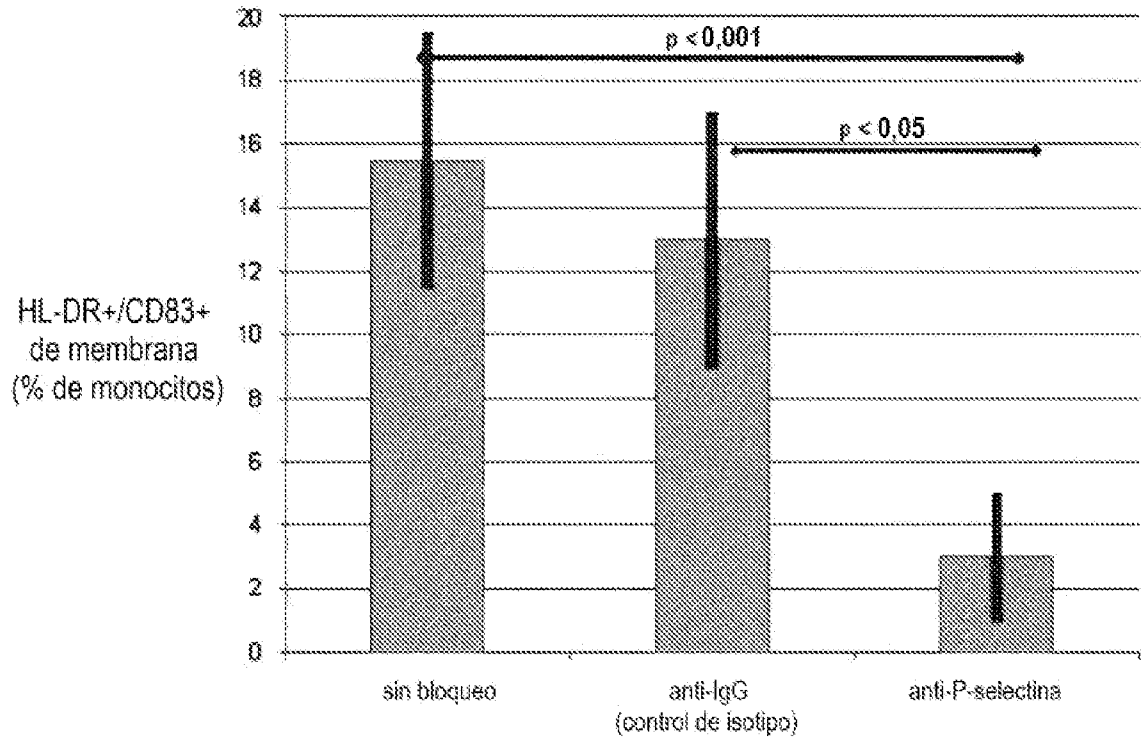


Figura 9

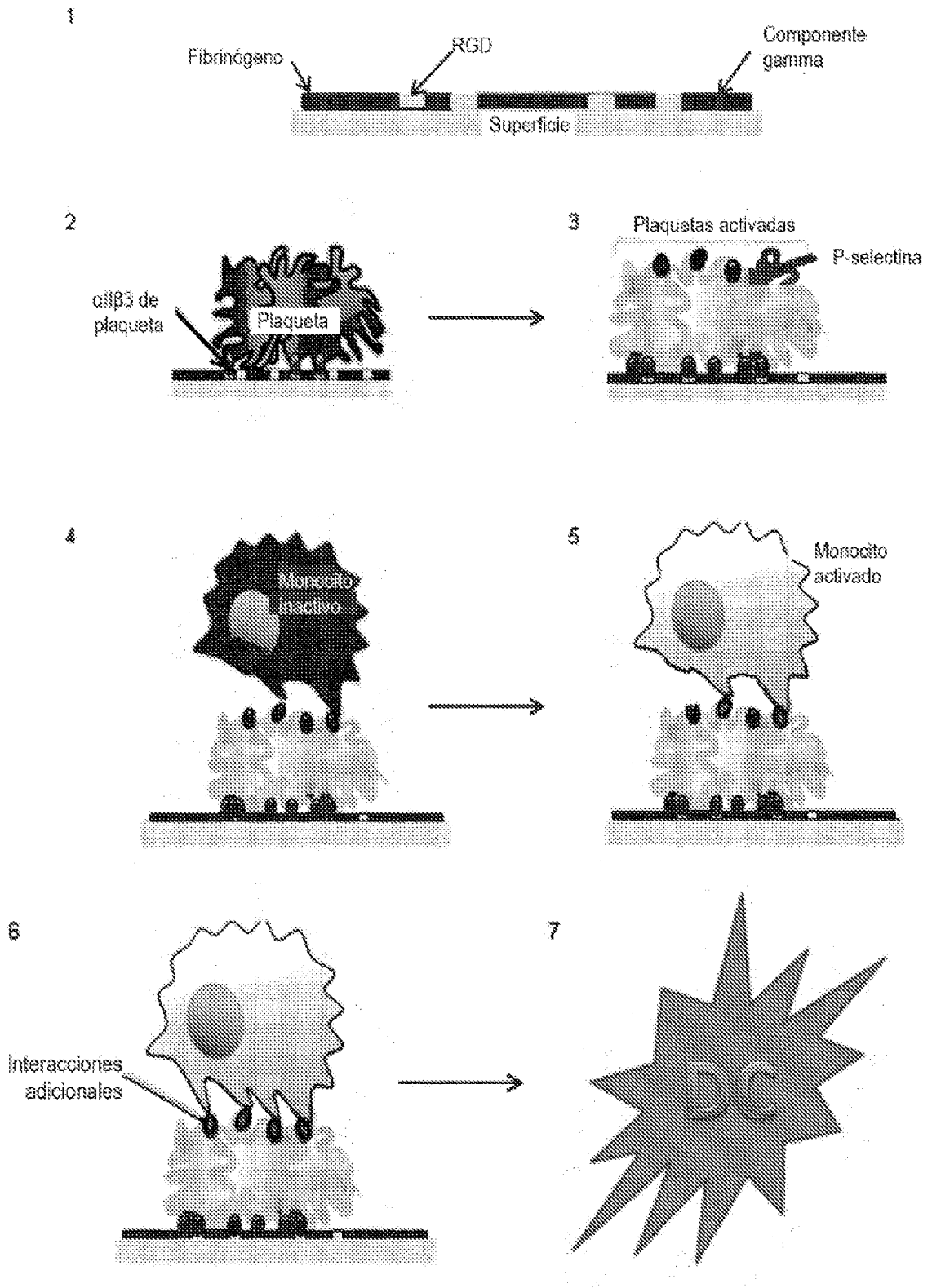


Figura 10

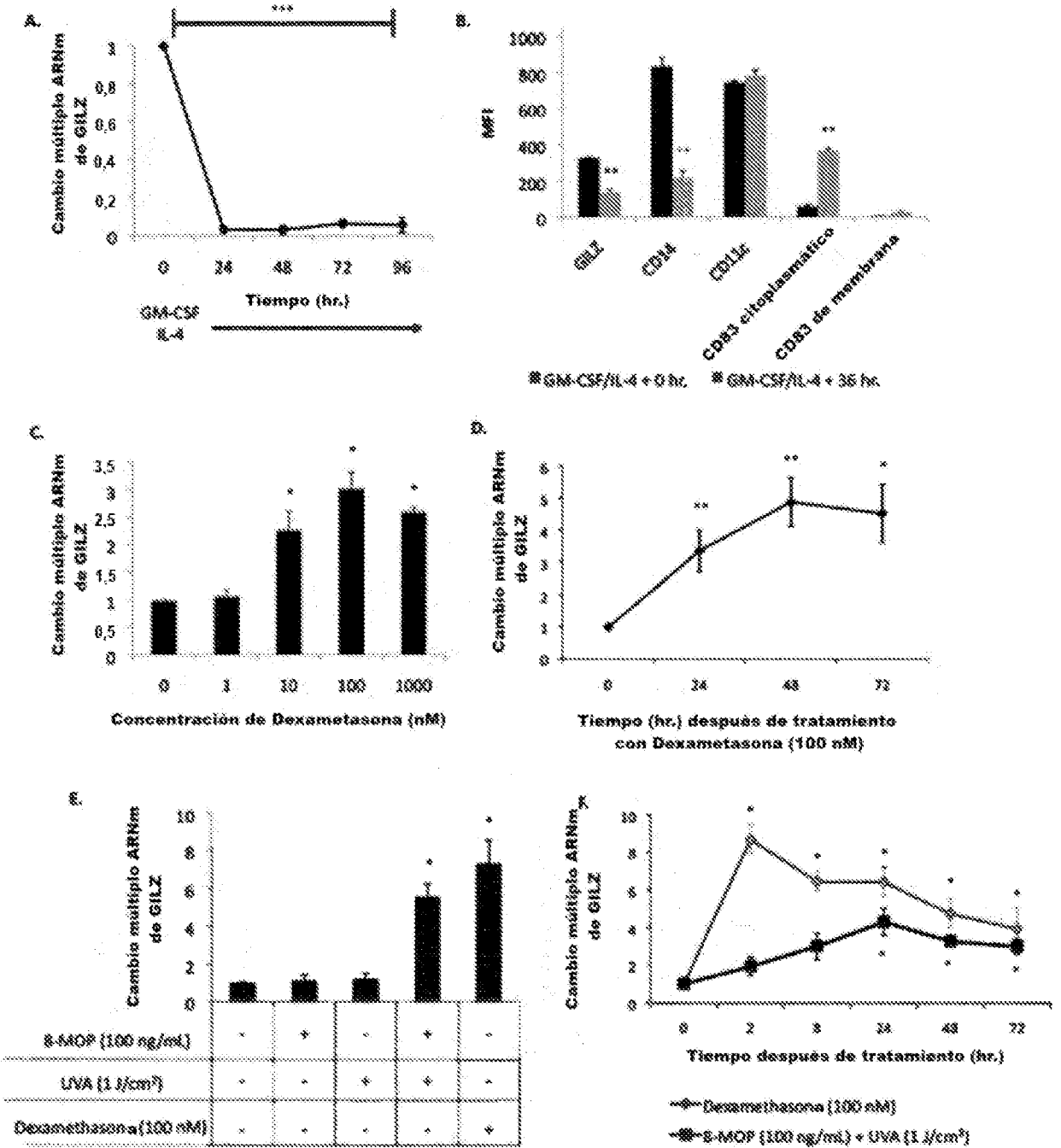


Figura 11

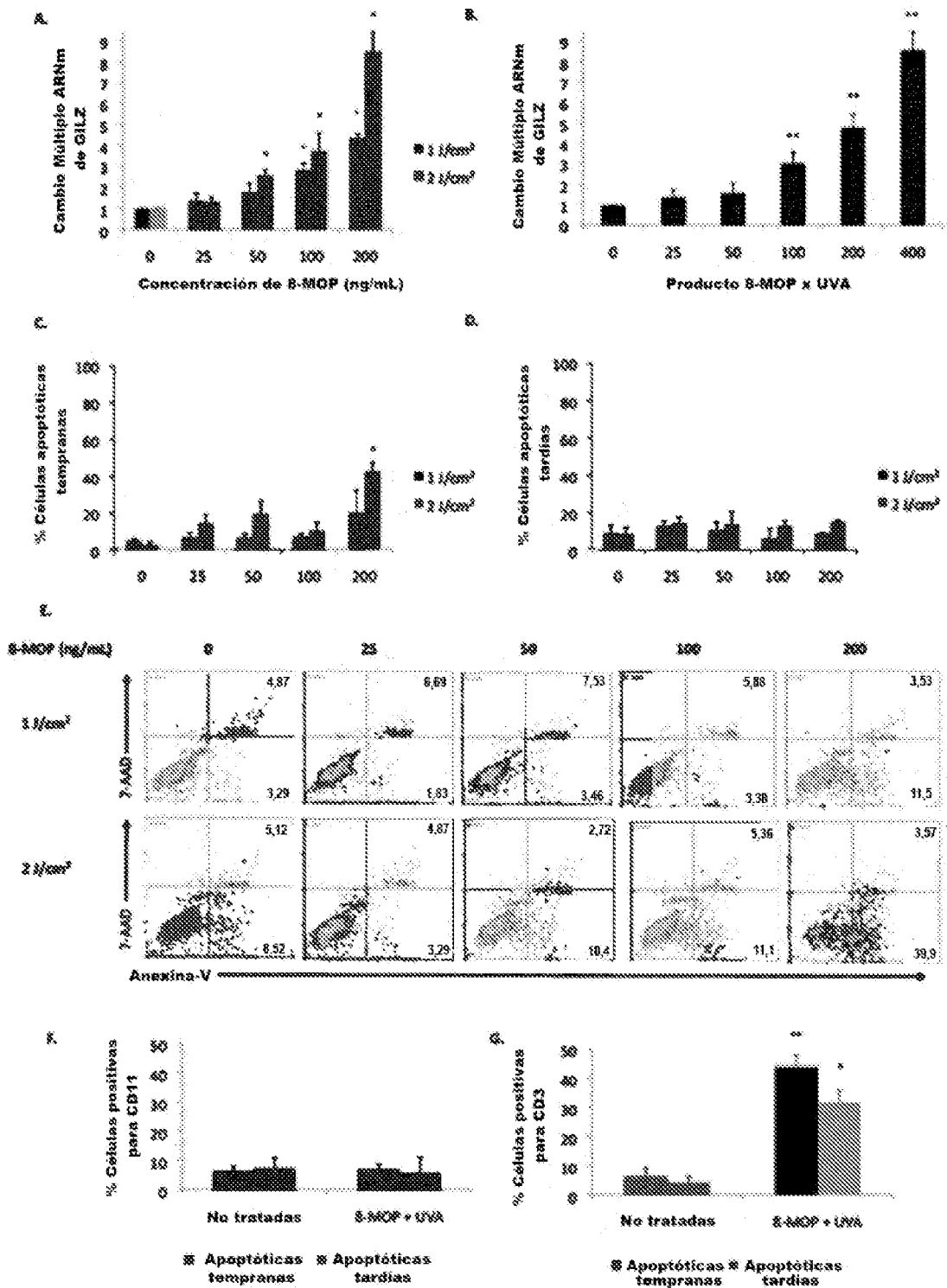


Figura 12

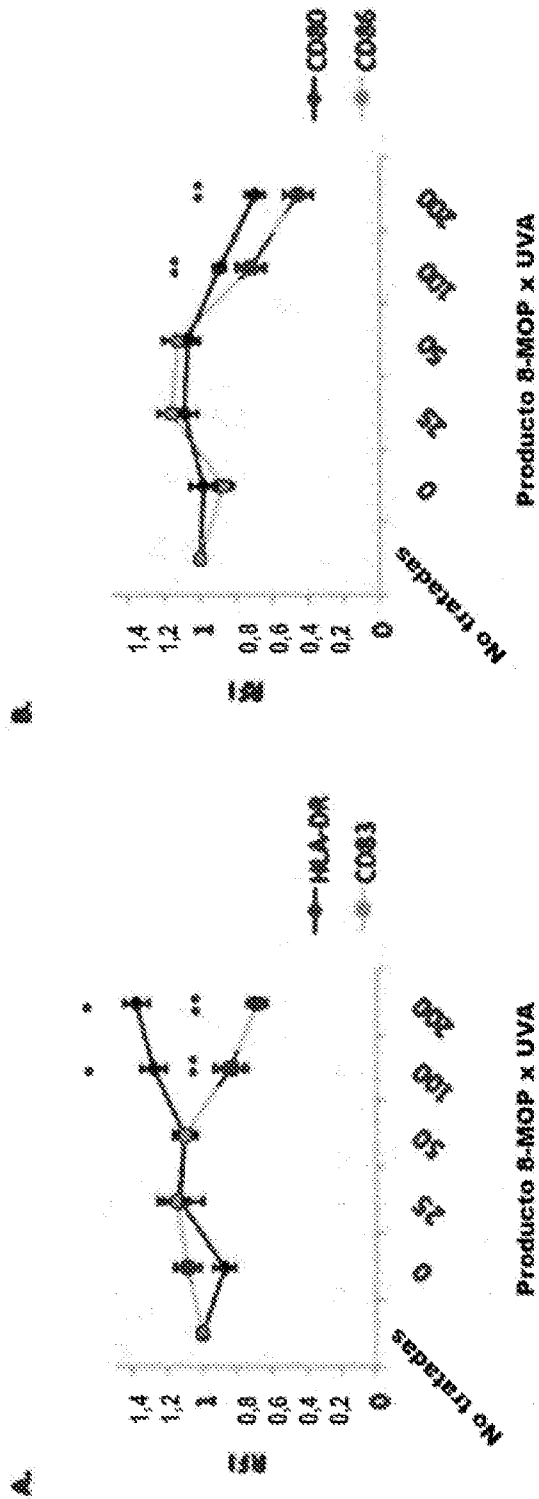


Figura 13

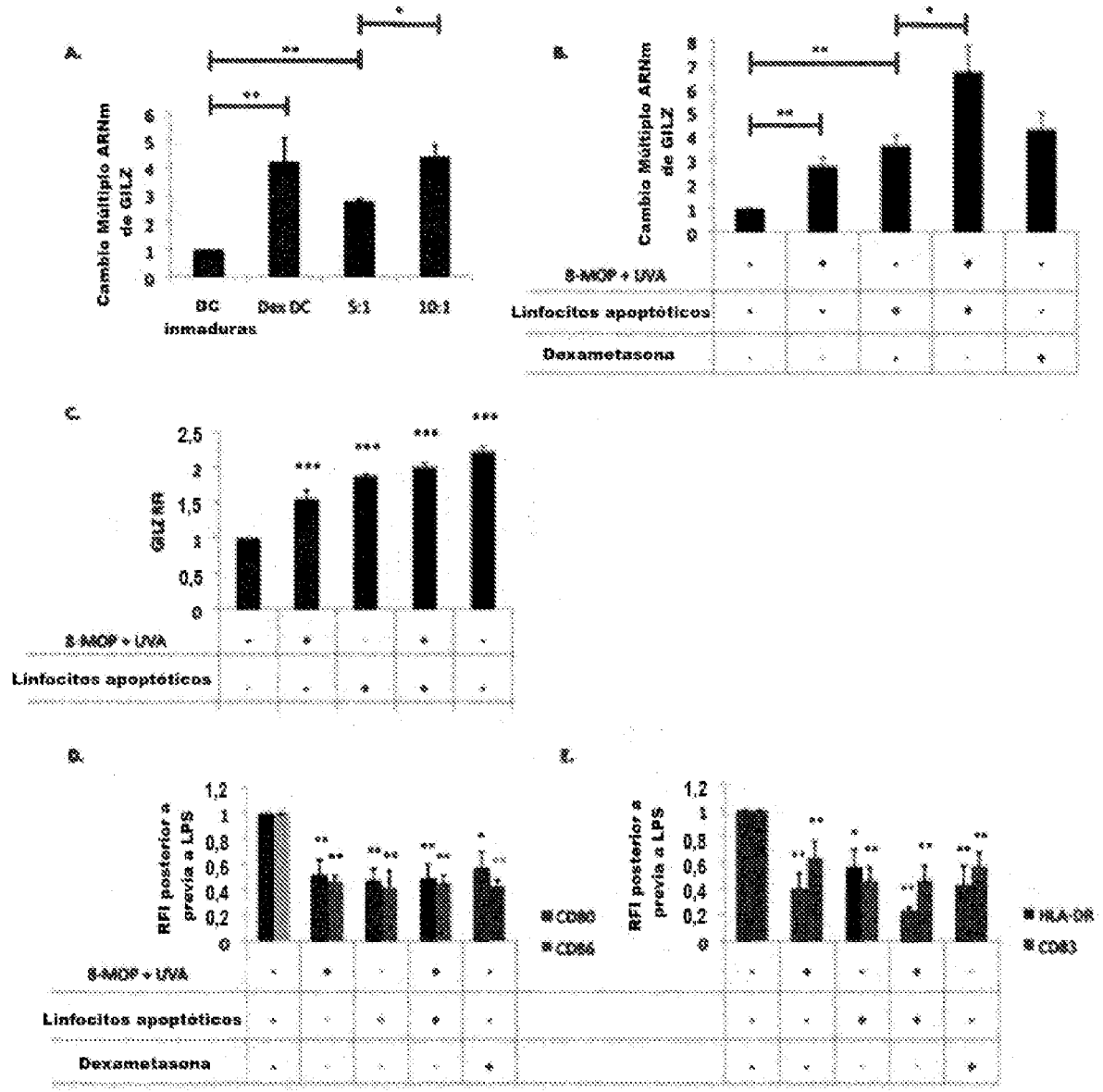




Figura 15

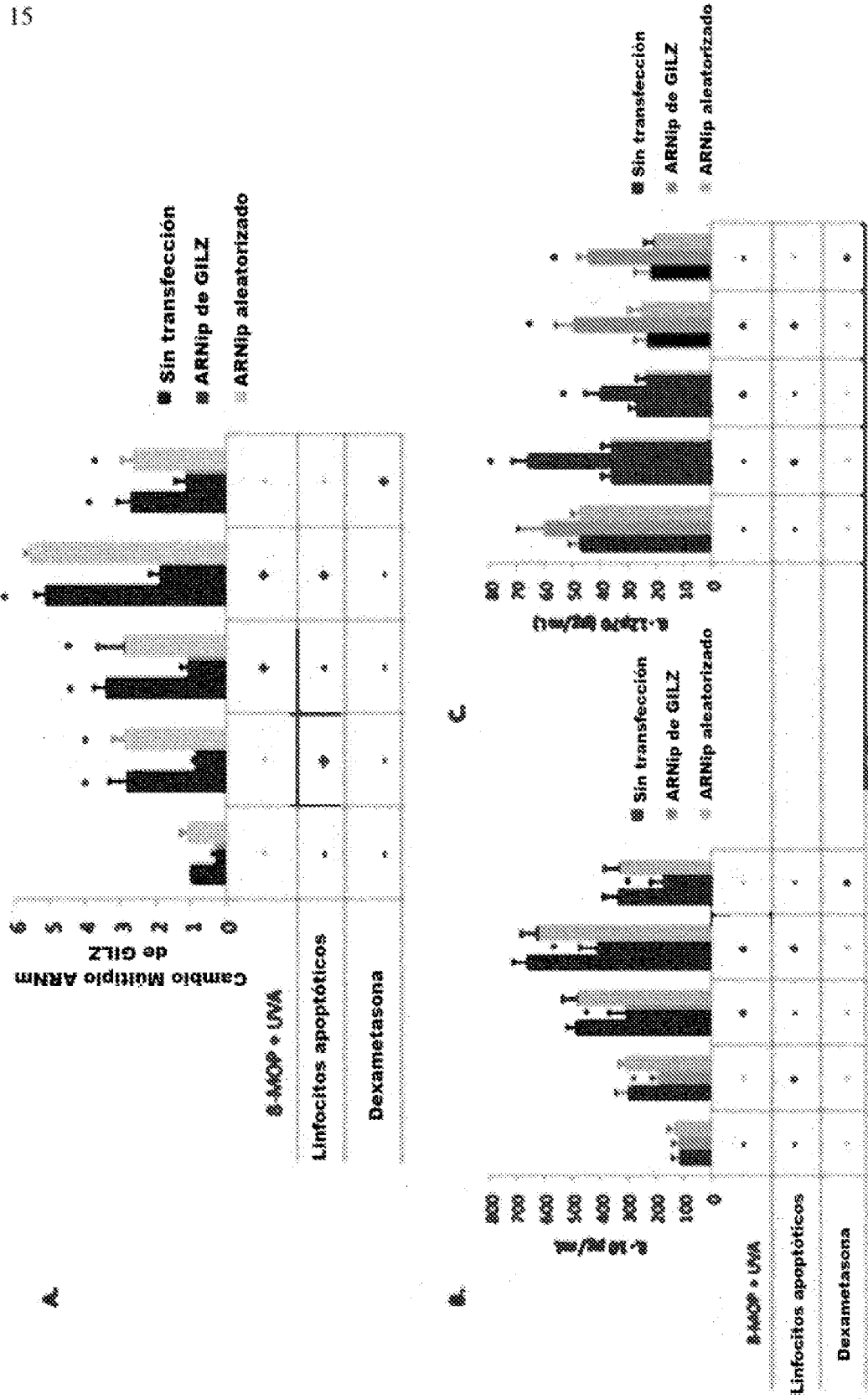


Figura 16

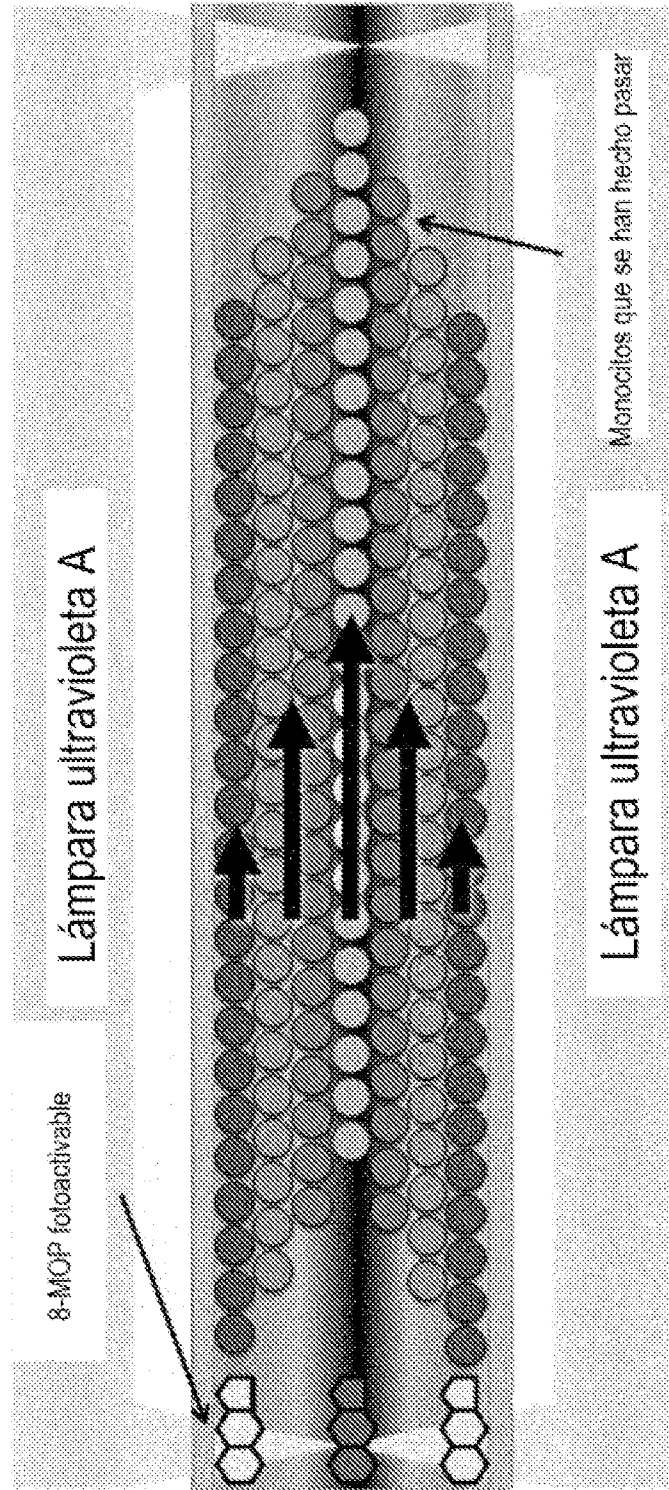


Figura 17

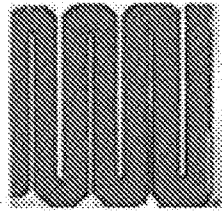
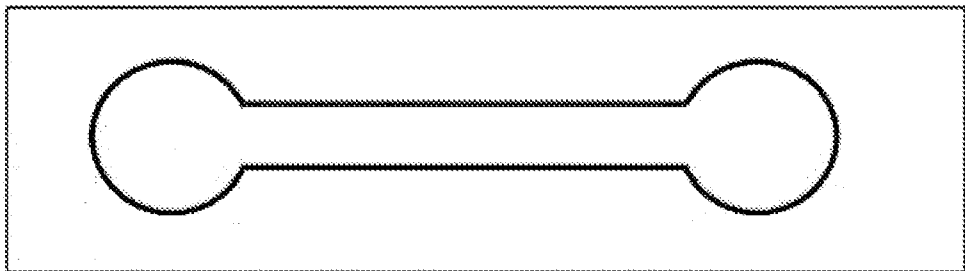


Figura 18

a)



b)

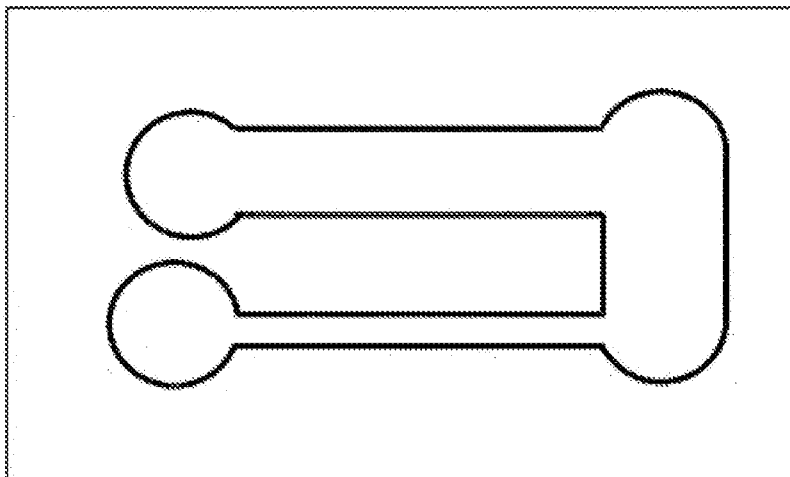
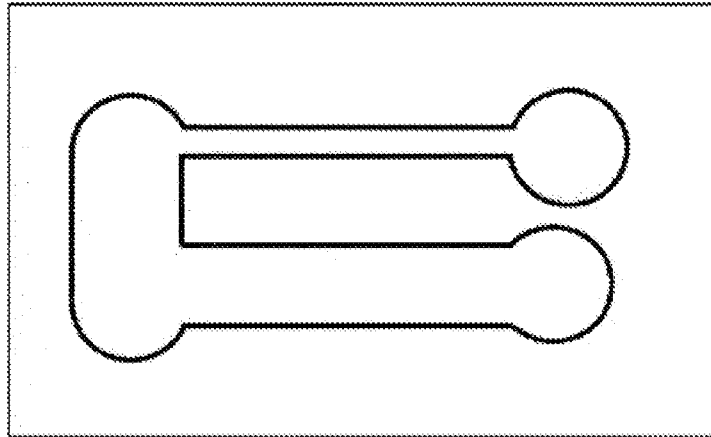


Figura 18 cont.

c)



d)

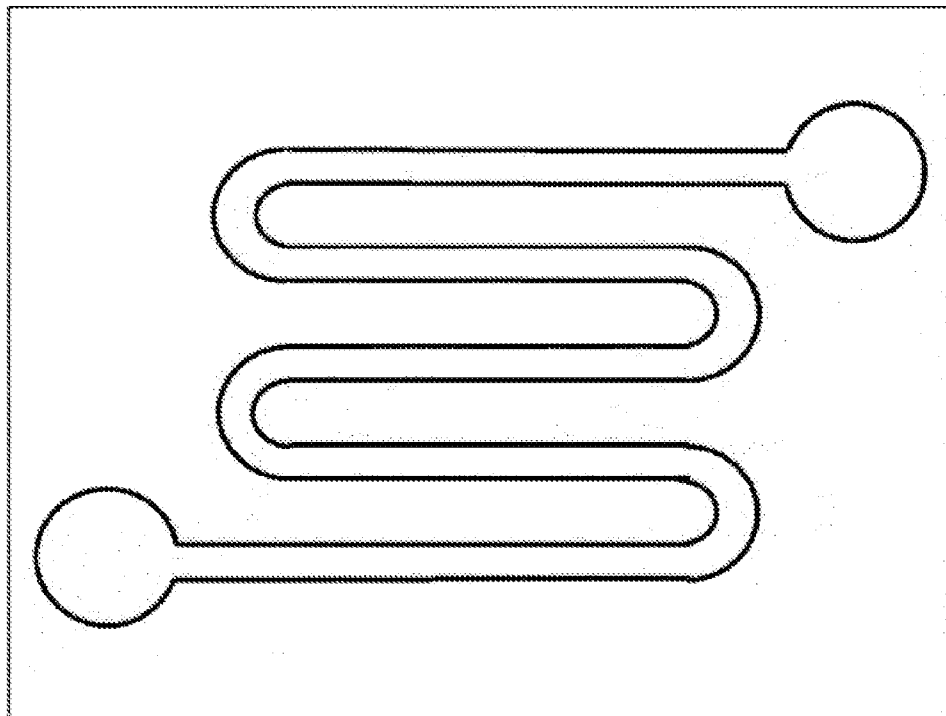
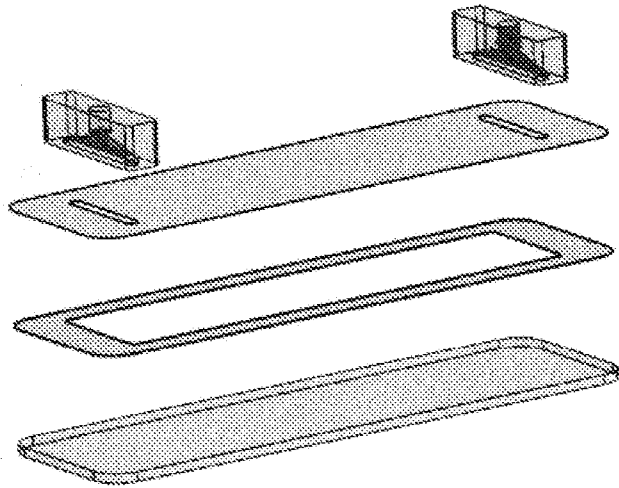


Figura 19

A)



B)

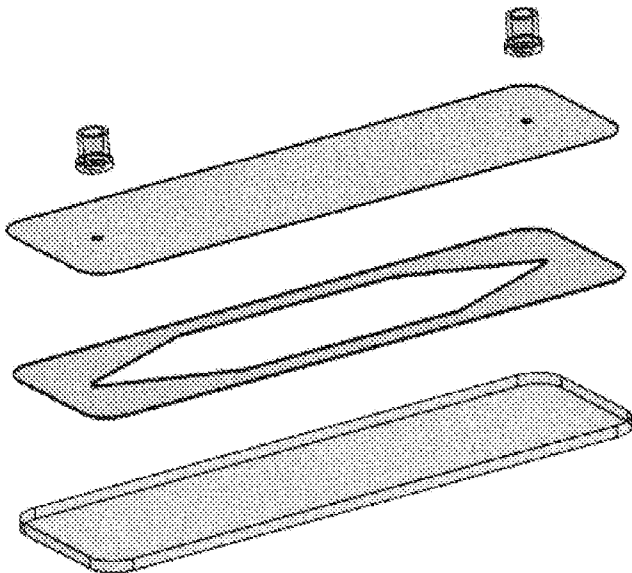


Figura 20

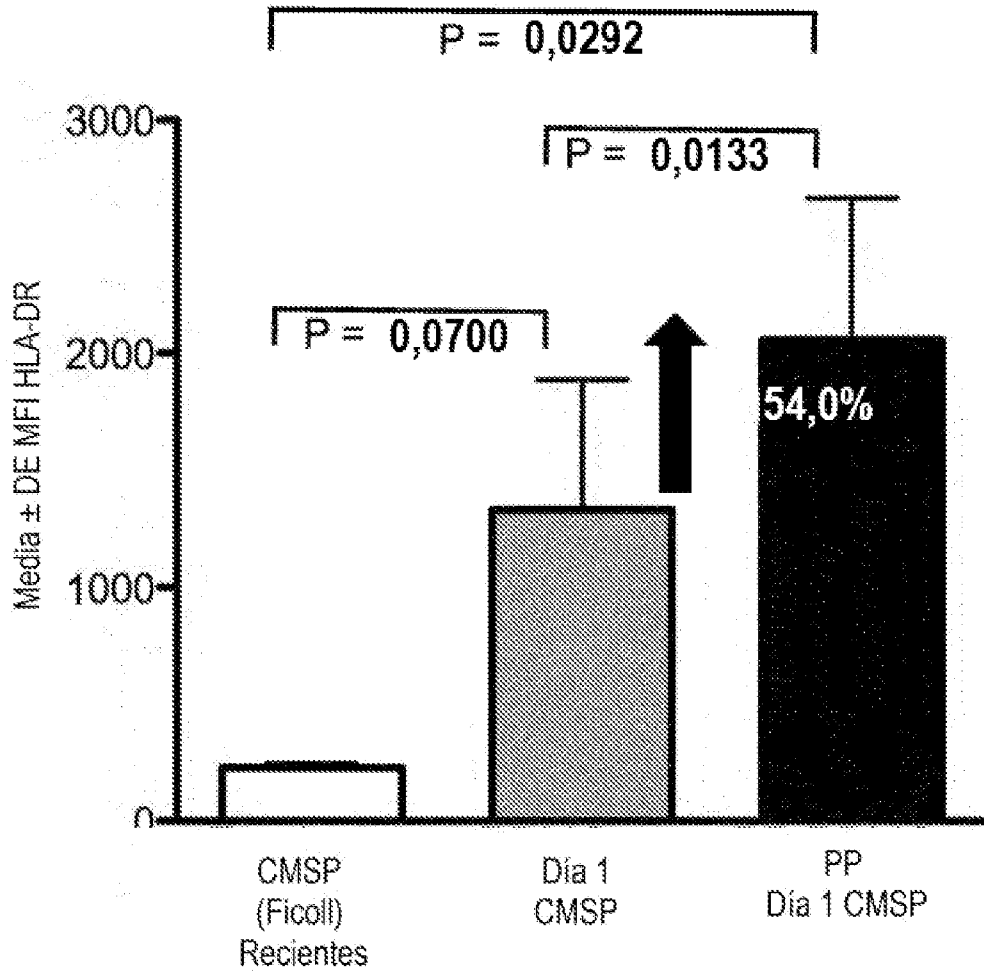


Figura 21

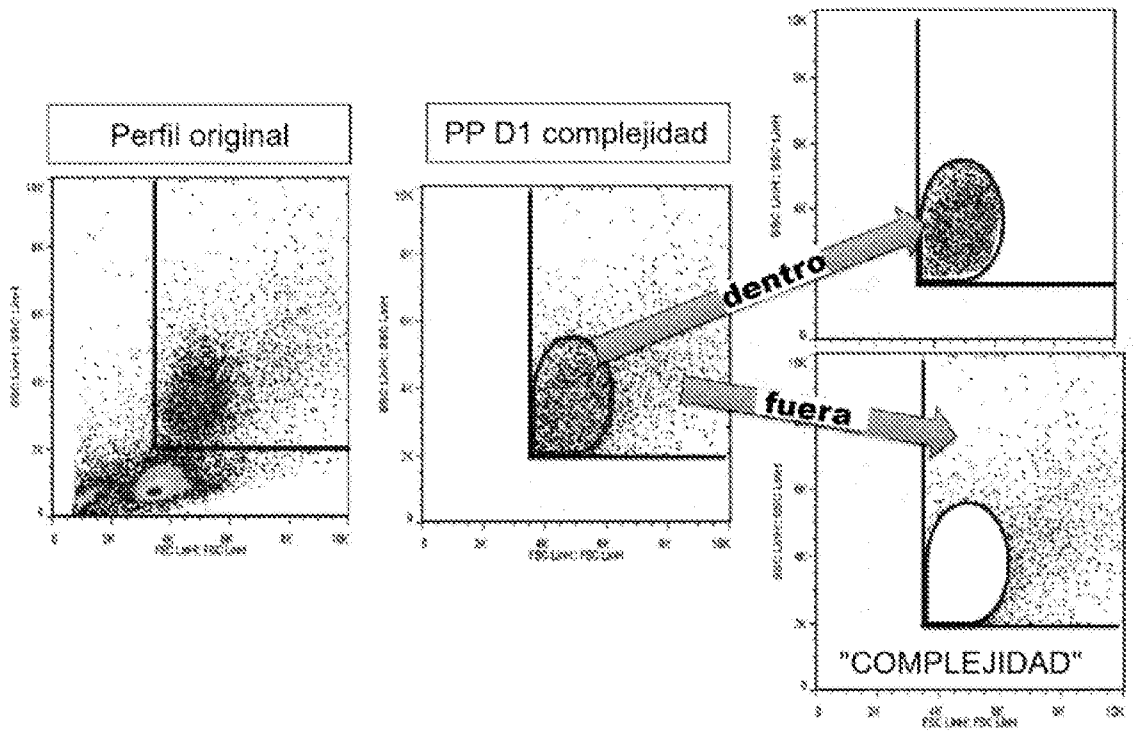


Figura 22

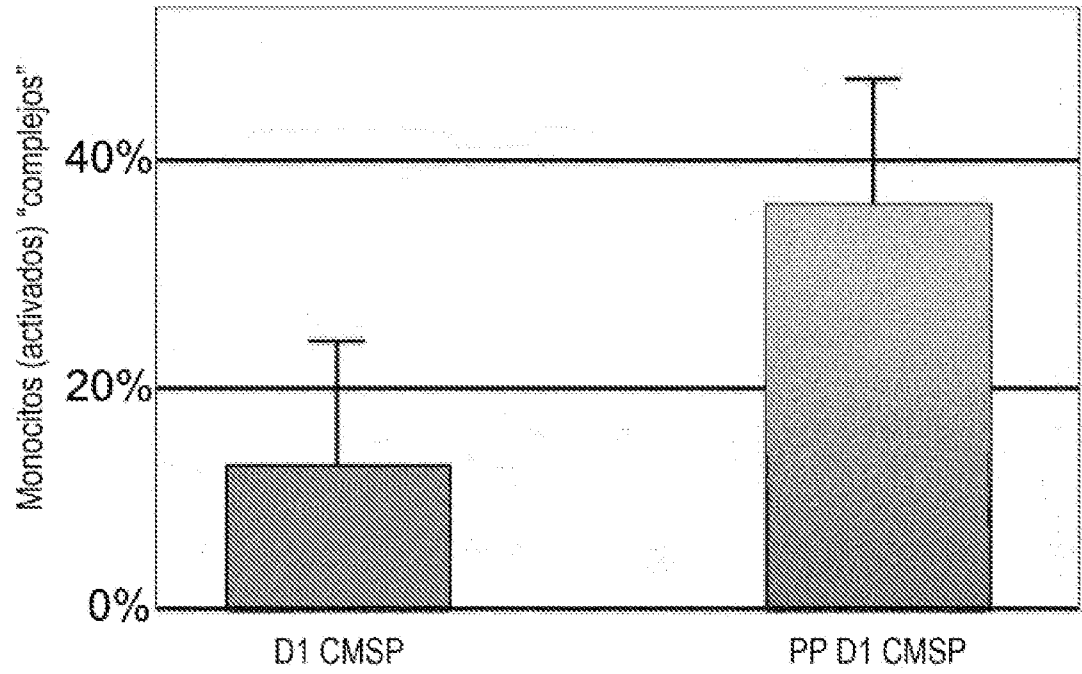


Figura 23

---

	HLA-DR	CD86	ICAM-1	PLAUR	FSC/SSC Complejidad
CMSP (Ficoll) recientes	0	0	0	0	0
D1 CMSP	++	0	++	++	+
PP D1 CMSP	+++	+	++++	++++	+++
DC rápidas inmaduras	++++	+++	++	-	?