



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0619499-0 A2**

(22) Data de Depósito: 08/12/2006
(43) Data da Publicação: 04/10/2011
(RPI 2126)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 5/00
C12N 5/0784

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA INDUÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MONOCÍTICAS IMATURAS

(30) Prioridade Unionista: 08/12/2005 US 60/748,885

(73) Titular(es): Northwest Biotherapeutics, INC.

(72) Inventor(es): Alton L. Boynton, Marnix L. Bosch

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006047083 de 08/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/067782 de 14/06/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA INDUÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MONOCÍTICAS IMATURAS. A presente invenção refere-se a métodos para indução do amadurecimento de células dendríticas imaturas (DC) e para ativação dessas células sem o uso de um agente de amadurecimento de célula dendrítica. A DC ativada pode ser usada para indução de uma resposta de célula T específica de antígeno. Os métodos da invenção podem também compreender a adição de um agente de amadurecimento direcional, tal como interferon- gama, para induzir uma influência a Th-1 e/ou Th-2 na resposta obtida. A presente invenção provê também populações de célula dendrítica úteis para ativação e para indução de células T específicas de antígeno. Similarmente, populações de célula T específicas de antígeno ativadas e métodos para sua produção são providos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA INDUÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MONOCÍTICAS IMATURAS**".

Pedidos Relacionados

- 5 O presente pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório dos Estados Unidos Nº 60/748.885 depositado em 8 de dezembro de 2005, incorporado aqui a título de referência em sua totalidade.

Antecedentes da Invenção

- 10 Células apresentando antígeno (APC) são importantes na eliciação de uma resposta imune eficaz. Elas não só apresentam antígenos a células T com receptores de célula T antígeno-específicos, mas também provêem os sinais necessários para ativação de célula T. Esses sinais permanecem incompletamente definidos, mas envolvem uma variedade de moléculas de superfície celular bem como citocinas ou fatores de crescimento.
- 15 Os fatores necessários para a ativação e polarização de células T puras podem ser diferentes daqueles requeridos para a reativação de células T de memória. A habilidade de APC em ambos apresentar antígenos e aplicar sinais para ativação de célula T é geralmente referida como uma função de célula acessório. Embora monócitos e células B tenham sido mostrados ser
- 20 APC competentes, suas capacidades de apresentação de antígeno *in vitro* parecem ser limitadas à reativação de células T previamente sensibilizadas. Então, monócitos e células B não são capazes de ativar diretamente populações de célula T funcionalmente puras ou não-preparadas. Eles não são também capazes de aplicar sinais que possam polarizar uma resposta imune
- 25 induzida, ou uma resposta imune conforme ela é induzida.

- Células dendríticas (DCs) são as células apresentando antígenos profissionais do sistema imune que são acreditadas ser capazes de ativação de ambas células T puras e de memória. Células dendríticas são progressivamente preparadas *ex vivo* para uso em imunoterapia, particularmente a imunoterapia de câncer. A preparação de células dendríticas com propriedades imunoestimuladoras ótimas requer uma compreensão e exploração da biologia dessas células para cultura *ex vivo*. Vários protocolos para a
- 30

cultura dessas células foram descritos, com várias desvantagens atribuídas a cada protocolo. Protocolos recentes incluem o uso de meio livre de soro e o emprego de condições de amadurecimento que dão as propriedades imunoestimuladoras desejadas às células culturadas.

5 A ativação de células dendríticas inicia o processo que converte DCs, que são fenotipicamente similares às células Langerhans da pele, em células apresentando antígeno, maduras, que podem migrar para os nós linfáticos. Este processo resulta na perda gradual e progressiva da capacidade de absorção de antígeno poderosa que caracteriza a célula dendrítica imatura, e na supra-regulagem de expressão de moléculas de superfície celular co-estimuladoras e várias citocinas. Vários estímulos podem iniciar o amadurecimento de DCs. Este processo é complexo e pelo menos *in vitro* pode levar até 48 horas para completar. Outra consequência de amadurecimento é uma mudança nas propriedades migratórias *in vivo* das células. Por exemplo, amadurecimento induz vários receptores de quimiocina, incluindo CCR7, que direcionam as células para as regiões de célula T de nós linfáticos de drenagem, onde as DCs maduras ativam células T contra o antígeno apresentado sobre a superfície de DC no contexto de moléculas de MHC de classe I e classe II. Os termos "ativação" e "maturação" e "ativado" e "maduro" descrevem o processo de indução e término da transição de uma DC imatura (parcialmente caracterizada pela habilidade em absorver antígeno) para uma DC madura (parcialmente caracterizada pela habilidade em estimular efetivamente de novo respostas de célula T). Os termos tipicamente são usados intercomutavelmente na técnica.

25 Protocolos de amadurecimento conhecidos são baseados no ambiente *in vivo* que DCs são acreditadas encontrar durante ou após exposição a antígenos. O melhor exemplo desta abordagem é o uso de meio condicionado por monócito (MCM) como um meio de cultura celular. MCM é gerado *in vitro* através de cultura de monócitos e usado como uma fonte de fatores de amadurecimento. (Vide, por exemplo, US 2002/0160430, incorporada aqui a título de referência). Os principais componentes de MCM responsáveis pelo amadurecimento são relatados ser as citocinas

(pró)inflamatórias Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e fator alfa de necrose de tumor (TNF α).

Amadurecimento de DCs então pode ser disparado por uma grande quantidade de fatores diferentes que agem através de um hospedeiro de cursos de transdução de sinal. Conseqüentemente, não há um único curso ou resultado de amadurecimento, mas existe na realidade um universo de estágios de DC madura, cada um com suas próprias características funcionais distintas. Conceitualmente isso faz sentido porque as várias ameaças ao corpo que o sistema imune deve responder são diversas, requerendo estratégias de ataque diferentes. Como um exemplo, enquanto infecção bacteriana é melhor tratada através de macrófagos ativados suplementados com anticorpos específicos, uma infecção viral é melhor atacada através de células T citotóxicas que eficazmente matam células infectadas com vírus. A morte de células de câncer tipicamente envolve uma combinação de células T citotóxicas, células assassinas naturais e anticorpos.

Amadurecimento *in vitro* de DCs pode então ser planejado para induzir o sistema imune a favorecer um tipo de resposta imune sobre outro, isto é, polarizar a resposta imune. Amadurecimento direcional de DCs descreve a noção de que o resultado do processo de amadurecimento dita o tipo de resposta imune subsequente que resulta do tratamento com as DCs maduras. Em sua forma mais simples, amadurecimento direcional resulta em uma população de DC que produz citocinas que direcionam uma resposta de célula T polarizada à resposta tipo Th1 ou tipo Th2. DCs expressam até nove receptores tipo Toll diferentes (TLR1 a TLR9), cada um dos quais pode ser usado para disparar amadurecimento. Não surpreendentemente, interação de produtos bacterianos com TLR2 e TLR4 resulta em amadurecimento direcional de DCs resultando em uma resposta polarizada mais apropriada para lidar com infecções bacterianas. Por outro lado, amadurecimento disparado através de TLR7 ou TLR9 parece resultar mais em uma resposta do tipo antiviral. Como um exemplo adicional, adição de interferon-gama (IFN- γ) à maioria dos protocolos de amadurecimento resulta na produção de interleucina 12 pelas DCs maduras, que dita uma resposta tipo Th1. Por outro

lado, inclusão de prostaglandina E2 tem o efeito oposto.

Fatores que podem ser usados no amadurecimento direcional de DCs ativadas podem então incluir, por exemplo, Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e fator alfa de necrose de tumor (TNF α). Outros fatores de amadurecimento incluem prostaglandina E2 (PGE2), poli-dIdC, peptídeo vasointestinal (VIP), lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), bem como micobactérias ou componentes de micobactérias, tal como constituintes de parede celular específicos. Fatores de amadurecimento adicionais incluem, por exemplo, um composto imidazoquinolina, por exemplo, um composto imidazoquinolino-4-amina, tal como 4-amino-2-etoximetil- α,α -dimetil-1H-imidazol[4.5-c]quinolin-1-etanol (chamado R848) ou 1-(2-metilpropil)-1H-imidazol[4.5-c]quinolin-4-amina e seus derivados (WO 00/47719, incorporado aqui a título de referência em sua totalidade), um polirribonucleotídeo de filamento duplo sintético, por exemplo, poli[I]:poli[C(12)U], e similar, agonistas de um receptor tipo Toll (TLR), tal como TLR3, TLR4, TLR7 e/ou TLR9, uma seqüência de ácidos nucléicos contendo motivos CpG não-metilados conhecidos por induzir o amadurecimento de DC, e similar. Ainda, uma combinação de qualquer um dos agentes acima pode ser usada na indução do amadurecimento de células precursoras dendríticas.

Células dendríticas completamente maduras diferem qualitativamente e quantitativamente de DCs imaturas. Uma vez completamente maduras, as DCs expressam níveis mais altos de antígenos de classe I e classe II do MHC, e níveis mais altos de moléculas co-estimuladoras de célula T, isto é, CD80 e CD86. Essas mudanças aumentam a capacidade das células dendríticas em ativar células T porque elas aumentam a densidade do antígeno sobre a superfície da célula, bem como a magnitude do sinal de ativação de célula T através dos semelhantes das moléculas co-estimuladoras nas células T, por exemplo, CD28 e similar. Ainda, DCs maduras produzem grandes quantidades de citocinas, o que estimula e polariza resposta de célula T.

Métodos gerais para geração de DC *ex vivo* compreendem a obtenção de uma população de célula enriquecida em células precursoras

DC de um paciente e então diferenciação das células precursoras DC *in vitro* em DCs maduras antes da introdução de volta no paciente. Alguns acreditam que DCs devem ser terminalmente diferenciadas, ou elas vão desdiferenciar de volta em monócitos/macrófagos e perder muito de sua habilidade de imunopotencialização. Amadurecimento *ex vivo* de DCs geradas a partir de monócitos foi realizado com sucesso com os métodos e agentes listados acima.

Tipicamente, para gerar células dendríticas (DC) imaturas, uma pessoa deve primeiro purificar ou enriquecer os precursores monocíticos de outros tipos de célula contaminantes. Isto é geralmente feito através de aderência dos precursores monocíticos a uma superfície plástica (poliestireno), uma vez que os monócitos têm uma tendência maior em grudar em plástico do que outras células encontradas em, por exemplo, sangue periférico, tal como linfócitos e células assassinas naturais (NK). Após remover substancialmente as células contaminantes através de lavagem vigorosa, os monócitos são cultivados com citocinas que convertem os precursores monocíticos em DC imatura ou diretamente em DC madura. Métodos para diferenciação das células precursoras monocíticas em DC imatura foram primeiro descritos por Sallusto e Lanzavecchia (*J. Exp. Med.*, 179:1109-1118, 1994, incorporado aqui a título de referência), que usaram as citocinas GM-CSF e IL-4 para induzir a diferenciação dos monócitos em DC imatura. Embora esta combinação de citocinas seja mais tipicamente usada, várias outras combinações foram descritas para atingir os mesmos objetivos, tal como substituição de IL-4 com IL-13 ou IL-15. O resultado final deste processo é uma célula "velada", que expressa moléculas co-estimuladoras de célula T, bem como altos níveis de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), mas não expressa marcador de amadurecimento de célula dendrítica CD83. Essas células são similares às células Langerhans na pele, e sua função fisiológica principal é capturar microorganismos invasores.

Variações neste método incluem métodos diferentes de purificação de monócitos, incluindo, por exemplo, filtração de fluxo tangencial (TFF), ou através de ligação de anticorpos ligados a contas a moléculas de superfície nos monócitos. As contas com as células ligadas são então con-

centradas em uma coluna, ou uma superfície magnética, de modo que as células contaminantes podem ser retiradas com lavagem, após o que os monócitos são eluídos das contas. Em ainda outro método para se obter precursores de células dendríticas, células expressando o marcador de célula tronco CD34, ou de sangue (Patente U.S. No. 5.994.126, incorporada aqui a título de referência) ou da medula óssea, são purificadas. Essas células podem ser cultivadas com a citocina essencial GM-CSF para diferenciar em DC imatura. Essas DC aparentemente têm características e propriedades funcionais muito similares à DC imatura gerada de monócitos.

DC imatura tem uma alta capacidade para absorver e processar antígeno, mas tem uma habilidade limitada em iniciar respostas imunes. A habilidade em iniciar uma resposta imune é adquirida pelo amadurecimento da DC imatura. Este amadurecimento é também referido como ativando, ou ativação da, DC. Este processo de amadurecimento é iniciado através de contato com citocinas, produtos bacterianos ou componentes virais de indução de amadurecimento, e similar, conforme acima descrito.

Embora esses métodos sejam capazes de produzir DC madura, existem desvantagens em usar moléculas recombinantes e sobrenadantes celulares para amadurecimento de DC. Essas incluem qualidade e rendimento inconsistentes de lote para lote desses reagentes e a introdução de quantidades grandes de proteínas exógenas que podem competir com o antígeno de interesse para transporte para o precursor de célula dendrítica monocítica para processamento. As proteínas exógenas podem ser também tóxicas ou resultar em auto-imunidade se administradas a pacientes. Tais reagentes podem ser também caros de produzir, tornando o custo de imunoterapia proibitivamente caro.

Breve Sumário

Os métodos e composições descritos aqui provêm a indução de ativação de células dendríticas (DC) imaturas e a preparação dessas células para uma resposta imune antígeno-específica. Em um aspecto, é provido um método para produção de uma população de célula enriquecida em células dendríticas ativadas através de contato das células dendríticas ima-

turas com um substrato de cultura de tecido e um meio de cultura tendo um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições de cultura adequadas para adesão das células dendríticas com o substrato de cultura de tecido e para cultura *in vitro* das células dendríticas imaturas por

5 um período de tempo suficiente para formar uma população de célula enriquecida em células dendríticas ativadas. Nos métodos descritos não é necessário adicionar um agente de amadurecimento de célula dendrítica para induzir a ativação da população de célula dendrítica. As células dendríticas imaturas podem ser contatadas com um antígeno predeterminado antes do,

10 durante ou após o contato das células dendríticas imaturas com a superfície de cultura de tecido. O antígeno predeterminado pode ser, por exemplo, um antígeno específico de tumor, um antígeno associado a tumor, um antígeno viral, um antígeno bacteriano, células de tumor, células bacterianas, células recombinantes expressando um antígeno, um lisato de célula, uma preparação

15 de membrana, um antígeno recombinantemente produzido, um antígeno de peptídeo (por exemplo, um antígeno de peptídeo sintético) ou um antígeno isolado. Ainda, o antígeno pode ser ou um antígeno solúvel ou um antígeno em partícula. Em uma modalidade particular o antígeno pode ser um lisato de célula ou uma preparação de membrana derivada de um tumor de

20 paciente ou uma linhagem de célula de tumor.

Em certas modalidades, o método pode opcionalmente incluir ainda obtenção de uma população de célula enriquecida em precursores de célula dendrítica; e cultura dos precursores na presença de um agente que pode induzir diferenciação das células precursoras de célula dendrítica monocítica para formar uma população de células dendríticas imaturas. Agentes de

25 diferenciação de célula dendrítica adequados incluem, por exemplo, GM-CSF, Interleucina 4, uma combinação de GM-CSF e Interleucina 4, ou GM-CSF e Interleucina 13 ou Interleucina 15. Os precursores de célula dendrítica monocítica podem ser obtidos como células isoladas de um indivíduo humano.

30 Em outro aspecto, um método para produção de uma população de célula enriquecida em células dendríticas ativadas é provido. O método geralmente inclui provisão de uma população de célula enriquecida em célu-

las dendríticas imaturas; e contato das células dendríticas imaturas com um substrato de cultura de tecido e um meio de cultura tendo um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições de cultura adequadas para adesão das células dendríticas com o substrato de cultura de tecido e para cultura *in vitro* das células dendríticas imaturas. As células são 5 cultivadas por um período de tempo suficiente para formarem uma população de célula enriquecida em células dendríticas maduras ativadas. A população de célula dendrítica madura ativada resultante pode, quando administrada a um mamífero, produzir uma resposta imune específica de antígeno neste mamífero. A população de célula dendrítica imatura pode ser contatada 10 com um antígeno predeterminado antes do, durante ou após contato com substrato de cultura de tecido sob condições adequadas para adesão. O antígeno predeterminado pode ser, por exemplo, um antígeno específico de tumor, um antígeno associado a tumor, um antígeno viral, um antígeno bacteriano, células de tumor, células bacterianas, células recombinantes expressando um antígeno, um lisato de célula, uma preparação de membrana, um antígeno recombinantemente produzido, um antígeno de peptídeo (isto é, um peptídeo sintético) ou um antígeno isolado. O antígeno pode ser ou 15 um antígeno solúvel ou um antígeno em partícula. Em uma modalidade particular o antígeno é um lisato de célula ou uma preparação de membrana derivada de um tumor de paciente ou uma linhagem de célula de tumor. Um agente que pode direcionar o amadurecimento das DCs para influenciar a resposta a uma Th1 e/ou uma resposta Th2, por exemplo, interferon-gama (IFN γ), pode ser também adicionado.

25 Em certas modalidades, o método pode opcionalmente incluir ainda obtenção de precursores de célula dendrítica monocítica; e cultura dos precursores *in vitro* na presença de um agente de diferenciação para formar as células dendríticas imaturas. Agentes de diferenciação adequados incluem, por exemplo, GM-CSF, Interleucina 4, Interleucina 13, Interleucina 15 ou 30 combinações dos mesmos. Os precursores de célula dendrítica monocítica podem ser isolados de um indivíduo humano com necessidade de tratamento ou de um indivíduo com histocompatibilidade comparada.

Em ainda outro aspecto, composições para ativação de células T são providas. As composições podem incluir uma população de célula dendrítica ativada e amadurecida através de contato com um substrato de cultura de tecido e um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições adequadas para adesão das células dendríticas ao substrato de cultura de tecido e para ativação; e um antígeno predeterminado. A população de célula dendrítica pode produzir uma resposta imune específica de antígeno similar àquela induzida por uma população de célula dendrítica madura produzida através de um método anterior. A população de célula dendrítica é produzida através de isolamento de células dendríticas imaturas de um meio de cultura anterior e adicionadas citocinas e contato das células dendríticas imaturas isoladas com um substrato de cultura de tecido sob condições adequadas para adesão das DCs ao substrato de cultura de tecido sem a adição de um agente de amadurecimento de célula dendrítica. As células dendríticas quando do contato com o substrato de cultura de tecido sob condições adequadas para adesão de célula dendrítica ao substrato de cultura de tecido são disparadas para prosseguir a ativação e amadurecimento em células dendríticas maduras ativas. Antígeno solúvel ou em partícula predeterminado adicionado ou simultaneamente com as células dendríticas imaturas ao substrato de cultura de tecido ou adicionado durante o processo de maturação, isto é, após ativação, mas antes do término de maturação, pode ser absorvido e processado pelas células dendríticas e apresentado no contexto dos receptores de superfície celular apropriados para estar disponível quando do contato com células T para induzir uma resposta imune específica de antígeno.

Em outro aspecto, uma população de célula dendrítica ativada, isolada, é provida. A população de célula inclui e é enriquecida em células dendríticas monocíticas ativadas maduras previamente contatadas com um substrato de cultura de tecido e um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições condutoras para aderência das células dendríticas com o substrato de cultura de tecido. As células dendríticas ativadas resultantes podem absorver e processar antígeno e quando da cultura conti-

nuada *in vitro* podem adquirir o fenótipo de superfície celular de uma célula dendrítica madura. A população de célula pode incluir opcionalmente um antígeno predeterminado e/ou células T isoladas, tal como células T puras. As células T podem estar opcionalmente presentes em uma preparação de

5 linfócitos isolados.

Um método para produção de células T ativadas é também provido. O método geralmente inclui provisão de uma população de célula enriquecida em células dendríticas imaturas isoladas; contato das células dendríticas imaturas com um antígeno predeterminado e contato das células

10 dendríticas imaturas com um substrato de cultura de tecido e um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições condutoras de adesão das células dendríticas imaturas ao substrato de cultura de tecido. As células são cultivadas por um período de tempo suficiente para induzir ativação das células dendríticas imaturas para formar células dendríticas

15 ativadas. As células dendríticas ativadas podem ser contatadas com células T puras para formar células T específicas de antígeno ativadas. Antígenos adequados podem incluir, por exemplo, um antígeno específico de tumor, um antígeno de associação a tumor, um antígeno viral, um antígeno bacteriano, células de tumor, células bacterianas, células recombinantes expres-

20 sando um antígeno, um lisato de célula (incluindo lisato de célula de tumor), uma preparação de membrana, um antígeno recombinantemente produzido, um antígeno de peptídeo (por exemplo, um antígeno de peptídeo sintético) ou um antígeno isolado. O antígeno predeterminado pode ser ou um antígeno solúvel ou um antígeno em partícula. Um agente que pode direcionar o amadurecimento das DCs para influenciar a resposta para Th1 e/ou uma

25 resposta Th2, por exemplo, interferon-gama, pode ser também adicionado.

A população de célula enriquecida em células dendríticas imaturas pode ser contatada simultaneamente com o antígeno predeterminado, e o substrato de cultura de tecido e o agente de indução de diferenciação de

30 célula dendrítica, ou as células podem ser contatadas com o antígeno predeterminado antes do, durante ou simultaneamente com, ou após contato com o substrato de cultura de tecido e o agente de indução de diferenciação de

célula dendrítica. Em certas modalidades, o método pode incluir ainda obtenção de uma população de célula enriquecida em precursores de célula dendrítica monocítica; e cultura dos precursores *in vitro* na presença do agente de indução de diferenciação de célula dendrítica para induzir a formação das células dendríticas imaturas. Agentes de indução de diferenciação adequados incluem, por exemplo, GM-CSF, Interleucina 4, Interleucina 13 ou Interleucina 15 ou combinações dos mesmos. Os precursores de célula dendrítica monocítica podem ser opcionalmente obtidos a partir de um indivíduo humano. Em uma modalidade particular, as células precursoras dendríticas monocíticas, células dendríticas imaturas e/ou células T são autólogas umas às outras.

As células T específicas de antígeno ativadas podem ser administradas a um animal, particularmente um mamífero, com necessidade de estimulação de uma resposta imune específica de antígeno. Antígenos adequados incluem, por exemplo, um antígeno específico de tumor, um antígeno associado a tumor, um antígeno viral, um antígeno bacteriano, células de tumor, células bacterianas, células recombinantes expressando um antígeno, um lisato de célula, uma preparação de membrana, um antígeno recombinantemente produzido, um antígeno de peptídeo (por exemplo, um antígeno de peptídeo sintético) ou um antígeno isolado. Em uma modalidade particular o lisato de célula e/ou a preparação de membrana é derivado de um tumor de paciente ou linhagem de célula de tumor. As células dendríticas imaturas podem ser opcionalmente simultaneamente contatadas com o antígeno predeterminado, e um substrato de cultura de tecido, um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica ou as células dendríticas imaturas podem ser contatadas com o antígeno predeterminado antes do contato com o substrato de cultura de tecido limpo, sem uso, novo.

Em certas modalidades, o método pode ainda incluir isolamento de precursores de célula dendrítica do animal; e cultura dos precursores *in vitro* na presença de um agente de diferenciação para formar as células dendríticas imaturas. O agente de diferenciação pode ser, por exemplo, GM-CSF, Interleucina 4, Interleucina 13, Interleucina 15 ou combinações dos mesmos.

O precursor de célula dendrítica monocítica, população de célula dendrítica imatura e/ou células T podem ser autólogos ao animal ou alogênicas ao animal. Alternativamente, os precursores de célula dendrítica monocítica, células dendríticas imaturas e/ou células T podem ter o mesmo haplotipo de MHC que o animal ou compartilhar um marcador de MHC. Em certas modalidades, o animal pode ser humano ou pode ser um animal não-humano.

Descrição Detalhada

A presente invenção provê métodos para indução ou disparo da ativação e do amadurecimento de populações de célula dendrítica (DC) imatura e para preparação dessas populações de célula para uma resposta imune antígeno-específica. As populações de célula dendrítica imatura podem ser obtidas de meios de preparação, incluindo, por exemplo, meio de isolamento, meio de cultura e similar, e a população de célula enriquecida em células dendríticas monocíticas imaturas são contatadas com um substrato de cultura de tecido e um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições adequadas para adesão das DCs ao substrato de cultura de tecido sem a adição de um agente de amadurecimento de célula dendrítica. As células dendríticas imaturas podem ser contatadas com um antígeno predeterminado sob condições de cultura celular *in vitro* adequadas para processamento e apresentação pelas DCs. Contato com o antígeno de interesse pode ser durante, antes ou subsequente ao início de ativação. Alternativamente, células dendríticas monocíticas imaturas, já expostas a antígeno (isto é, *in vivo*), podem ser obtidas e contatadas com um substrato de cultura de tecido sob condições de cultura de célula similarmente adequadas. As células dendríticas maduras ativadas resultantes apresentam o antígeno de interesse e são preparadas para ativar células T em direção a uma resposta específica de antígeno. Direção da resposta, isto é, influenciar a resposta em favor de respostas Th-1 ou Th-2 pode ser influenciada pela adição de um agente de amadurecimento direcional, tal como interferon-gama (IFN γ) e similar.

Em outro aspecto, uma população de célula enriquecida em pre-

cursores de célula dendrítica monocítica pode ser obtida a partir de um indivíduo ou de um doador. A população de célula pode ser contatada com um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica tal como, por exemplo, uma ou mais citocinas (por exemplo, mas não limitado a, GM-CSF, e combinações de GM-CSF e IL-4, GM-CSF e IL-3, GM-CSF e IL-15 e similar) para se obter células dendríticas imaturas. As células dendríticas imaturas podem então ser contatadas com um antígeno predeterminado, ou em combinação com um substrato de cultura de tecido e um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica, ou uma citocina ou outro agente de amadurecimento direcional, para ativar e/ou parcialmente amadurecer as células dendríticas. As células dendríticas maduras podem ser usadas diretamente para induzir uma resposta imune específica de antígeno em um indivíduo ou as células podem ser usadas para indução de uma resposta imune específica de antígeno em células T. Em certas modalidades, processamento de antígeno de Classe-I do MHC é estimulado, que é útil para eliciar uma resposta de CTL contra células mostrando o antígeno predeterminado. A direção da resposta induzida pode ser influenciada pela adição de um agente de amadurecimento direcional, tal como interferon-gama. Conforme aqui usado, um agente de amadurecimento direcional é um agente que pode afetar o estado final das DCs maduras, mas não induz amadurecimento de DC quando usado sozinho. Por exemplo, um agente de amadurecimento direcional pode polarizar o amadurecimento de uma população de DC para favorecer uma resposta Th-1 versus uma Th-2, ou vice versa.

Células dendríticas são uma população diversa de células apresentando antígeno encontrada em uma variedade de tecidos linfóides e não-linfóides. (Vide Liu, *Cell* 106:259-262 (2001); Steinman, *Ann. Rev. Immunol.*, 9:271-296 (1991)). Células dendríticas incluem células dendríticas linfóides do baço, células Langerhans da epiderme e células veladas na circulação sanguínea. Coletivamente, células dendríticas são classificadas como um grupo baseado em sua morfologia, altos níveis de expressão de MHC-classe II de superfície e ausência de certos outros marcadores de superfície expressos em células T, células B, monócitos e células assassinas naturais.

Em particular, células dendríticas derivadas de monócito (também referidas como células dendríticas monocíticas) geralmente expressam CD11c, CD80, CD83, CD86 e são HLA-DR⁺, mas são tipicamente, mas não são sempre, CD14⁻.

5 Em contraste, precursores célula dendrítica monocítica (tipicamente monócitos) são geralmente CD14⁺ e expressam nenhum ou níveis baixos de HLA-DR, CD83 e CD86. Precursores de célula dendrítica monocítica podem ser obtidos de qualquer tecido onde eles residam, particularmente tecidos linfóides tal como baço, medula óssea, nós linfáticos e timo. Pre-
10 cursores de célula dendrítica monocítica podem ser obtidos do sistema circulatório. Sangue periférico é uma fonte prontamente acessível de precursores de célula dendrítica monocítica. Sangue de cordão umbilical é outra fonte de precursores de célula dendrítica monocítica. Precursores de célula dendrítica monocítica podem ser obtidos de uma variedade de organismos onde uma
15 resposta imune pode ser elicitada. Tais organismos incluem animais, por exemplo, incluindo seres humanos, e animais não-humanos, tais como primatas, outros mamíferos (incluindo, mas não limitado a, cachorros, gatos, camundongos e ratos), aves (incluindo galinhas), bem como suas espécies transgênicas.

20 Em certas modalidades, a população de célula enriquecida em precursores de célula dendrítica monocítica e/ou células dendríticas imaturas pode ser obtida de um indivíduo saudável ou, em alternativa, de um indivíduo com necessidade de imunoestimulação, tal como, por exemplo, um paciente com câncer (por exemplo, câncer do cérebro, mama, ovário, pulmão, próstata, colo e similar) ou outro indivíduo para o qual imunoestimulação celular pode ser benéfica ou desejada (isto é, um indivíduo tendo uma infecção bacteriana ou viral e similar). Precursores de células dendríticas e/ou células dendríticas imaturas podem ser também obtidos de um indivíduo saudável comparável em HLA para administração a um indivíduo comparável em HLA
25 com necessidade de imunoestimulação.
30 com necessidade de imunoestimulação.

Precursores de Célula Dendrítica e Células Dendríticas Imaturas

Métodos para isolamento de populações de célula enriquecidas

em precursores de célula dendrítica e células dendríticas imaturas de várias fontes, incluindo sangue e medula óssea, são conhecidos na técnica. Por exemplo, populações de célula enriquecidas em precursores de célula dendrítica e células dendríticas imaturas podem ser obtidas através da coleta de sangue heparinizado, através de aférese ou leucaférese, através da preparação de camadas de célula branca ("*buffy coats*"), *rosetting*, centrifugação, centrifugação de gradiente de densidade (por exemplo, usando FICOLL (tal como FICOLL-PAQUE®), PERCOLL® (partículas de sílica coloidal (15-30 mm de diâmetro) revestidas com polivinilpirrolidona não-dialisável (PVP)), saca-rose e similar), lise diferencial de células, filtragem e similar. Em certas modalidades, uma população de leucócito pode ser preparada, tal como, por exemplo, através de coleta de sangue de um indivíduo, desfibrinação para remover as plaquetas e lise das células sanguíneas vermelhas. Precursores de célula dendrítica e células dendríticas imaturas podem ser opcionalmente enriquecidos em precursores de célula dendrítica monocítica através de, por exemplo, centrifugação através de um material de gradiente de densidade, tal como, por exemplo, um gradiente PERCOLL®.

Todas as populações enriquecidas em precursores de células dendríticas e células dendríticas imaturas opcionalmente podem ser preparadas em, por exemplo, um sistema asséptico, fechado. Conforme aqui usado, o termo "sistema asséptico, fechado" ou "sistema fechado" refere-se a um sistema onde exposição a ar não-esterilizado, ambiente ou circulante ou outras condições não-estéreis é minimizada ou eliminada. Sistemas fechados para obtenção de precursores de célula dendrítica e células dendríticas imaturas geralmente excluem centrifugação de gradiente de densidade em tubos abertos na parte de cima, transferência de células aberto ao ar, cultura de células em placas de cultura de tecido ou frascos não-vedados e similar. Em uma modalidade típica, o sistema fechado permite transferência asséptica dos precursores de célula dendrítica e células dendríticas imaturas a partir de um recipiente de coleta inicial para recipiente de cultura de tecido vedável sem exposição a ar não-estéril.

Em certas modalidades, precursores de célula dendrítica mono-

cítica são obtidos através de aderência de monócitos a um substrato de ligação de monócito, conforme revelado no WO 03/010292, cuja descrição é aqui incorporada a título de referência. Por exemplo, uma população de leucócitos (por exemplo, isolados através de leucaférese) pode ser contatada com um substrato de adesão de precursor de célula dendrítica monocítica. Quando a população de leucócitos é contatada com o substrato, os precursores de célula dendrítica monocítica na população de leucócito de preferência aderem ao substrato. Outros leucócitos (incluindo outros precursores de célula dendrítica potenciais) exibem afinidade de ligação reduzida ao substrato, deste modo permitindo que os precursores de célula dendrítica monocítica sejam de preferência enriquecidos na superfície do substrato.

Substratos adequados incluem, por exemplo, aqueles tendo uma razão de área de superfície para volume grande. Tais substratos podem ser, por exemplo, um substrato em partícula ou fibroso. Substratos em partícula adequados incluem, por exemplo, partículas de vidro, partículas de plástico, partículas de plástico revestidas com vidro, partículas de poliestireno revestidas com vidro e outras contas adequadas para absorção de proteína. Substratos fibrosos adequados incluem tubos microcapilares e membrana microvilosa. O substrato em partícula ou fibroso geralmente permite que os precursores de célula dendrítica monocítica aderidos sejam eluídos sem substancialmente reduzir a viabilidade das células aderidas. Um substrato em partícula ou fibroso pode ser substancialmente não-poroso para facilitar eluição de precursores de célula dendrítica monocítica ou células dendríticas a partir do substrato. Um substrato "substancialmente não-poroso" é um substrato onde pelo menos a maior parte dos poros presentes no substrato é menor do que as células para minimizar aprisionamento de células no substrato.

Aderência dos precursores de célula dendrítica monocítica aos substratos pode ser opcionalmente aumentada através da adição de um meio de ligação. Meios de ligação adequados incluem meio de cultura de precursor de célula dendrítica monocítica (por exemplo, AIM-V®, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15® e similar) suplementado, individualmente ou em qual-

quer combinação, com, por exemplo, citocinas (por exemplo, Fator de Estimulação de Colônia de Granulócito/Macrófago (GM-CSF), Interleucina 4 (IL-4) ou Interleucina 13 (IL-13)), plasma sanguíneo, soro (por exemplo, soro humano, tal como soros autólogos ou alogênéticos), proteínas purificadas, tal como albumina de soro, cátions divalentes (por exemplo, íons de cálcio e/ou magnésio) e outras moléculas que auxiliam na aderência específica de precursores de célula dendrítica monocítica ao substrato, ou que previnem aderência de precursores de célula dendrítica não-monocítica ao substrato. Em certas modalidades, o plasma sanguíneo ou soro pode ser inativado com calor. O plasma inativado com calor pode ser autólogo ou heterólogo aos leucócitos.

Seguindo aderência de precursores de célula dendrítica monocítica ao substrato, os leucócitos não-aderentes são separados dos complexos de precursor de célula dendrítica monocítica/substrato. Quaisquer meios adequados podem ser usados para separar as células não-aderentes dos complexos. Por exemplo, a mistura dos leucócitos não-aderentes e os complexos pode ser deixada sedimentar, e os leucócitos de não-adesão e meios decantados ou drenados. Alternativamente, a mistura pode ser centrifugada, e o sobrenadante contendo os leucócitos de não-aderência decantado ou drenado dos complexos de pélete.

Em outro método, todas as populações enriquecidas em precursores de célula dendrítica monocítica podem ser obtidas a partir de uma população de célula enriquecida em leucócitos preparada através do uso de um dispositivo de filtração de fluxo tangencial. Um dispositivo de filtração de fluxo tangencial útil para obtenção da população enriquecida em precursores de célula dendrítica monocítica pode compreender uma unidade removedora tendo uma câmara de fluxo cruzado, uma câmara de filtrado e um dispositivo disposto entre elas. (Vide WO 2004-000444 incorporado aqui a título de referência em sua totalidade). O filtro está em comunicação fluida em um lado, a superfície do retentato, com a câmara de fluxo cruzado, e no outro lado, a superfície do filtrado, com a câmara do filtrado. A câmara de fluxo cruzado tem uma entrada adaptada para introduzir uma amostra de

constituintes do sangue compreendendo leucócitos na câmara de fluxo cruzado e paralela à superfície do retentato do filtro. Uma saída é também provida na câmara de fluxo cruzado centralmente disposta em uma porção da câmara oposta à superfície do retentato do filtro. O filtrado adequado para uso no dispositivo de filtração tangencial tipicamente tem um tamanho de poro médio variando de a partir de cerca de 1 a cerca de 10 microns. O filtro pode ter um tamanho de poro médio de cerca de 3 a cerca de 7 microns. Um meio para provisão de uma taxa de entrada predeterminada da amostra na entrada da câmara de fluxo cruzado e um dispositivo para controle de uma taxa de filtração de filtrado através do filtro e para a câmara de filtrado pode ser também incluído. O meio de controle de taxa de filtração limita a taxa de filtração para menos do que a taxa de filtração que não tem oposição para o filtro. A amostra compreendendo constituintes do sangue pode ser provida por um dispositivo fonte tal como dispositivo de leucaférese ou um recipiente compreendendo uma amostra coletada de um dispositivo de leucaférese.

Os precursores de célula dendrítica podem ser cultivados *in vitro* ou *ex vivo* para diferenciação, amadurecimento e/ou expansão. (Conforme aqui usado, células dendríticas imaturas isoladas, precursores de célula dendrítica, células T, e outras células, refere-se a células que, pela mão humana, existem fora de seu ambiente nativo, e não são então um produto da natureza. Células isoladas podem existir em forma purificada, em forma semi-purificada (por exemplo, uma população de célula enriquecida), ou em um ambiente não-nativo). Resumidamente, diferenciação *ex vivo* tipicamente envolve cultura de precursores de célula dendrítica, ou populações de células tendo precursores de célula dendrítica, na presença de um ou mais agentes de diferenciação de célula dendrítica. Agentes de indução de diferenciação adequados podem ser, por exemplo, mas não limitados a, fatores de crescimento celular (por exemplo, citocinas tal como (GM-CSF), Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 13 (IL-13), Interleucina 15 (IL-15) e/ou combinações dos mesmos). Em certas modalidades, os precursores de célula dendrítica monocítica são induzidos para diferenciar de células dendríticas imaturas derivadas de monócito.

Os precursores de célula dendrítica podem ser cultivados e induzidos para diferenciar sob condições de cultura adequadas. Meios de cultura de tecido adequados incluem, por exemplo, AIM-V®, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15® e similar. O meio de cultura de tecido pode ser suplementado com soro, aminoácidos, vitaminas, citocinas, tal como GM-CSF e/ou IL-4, IL-13 ou IL-15, cátions divalentes e similar, para promover diferenciação das células em células dendríticas imaturas. Em certas modalidades, os precursores de célula dendrítica podem ser cultivados *in vitro* em um meio livre de soro. Tais condições de cultura podem opcionalmente excluir quaisquer produtos derivados de animal. Uma combinação de citocina comum em um meio de cultura de célula dendrítica típico compreende cerca de 500 unidades/ml cada de GM-CSF e IL-4. Precursores de célula dendrítica, quando diferenciados para formar células dendríticas imaturas, são fenotipicamente similares a células Langerhans da pele. Células dendríticas imaturas tipicamente são CD14⁻ e CD11c⁺, expressam níveis baixos de CD86 e CD83 e são capazes de capturar antígenos solúveis através de endocitose especializada.

Tipicamente, em métodos anteriores, as células dendríticas imaturas são amadurecidas *in vitro* ou *ex vivo* para formarem células dendríticas maduras antes da administração a um paciente ou antes do contato com células T. Nesses métodos, um agente de amadurecimento de célula dendrítica é adicionado à cultura *in vitro* compreendendo as células dendríticas imaturas ou antes do ou com um antígeno predeterminado. Quando da maturação, as DCs gradualmente e progressivamente perdem a habilidade em absorver antígeno e elas tipicamente mostram expressão supra-regulada de moléculas de superfície de célula co-estimuladoras e várias citocinas. Especificamente, DC madura expressa níveis mais altos de antígenos de classes I e II do MHC do que as células dendríticas imaturas, e as células dendríticas maduras são geralmente identificadas como sendo CD80⁺, CD83⁺, CD86⁺ e CD14⁻. Expressão do MCH maior leva a um aumento em densidade de antígeno sobre a superfície de DC, enquanto supra-regulação de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 reforça o sinal de ativação de célula T através

dos correspondentes das moléculas co-estimuladoras, tal como CD28, nas células T.

Diferente dos métodos anteriores, ativação das células dendríticas imaturas no método da presente invenção é iniciada ou disparada através de contato de células dendríticas imaturas isoladas com um substrato de cultura de tecido e um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições adequadas para aderência da célula dendrítica à superfície de cultura de tecido. Em um método típico da presente invenção, ativação é conseguida sem a adição de um agente de maturação. As células dendríticas imaturas são removidas de um substrato de cultura anterior ou meios de purificação e isoladas dos meios de cultura anteriores. As células dendríticas imaturas isoladas são então contadas e congeladas para uso posterior combinadas com meios de cultura sem fatores de amadurecimento de célula dendrítica adicionados para o restante do processo. Em um método alternativo, um agente de amadurecimento direcional pode ser adicionado durante ativação para influenciar as células dendríticas de modo que elas podem polarizar uma resposta de célula T para uma resposta Th-1 ou Th-2. Como um exemplo, mas não como uma limitação aos agentes que podem ser usados, interferon-gama pode ser adicionado para influenciar a resposta de célula T em direção a uma resposta Th-1. Interferon-gama adicionado a precursores de célula dendrítica monocítica de DCs imaturas em si não induz diferenciação e/ou amadurecimento de DC.

Substratos de cultura de tecido úteis nos métodos da presente invenção podem compreender uma cavidade, frasco, garrafa, bolsa ou qualquer matriz usada em um biorreator para cultura de tecido, tal como fibra, contas, placas e similar. Tipicamente, substratos de cultura de tecido compreendem plásticos, tal como poliestireno, Teflon® (politetrafluoretileno, PTFE) e similar. Esses substratos de cultura de tecido freqüentemente usados para cultura *ex vivo* de células dendríticas para imunoterapia compreendem frascos, bolsas ou frações celulares que são compreendidas de camadas de plástico empilhadas múltiplas de cultura de tecido, e similar.

As células dendríticas imaturas isoladas podem ser cultivadas e

amadurecidas em condições de cultura de amadurecimento adequadas. Meios de cultura de tecido adequados incluem AIM-V®, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15® e similar. Os meios de cultura de tecido podem ser suplementados com aminoácidos, vitaminas, citocinas, soro humano, por exemplo, cerca de 1% a cerca de 10% de soro AB humano, cátions divalentes e similar, para promover amadurecimento das células.

Amadurecimento ou ativação de células dendríticas pode ser monitorado através de métodos conhecidos na técnica. Marcadores de superfície celular podem ser detectados em ensaios conhecidos à técnica, tal como citometria de fluxo, imunistoquímica e similar. As células podem ser também monitoradas quanto à produção de citocina (por exemplo, através de ELISA, FACS ou outro imunoenensaio). Em uma população de DC ativada de acordo com a presente invenção, células podem ser também ensaiadas quanto ao aparecimento de marcadores de superfície celular típicos CD83, CD86 e HLA-DR. Alguns desses antígenos tal como CD83 são expressos apenas em DCs maduras, enquanto a expressão de outros é significativamente supra-regulada quando do amadurecimento. DCs maduras também perdem a habilidade em absorver antígeno através de pinocitose, que pode ser analisada através da absorção de ensaios conhecidos a um versado na técnica. Precursores de célula dendrítica, células dendríticas imaturas e células dendríticas maduras, ou preparadas ou não-preparadas, com antígenos podem ser criopreservadas para uso em uma ocasião posterior. Métodos para criopreservação são bem-conhecidos na técnica. Vide, por exemplo, Patente U.S. 5.788.963 incorporada aqui a título de referência em sua totalidade.

25 Antígenos

As células dendríticas ativadas, maduras, de acordo com a presente invenção podem apresentar antígenos para células T. Células dendríticas ativadas, maduras, podem ser formadas através de contato de células dendríticas imaturas com um antígeno predeterminado ou durante ou subsequente à ativação. Alternativamente, células dendríticas imaturas que já foram contatadas com antígeno (por exemplo, *in vivo* antes do isolamento) podem ser contatadas com o substrato de cultura de tecido e um agente de

indução de diferenciação de célula dendrítica para produzir células dendríticas maduras ativadas para indução de resposta de célula T citotóxica.

Antígenos predeterminados adequados podem incluir qualquer antígeno para o qual ativação de célula T é desejada. Tais antígenos podem
5 incluir, por exemplo, antígenos bacterianos, antígenos específicos de tumor ou associados a tumor (por exemplo, células integrais, lisato de célula de tumor, por exemplo, lisato de glioblastoma, células de tumor de próstata, ou ovário, mama, colo, cérebro, melanoma ou pulmão e similar), antígenos isolados de tumores, proteínas de fusão, lipossomas e similar, antígenos virais
10 e qualquer outro antígeno ou fragmento de antígeno, por exemplo, um antígeno de peptídeo ou polipeptídeo. Em certas modalidades, o antígeno pode ser, por exemplo, mas não limitado a, antígeno de membrana específico da próstata (PSMA), fosfatase ácida prostática (PAP) ou antígeno específico da próstata (PSA). (Vide, por exemplo, Pepsidero e outros, *Cancer Res.*,
15 40:2428-32 (1980); McCormack e outros, *Urology* 45:729-44 (1995)). O antígeno pode ser também uma célula bacteriana, lisato bacteriano, fragmento de membrana de um lisato celular ou qualquer outra fonte conhecida na técnica. O antígeno pode ser expresso ou produzido recombinantemente, ou até mesmo quimicamente sintetizado. O antígeno recombinante pode ser
20 também expresso na superfície de uma célula hospedeira (por exemplo, células de bactéria, levedura, inseto, vertebrado ou mamífero), pode estar presente em um lisato ou pode ser purificado a partir do lisato. O antígeno pode ser ou um antígeno sólido ou um antígeno em partícula.

Antígeno pode também estar presente em uma amostra de um
25 indivíduo. Por exemplo, uma amostra de tecido de uma condição hiperproliferativa ou outra em um indivíduo pode ser usada como uma fonte de antígeno. Tal amostra pode ser obtida, por exemplo, através de biópsia ou através de ressecção cirúrgica. Tal antígeno pode ser usado, por exemplo, como um lisato ou como uma preparação isolada. Alternativamente uma preparação
30 de membrana de células de um indivíduo (por exemplo, um paciente com câncer) ou uma linhagem de célula estabelecida pode ser também usada como um antígeno ou fonte de antígeno.

Em uma modalidade exemplar, um lisato de célula de tumor glioblastoma recuperada de espécimes cirúrgicos pode ser usado como uma fonte de antígeno. Por exemplo, uma amostra do tumor do próprio paciente de câncer, obtida na biópsia ou em ressecção cirúrgica, pode ser usada diretamente para apresentar antígeno a células dendríticas ou para prover um lisato de célula para apresentação de antígeno. Alternativamente, uma preparação de membrana de células de tumor de um paciente de câncer pode ser usada. A célula de tumor pode ser células de tumor glioblastoma, próstata, pulmão, ovariano, mama, colo, cérebro, melanoma ou qualquer outro tipo.

5 Lisatos e preparações de membrana podem ser preparados a partir de células de tumor isoladas através de métodos bem-conhecidos na técnica.

Em uma modalidade, os precursores de célula dendrítica monocítica podem ser isolados em um substrato, eluídos do substrato e transferidos para um biorreator, ou outro sistema fechado, tal como uma bolsa de cultura de tecido. Bolsas de cultura de tecido adequadas incluem, por exemplo, recipientes de cultura STERICELL (Nexell Therapeutics Inc.) ou bolsas de cultura TEFLON (American Fluoroseal Corp.) e similar. O sistema fechado pode ter qualquer tamanho de volume adequado, como será compreendido por aqueles versados na técnica. Volumes adequados incluem, por exemplo,

15 de a partir de cerca de 0,01 litro a cerca de 5 litros ou cerca de 0,01 litro a cerca de 0,05 litro, embora volumes maiores e menores sejam possíveis e estejam dentro do escopo da presente invenção.

Os precursores de célula dendrítica monocítica podem ser também cultivados no substrato. Por exemplo, os precursores de célula dendrítica monocítica no substrato podem ser cultivados em um biorreator (incluindo um fermentador) ou recipientes de cultura de tecido, tal como frascos, bolsas ou placas de cultura de tecido. Os frascos, bolsas ou placas de cultura de tecido podem ter qualquer tamanho ou volume adequado, como será compreendido pelo versado. Um biorreator tipicamente tem um volume de a partir

25 de cerca de 0,01 a cerca de 5 litros, ou cerca de 0,01 a cerca de 0,05 litro, embora volumes maiores e menores sejam possíveis e estejam dentro do escopo da presente invenção. Tipicamente, o biorreator usado para cultura de

30

precusores de célula dendrítica monocítica terão um volume de cerca de 0,01 a cerca de 0,1 litro. O biorreator pode ser inoculado com qualquer quantidade adequada de precusores de célula dendrítica monocítica, tal como, por exemplo, de a partir de cerca de 10^5 células a cerca de 5×10^6 células por mililitro de substrato. Os precusores de célula dendrítica monocítica no substrato podem ser também cultivados em um sistema asséptico, fechado.

Os precusores de célula dendrítica monocítica são cultivados e diferenciados para se obter células dendríticas imaturas. Meios de cultura de tecido adequados incluem AIM-V, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15 e similar. O meio de cultura de tecido pode ser suplementado com aminoácidos, vitaminas, citocinas, tal como fator de estimulação de colônia de granulócito/macrófago (GM-CSF) e/ou interleucina 4 (IL-4), interleucina 7 (IL-7) ou interleucina 13 (IL-13), cátions divalentes e similar, para promover diferenciação de precusores de célula dendrítica monocítica em células dendríticas imaturas. Uma combinação de citocina típica é cerca de 500 unidades/ml de cada um de GM-CSF e IL-4. Tipicamente, se os precusores de célula dendrítica monocítica forem cultivados no substrato o número de células dendríticas maduras recuperadas como as células não-aderidas da superfície do substrato são principalmente células dendríticas maduras. Os precusores de célula dendrítica monocítica podem ser cultivados por qualquer tempo adequado.

Em certas modalidades, tempos de cultura adequados para a diferenciação de precusores em células imaturas pode ser cerca de 4 a cerca de 7 dias. A diferenciação de células dendríticas imaturas a partir dos precusores pode ser monitorada através de métodos conhecidos daqueles versados na técnica, tal como através do monitoramento da presença ou ausência de marcadores de superfície celular, tal como CD14, CD11c, CD83, CD86, HLA-DR, com anticorpo monoclonal marcado. O fenótipo das células dendríticas pode ser também determinado através da análise de padrões de expressão de gene através de métodos bem-conhecidos na técnica. Um fenótipo de superfície celular típico para células dendríticas imaturas seria $CD14^-$, $CD11c^+$, $CD83^-$, $CD86^-$ e $HLA-DR^+$. Células dendríticas imaturas podem ser também cultivadas em meio de cultura de tecido apropriado para

expandir a população de célula e/ou manter as células dendríticas imaturas em um estado para diferenciação ou absorção, processamento e apresentação adicionais de antígeno. Por exemplo, células dendríticas imaturas podem ser mantidas e/ou expandidas na presença de GM-CSF e IL-4.

- 5 Células dendríticas imaturas podem ser preferidas para algumas aplicações porque elas retêm a habilidade em processar novo antígeno. (Vide, por exemplo, Koch e outros, *J. Immunol.* 155:93-100 (1995)). Em contraste, células dendríticas maduras (por exemplo, CD14⁺, CD11c⁺, CD83⁺, CD86⁺ e HLA-DR⁺), aquelas que foram expostas a e processam antígeno e
- 10 a condições de amadurecimento adequadas, perderam tipicamente a habilidade em processar eficientemente novos antígenos. Células dendríticas maduras podem ser contatadas com peptídeos que são capazes de se ligar a moléculas de classe I do MHC e/ou classe II do MHC para apresentação sobre a superfície celular.
- 15 Durante a cultura, células dendríticas imaturas podem ser opcionalmente expostas a um antígeno predeterminado. Antígenos predeterminados adequados podem incluir como acima qualquer antígeno para o qual ativação de célula T é desejada. Em uma modalidade, células dendríticas imaturas são cultivadas na presença de um lisato de célula de tumor, tal
- 20 como um lisato de célula de tumor glioblastoma, próstata, pulmão, ovário, mama, colo, cérebro, melamina, e similar, para imunoterapia de câncer e/ou inibição de crescimento de tumor. Outros antígenos podem incluir, por exemplo, antígenos bacterianos e virais, células de tumor, membranas de célula de tumor purificadas, antígenos específicos de tumor ou associados a
- 25 tumor (por exemplo, antígenos isolados de tumores, proteínas de fusão, lipossomas e similar), células bacterianas, antígeno bacteriano, partículas virais, antígenos virais e qualquer outro antígeno. Ainda, um antígeno pode ser expresso na superfície de uma célula hospedeiro transformada ou transfectada expressando o antígeno, ou uma membrana purificada ou um lisato
- 30 de célula de uma célula transfectada ou transformada expressando o antígeno de interesse.

Seguindo contato com o antígeno, tal como lisato de célula de

tumor, as células podem ser cultivadas por qualquer tempo para permitir absorção e processamento de antígeno, para expandir a população de células dendríticas específicas de antígeno e similar. Células dendríticas imaturas podem ser também amadurecidas em células dendríticas ativadas que apresentam antígeno no contexto de moléculas de classe I do MHC ou classe II do MHC. Tal amadurecimento pode ser realizado, por exemplo, através de cultura em um substrato de cultura de tecido e com um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições condutoras para adesão de célula dendrítica ao substrato de cultura de tecido na ausência de outros agentes de amadurecimento conhecidos. Tipicamente, o agente de indução de diferenciação de célula dendrítica é GM-CSF e IL-4, IL-13 ou IL-15 e similar.

De acordo com outro aspecto, células dendríticas podem ser expostas a um antígeno predeterminado e um agente de amadurecimento direcional. Um agente de amadurecimento direcional não, quando usado sozinho, induz a diferenciação de células precursoras dendríticas monocíticas ou induz a amadurecimento de células dendríticas imaturas, mas tipicamente quando combinado com um processo de ativação direcional o amadurecimento das DCs em direção a células que podem induzir uma resposta Th-1 ou Th-2. Interferon-gama é um exemplo de um agente que pode induzir a influência da resposta de célula T induzida em direção a uma resposta Th-1.

Em outra modalidade da presente invenção, células dendríticas imaturas expostas a um antígeno predeterminado podem ser usadas para ativar células T *in vitro* contra um antígeno. As células dendríticas podem ser usadas imediatamente após exposição a antígeno para estimular células T. Alternativamente, células dendríticas podem ser mantidas na presença de uma combinação de citocina (por exemplo, GM-CSF e IL-4) antes da exposição a antígeno e células T, ou as células dendríticas podem ser criopreservadas através de métodos bem-conhecidos na técnica para uso em um momento posterior. Em uma modalidade específica, células dendríticas humanas são usadas para estimular células T humanas.

Células T ou um subconjunto de células T podem ser obtidos de vários tecidos linfóides para uso em células respondedoras. Tais tecidos in-

cluem, mas não estão limitados ao, baço, nós linfáticos e sangue periférico. As células T isoladas ou purificadas podem ser co-culturadas com células dendríticas expostas ao antígeno predeterminado como uma população de célula T mista ou como um subconjunto de célula T purificada.

- 5 Por exemplo, células T CD8⁺ podem ser co-culturadas com células dendríticas expostas a antígeno para elicitar uma resposta CTL antígeno-específica. Ainda, eliminação precoce de células T CD4⁺ pode prevenir o crescimento excessivo de células CD4⁺ em uma cultura mista de ambas células T CD8⁺ e CD4⁺. Purificação celular pode ser conseguida através de
10 seleção positiva ou negativa incluindo, mas não limitado ao uso de anticorpos direcionados a CD2, CD3, CD4, CD6 e/ou CD8.

- Alternativamente, populações mistas de células T CD4⁺ e CD8⁺ podem ser co-culturadas com células dendríticas para elicitar uma resposta específica para um antígeno compreendendo ambos uma resposta imune
15 citotóxica e T auxiliar. Em certas modalidades, células T CD8⁺ ou CD4⁺ ativadas podem ser geradas de acordo com o método da presente invenção. Tipicamente, células dendríticas preparadas, maduras, usadas para gerar as células T polarizadas, reativas a antígeno, são singenéticas ao indivíduo ao qual elas devem ser administradas (por exemplo, são obtidas do indivíduo).
20 Alternativamente, células dendríticas tendo o mesmo haplotipo de HLA que o indivíduo recipiente podem ser preparadas *in vitro* usando células não-cancerosas (por exemplo, células normais) de um doador comparável. Em uma modalidade específica, células T reativas a antígeno, incluindo células CTL e auxiliares Th-1, são expandidas *in vitro* como uma fonte de células
25 para imunoestimulação.

Administração *in vivo* de Populações de Célula

- Em outro aspecto da invenção são providos métodos para administração de células dendríticas preparadas, maduras, ou células T ativadas, por exemplo, polarizadas, ou uma população de célula contendo tais células,
30 a um indivíduo com necessidade de imunoestimulação. Tais populações de célula podem incluir ambas populações de célula dendrítica ativada, madura e/ou populações de célula T ativadas, por exemplo, polarizadas. Em certas

modalidades, tais métodos são realizados através da obtenção de precursores de célula dendrítica ou células dendríticas imaturas, diferenciação e amadurecimento dessas células através de contato com um substrato de cultura de tecido, um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica e antígeno predeterminado para formar uma população de célula dendrítica ativada madura preparada para induzir uma resposta de célula T específica de antígeno. As células dendríticas imaturas podem ser contatadas com o antígeno antes da, durante ou seguindo ativação. Células dendríticas maduras ou ativadas podem ser administradas diretamente a um indivíduo com necessidade de imunoestimulação.

Em uma modalidade relacionada, as células dendríticas ativadas ou maduras podem ser contatadas com linfócitos de um indivíduo para estimular células T dentro de uma população de linfócito. Os linfócitos polarizados, ativados, opcionalmente seguido pela expansão clonal em cultura de célula de células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ reativas a antígeno, podem ser administrados a um indivíduo com necessidade de imunoestimulação. Em certas modalidades, células T polarizadas, ativadas, são autólogas ao indivíduo.

Em outra modalidade, as células dendríticas, células T e o indivíduo recipiente têm o mesmo haplotipo do MHC (HLA). Métodos de determinação de haplotipo de HLA de um indivíduo são conhecidos na técnica. Em uma modalidade relacionada, as células dendríticas e/ou células T são alogênicas ao indivíduo recipiente. Por exemplo, as células dendríticas podem ser alogênicas para as células T e o recipiente, que têm o mesmo haplotipo do MHC (HLA). As células alogênicas são tipicamente comparadas em pelo menos um alelo de MHC (por exemplo, compartilhando pelo menos um, mas não todos os alelos de MHC). Em uma modalidade menos típica, as células dendríticas, células T e os indivíduos recipientes são todos alogenícos com relação uns aos outros, mas todos têm pelo menos um alelo de MHC em comum.

De acordo com uma modalidade, as células T são obtidas a partir do mesmo indivíduo a partir do qual as células dendríticas imaturas foram obtidas. Após amadurecimento e polarização *in vitro*, as células T autólogas são administradas ao indivíduo para provocar e/ou aumentar uma resposta

imune existente. Por exemplo, células T podem ser administradas, através de infusão intravenosa, por exemplo, em doses de cerca de 10^8 a cerca de 10^9 células/m² de área de superfície do corpo (vide, por exemplo, Ridell e outros, *Science* 257:238-241 (1992), incorporada aqui a título de referência).

- 5 Infusão pode ser repetida em intervalos desejados, por exemplo, mensalmente. Os recipientes podem ser monitorados durante e após infusões de célula T quanto a qualquer evidência de efeitos adversos.

De acordo com outra modalidade, células dendríticas amadurecidas através de contato com um substrato de cultura de tecido limpo sem
10 uso, novo, de acordo com a presente invenção podem ser injetadas diretamente em um tumor, ou outro tecido contendo um antígeno alvo. Tais células parcialmente maduras podem absorver um antígeno e apresentar este antígeno a células T *in vivo*.

Exemplos

- 15 Os exemplos que seguem são providos meramente como ilustrativo de vários aspectos da invenção e não devem ser considerados limitar a invenção de modo algum.

Exemplo 1: Amadurecimento de Precursores de Célula Dendrítica Monocítica através de Contato com um Substrato de Cultura de Tecido

- 20 Neste exemplo, precursores de célula dendrítica monocítica em uma população de célula enriquecida em precursores são diferenciados para formar células dendríticas imaturas na presença de GM-CSF e IL-4. As células dendríticas imaturas são coletadas de um sistema de cultura de tecido, lavadas, contadas e combinadas com um antígeno predeterminado em recipi-
25 ente de cultura de tecido limpo, novo. As células são cultivadas na presença de um antígeno solúvel ou em partícula predeterminado sob condições típicas para manutenção de célula dendrítica, meios de cultura de célula dendrítica típicos suplementados com GM-CSF e IL-4. Nenhum agente de amadurecimento de célula dendrítica é adicionado ao meio. As células dendríticas são
30 determinadas ter amadurecido sem a adição do agente de amadurecimento de célula dendrítica através da determinação da presença de marcadores de superfície celular característicos de células dendríticas maduras.

Resumidamente, DCs imaturas são preparadas contatando monócitos de sangue periférico com plástico na presença de meios OptiMEM® (Gibco-BRL) suplementado com 1% de plasma humano. Monócitos não-ligados podem ser removidos através de lavagem. Os monócitos ligados podem ser cultivados em meios X-VIVO 15® na presença de 500 Unidades de GM-CSF e 500 unidades de IL-4 por mililitro por cerca de 6 a 7 dias.

As DCs imaturas são coletadas através de enxágue e as células são lavadas com meios de cultura. Células são contadas e as DCs lavadas são combinadas com um lisato de célula de tumor de, por exemplo, um glioblastoma cirurgicamente removido do paciente para receber tratamento. As DCs e lisato nos meios de cultura com GM-CSF e IL-4, conforme acima, e são adicionados a um novo prato de cultura de tecido sem uso, limpo, novo, e cultivados por cerca de 12 a cerca de 20 horas. Em uma modalidade alternativa interferon-gama pode ser adicionado para induzir uma resposta aumentada para Th-1.

As DCs ativadas são coletadas, lavadas e preparadas para administração ao paciente. Uma amostra das DCs ativadas é usada para testar o fenótipo das células através de marcação com anticorpo específico para cada CD14, CD83, CD86 e HLA-DR. As células marcadas são analisadas através de citometria de fluxo para determinar seu fenótipo. As DCs ativadas mostram pouca ou nenhum CD14, são positivas para CD83 e expressam níveis altos de CD86 e HLA-DR como seria esperado para células dendríticas maduras.

A porção restante das DCs ativadas é administrada ao paciente em quantidades de a partir de 1×10^6 células a 1×10^{10} células por injeção. Indução de uma resposta imune específica de antígeno é avaliada medindo as respostas de célula T através de análise de tetrâmero de MHC e/ou respostas de anticorpo ao antígeno através de ELISA.

Exemplo 2: Determinação de Fenótipo de Superfície Celular de Células Precursoras de Célula Dendrítica Monocítica Ativada Sem um Agente de Amadurecimento

Neste exemplo monócitos foram purificados através de adesão a um recipiente de cultura de tecido plástico, coletados e lavados e ressus-

pensos em um novo recipiente de cultura de tecido por um período de cultura adicional. A expressão de superfície de célula do marcador de célula dendrítica madura CD83 foi determinada.

- Para gerar DC imatura, monócitos foram purificados através de adesão a plástico e cultivados por cerca de 7 dias em um meio de cultura de célula dendrítica com GM-CSF e IL-4, e 1% de soro AB humano. Após cerca de 7 dias, as células, que estavam quase todas flutuando livres no meio, foram coletadas e postas em placa novamente em frascos de cultura de tecido de poliestireno limpo, sem uso, com meio de cultura de célula dendrítica com GM-CSF e IL-4 e cerca de 1% de soro AB humano. Observação visual das células postas em placa novamente sob um microscópio invertido revelou que a maioria das células era firmemente aderente à superfície de cultura de tecido. Vinte e quatro horas após a serem postas em placa novamente, as células mostraram indução de marcador de DC CD83. A tabela que segue apresenta tingimento de CD83 nas várias amostras de monócitos isolados.

Amostra	% de CD83 ⁺
A	56,7
B	47,6
C	41
D	21
E	15,4
F	24,1
G	40,5
H	19,6
I	20,5
J	19,4
K	17,9
L	11,6
M	12,5
N	23,6
O	17,1
P	13,8

Exemplo 3: Uso Clínico de Células Dendríticas Ativadas Sem Agente de Amadurecimento

Neste exemplo a segurança e a eficácia de uma composição de célula dendrítica obtida a partir de um paciente multiforme de glioblastoma
5 ativada sem um agente de diferenciação de célula dendrítica e contatada com um lisato de tumor preparado a partir do paciente foram testadas.

O lisato de tumor foi preparado a partir de tecido de tumor que sofreu ressecção cirurgicamente. Tecido de tumor isolado foi moído e posto em um recipiente com uma solução tampão contendo collagenase para dis-
10 sociar o tecido. Esta mistura foi deixada da noite para o dia em temperatura ambiente. Seguindo filtragem da digestão de tecido de garantia, células de tumor liberadas foram centrifugadas em um pélete. O pélete de célula foi suspenso em um pequeno volume de RPMI 1640 e submetido a três ciclos de congelamento-descongelamento. Após congelamento-descongelamento,
15 o lisato de tumor foi purificado através de centrifugação e o sobrenadante contendo proteína foi filtrado através de um filtro de 0,22 micron para esterilização.

Uma população de célula enriquecida em precursores de célula dendrítica monocítica foi preparada através de purificação de um produto de
20 leucaférese em um gradiente FICOLL, seguido por aderência a plástico. As células aderentes eram precursoras de célula dendrítica monocítica cultivadas sob condições de cultura de célula dendrítica padrão por sete dias em RPMI 1640 suplementado com soro humano AB a 10% e 500 U/ml de cada um de hGM-CSF e hIL-4.

25 Após sete dias as células dendríticas imaturas diferenciadas foram coletadas, lavadas e ou congeladas para uso posterior ou misturadas com lisato de tumor de paciente e postas em placa novamente em um frasco de cultura de tecido fresco na presença de 1% a 10% de soro AB humano e 500 U/ml de cada um de hGM-CSF e IL-4. A concentração final de DC era
30 0,5 a 2 milhões células/ml (tipicamente 1×10^6 células/ml) e a concentração final de lisato de tumor era 10 a 1000 µl/ml (tipicamente 100 µg/ml).

No primeiro teste descrito pacientes receberam células dendríti-

- cas contatadas com lisato de tumor derivado de células de tumor cultivadas autólogas. O estudo era um estudo de escalada de dose onde três indivíduos receberam 1×10^6 DCs, três indivíduos receberam 5×10^6 DCs e seis indivíduos receberam 10×10^6 DCs. Respostas imunes foram avaliadas medindo
- 5 hipersensibilidade do tipo retardada (respostas DTH), respostas de célula T citotóxicas (CTL) e através da determinação da presença de linfócitos infiltrantes durante reoperação em casos de recorrência de doença. Cada um dos ensaios mede aspectos diferentes da resposta imune induzida. Uma resposta DTH é tipicamente evidência de atividade de célula T auxiliar (Th), enquanto
- 10 resposta de CTL mede se a resposta induzida levou a células T com a capacidade de matar células de tumor. Células T infiltrantes detectadas no tumor quando da reação medem se as células T ativadas têm a habilidade em migrar para o local do tumor para matar células de tumor *in situ*.

Tabela 2. Sumário de Respostas Imunes – primeiro teste de fase I

Nº do pacien- te	Dose de DC (nº de célu- las/injeção)	Aumento do Teste de Pele de DTH	Aumento da Atividade de CTL Periférica	Células T Intra- tumorais (na reoperação) ^a
1	1×10^6	Positivo	Positivo	++++
2	1×10^6	Negativo	Negativo	--
3	1×10^6	Positivo	Positivo	+++
4	5×10^6	Negativo	Positivo	++
5	5×10^6	Positivo	Positivo	n.a.
6	5×10^6	Negativo	Positivo	n.a.
7	10×10^6	Negativo	Negativo	--
8	10×10^6	Negativo	Negativo	++
9	10×10^6	Positivo	Positivo	+++
10	10×10^6	Negativo	Negativo	n.a.
11	10×10^6	Negativo	Negativo	n.a.
12	10×10^6	Negativo	Negativo	n.a.

- 15 ^aclassificadas através de avaliação semi-subjetiva de números de linfócitos infiltrantes.

n.a., não-aplicável porque nenhuma cirurgia foi realizada.

O segundo teste era também um estudo de escalada de dose, com quatro indivíduos recebendo 1×10^6 DC por injeção, seis indivíduos recebendo 5×10^6 DC por injeção e seis indivíduos recebendo 10×10^6 DC por injeção. Neste estudo, lisato de tumor era derivado de tumor que sofreu ressecção de cada paciente particular e o lisato foi contatado com DC derivada deste paciente. Respostas imunes foram avaliadas através de tingimento de tetrâmero para células T D8⁺ específicas de antígeno após vacinação e através da determinação da presença de células T intratumorais infiltrantes na reoperação, se aplicável. Tipicamente, reoperação foi apenas realizada após a recorrência de doença. Treze dos pacientes tinham glioblastoma multiforme (GBM) recém-diagnosticado, dois tinham GBM recorrente e um tinha um oligoastrocitoma de Grau III recorrente.

Avaliação da resposta imune através de tingimento de tetrâmero para células T antígeno-específicas permite a determinação da presença de, e para a quantificação dos níveis de, células T em circulação que expressam o receptor de célula T específico para um dado antígeno. Tais células T, se também expressando CD8, são presumidas ser representativas de populações de CTL contra esses antígenos. Os antígenos selecionados para este estudo eram antígenos de tumor conhecidos que tinham sido mostrados através de métodos histológicos estar presentes no tumor que sofreu ressecção originalmente. Reatividade foi testada para antígenos associados a tumor incluindo Gp100 (antígeno de tumor associado a melanoma, também encontrado em GBM), Trp-2 (proteína 2 relacionada à tiroinase), Her-2 (um receptor de tirosina cinase relacionado a receptor de fator de crescimento epidermal) e CMV (citomegalovírus) usando métodos padrão.

Tingimento de tetrâmero para células T CD8⁺ específicas de antígeno foi tentado em sete pacientes, e uma reatividade positiva foi detectada em cinco. Dos cinco pacientes reativos, dois tinham sido imunizados com 1×10^6 CD e três tinham sido imunizados com 10×10^6 DC. Esses resultados indicam que as DCs amadurecidas através dos métodos da presente invenção eram capazes de induzir uma resposta imune na maioria dos pacientes. Na maioria dos casos esta resposta incluía uma resposta de célula T

citotóxica específica de antígeno.

Os exemplos anteriores são providos para ilustrar, mas não limitar, o escopo das invenções reivindicadas. Outras variantes das invenções serão prontamente aparentes àqueles de habilidade comum na técnica e

5 compreendidas pelas reivindicações apensas. Todas as publicações, patentes, pedidos de patente e outras referências *citadas aqui e são também* incorporadas a título de referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de uma população de célula compreendendo uma população enriquecida de células dendríticas ativadas compreendendo: contato de uma população de célula compreendendo uma população enriquecida de células dendríticas imaturas com um substrato de cultura de tecido e um meio de cultura tendo uma agente de diferenciação de célula dendrítica sob condições adequadas para adesão das células dendríticas imaturas com o substrato de cultura de tecido e para cultura *in vitro* das células dendríticas por um período de tempo suficiente para amadurecimento das células dendríticas ativadas.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que um antígeno predeterminado é contatado com a população de célula antes do, simultâneo ao ou subsequente a contato com o substrato de cultura de tecido.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, em que o antígeno predeterminado é um antígeno específico de tumor, um antígeno associado a tumor, um antígeno viral, um antígeno bacteriano, células de tumor, células bacterianas, células recombinantes expressando um antígeno, um lisato de célula, uma preparação de membrana, um antígeno recombinantemente produzido, um peptídeo ou um antígeno isolado.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o lisato de célula ou preparação de membrana é obtido de um tumor cerebral, um tumor de próstata, um tecido de próstata, um tumor ovariano, um tumor de mama, um tecido de mama, uma população de célula leucêmica, um tumor de pulmão, um melanoma, um tumor de bexiga ou uma linhagem de célula de tumor.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, em que o tumor cerebral é glioblastoma multiforme ou um oligoastrocitoma.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o agente de diferenciação de célula dendrítica é GM-CSF, IL-4, IL-13, IL-15 ou uma combinação dos mesmos.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que as células dendríticas imaturas são derivadas de uma população

de célula enriquecida em precursores de célula dendrítica monocítica.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, em que a população de célula enriquecida em precursores de célula dendrítica monocítica é contatada com um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica.

5 9. Método de acordo com a reivindicação 8, em que o agente de indução de diferenciação de célula dendrítica é GM-CSF, IL-4, IL-13 ou IL-15 e suas combinações.

10 10. Método de acordo com as reivindicações 7 a 9, em que os precursores de célula dendrítica monocítica são de um paciente ou de um indivíduo comparável em HLA.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 9, em que as células de tumor e as células dendríticas são de um paciente.

15 12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que as células dendríticas imaturas são contatadas mais com um agente de amadurecimento direcional.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, em que o agente de amadurecimento direcional é interferon-gama.

20 14. Método para ativação de células dendríticas imaturas compreendendo contato das células dendríticas imaturas com um substrato de cultura de tecido e um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições adequadas para cultura *in vitro* de células dendríticas imaturas e para adesão das células dendríticas imaturas ao substrato de cultura de tecido.

25 15. Método de acordo com a reivindicação 14, compreendendo ainda contato das células dendríticas imaturas com um antígeno predeterminado antes do, simultâneo ao ou subsequente a contato das células dendríticas imaturas com o substrato de cultura de tecido.

30 16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que o antígeno predeterminado é um antígeno específico de tumor, um antígeno associado a tumor, um antígeno viral, um antígeno bacteriano, células de tumor, células bacterianas, células recombinantes expressando um antígeno, um lisato de célula, uma preparação de membrana, um antígeno recombinante-

mente produzido, um peptídeo ou um antígeno isolado.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o lisato de célula ou preparação de membrana é derivado de tecido de tumor ou linhagem de célula de tumor.

5 18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que o tecido de tumor ou linhagem de célula de tumor é obtido de um tumor cerebral, um tumor de próstata, um tumor ovariano, um tumor de mama, um tumor de pulmão, um melanoma, um tumor de bexiga ou uma população de célula leucêmica.

10 19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o tumor cerebral é glioblastoma multiforme ou um oligoastrocitoma.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 19, em que o agente de indução de diferenciação de célula dendrítica é GM-CSF, IL-4, IL-13, IL-15 ou suas combinações.

15 21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 14 a 20, em que as células dendríticas imaturas são contatadas mais com um agente de amadurecimento direcional.

22. Método de acordo com a reivindicação 21, em que o agente de amadurecimento direcional é interferon-gama.

20 23. Método de ativação de células T compreendendo:
contato das células T com uma população de célula dendrítica amadurecida através de contato com um substrato de cultura de tecido e um agente de indução de diferenciação de célula dendrítica sob condições condutoras para adesão de células dendríticas imaturas ao substrato de cultura
25 de tecido; e

um antígeno predeterminado.

24. Método para produção de células T específicas de antígeno ativadas compreendendo:

30 contato de células dendríticas imaturas isoladas com um antígeno predeterminado;

contato das células dendríticas imaturas isoladas com um substrato de cultura de tecido e um agente de indução de diferenciação de célula

dendrítica sob condições condutoras para adesão das células dendríticas imaturas ao substrato de cultura de tecido para ativar as células dendríticas imaturas; e

contato das células dendríticas ativadas com células T puras
5 para formar células T específicas de antígeno ativadas.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, em que o antígeno predeterminado é um antígeno específico de tumor, um antígeno associado a tumor, um antígeno viral, um antígeno bacteriano, células de tumor, células bacterianas, células recombinantes expressando um antígeno, um
10 lisato de célula, uma preparação de membrana, um antígeno recombinantemente produzido, um antígeno de peptídeo ou um antígeno isolado.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, em que o lisato de célula ou preparação de membrana é obtido de um tumor cerebral, um tumor de próstata, um tecido de próstata, um tumor ovariano, uma população de célula leucêmica, um tumor de pulmão, um tumor de mama ou um
15 tumor de bexiga.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, em que o tumor cerebral é glioblastoma multiforme ou um oligoastrocitoma.

28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 24
20 a 27 compreendendo ainda uma primeira etapa:

cultura dos precursores de célula dendrítica monocítica na presença de um agente de indução de diferenciação para formar as células dendríticas imaturas.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, em que o agente de indução de diferenciação é GM-CSF, Interleucina 4, uma combinação de GM-CSF e Interleucina 4 ou Interleucina 13.
25

30. Método de acordo com as reivindicações 28 e 29, em que os precursores de célula dendrítica monocítica são isolados de um indivíduo humano.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, em que as células
30 dendrítica imaturas e células T são autólogas umas às outras.

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA INDUÇÃO DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MONOCÍTICAS IMATURAS"**.

A presente invenção refere-se a métodos para indução do amadurecimento de células dendríticas imaturas (DC) e para ativação dessas células sem o uso de um agente de amadurecimento de célula dendrítica. A DC ativada pode ser usada para indução de uma resposta de célula T específica de antígeno. Os métodos da invenção podem também compreender a adição de um agente de amadurecimento direcional, tal como interferon-gama, para induzir uma influência a Th-1 e/ou Th-2 na resposta obtida. A presente invenção provê também populações de célula dendrítica úteis para ativação e para indução de células T específicas de antígeno. Similarmente, populações de célula T específicas de antígeno ativadas e métodos para sua produção são providos.