



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 354 156**

(51) Int. Cl.:
C12N 5/0783 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **04703642 .1**
(96) Fecha de presentación : **20.01.2004**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1594958**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

(54) Título: **Activación y expansión de células T.**

(30) Prioridad: **22.01.2003 US 350305**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.03.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.03.2011

(73) Titular/es: **LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION**
5791 Van Allen Way
Carlsbad, California 92008, US

(72) Inventor/es: **Berenson, Ronald, J.;**
Bonyhadi, Mark;
Hardwick, Alan;
Chana, Harjinder, Singh;
Saund, Narinder;
McMillen, David;
Law, Che;
Craig, Stewart y
Kalamasz, Dale

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a métodos
 5 para expandir selectivamente células T CD8⁺ de memoria hasta densidades muy elevadas y a expandir células hasta números muy elevados y a suprimir selectivamente células CD8⁺ de memoria. La presente invención se refiere también a composiciones de células, que incluyen las células T activadas
 10 y expandidas a concentraciones elevadas y expandidas hasta números elevados.

Descripción de la técnica relacionada

El receptor de antígenos de células T (TCR) es un receptor de reconocimiento inmune de múltiples subunidades
 15 que se asocia con el complejo CD3 y se una a péptidos presentados por las proteínas de clase I y II del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) en la superficie de las células que presentan antígenos (APC). La unión de TCR al péptido antígeno en las APC es el acontecimiento central en
 20 la activación de células T, que se produce en una sinapsa inmunológica en el punto de contacto entre la célula T y la APC.

Para mantener la activación de células T, los linfocitos T requieren normalmente una segunda señal co-estimuladora. La co-estimulación es necesaria normalmente
 25 para que una célula helper T produzca suficientes niveles de citoquinas para inducir la expansión clonal. Bretscher, Immunol. Today 13:74, 1992; June et al., Immunol. Today 15:321, 1994. La señal co-estimuladora principal se produce
 30 cuando un miembro de los ligandos de la familia B7 (CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2)) en una célula activada que presenta antígenos (APC) se une a CD28 en una célula T.

Los métodos para estimular la expansión de ciertos subconjuntos de células T tienen la capacidad potencial de
 35 generar una diversidad de composiciones de células T útiles

en inmunoterapia. Una inmunoterapia satisfactoria puede estar ayudada mediante el aumento de la reactividad y cantidad de células T mediante una estimulación eficaz.

Las diversas técnicas disponibles para expandir células T humanas se han basado principalmente en el uso de células accesorias y/o factores de crecimiento exógenos, como interleucina-2 (IL-2). La IL-2 ha sido usada conjuntamente con un anticuerpo anti-CD3 para estimular la proliferación de células T, expandiendo predominantemente la subpoblación CD8⁺ de célula T. Ambas señales de APC se cree que son necesarias para una activación, expansión y supervivencia a largo plazo óptimas de células T de las células T tras la re-infusión. El requisito de APC coincidentes con MCH como células accesorias presenta un problema significativo para sistemas de cultivo a largo plazo porque las APC tienen una vida relativamente corta. Por lo tanto, en un sistema de cultivo a largo plazo, las APC deben ser continuamente obtenidas a partir de una fuente y repuestas. La necesidad de un suministro renovable de células accesorias es problemática para el tratamiento de inmunodeficiencias en las que estén afectadas células accesorias. Además, cuando se trata una infección viral, si las células accesorias portan el virus, las células pueden contaminar la población completa de células T durante un cultivo a largo plazo.

En ausencia de factores de crecimientos exógenos o células accesorias, una señal co-estimuladora puede ser suministrada a una población de células T, por ejemplo, exponiendo las células T a un ligando CD3 y un ligando CD28 unidos a una superficie de fase sólida, como un gránulo. Véase C. June et al. (patente de EE.UU N° 5,858,358); C. June et al. documento WO 99/953823. Aunque estos métodos son capaces de conseguir poblaciones de células T terapéuticamente útiles, la consistencia aumentada y la facilidad de preparación de células T continúa siendo menor que lo ide-

al.

Además, los métodos actualmente disponibles en la técnica no se han enfocado sobre la expansión a corto plazo de células T o la obtención de una población más consistente de células T y de sus resultados ventajosos. Además de ello, La aplicabilidad de las células T expandidas ha estado limitada solamente a unos pocos estados de enfermedad. Para una máxima eficacia *in vivo*, teóricamente, una población de células T activadas y generadas *ex vivo* o *in vivo* deben estar en un estado que pueda compaginar de forma máxima una respuesta inmune a un cáncer, enfermedad infecciosa u otros estados de enfermedad.

La presente invención es un método *in vitro* para expandir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria, que comprende:

poner en contacto una población de células T en la que al menos una parte de las mismas comprende células T CD8⁺ con un gránulo, en que dicho gránulo tiene unido al mismo un primer agente que liga el receptor de antígeno de células T (TCR)/complejo CDR de células T, y el mismo gránulo tiene unido al mismo un segundo agente que liga la molécula accesoria CD28 de células T, en que el primer agente es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el segundo agente es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y expandir así selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria,

caracterizado porque dicha relación de gránulo:célula es de 1:1 a 1:10.

En una realización, la relación de gránulos:células es de 1:5 a 1:10.

En una realización adicional, la relación de anticuerpo anti-CD3:anticuerpo anti-CD8 es de 1:1 a 1:100.

La presente invención proporciona también una composición que comprende una población de células de CD8⁺ de memoria activadas producida según el método *in vitro* para ex-

pandir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria definidas en la presente memoria descriptiva.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una población de células T CD8⁺ de memoria según el método *in vitro* para expandir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria definidas en la presente memoria descriptiva, junto con un vehículo, diluyente o tampón farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona también el uso de una población de células T CD8⁺ de memoria producida según el método *in vitro* para expandir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria definidas en la presente memoria descriptiva, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

La presente invención se refiere también al uso de una población de células T CD8⁺ de memoria producida según el método *in vitro* para expandir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria definida en la presente memoria descriptiva en el tratamiento del cáncer.

El cáncer puede ser un melanoma, un linfoma que no es de Hodgkin, linfoma de células T cutáneas, enfermedad de Hodgkin, leucemia, plasmacitoma, sarcoma, glioma, timoma, cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer colo-rectal, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer uterino, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, cáncer gástrico, cáncer esofágico, mieloma múltiple, hepatoma, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielogenosa aguda (AML), leucemia mielogenosa crónica (CML), o leucemia linfocítica crónica (CLL). En una realización, el cáncer es un mieloma múltiple o CLL.

La presente invención se refiere adicionalmente a un método *in vitro* para suprimir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria, que comprende:

poner en contacto una población de células con un gránulo, en que al menos una parte de dichas células comprende células T CD8⁺ en que dicho gránulo tiene unido al mismo un primer agente que se liga al receptor de antígeno de células T (TCR)/complejo CD3 de células T y el mismo gránulo tiene unido al mismo un segundo agente que se liga a moléculas accesorias CD28 de células T, en que el primer agente es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el segundo agente es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, suprimiendo así selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria,

caracterizado porque dicha relación de gránulo:célula es de 3:1 a 10:1.

En una realización del método *in vitro* para suprimir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria, la relación de gránulo:célula es de 5:1 a 10:1.

En una realización adicional del método *in vitro* para suprimir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria, la relación de anticuerpo anti-CD3: anticuerpo anti-CD28 es de 1:1 a 1:100.

La presente invención proporciona también una composición que comprende una población de células T CD8⁺ activadas, con agotamiento de células de memoria, producida según el método *in vitro* para suprimir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria definida en la presente memoria descriptiva.

La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende una población de células T CD8⁺, con agotamiento de células de memoria, producida según el método *in vitro* para suprimir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria definida en la presente memoria descriptiva, junto con un diluyente, tampón o medio farmacéuticamente aceptable.

Estos y otros aspectos de la presente invención resul-

tarán evidentes haciendo referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos anejos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LOS DIBUJOS

5 La Figura 1 es un gráfico que compara los números totales de células T archivadas y expandidas medidas en el día 8 partiendo de aproximadamente $0,5 \times 10^9$ células T con (XCELLERATE II®) o sin (XCELLERATE I®) concentración magnética y estimulación.

10 La Figura 2 es un gráfico que compara la expansión en veces de células T activadas y expandidas medidas en el día 8 con (XCELLERATE II®) o sin (XCELLERATE I®) concentración y estimulación magnética.

La Figura 3 es un gráfico que representa un análisis de citometría de flujo de expresión de CD154 que compara la re-estimulación de células T previamente cultivadas durante 8 días después de una concentración y estimulación magnética (XCELLERATE II®) o sin concentración y estimulación magnética (XCELLERATE I®).

20 La Figura 4 es un gráfico que representa un análisis de citometría de flujo de la expresión de CD154 después de 3 días en cultivo que compara la concentración y estimulación magnética (XCELLERATE II®) con células activadas sin concentración y estimulación magnética (XCELLERATE I®).

25 Las Figuras 5A-5B son gráficos que exponen la activación y expansión de células T con XCELLERATE I® PBMC (5A) o PBMC que han sido congeladas y descongeladas (5B) para iniciar el procedimiento XCELLERATE I®.

Las Figuras 6A-6B son gráficos que exponen el análisis en el transcurso del tiempo de la expresión de CD25 después de una activación de células T en una muestra de donante (PC071) durante el procedimiento XCELLERATE I® o II®. La re-estimulación se realizó en la marca del día 8 para estimular la activación *in vivo*. La Figura 6A expone la expresión de CD5 sobre células CD4⁺ mientras que la Figura 6B

expone la expresión de CD25 sobre células CD8⁺.

Las Figuras 7A-7B son gráficos que exponen el análisis en el transcurso del tiempo de la expresión de CD154 después de la activación de células T en una muestra de donante (PC071) durante el procedimiento XCELLERATE I® o II®. La re-estimulación se realizó en la marca del día 8 para estimular la activación *in vivo*. La Figura 7A expone la expresión de CD154 sobre células CD4⁺ mientras que la Figura 7B expone la expresión de CD154 sobre células CD8⁺.

Las Figuras 8A-8B son gráficos que ilustran el crecimiento de células T de sangre periférica humana después de una estimulación con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD8 utilizando el procedimiento expuesto en el Ejemplo IX.

La Figura 9 es un gráfico que ilustra el crecimiento de células T de sangre periférica humana después de una estimulación con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28 + /IL-2-recombinante humana a 10 µ/ml y +/-supresión de monocitos. Todas las células fueron cultivadas en matraces Baxter Lifecell (300 ml). La extrapolación se refiere a un cultivo en matraz de 300 l (sin IL-2/ con agotamiento de monocitos) que fue expandido hasta un matraz de 3 litros Baxter Lifecell.

La Figura 10 es un gráfico que demuestra el análisis cinético del tamaño celular determinado mediante perfiles de citometría de flujo de dispersión frontal a lo largo del tiempo.

Las Figuras 11A y 11B son gráficos que representan la expresión de CD25 en el tiempo después de una estimulación inicial con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28. La Figura 11A representa el perfil de expresión de CD25 sobre células CD4⁺, mientras que la Figura 11B representa el perfil de expresión de CD25 sobre células CD8⁺.

La Figura 12 es un gráfico que ilustra los cambios de tamaño celular determinados mediante perfiles de citometría

de flujo de dispersión frontal a lo largo del tiempo después de una estimulación primaria y secundaria.

Las Figuras 13A y 13B son gráficos que representan la expresión de CD25 en el tiempo después de una estimulación primaria y secundaria. La Figura 13A representa el perfil de expresión de CD25 sobre células CD4⁺, mientras que la Figura 13B representa el perfil de expresión de CD25 sobre células CD8⁺.

Las Figuras 14A y 14B son gráficos de datos de citometría de flujo que representan la expresión de CD154 después de una estimulación secundaria, en el que se variaron las fuentes de estimulación primaria y secundaria. La Figura 14A representa el perfil de expresión de CD154 sobre células CD4⁺, mientras que la Figura 14B representa el perfil de expresión de CD154 sobre células CD8⁺.

La Figura 15 es un gráfico de datos de citometría de flujo que representa la expresión de CD137 sobre todas las células T expandidas en la muestra después de la estimulación secundaria.

Las Figuras 16A y 16B son gráficos de datos de citometría de flujo que representan la expresión de CD54 después de la estimulación secundaria, en que se hicieron variar las fuentes de estimulación secundaria. La Figura 16A representa el perfil de expresión de CD54 sobre células CD4⁺, mientras que la Figura 16B representa la expresión de CD54 sobre células CD8⁺.

Las Figuras 17A y 17B son gráficos de datos de citometría de flujo que representan fenotipos celulares así como la expresión de CD154 y CD137 después de la estimulación secundaria mediante gránulos acoplados anti-CD3 y anti-28 de células T obtenidas de un paciente con leucemia linfocítica crónica de células B. Las Figuras 17A y 17B representan células CD4⁺ y CD8⁺ presentes en muestras 13 días después de la estimulación con gránulos acoplados anti-CD3 y anti-CD8 (17A) y 18 días después de una estimulación prima-

ria y 7 días después de una estimulación secundaria con gránulos acoplados anti-CD3 y anti-CD28 (17 B). Las Figuras 17 C y 17D son gráficos de datos de citometría de flujo que representan la expresión de C154 y CD137 después de una es-
 5 timulación secundaria de células obtenidas de un paciente con leucemia linfocítica crónica de células B.

Las Figuras 18A-18C son gráficos de datos que representan la expresión a lo largo del tiempo de IL-2 (18gránulos:célula), interferón gamma (IFN- γ) (18B), e IL-4
 10 (18C) después de una estimulación primaria y secundaria de células T de donantes normales.

Las Figuras 19A-19B son gráficos que representan la expresión a lo largo del tiempo de CD62L después de una estimulación con gránulos acoplados anti-CD3 y anti-CD28.

15 La Figura 20 es un gráfico que expone el porcentaje de células CD4 o C8 después de una estimulación con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28.

Las Figuras 21A-21B son gráficos que representan datos de citometría de flujo como una función de la intensidad
 20 media de fluorescencia de la expresión de CD25 y CD154, respectivamente, después de una estimulación con gránulos co-inmovilizado anti-CD3 y anti-CD8 y +/-re-estimulación utilizando el procedimiento del ejemplo IZ.

Las Figuras 22A-228C son gráficos que representan análisis de citometría de flujo de una tinción de CD154 frente
 25 a una tinción testigo (por ejemplo, del fon n células subpoblaciones tanto cD4 como CD8 (22a) o poblaciones enriquecidas en CD4 (22B9 antes de una estimulación de gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28.

30 Las Figuras 23A - 23B son gráficos que representan un análisis ELISA de TNF- α (23A) y de IFN- γ (23B) en medios después de una estimulación de linfocitos de sangre periférica con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28.

Las Figuras 24A-24B son gráficos que representan análisis

lisis ELISA de IL-4 (24A) y de IL-2 (24B) en medios después de una estimulación de linfocitos de sangre periférica con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28.

La Figura 25 es un gráfico que expone el aumento de tamaño de células T después de una estimulación de linfocitos de sangre periférica con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28 y usando un análisis de dispersión frontal.

Las Figuras 26A-26L son gráficos de barras que representan datos de citometría de flujo de la expresión CD62L (intensidad de fluorescencia media (MFI) (26A), CD49d (MFI) (26B), CD25 (MFI) (26C), CD69 (MFI) (26D), CD154 (MFI) (26E), dispersión de luz frontal (tamaño) (26F), viabilidad (% acceso vivo) (26G); todo después de una estimulación con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28 y nueva estimulación con lo mismo en el día 8. Las Figuras 26H-26L exponen CD62L, CD69, CD49d, CD154 y CD25 a las 4 y 18 horas posteriores a la estimulación, respectivamente.

La Figura 27 es un gráfico que expone el aumento en veces de células T a lo largo del tiempo después de una estimulación con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28 con relaciones variables CD3: CD28.

La Figura 28 es un gráfico que compara la expresión de células T en un sistema estático a la expansión de células T en el dispositivo Wave Bio-reactor.

La Figura 29 es un gráfico que comprara el aumento en veces de células T policlonales respecto al aumento en veces de células T CMV pp65 A2-tetramer+ (específicas para antígeno) usando relaciones variables de gránulos:células. Las barras continuas representan células T policlonales. Las barras de rayas representan células T específicas para CMW.

La Figura 30, paneles a, b y c, es un gráfico que muestra la comparación de marcadores de activación de células T en procedimiento durante el procedimiento estático de

XCELLERATE® II y el procedimiento basado en un dispositivo Wave Bio-reactor XCELLERATE® III.

La Figura 31, paneles a, b y c, es un gráfico que muestra la comparación de concentraciones de citoquinas solubles en procedimiento durante el procedimiento estático XCELLERATE® II y el procedimiento XCELLERATE® III basado en un dispositivo Wave Bio-reactor.

La Figura 32, paneles a, b, y c, es un gráfico que muestra la comparación de la activación de células T en procedimiento durante la elaboración de células T XCELLERATE® para una infusión en múltiples pacientes con mielomas usando el procedimiento estático XCELLERATE® II y el procedimiento XCELLERATE® III basado en dispositivo Wave Bio-reactor.

La Figura 33, paneles a, b, y c, es un gráfico que muestra la comparación de concentraciones de citoquinas solubles en procedimiento durante la elaboración de células T Xcelleradas® usando el procedimiento estático XCELLERATE® II y el procedimiento XCELLERATE® III para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple.

La Figura 34, paneles a, b, y c, es un gráfico de barras que muestra la comparación de la actividad biológica de células T Xcelleradas elaboradas usando el procedimiento estático XCELLERATE® II (n=3) y el procedimiento XCELLERATE® III basado en dispositivo Wave Bio-reactor (n=5) después de una nueva estimulación *in vitro*.

La Figura 35, es un gráfico que muestra la recuperación de linfocitos en pacientes con mieloma múltiple después de una quimioterapia de dosis elevada, un trasplante de célula madre autólogas con (procedimiento XCELLERATE® II o procedimiento XCELLERATE® III) o sin (testigo) una infusión única de células T Xcelleradas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Antes de continuar con la explicación de la invención, puede ser útil para su comprensión una exposición de las

definiciones de ciertos términos que se usarán con posteridad.

El término "biocompatible", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a la propiedad de ser predominantemente no tóxico para las células vivas.

El término "estimulación", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una respuesta primaria inducida mediante la ligadura de un resto de superficie celular. Por ejemplo, en el contexto de los receptores, esta estimulación supone la ligadura de un receptor y un acontecimiento posterior de transducción de señales. Con respecto a la estimulación de una célula T, esta estimulación se refiere a la ligadura de un resto de superficie de células T que, en una realización, induce posteriormente un acontecimiento de transducción de señales, como la unión al complejo TCR/CD3. Adicionalmente, el acontecimiento de estimulación puede activar una célula y sobre-regular o infra-regular la expresión o secreción de una molécula, como la infra-regulación de TGF- β . Por tanto, la ligadura de restos de superficies celulares, incluso en ausencia de un acontecimiento de transducción de señales directas, puede dar lugar a la reorganización de estructura citoesqueléticas o a la coalescencia de restos e superficies celulares, cada uno de los cuales podría servir para mejorar, modificar o alterar posteriores respuestas celulares.

El término "activación", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere al estado de una célula después de una ligadura suficiente de restos de superficies celulares para inducir un cambio bioquímico o morfológico apreciable. Dentro del contexto de las células T, esta activación se refiere al estado de una célula T que ha sido suficientemente estimulada para inducir la proliferación celular. La activación de una célula T puede inducir también la producción de citoquinas y la realización de fun-

ciones efectoras reguladoras o citolíticas. Dentro del contexto de otras células, este término supone la sobre- o infra-regulación de un procedimiento físico-químico particular.

5 El término "fuerza", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una fuerza artificial o externa aplicada a las células para que sean estimuladas para inducir una concentración celular y concentración de células en el agente que se une a un resto de superficie celular. Por ejemplo, el término "fuerza" incluye cualquier fuerza mayor que la gravedad (es decir, además de la gravedad y no solamente la fuerza de gravitación) que induzca la concentración de células y/o la agregación de restos de superficies celulares. Estas fuerzas incluyen la presión de transmembrana como filtración, una fuerza hidráulica, una fuerza eléctrica, una fuerza acústica, una fuerza centrífuga o una fuerza magnética. De forma ideal, la fuerza utilizada conduce la concentración de la célula diana de interés con un agente que se liga a un resto de superficie celular. 15 En diversos contextos, la fuerza puede ser por impulsos, es decir aplicada y nuevamente aplicada (por ejemplo, una fuerza magnética podría ser activada y desactivada, impulsando la población de células en combinación con una partícula paramagnética).

25 El término "simultáneo", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere al hecho de que inherentemente, tras la concentración de células en una superficie que tiene agentes de unión de restos de superficies celulares unidos a la misma, da lugar a una concentración de células unas con otras y con la superficie, por lo tanto, ligandos (es decir, agentes). Sin embargo, el uso del término "simultáneo" no excluye la unión previa de las células dianas con una superficie que tenga agentes de unión de restos de superficies celulares unidos a la misma, 30 ya que la concentración y la unión a ligandos adicional se

produce simultáneamente en la superficie de concentración. Por ejemplo, en el contexto de la activación de células T, las células T pueden ser expuestas a una superficie como un gránulo paramagnético que tenga anticuerpo anti-CD3 y anti-
 5 CD28 unidos al mismo y posteriormente concentradas mediante un campo magnético. Por tanto, en este contexto, aunque las células y gránulos tienen un contacto y ligadura previos, no obstante, durante la concentración se produce una ligadura adicional de células.

10 La expresión "célula diana", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a cualquier célula que esté destinada a ser estimulada mediante una ligadura de restos de superficies celulares.

Un "anticuerpo" como se usa en la presente memoria
 15 descriptiva, incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales; primatizados (por ejemplo, humanizados); de muridos; ratón-humano; ratón-primate y quiméricos y puede ser una molécula intacta, un fragmento de la misma (como fragmentos scFv, Fv, Fd, Fab, Fab' y F(ab)'₂) o multimeros
 20 o agregados de moléculas y/o fragmentos intactos; o se puede producir en la naturaleza o ser producido, por ejemplo, mediante inmunización, síntesis o ingeniería genética; un "fragmento de anticuerpo", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a fragmentos derivados o rela-
 25 cionados con un anticuerpo, que se une a un antígeno y que en algunas realizaciones puede ser derivado para exhibir características estructurales que faciliten su desaparición y absorción, por ejemplo, mediante la incorporación de residuos de galactosa. Esto incluye, por ejemplo, F(ab),
 30 F(ab)'₂, scFv, región variable de cadena ligera (V_L), región variable de cadena pesada (V_H) y sus combinaciones.

El término "proteína", como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos; y puede ser una molécula inerte, un fragmento de la
 35 misma o multimeros o agregados de moléculas y/o fragmentos

intactos; y se puede producir en la naturaleza o ser producido, por ejemplo, mediante síntesis (incluida la química y/o enzimática) o ingeniería genética.

El término "agente" "ligando" o "agente que se une a un resto de superficie celular", como se usan en la presente memoria descriptiva, se refieren a una molécula que se une a una población definida de células. El agente se puede unir a cualquier resto de superficie celular como un receptor, un determinante antigénico u otro sitio de unión presente en la población de células diana. El agente puede ser proteína, péptido, anticuerpo o sus fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión, molécula sintética, una molécula orgánica (por ejemplo, una molécula pequeña) o similar. Dentro de la memoria descriptiva y en el contexto de la estimulación de células T, los anticuerpos son usados como un ejemplo prototípico de este agente.

Las expresiones "agente que se une a una superficie celular" y "resto de superficie celular" como se usan en la presente memoria descriptiva, se usan en el contexto de un par ligando/anti-ligando. Consecuentemente, estas moléculas deben ser consideradas como un conjunto complementario/anti-complementario de moléculas que demuestran una unión específica, generalmente de afinidad relativamente elevada (una constante de afinidad, K_a , de aproximadamente 10^6 M^{-1}).

Una "señal co-estimuladora", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una señal que, en combinación con una señal primaria como una ligadura TCR/CD3, conduce a la proliferación de células T.

Un "par ligando/antiligando", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a un conjunto complementario/anti-complementario de moléculas que demuestra unión específica, generalmente de afinidad relativamente elevada (una constante de afinidad, K_a , de aproximadamente 10^6 M^{-1}). Ejemplos de pares de ligando/anti-ligando son enzi-

ma/inhibidor, hapteno/anticuerpo, lecitina/carbohidrato, ligando/receptor y biotina/avidina o estreptavidina. En el contexto de la presente invención, la especificación de receptores y otros restos de superficie celular son antiliga-
5 gandos, mientras que los agentes (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos) reactivos con los mismos se consideran ligandos.

"Separación", como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye cualquier medio para purificar sustancialmente un componente de otro (por ejemplo, mediante filtración o atracción magnética).

"Estático", como se usan en la presente memoria descriptiva, se refiere a un estado celular en el que la célula no prolifera de forma activa.

15 Una "superficie", como se usan en la presente memoria descriptiva, se refiere a un gránulo capaz de tener un agente unido al mismo y comprende, sin limitación, metales, vidrio, plásticos, copolímeros, coloides, lípidos, superficies celulares y similares. Esencialmente, cualquier superficie que sea capaz de retener un agente unido y conectado
20 a la misma.

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente de que la combinación de una fuerza que induce la concentración de células/ligadura de restos de superficies celulares y el cultivo de células en un sistema cerrado y basculante, da lugar a una mejora profunda en la activación y expansión de estas células. Aunque no se desean vinculaciones teóricas, la presente invención puede funcionar aprovechando un fenómeno que incluye un sobreescurrimiento de lípidos y/polarización de receptores. Los fenóme-
25 nos son similares en cuanto que sugieren un inicio/mejora de la transducción de señales mediante la agregación de sobreescurrimientos de lípidos que comprenden restos de superficies celulares o la transducción de señales mejorada
30 debido a la localización (es decir polarización) de recep-
35

tores en una o incluso varias zona(s) de una célula. Por tanto, esta ligadura de restos de superficies celulares no solamente conduce a una activación celular inesperadamente estable y a una proliferación de células T, sino que puede
5 ser aplicada también para aumentar el acontecimiento de transducción de señales de muchos tipos de células. Adicionalmente, aunque no se desean vinculaciones teóricas, la presente invención puede funcionar proporcionando una aireación óptima para las células en expansión. Por tanto, la
10 ligadura de restos de superficies celulares combinada con una aireación a través de medios basculantes y perfusión conduce a una activación celular inesperadamente estable y a la expansión de células T hasta densidades y números absolutos inesperadamente elevados. Consecuentemente, en el
15 contexto de las células T, la presente invención proporciona una diversidad de ventajas inesperadas, en primer lugar elimina la necesidad de una etapa separada de agotamiento de monocitos usando partículas "sin revestir" simplifica la expansión de células T requiriendo menos transferencias celulares y menos reactivos, aumentó el nivel de activación
20 de células T durante el procedimiento de activación, reduce significativamente el tiempo para conseguir números de células adecuados para una terapia celular, reduce el tiempo y el trabajo involucrado en el tratamiento de las células, reduce el coste de fabricación y aumenta la flexibilidad
25 del programa de tratamiento e infusiones del paciente.

En un aspecto adicional de la presente invención, una primera y una segunda o más superficies son utilizadas con o sin ligandos/agentes unidos a la misma. En esta realización, las diversas superficies pueden tener los mismos o
30 diferentes agentes unidos a la misma para la unión de restos de superficies celulares de células dianas. Por ejemplo, un gránulo ilustrativo puede tener unido al mismo un anticuerpo para un receptor en una célula diana y estos
35 gránulos pueden ser mezclados con una población de células

que contenga la célula diana. Adicionalmente, la población celular puede ser mezclada con un segundo gránulo o más con los mismos o diferentes agentes de unión a restos de superficies celulares unidos a la misma. Tras la concentración inducida de la fuerza, los gránulos y células se llevan conjuntamente en un volumen más pequeño y, por tanto, se aumenta la señalización. En otro ejemplo, los gránulos ilustrativos que tienen un agente específico para un carbohidrato u otro resto de superficie celular no receptor unido a la misma se mezclan con una población de células que contienen la células diana. Se usa seguidamente un campo magnético para atraer las células unidas a gránulos a otra superficie que tiene agentes de ligadura de receptores unidos a la misma. Por tanto, el agente inductor de transducción de señales está en la segunda superficie. Todavía, en otro ejemplo, un agente que se une a un resto de superficie celular de una célula diana puede estar unido a una partícula suficientemente grande para ser retenida en una malla o filtro que tenga en sí mismo ligandos unidos al mismo.

Como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona métodos para expandir una población celular mediante restos de unión en las superficies de las células en esa población. El contacto de una población celular con un agente (por ejemplo, un ligando) que se une al resto de superficie celular puede estimular la expansión de la población celular. El ligando puede estar en solución pero puede estar también unido a una superficie. La ligadura de restos de superficies celulares, como un receptor, puede inducir generalmente una trayectoria de señalización particular. Unos estudios recientes surgieron que para que se produzca una señalización, se deben agregar concentraciones críticas de sobreescurrecimientos de lípidos que contienen los receptores necesarios. A modo de ejemplo, la agregación de sobreescurrecimientos puede ser facilitada *in vivo* o *in vitro*

uniendo ligandos para restos de superficies celulares particulares a partículas paramagnéticas, exponiendo las partículas que portan ligandos a las células y poco después o simultáneamente aplicar una fuerza, como un campo magnético, para ayudar a polarizar lo restos ligados (por ejemplo, receptores) y concentrar las células en un volumen pequeño. La aplicación de una fuerza magnética concentra las células además de concentrar las células con la superficie que tiene agentes unidos a la misma que liga los restos de superficies celulares, produciendo así un mayor contacto de las células con los ligandos, dando lugar a una activación acelerada y más potente. Son posibles muchas aplicaciones de la presente invención, por ejemplo, si las células tienen números bajos y/o receptores disfuncionales, el método puede concentrar suficientemente estos receptores en el sobreescurecimiento de lípidos para superar estos defectos y para permitir una apropiada actividad señalizadora. Un ejemplo de esta corrección del repertorio de superficies celulares es en pacientes con ciertos tipos de leucemia, en los que antes de la estimulación de restos de superficies celulares con agentes como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, diversos marcadores de superficies marcadores de superficies celulares normales son inusualmente bajos como el complejo CD3/TCR. Estimulando la expansión de estas poblaciones celulares con agentes como anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, los marcadores celulares de estas células vuelven a un nivel que parece normal y, como tales, pueden proporcionar un producto de inmunoterapia más estable para la terapia del cáncer, que proporciona una respuesta inmune más fuerte y más rápida cuando se hace retornar al paciente. Todavía, en otras aplicaciones de esta invención, las células pueden ser eficazmente concentradas y activadas, incluyendo la inducción de la polarización de receptores, maximizando así los acontecimientos señalizadores de receptores. Estas aplicaciones tienen una amplia utilidad que

incluye el uso en ensayos de selección dirigidos a receptores o recogiendo sobreescurrecimientos celulares en la superficie de una célula para inducir la activación como la inducción de la apoptosis ligando Fas o moléculas similares
5 en una célula tumoral.

En un ejemplo de estos ensayos de selección, se podrían usar células que portan receptores de proteínas acopladas G y ponerlas en contacto con agentes que se unen a las mismas, estando unidos estos agentes a una superficie que
10 permita la concentración inducida por fuerzas. Consecuentemente, como los receptores se sobreescurren conjuntamente, el acontecimiento de transducción de señales se amplificaría. Esto podría ser importante en el estudio de acontecimientos de transducción de señales que son de un nivel muy
15 bajo en experimentos típicos y, por tanto, seleccionar compuestos de fármacos que inhiban o modifiquen algo estos acontecimientos de transducción de señales.

Estimulación de una población celular

Los métodos de la presente invención se refieren a la
20 estimulación de una célula diana introduciendo un ligando o agente que se une a un resto celular, induciendo un acontecimiento celular. La unión del ligando o agente a la célula puede provocar una trayectoria de señalización que ha su vez activa cambios fenotípicos o biológicos particulares en
25 la célula. La estimulación de una célula diana introduciendo un ligando o agente que se une a un resto celular, como se describe en la presente memoria descriptiva, puede sobre-regular o infra-regular cualquier número de procedimientos celulares que conducen a cambios fenotípicos o biológicos
30 particulares en la célula. La activación de la célula puede mejorar funciones celulares normales o iniciar funciones celulares normales en una célula anormal. El método descrito en la presente memoria descriptiva proporciona una estimulación forzando la concentración de las
35 células conjuntamente con el ligando o agente que se une a

un resto de superficie celular. La estimulación de una célula puede ser mejorada o un acontecimiento celular particular puede ser estimulado introduciendo un segundo agente o ligando que se liga a un segundo resto de superficie celular. La invención proporciona adicionalmente medios para la selección o el cultivo de las células estimuladas. Consecuentemente, la presente invención proporciona también poblaciones de células que resultan de esta metodología, así como poblaciones celulares que tienen características fenotípicas distintas, que incluyen células T con características fenotípicas específicas.

Los pares de resto de superficie celular-ligando incluyen receptores de antígenos de células T (TCR) y anti-CD3 mAb.

La naturaleza de la unión de un receptor por un ligando dará lugar a la multimerización de los receptores, o la agregación/orientación de los receptores, de forma que la señalización o respuesta celular es sobre-regulada, infra-regulada, acelerada, mejorada o de algún otro modo alterada, de forma que se confiera una ventaja particular, como la división celular, secreción de citoquinas, desplazamiento celular interacción aumentada de célula-célula, etc.

La activación de células T normales mediante antígeno y las células que presentan antígenos dan lugar habitualmente a la agregación de sobreescurrimientos de TCR, reorganización citoesquelética, polarización de señales de (activación y división celular, por ejemplo. Usando aproximaciones artificiales, como las descritas en la presente memoria descriptiva, en ausencia de activación de células T *in vivo* "normales", se podría acelerar, mejorar o aceptar de algún otro modo las funciones anteriormente descritas, en particular a través de la ligadura acelerada, controlada y espacialmente orientada de TCR y CD28. Las ventajas podrían ser una expansión celular mejorada *in vitro* que da lugar a números más elevados de células infusibles y más es-

tables para aplicaciones terapéuticas. En particular, la presente invención proporciona métodos para activar y expandir células T hasta densidades muy elevadas (que varían en el intervalo de 6×10^6 células/ml hasta 90×10^6 células/ml) y que da lugar a la producción de números muy elevados de células (tanto como 800 mil millones de células son expandidas a partir de un individuo desde un número de partida de células de aproximadamente $0,5 \times 10^9$ células). Otras ventajas podrían ser la "agregación" mejorada de receptores para células con defectos, como una densidad TCR inferior a la normal en la superficie celular. Análogamente, las aplicaciones *in vivo* podrían ser ventajosas cuando las poblaciones específicas de células T necesitan ser activadas, como células T específicas para tumores en sitios de tumores. La agregación y orientación de receptores mejoradas podrían proporcionar una señal de activación que por lo demás es difícil de obtener para células T funcionalmente tolerizadas. Además, esta activación podría ser usada en el contexto de células T específicas de antígenos. A este respecto, las células T de un tumor podrían ser aisladas y expandidas e infundidas en el paciente. Análogamente, las células T expuestas a un antígeno *in vivo* o *in vitro* podrían ser expandidas mediante las presentes metodologías.

En otro aspecto, la inducción mejorada de la muerte celular se produce a través de una trayectoria FAS: la capacidad de acelerar la multimerización de FAS, orientar espacialmente FAS "activadas" en superficies celulares dianas o favorecer una ligadura de FAS acumulativa, que por otra parte sería inalcanzable, podría proporcionar una ventaja significativa *in vivo*, particularmente para tratar cáncer, respuestas autoinmunes o una enfermedad de injerto frente a hospedante. Por ejemplo, una célula tumoral puede expresar niveles bajos de FAS *in vivo* y el hospedante puede expresar niveles bajos de FAS-L en sitios tumorales (debido a citoquinas supresoras, etc.). Debido a estos bajos niveles, no

puede ser generada una señal de FAS adecuada, permitiendo la supervivencia y crecimiento del tumor. Una forma posible de superar esta deficiencia de FAS/ligando de FAS podría ser dirigir a diana los tumores/sitios tumorales con ligandos monovalentes o multivalentes para FAS (FAS-L, anticuerpos, etc.), unidos a partículas paramagnéticas. La aplicación de un campo magnético fuerte usando el presente en sitios tumorales (por ejemplo, melanoma, sarcoma de Kaposi, carcinomas de cuello de células escamosa, etc.) podría proporcionar la orientación espacial de las partículas paramagnéticas en sitios tumorales como las partículas FAS unidas a en células tumorales, adaptadas para una activación de receptores y/o activación y expansión de células T. La agregación aumentada de FAS acompañada de una polarización de señales puede proporcionar una señal adecuada para inducir seguidamente la muerte celular en las células tumorales.

En una realización particular de la invención, la población de células T puede ser estipulada concentrando y ligando simultáneamente las superficies de las células T.

En la presente invención, los anticuerpos para CD3 y CD28 son co-inmovilizados en una superficie. Una superficie preferida para esta inmovilización incluye gránulos, como gránulos paramagnéticos. En otro aspecto de la presente invención, cualquier ligando que se une al complejo TCR/CD3 e inicia una señal de estimulación primaria puede ser utilizado como un agente de activación primario inmovilizado en la superficie. Cualquier ligando que se une a CD28 e inicia la trayectoria de transducción de señales de CD28, provocando así una co-estimulación de la célula con un ligando CD3 y mejorando la activación de una población de células T, es un ligando CD28 y, consecuentemente es un agente co-estimulador en el contexto de la presente invención. En un aspecto adicional de la invención, es aplicada una fuerza a la mezcla de células T y superficies conjugadas anti-CD3 y

anti-CD28 para concentrar las células T, maximizando así la
ligadura de superficies de células T. Aunque en una reali-
zación particular la fuerza de concentración es una fuerza
magnética, aplicada cuando las superficies revestidas anti-
5 CD3 y anti-CD28 son gránulos paramagnéticos, están disponi-
bles en la técnica otros medios para llevar las células y
los ligandos conjuntamente de una forma concentrada. Estos
métodos de estimular una población de células T proporcio-
nan un contacto significativo gránulo-célula y/o célula-
10 célula que induce una activación y/o proliferación sorpren-
dentemente mayor de células T. Además de ello, los métodos
de la invención alteran el perfil del marcador de la super-
ficie celular en el que las células T activadas expresan
marcadores de superficies celulares que indican un fenotipo
15 más normal y un producto final menos variable en compara-
ción con el perfil de las células T cuando se aislaron en
primer lugar a partir de un sujeto con una enfermedad.

La señal primaria

Se exponen brevemente a continuación los acontecimien-
20 tos bioquímicos responsables de la estimulación de células
T ex vivo. La interacción entre el complejo TCR/CD3 y antí-
geno presentada conjuntamente con moléculas MHC de clase I
o clase II o una célula que presenta antígeno inicia una
serie de acontecimientos bioquímicos denominados activación
25 de células T específica para antígenos. Consecuentemente,
la activación de células T se puede realizar estimulando el
complejo TCR/CD3 de células T o estimulando la proteína de
superficie CD2. Puede ser usado un anticuerpo monoclonal
anti-CD3 para activar una población de células T a través
30 del complejo TCR/CD3. Está disponible en el comercio un
cierto número de anticuerpos monoclonales CD3 anti-humanos,
de los que son ejemplos OKT3, preparado a partir de células
de hibridomas obtenidas de la entidad American Type Culture
Collection y anticuerpo monoclonal G19-4. Análogamente, son
35 conocidas y están disponibles formas estimuladoras de anti-

cuerpos anti-CD2. La estimulación a través de CD2 con anticuerpos anti-CD2 se realiza normalmente usando una combinación de al menos dos anticuerpos anti-CD" diferentes. Las combinaciones estimuladoras de anticuerpos anti-CD2 que han sido descritas incluyen las siguientes: el anticuerpo T11.3 en combinación con el anticuerpo T11.1 o T11.2 (Meuer et al., Cell 36:897-906, 1984) y el anticuerpo 9.6 (que reconoce el mismo epitopo como T11.1) en combinación con el anticuerpo 9-1 (Yang et al., J. Immunol. 137:1097-1100, 1986). Pueden ser usados también otros anticuerpos que se unan a los mismos epitopos como cualquiera de los anticuerpos anteriormente descritos. Pueden ser preparados y ser identificados mediante técnicas estándar anticuerpos adicionales o combinaciones de anticuerpos.

Una señal de activación primaria puede ser suministrada también a una célula T a través de otros mecanismos. Por ejemplo, puede ser usada una combinación que incluya un activador de proteína quinasa C (PKC), como éster de forbol (por ejemplo, miristato-acetato de forbol) y un ionóforo de calcio (por ejemplo, ionomicina, que eleva las concentraciones de calcio citoplásmico) o similar. El uso de estos agentes desvía el complejo TCR/CD3 pero suministra una señal estimuladora a las células T. Otros agentes que actúan como señales primarias pueden incluir ligandos naturales y sintéticos. Un ligando natural puede incluir MHC con o sin presentación de un péptido. Otros ligandos pueden incluir, pero sin limitación un péptido, polipéptido, factor de crecimiento, citoquina, quimioquina, glicopéptido, receptor soluble, esteroide, mitogen, como PHA u otros superantígenos, tetrameros péptido-MHC (Altman, et al., Science. 1996 Oct 4;274(5284):94-6.) y dímero MHC solubles (Dal Porto, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 1993 Jul 15;90). Dentro del contexto de la presente invención, el uso de la concentración y estimulación puede dar lugar a una elevada polarización de receptores de forma que no es necesaria ninguna se-

ñal secundaria para inducir la proliferación de células T.

En otras realizaciones, los acontecimientos de transducción de señales de cualquier tipo pueden ser aumentados o analizados utilizando la presente invención. Por ejemplo, los receptores acoplados a proteína G pueden ser estimulados y medidos usando los métodos de concentración de la presente invención.

La señal secundaria

Aunque la estimulación del complejo TCR/CD3 parece que es necesaria para el suministro de una señal de activación primaria en una célula T, un cierto número de moléculas en la superficie de las células T, denominadas moléculas accesorias o co-estimuladoras, han estado implicadas en regular la transición de una célula T en reposo a una transformación expansiva y una posterior proliferación y diferenciación. Por tanto, además de la señal de activación primaria, la inducción de respuestas de células T requiere una segunda señal co-estimuladora. Una de estas moléculas co-estimuladoras o accesorias CD28, se cree que inicia o regula una trayectoria de transducción de señales que es distinta de cualquier complejo estimulado por el TCR.

Por lo tanto, para aumentar la activación y proliferación de una población de células T en ausencia de factores de crecimiento exógenos o células accesorias, una molécula accesoria en la superficie de la célula T, como CD28, es estimulada con un ligando que se une a la molécula accesoria. En una realización, la estimulación de la molécula accesoria CD28 y la activación de la célula T se produce simultáneamente poniendo en contacto una población de células T con una superficie a la que se une un ligando que se une a CD23 y un ligando que se une a CD28.

Consecuentemente, un experto en la técnica reconocerá que cualquier agente, incluido un anticuerpo anti-CD28 o fragmento del mismo capaz de reticular la molécula de CD28, o un ligando natural para CD28, puede ser usado para esti-

mular células T. Ejemplos de anticuerpos anti-CD28 o fragmentos del mismo útiles en el contexto de la presente invención incluyen anticuerpo monoclonal 9.3 (IgG2_a) (Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ), anticuerpo monoclonal KOLT-2 (IgG1), 15E8 (IgG1), 248.23.2 (IgM), y EX5.3D10 (IgG2_a) (ATCC HB11373). Ejemplos de ligandos naturales incluyen la familia B7 de proteínas como B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) (Freedman et al., J. Immunol. 137:3260-3267, 1987; Freeman et al., J. Immunol. 143:2714-2722, 1989; Freeman et al., J. Exp. Med. 174:625-631, 1991; Freeman et al., Science 262:909-911, 1993; Azuma et al., Nature 366:76-79, 1993; Freeman et al., J. Exp. Med. 178:2185-2192, 1993). Además, pueden ser usados de acuerdo con la presente invención homólogos de unión de un ligando natural, ya sean nativos o sintetizados mediante técnicas químicas o recombinantes. Otros agentes que actúan como señales secundarias pueden incluir ligandos naturales y sintéticos. Los agentes pueden incluir, pero sin limitación, otros anticuerpos o sus fragmentos, un péptido, polipéptido, factor de crecimiento, citoquina, quimioquina, glicopéptido, receptor soluble, esteroide, hormona, mitogen como PHA u otros superantígenos.

Expansión de una población de células T

En un aspecto de la presente invención, la expansión de células T ex vivo se puede realizar mediante el aislamiento de células T y una posterior estimulación. Las células T son estimuladas con dos agentes, uno que induce una señal primaria y un segundo que es una señal co-estimuladora. Los ligandos útiles para estimular una señal única o estimular una señal primaria y una molécula accesoria que estimula una segunda señal pueden ser usados en forma soluble, unidos a la superficie de una célula o inmovilizados en una superficie, como se describe en la presente memoria descriptiva. Un ligando o agente que se une a una superficie sirve como un "sucedáneo", célula que presenta

antígeno (AP). En una realización preferida los agentes tanto primarios como secundarios son co-inmovilizados en una superficie. En una realización la molécula que proporciona la señal de activación primaria, como un ligando CD3 y la molécula co-estimuladora, como un ligando CD28, son acopladas a la misma superficie, por ejemplo, un gránulo. Adicionalmente, como se indicó con anterioridad, una, dos o más moléculas estimuladoras pueden ser usadas en las mismas o diferentes superficies.

10 Antes de la expansión, es obtenida una fuente de células T a partir de un sujeto. El término "sujeto" está destinado a incluir organismos vivos en los que puede ser provocada una respuesta inmune (por ejemplo mamíferos). Ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y sus especies transgénicas. Las células T pueden ser obtenidas a partir de un cierto número de fuentes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, médula de nódulos linfáticos, sangre cardíaca, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, tejido del vaso y tumores. En ciertas realizaciones de la presente invención, puede ser usado cualquier número de líneas de células T disponible en la técnica. En ciertas realizaciones de la presente invención, las células T pueden ser obtenidas de una unidad de sangre recogida de un sujeto, usando cualquier número de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, como separación en Ficoll. En una realización preferida, son obtenidas células de sangre en circulación de un individuo mediante aféresis o leucaféresis. El producto de aféresis contiene normalmente linfocitos, incluidas células T, monocitos, granulocitos, células B, otras células de glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una realización, las células recogidas mediante aféresis pueden ser lavadas para separar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para las posteriores etapas de tratamiento.

En una realización de la invención, las células son lavadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos o de la totalidad de los cationes divalentes. Nuevamente, de forma sorprendente, las etapas de activación iniciales en ausencia de calcio conducen a una activación aumentada. Como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica, una etapa de lavado se puede realizar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, como mediante el uso de una centrifugadora semi-automática de "flujo transversal" (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991) según las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden volver a poner en suspensión en una diversidad de tampones biocompatibles como, por ejemplo, PBS exento de Ca y exento de Mg. Alternativamente, los componentes no deseables de la muestra de aféresis pueden ser separados y las células se pueden volver a poner directamente en suspensión en medios de cultivo.

En otra realización, las células T son aisladas de linfocitos de sangre periférica mediante lisado de los glóbulos rojos y agotamiento de los monocitos, por ejemplo, mediante centrifugación a través de un gradiente de PERCOLL®. Una subpoblación específica de células T CD⁸ puede ser adicionalmente aislada mediante técnicas de selección positivas o negativas. Por ejemplo, en una realización preferida, las células T son aisladas mediante incubación con gránulos conjugados anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3x28), como los gránulos DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de las células t deseadas. En una realización, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En una realización adicional, el período de tiempo varía en el intervalo de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros entre ellos. En una realización adicional, el período de tiempo

es de al menos 1, 2 3, 4, 5 o 6 horas. Todavía, en otra realización preferida, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. En una realización preferida, el período de tiempo de incubación es de 24 horas. Para el aislamiento de células T de pacientes con leucemia, el uso de tiempos de incubación más prolongados, como 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular. Pueden ser usados tiempos de incubación más prolongados para aislar células T en cualquier situación en las que haya pocas células T en comparación con otros tipos de células, como en el aislamiento de linfocitos de infiltración tumoral (TIL) de un tejido tumoral o de individuos con el sistema inmune comprometido. Adicionalmente, el uso de tiempos de incubación más prolongado puede aumentar la eficacia de la captura de células T CD8⁺. Por tanto, mediante un simple acortamiento o alargamiento del tiempo, se puede permitir que las células T se unan a los gránulos CD37CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de gránulos a células T (como se describe adicionalmente en la presente memoria descriptiva) se pueden seleccionar preferencialmente subpoblaciones de células T seleccionadas a favor o en contra en el inicio de cultivo o en otros valores puntuales del tiempo durante el procedimiento. Adicionalmente, aumentando o disminuyendo la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en los gránulos u otra superficie, se pueden seleccionar preferencialmente subpoblaciones de células T a favor en contra en el inicio del cultivo o en otros valores puntuales del tiempo deseados. Los expertos en la Técnica reconocerán que se pueden usar también múltiples rondas de selección en el contexto de esta invención. En ciertas realizaciones, puede ser deseable realizar el procedimiento de selección y usar las células "no seleccionadas" en el procedimiento XCELLERATE®. Las células "no seleccionadas" pueden ser sometidas también a rondas adicionales de selección.

Para el aislamiento de una población deseada de células

las mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de las células y gránulos. En ciertas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que son conjuntamente mezclados los gránulos y células (es decir, aumentar la concentración de células), para asegurar un contacto máximo entre células y gránulos. Por ejemplo, en una realización, se usa una concentración de 2 mil millones de células/ml. En una realización, se usa una concentración de 1 mil millones de células/ml. En una realización adicional, se usa más de 100 mil millones de células/ml. En una realización adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 mil millones de células/ml. Todavía en otra realización, se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mil millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden usar concentraciones de 125 o 150 mil millones de células/ml. El uso de concentraciones elevadas puede dar lugar a un rendimiento celular aumentado, activación celular y expansión celular. Adicionalmente, el uso de concentraciones celulares elevadas permite una captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente antígenos dianas de interés, como células T CD28-negativas, o a partir de muestras en las que haya presente muchas células tumorales (por ejemplo, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Estas poblaciones de células pueden tener un valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una concentración elevada de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que la que normalmente tiene la expresión de CD28 más débil.

En una realización relacionada, puede ser deseable usar concentraciones inferiores de células. Diluyendo significativamente la mezcla de células T y gránulos, se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esta selección de células puede expresar cantidades elevadas de antígenos deseados que se van a unir a las partícu-

las. Por ejemplo, las células T CD4⁺ expresan niveles superiores de CD28 y capturan más eficazmente que las células T CD8⁺ en concentraciones diluidas. En una realización, la concentración de células usadas es 5×10^6 / ml. En otras
 5 realizaciones, la concentración usada puede ser de aproximadamente 1×10^5 / ml a 1×10^6 / ml y cualquier valor entero entre ellos.

Si se desea o es necesario, las poblaciones de monocitos (es decir, células CD14⁺) pueden ser agotadas de las
 10 preparaciones de sangre antes de la expansión ex vivo mediante una diversidad de metodologías, que incluyen gránulos o columnas revestidos anti-CD14 o la utilización de la actividad fagocítica de estas células para facilitar la supresión. Consecuentemente, en una realización, la invención
 15 usa partículas paramagnéticas de un tamaño suficiente para ser abarcadas por los monocitos fagocíticos. En ciertas realizaciones, las partículas paramagnéticas son gránulos disponibles en el comercio, por ejemplo, los producidos por la empresa Dynal AS bajo la marca registrada Dynabeads®.
 20 Ejemplos de Dynabeads® a este respecto son M-280, M-450 y M-500. En un aspecto, otras células no específicas son suprimidas revistiendo las partículas paramagnéticas con proteínas irrelevantes (por ejemplo, proteínas de suero o anticuerpos). Las proteínas irrelevantes y los anticuerpos
 25 incluyen las proteínas y anticuerpos o sus fragmentos que no dirigen específicamente a diana las células T que van a ser expandidas. En ciertas realizaciones los gránulos irrelevantes incluyen gránulos revestidos con anticuerpos anti-ratón de oveja, anticuerpos anti-ratón de cabra y albúmina
 30 de suero humano.

Brevemente expuesto, este agotamiento de monicitos se realiza preincubando PBMC aislado a partir de sangre completa o sangre periférica aferesada con una o más variedades de partículas paramagnéticas irrelevantes o no acopladas a anticuerpos en cualquier cantidad que permita la su-
 35

presión de monocitos (una relación de aproximadamente 20:1 de gránulo:célula) durante aproximadamente 30 minutos a 2 horas de 22 a 37°C, seguido de la supresión magnética de las células que se hayan unido o hayan sido abarcadas por las partículas paramagnéticas. Esta separación se puede realizar usando métodos estándar disponibles en la Técnica. Por ejemplo, puede ser usada cualquier metodología de separación magnética que incluye una diversidad de las que están disponibles en el comercio (por ejemplo, DYNAL® Magnetic Particle Concentrator (DYNAL MPC®)). La seguridad del agotamiento necesario puede ser verificada mediante una diversidad de metodologías conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen análisis citométrico de flujo de células positivas CD14, antes y después de dicho agotamiento.

Las células T para la estimulación pueden ser congeladas también después de la etapa de lavado, lo que no requiere la etapa de supresión de monocitos. Aunque no se desean vinculaciones teóricas, la etapa de congelación y posterior descongelación proporciona un producto más uniforme suprimiendo los granulocitos y, en alguna medida, los monocitos en la población celular. Después de la etapa de lavado que suprime el plasma y las plaquetas, las células se pueden poner en suspensión en una solución congelante. Aunque son conocidas en la técnica muchas soluciones y parámetros congelantes y serán útiles en este contexto, un método incluye usar PBS que contiene 20% de DMSO y 8% de albúmina de suero humano u otros medios de congelación de células adecuados, seguidamente las células se congelan a -80°C a una velocidad de 1° por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un depósito de almacenamiento de nitrógeno líquido. Pueden ser usados también otros métodos para controlar la congelación, como una congelación incontrolada inmediatamente a -20°C o en nitrógeno líquido.

También está contemplado en el contexto de la inven-

ción la recogida de muestras de sangre o producto de leucaferesis de un sujeto en un período de tiempo anterior a cuando las células expandidas, como se describe en la presente memoria descriptiva, pueden ser necesarias. Como tal, la fuente de las células que van a ser expandidas puede ser recogida en cualquier valor puntual del tiempo necesario y las células deseadas, como las células T, pueden ser aisladas y congeladas para un uso posterior en terapia de células T para cualquier número de enfermedades o condiciones que se aprovecharían de la terapia de células T, como las descritas en la presente memoria descriptiva. En una realización, se toma una muestra de sangre o una leucoferesis de un sujeto generalmente sano. En ciertas realizaciones, se toma una muestra de sangre o una leucaferesis de un sujeto generalmente sano que está en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que no ha desarrollado todavía la enfermedad, y las células de interés son aisladas y congeladas para un uso posterior. En ciertas realizaciones, las células T pueden ser expandidas, congeladas y usadas en un momento posterior. En ciertas realizaciones, las muestras son recogidas de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular, como se describe en la presente memoria descriptiva, pero antes de cualesquiera tratamientos. En una realización adicional, las células son aisladas de una muestra de sangre o leucaferesis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamientos relevantes que incluyen, pero sin limitación, tratamiento con agentes como agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes innoablativos como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3, citoxina, fludaribina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228 e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 quinasa que es

importante para la señalización inducida por el factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993; Isoniemi (supra)).

5 En una realización adicional, las células son aisladas de un paciente y congeladas para un uso posterior conjuntamente (por ejemplo, antes, simultáneamente o a continuación) con un trasplante de médula ósea, una terapia ablativa de células T usando agentes de quimioterapia como fludarabina,
10 terapia de radiación de haces externos (XRT), ciclofosfámi- da o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las células son aisladas con anterioridad y pueden ser congeladas para un uso posterior para un tratamiento a conti-
nuación de una terapia ablativa de células T como agentes
15 que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan.

En una realización adicional de la presente invención, las células T son obtenidas de un paciente directamente a continuación del tratamiento. A este respecto, se ha obser-
vado que a continuación de ciertos tratamientos de cáncer,
20 en particular tratamientos con fármacos que deterioran el sistema inmune, poco después del tratamiento, durante el período en que los pacientes normalmente se recuperarían del tratamiento, la calidad de las células T obtenidas pue-
de ser óptima o mejorada en cuanto a su capacidad para ser
25 expandidas ex vivo. Análogamente, a continuación de una ma- nipulación ex vivo usando los métodos descritos en la pre- sente memoria descriptiva, estas células pueden estar en un estado preferido para un abarcamiento mejorado y una expan-
sión *in vivo*. Por tanto, está contemplado dentro del con-
30 texto de la presente invención recoger células de sangre, incluidas células T, células dendríticas u otras células de la alineación hematopoyética, durante esta fase de recupe-
ración. Adicionalmente, en ciertas realizaciones, pueden ser usados regímenes de movilización, por ejemplo, movili-
35 zación con CM-CSF) y acondicionamiento para crear un estado

en el que se favorezca la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos de células particulares, especialmente durante un intervalo de tiempo definido a continuación de la terapia.

5 La población celular puede ser estimulada como se describe en la presente memoria descriptiva, como mediante contacto con un anticuerpo anti-CD3. Para la co-estimulación de una molécula accesoria en la superficie de las células T, se usa un ligando que se une a la molécula
10 accesoria. Para estimular la proliferación de células T CD8⁺, se puede usar un anticuerpo anti-CD3 o el anticuerpo anti-CD28 B-73, XR-CD28 (Diaclone, Besançon, Francia) como también se pueden usar otros métodos para estimular CD3 y CD28 comúnmente conocidos en la técnica (Berg et al.,
15 Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998; Haanen et al., J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999; Garland et al., J. Immunol Meth. 227(1-2):53-63, 1999).

 La señal estimuladora primaria y la señal co-estimuladora para la célula T pueden ser proporcionadas mediante diferentes protocolos. Por ejemplo, los agentes que
20 proporcionan cada señal pueden estar acoplados a una superficie. Cuando están acoplados a una superficie, los agentes están acoplados a la misma superficie (es decir, en formación "cis").

25 Los dos agentes son inmovilizados en el mismo gránulo, es decir, "cis". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 y el agente que proporciona la señal co-estimuladora es un anticuerpo anti-CD28; y ambos agentes son co-
30 inmovilizados al mismo gránulo en cantidades moleculares equivalentes. Se usa una relación 1: 1 de cada anticuerpo unido a los gránulos para la expansión de células T CD4⁺ y el crecimiento de células T. En ciertos aspectos de la presente invención, se usa una relación de anticuerpos anti
35 CD3:CD28 unidos a los gránulos tal que se observe un aumen-

to de la expansión de células T en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una realización particular, la relación de anticuerpo CD3:CD28 unidos a los gránulos varía en el intervalo de 1:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto de la presente invención, están unidos más anticuerpos anti-CD28 a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3: CD28 es de menos uno. En ciertas realizaciones de la invención, a la relación de anticuerpo CD28 a anticuerpo CD3 unido a los gránulos es de más de 2:1. En una realización particular, se usa una relación 1:100 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En otra relación, se usa una relación 1,75 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En una realización adicional, se usa una relación 1:50 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En otra realización se usa una relación 1:30 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En una realización preferida, se usa una relación 1:10 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En otra realización, se usa una relación 1:3 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. Todavía, en otra realización se usa una relación 3:1 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos.

Se pueden usar relaciones de gránulos a células de 1:1 a 1:10 y cualesquiera valores enteros entre ellas para estimular células T u otras células dianas. Como apreciarán los expertos en la técnica, la relación de partículas a células puede depender del tamaño de partículas relativo a la célula diana. Por ejemplo, los gránulos de tamaño pequeño solo se podrían unir a células pequeñas, mientras que los gránulos más grandes se podrían unir a muchas realizaciones y la relación comprende 1:9 a 9:1 y cualesquiera valores enteros entre ellos, que pueden ser usados también para estimular células T. La relación de partículas acopladas anti-CD3 y anti-CD28 a células T que da lugar a una estimulación de células T puede variar como se indicó ante-

riormente, sin embargo, ciertos valores preferidos incluyen al menos 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2 o 1:1, siendo una relación preferida de al menos 1:1 partículas por célula T. En una realización, se usa una relación de partículas a células de 1:1. En una realización preferida, una relación de partícula:célula preferida es 1:5. En realizaciones adicionales, la relación de partículas a células se puede hacer variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, en una realización, la relación de partículas a células es de 1:1 en el primer día y se añaden partículas adicionales a las células cada día o cada dos días con posterioridad durante hasta 10 días, a relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basadas en los recuentos celulares en el día de adición). En una realización particular, la relación de partículas a células es 1:1 en el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 en el tercer y quinto días de estimulación. En otra realización, las partículas son añadidas sobre una base diaria o de cada dos días hasta una relación final de 1:1 en el primer día y 1:5 en el tercer y quinto días de estimulación. En otra realización, las partículas son añadidas sobre una base diaria o de cada dos días hasta una relación final de 1:1 en el primer día y 1:10 en el tercer y quinto días de estimulación. Un experto en la Técnica apreciará que otras relaciones pueden ser adecuadas para ser usadas en la presente invención. En particular, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partículas y el tamaño y tipo de células.

Un aspecto de la presente invención surge del descubrimiento sorprendente de que usando diferentes relaciones de gránulos: celdas puede conducir a diferentes resultados con respecto a la expansión de células T específicas para antígenos. En particular, las relaciones de gránulos: celdas se pueden variar para expandir o suprimir selectivamente células T específicas para antígenos (memoria). En una realización, la relación de gránulos: celdas particular

usada suprime selectivamente células T específicas para antígenos. En una realización, la relación particular de gránulos:células usada expande selectivamente células T específicas para antígenos. El experto en la técnica apreciará fácilmente que se puede usar cualquier relación en la medida en que se produzca la expansión o supresión deseada. Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser usados para expandir poblaciones específicas de células o para suprimir poblaciones específicas de células T para ser usadas en cualquier diversidad de ajustes inmuno-terapéuticos descritos en la presente memoria descriptiva.

El uso de ciertas metodologías puede ser ventajoso para mantener la estimulación a largo plazo de una población de células a continuación de la activación y estimulación inicial, separando las células T del estímulo después de un período de aproximadamente 12 a aproximadamente 14 días. La velocidad de proliferación de células T se verifica periódicamente (por ejemplo, diariamente) por ejemplo, examinando el tamaño o midiendo el volumen de las células T, como con un contador Coulter. A este respecto, una célula T restante tiene un diámetro medio de aproximadamente 6,8 micrómetros y, tras la activación y estimulación inicial, en presencia del ligando estimulador, el diámetro medio de las células T aumentará hasta más de 12 micrómetros en el día 4 y comenzará a disminuir aproximadamente en el día 6. Cuando el diámetro medio de las células T disminuye hasta aproximadamente 8 micrómetros, las células T pueden ser reactivadas y re-estimuladas para inducir una proliferación adicional de las células T. Alternativamente, la velocidad de proliferación de células T y el tiempo para la re-estimulación de células T pueden ser verificados ensayando en cuanto a la presencia de moléculas de superficies celulares, como CD154, CD54, CD25, CD137 o CD134, que son inducidas sobre células T activadas.

En una realización, la estimulación de células T se realiza con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 co-inmovilizados en gránulos (3x28 gránulos) durante un período de tiempo suficiente para que las células vuelvan a un estado estático (proliferación baja o nula) (aproximadamente 8-14 días después de la estimulación inicial). Seguidamente es retirada la señal de estimulación de las células y las células se lavan y se vuelven a infundir en el paciente. Las células al final de la fase estimulación se hacen "super-inducibles" mediante los métodos de la presente invención, como lo demuestra su capacidad para responder a antígenos y la capacidad de estas células para demostrar un fenotipo de tipo memoria, como se pone de manifiesto mediante los ejemplos. Consecuentemente, tras la re-estimulación exógena o mediante un antígeno *in vivo* después de la infusión, las células T activadas demuestran una respuesta estable caracterizada por propiedades fenotípicas únicas, como una expresión sostenida de CD154 y una producción aumentada de citoquinas.

En realizaciones adicionales de la presente invención, las células, como las células T, se combinan con gránulos revestidos con agente, los gránulos y las celdas son posteriormente separados y seguidamente las células se cultivan. En una realización alternativa, antes del cultivo, los gránulos revestidos con agentes y las células no se separan sino que se cultivan conjuntamente. En una realización adicional, los gránulos y las células se concentran en primer lugar mediante la aplicación de una fuerza, dando lugar a la ligadura de los restos de superficies celulares, induciendo así la estimulación celular.

A modo de ejemplo, los restos de superficies celulares pueden ser ligados permitiendo que los gránulos a los que se unen los anti-CD3 y anti-CD28 (3x28 gránulos) entren en contacto con las células T. En una realización, las células (por ejemplo, 10^4 a 10^9 células T) y los gránulos (por

ejemplo, gránulos paramagnéticos T CD3/CD28 DYNABEADS® a una relación de 1:1) se combinan en un tampón, preferentemente PBS (sin cationes divalentes como calcio y magnesio). Nuevamente, los expertos en la técnica pueden apreciar fácilmente que se puede usar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solamente 0,01% de la muestra o la muestra completa (es decir, 100%) puede comprender la célula diana de interés. Consecuentemente, cualquier número de células está dentro del contexto de la presente invención. En ciertas realizaciones, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que las partículas y células se mezclan conjuntamente (es decir, aumentar la concentración de células) para asegurar un contacto máximo de células y partículas. Por ejemplo, en una realización, se usa una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En otra realización se usan más de 100 millones de células/ml. En una realización adicional, se usa una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. Todavía, en otra realización se usa una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En realizaciones adicionales, se pueden usar concentraciones de 125 0 150 millones de células/ml. El uso de concentraciones elevadas puede dar lugar a un rendimiento celular aumentado, activación celular y expansión celular. Además, el uso de concentraciones celulares elevadas permite una captura más eficaz de células que pueden expresar débilmente antígenos dianas de interés, como células T CD28-negativas. Estas poblaciones de células pueden tener utilidad terapéutica y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una concentración elevada de células permite una selección más eficaz de células T CD8+ que normalmente tienen una expresión más débil de CD28.

En una realización relacionada, puede ser deseable

usar concentraciones inferiores de células. Diluyendo significativamente la mezcla de células T y gránulos, se minimizan las interacciones entre gránulos y células. Esto selecciona células que expresan cantidades elevadas de antígenos deseados para unirse a las partículas. En una realización, la concentración de células usada es de aproximadamente $5 \times 10^6/\text{ml}$. En otras realizaciones, la concentración usada puede ser de aproximadamente $1 \times 10^5/\text{ml}$ a aproximadamente $1 \times 10^6/\text{ml}$ y cualquier valor entero entre ellos.

El tampón en el que se ponen en suspensión las células puede ser cualquiera que sea apropiado para el tipo de célula particular. Cuando se utilizan ciertos tipos de células, el tampón puede incluir otros componentes, por ejemplo 1-5% de suero, necesarios para mantener la integridad celular durante el procedimiento. En otra realización, las células y gránulos se pueden combinar en medios de cultivo celulares. Las células y los gránulos se pueden mezclar, por ejemplo, mediante rotación, agitación o cualquier medio para mezclar, durante un período de tiempo que varía en el intervalo de 1 minuto a varias horas. El recipiente de los gránulos y células se concentra seguidamente mediante una fuerza, como colocándolo en un campo magnético. Los medios y las células sin unir se separan y las células unidas a los gránulos se lavan, por ejemplo, mediante bombeo a través de una bomba peristáltica y seguidamente se vuelven a poner en suspensión en medios apropiados para el cultivo celular.

En una realización de la presente invención, la mezcla puede ser cultivada durante varias horas (aproximadamente 3 horas) hasta aproximadamente 14 días o cualquier valor horario entero entre ellos. En otra realización, la mezcla puede ser cultivada durante 21 días. En una realización de la invención, los gránulos y las células T son cultivados conjuntamente durante aproximadamente 8 días. En otra realización, los gránulos y las células T son conjuntamente

cultivados durante 2-3 días. Pueden ser deseados también varios ciclos de estimulación, de forma que el tiempo de cultivo de las células T puede ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de células T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, medio esencial mínimo o medio RPMI 1640 o X-vivo 15 (BioWhittaker)) que pueden contener factores necesarios para la proliferación y viabilidad que incluyen suero (por ejemplo, suero bovino fetal o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN- γ , IL-4, GM-CSF, IL-10, IL-12, TGF β y TNF- α u cualesquiera otros derivados para el crecimiento de células conocidos por el experto en la técnica. Otros aditivos para el crecimiento de células incluyen, pero sin limitación tensioactivos, plasmanate y agentes reductores como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. Los medios pueden incluir RPMI 1640 AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20, con aminoácidos y vitaminas añadidos, ya sea exentos de suero o complementados con una cantidad apropiada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas y/o una cantidad de citoquina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de células T. Los antibióticos, por ejemplo, penicilina y estreptomycin, son incluidos solamente en cultivos experimentales y no en cultivos de células que van a ser infundidas en un sujeto. Las células dianas se mantienen bajo condiciones necesarias para soportar el crecimiento, por ejemplo, una temperatura apropiada (por ejemplo, 37°C y atmósfera (por ejemplo, aire más 5% de CO₂)).

Cuando se usa un campo magnético como la fuerza de concentración, la resistencia del campo magnético aplicado a las células antes del cultivo celular puede variar en el intervalo entre 200 gauss y 12.000 gauss en la superficie magnética. La forma y el tamaño del imán pueden estar adaptadas al tamaño y la forma de la mezcla o recipientes del cultivo celular o a cualquier otro parámetro que facilite o

aumente el contacto de célula a célula y la concentración de las células. La fuerza magnética puede ser difundida colocando un material que actúe como un amortiguador o separador entre el imán y los gránulos paramagnéticos contenidos en la mezcla con las células. Una fuerza magnética fuerte se considera generalmente que es de al menos 7.500 gauss en la superficie, mientras que una fuerza magnética débil se considera que está en el intervalo de 2.000-2.500 gauss en la superficie. La fuerza magnética aproximada aplicada por un imán sobre un gránulo paramagnético depende del volumen del gránulo paramagnético y de la resistencia del campo magnético según la siguiente fórmula:

$$F_{mag} = (v) (\psi) (B) (dB/dx)$$

15

en la que F_{mag} es igual a la fuerza magnética, v es igual al volumen del gránulo paramagnético, ψ es igual a susceptibilidad magnética de un gránulo paramagnético (un valor proporcionado por el fabricante), B es igual a la resistencia del campo magnético y (dB/dx) es igual al gradiente de la resistencia del campo. Un experto en la técnica apreciará que los factores del lado derecho de la ecuación pueden ser obtenidos o medidos, permitiendo el cálculo de la fuerza magnética aplicada.

25 Las células estimuladas mediante los métodos de la presente invención son activadas como se muestra por la inducción de la transducción de señales, la expresión de marcadores de superficie celulares y/o la proliferación. Un marcador de este tipo apropiado para células T es CD154 que es una molécula inmunomoduladora importante. La expresión de CD154 es extremadamente beneficiosa para la amplificación de la respuesta inmune. El CD154 interacciona con la molécula CD40 expresada en muchas células B, células dendríticas, monocitos y algunas células endoteliales. Con-

secuentemente, este aumento inesperado y sorprendente en la expresión de CD154 es probable que conduzca a composiciones de células T más eficaces. La estimulación de células CD3⁺ como se describen en la presente memoria descriptiva proporciona células T que expresan un aumento de 1,1 a 20 veces en los niveles de ciertos marcadores de superficies celulares como la expresión de CD154 en los días 1, 2, 3 o 4 a continuación de la estimulación (véase el ejemplo V, Tabla 2 y Figura 4). La expresión de otro marcador de superficie celular CD25, fue también mayor sobre células T después de una concentración y estimulación que sobre las células antes del cultivo, o las células estimuladas mediante otros métodos (véase la Tabla 2).

Las superficies revestidas con agentes, es decir, los gránulos, pueden ser separados de las células antes del cultivo, en cualquier punto durante el cultivo, o a la terminación del cultivo. Además, las superficies revestidas con agentes ligadas a las células dianas pueden ser separadas de las células que no están unidas antes del cultivo o de las otras células que permanecen también en el cultivo. En una realización, antes del cultivo, los gránulos revestidos con agentes y las células dianas no están separados sino que se cultivan conjuntamente. En una realización adicional, los gránulos y las células dianas son concentrados en primer lugar mediante la aplicación de una fuerza, dando lugar a una ligadura de restos de superficies celulares, induciendo así la estimulación y posterior activación.

Un experto en la técnica apreciará fácilmente que el contacto entre los gránulos revestidos con agentes y las células que van a ser estimuladas puede ser aumentado mediante una concentración, usando otras fuerzas. Consecuentemente, cualquier medio para concentrar células con ligandos de unión a restos de superficies celulares será suficiente en la medida en que la concentración conlleve células y agentes de una manera que sobrepase la gravedad o di-

fusión.

La superficie revestida con agente es un gránulo que es mezclado con las células y concentrado en un volumen pequeño en un campo magnético, arrastrando así todas las células y células unidas a gránulos en una zona definida y concentrada. En ciertas realizaciones, la superficie revestida con agente puede ser arrastrada conjuntamente por la fuerza en 30 segundos a 4 horas para ser expuesta a las células diana. En otras realizaciones, el tiempo puede ser de 1 minuto a 2 horas y todos los intervalos enteros entre ellos. La aplicación de una fuerza a una población celular con células que portan receptores que es mezclada con una superficie a la que está unida al menos un ligando de superficie celular puede incluir la polarización de receptores celulares, agregando moléculas de superficies celulares. Este medio para inducir la polarización de superficies celulares puede aumentar la señalización en la célula agregando las moléculas de superficies celulares que comprenden sobreescurrimientos de lípidos. Esta agregación puede inducir una trayectoria de señales, que puede conducir a la infra-regulación o supresión de un acontecimiento celular. Alternativamente, la agregación de las moléculas de superficies celulares puede conducir a una sobre-regulación o activación de un acontecimiento celular.

Un acontecimiento celular puede incluir, por ejemplo, la transducción de señales mediada por receptores que induce o suprime una trayectoria particular, incluida una trayectoria apoptótica, o induce la fosforilación de proteínas o estimula o suprime las señales de crecimiento. En una realización, las células pueden ser linfocitos, particularmente una célula T y el ligando de superficie celular puede ser un anticuerpo anti-CD3 unido a una superficie, por ejemplo, una partícula. La partícula puede ser un gránulo paramagnético y la fuerza aplicada una fuerza magnética. La aplicación de una fuerza magnética a una mezcla de los lin-

focitos y la superficie revestida de anti-CD3 del gránulo paramagnético puede provocar que los receptores CD3 de la célula T se polaricen más rápidamente de lo que lo harían en ausencia de una fuerza externa. Este método de estimular la célula T favorece una activación más rápida de las trayectorias de respuestas inmunes de células T y la proliferación de células.

En una realización de la presente invención, las relaciones de gránulos:células puede ser adaptada para obtener un fenotipo deseado de células T. En una realización particular, las relaciones de gránulos:células se pueden variar para expandir o suprimir selectivamente células T específicas para antígenos (memoria). En una realización, la relación de gránulos:células usada suprime selectivamente células T específicas para antígenos. En una realización adicional, la relación particular de gránulos:células usada expande selectivamente células T específicas para antígenos. Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser usados para expandir poblaciones específicas de células T o para suprimir poblaciones específicas de células T, para ser usadas en cualquier variedad de ajustes inmunoterapéuticos descritos en la presente memoria descriptiva.

En otra realización, el tiempo de exposición a agentes estimuladores como gránulos revestidos anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3x28) puede ser modificado o adaptado para obtener un fenotipo deseado de células T. Muchas respuestas inmunes específicas están mediadas por células T específicas para antígenos CD8⁺, que pueden lisar o destruir directamente células dianas. Alternativamente, en situaciones en que son deseados números aumentados de células T CD8⁺, las aproximaciones XCELLERATE descritas en la presente memoria descriptiva pueden ser utilizadas también como, por ejemplo, para pre-seleccionar células CD8⁺ antes de la estimulación y/o cultivo. Estas situaciones pueden existir cuando

se prefieren niveles aumentados de IFN- γ o una citolisis aumentada de una célula diana. En una realización adicional, el procedimiento XCELLERATE® puede ser modificado o adaptado para favorecer el alojamiento de células T en sitios particulares de interés, como en nódulos linfáticos o sitios de inflamación, o para una médula ósea, por ejemplo. Adicionalmente, en ciertas realizaciones, las aproximaciones XCELLERATE® descritas en la presente memoria descriptiva pueden ser utilizadas también para la generación de células reguladoras T para una inmunosupresión específica en el caso de una enfermedad inflamatoria, autoinmunidad y aceptación de injerto extraño, o cualquier otro ajuste de enfermedad en el que se desean células T reguladoras. Clásicamente, las células reguladoras T tienen un fenotipo CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GITR⁺, y FoxP3⁺ (véase, por ejemplo, Woo, et al., J Immunol. 2002 May 1;168(9):4272-6; Shevach, E.M., Annu. Rev. Immunol. 2000, 18:423; Stephens, et al., Eur. J. Immunol. 2001, 31:1247; Salomon, et al, Immunity 2000, 12:431; and Sakaguchi, et al., Immunol. Rev. 2001, 182:18). Las células T reguladoras pueden ser generadas y expandidas usando los métodos de la presente invención. Las células T reguladoras pueden ser específicas para antígenos y/o policlonales. Las células T reguladoras pueden ser generadas también usando técnicas reconocidas en el estado de la técnica como se describe, por ejemplo, por Woo, et al.; Shevach, E.M.; Stephens, et al.; Salomon, et al.; y Sakaguchi, et al.; Supra.

Para efectuar un aislamiento de poblaciones diferentes de células T, se pueden variar los tiempos de exposición a los gránulos. Por ejemplo, en una realización preferida, las células T son aisladas mediante incubación con gránulos 3x28 como Dynabeads M-450, durante un período de tiempo suficiente para una selección positiva de las células T deseadas. En una realización, el período de tiempo es de

aproximadamente 30 minutos. En una realización adicional, el período de tiempo es de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. Todavía, en otra realización preferida, el período de tiempo es de 10 a 24 horas o más. En una realización preferida, el período de tiempo de incubación es de 24 horas. Para el aislamiento de células T de pacientes de cáncer, el uso de tiempos de incubación más prolongados como 24 horas, puede aumentar el rendimiento celular.

Para efectuar el aislamiento de poblaciones diferentes de células T, los tiempos de exposición a la fuerza de concentración pueden ser variados o sometidos a impulsos. Por ejemplo, cuando esta fuerza es un imán, la exposición al imán o la resistencia del campo magnético se pueden variar y/o los tiempos de expansión se pueden variar para obtener el fenotipo específico de interés. La expresión de una diversidad de marcadores fenotípicos cambia a lo largo del tiempo; por lo tanto, puede ser escogido un valor puntual de tiempo particular para obtener una población específica de células T. Consecuentemente, dependiendo del tipo de célula que va a ser estimulada, el tiempo de estimulación y/o expansión puede ser de 10 semanas o menos, 8 semanas o menos, 4 semanas o menos, 2 semanas o menos, 10 días o menos o 8 días o menos (4 semanas o menos, incluye todos los intervalos de tiempo desde 4 semanas disminuyendo hasta 1 día (24 horas) o cualquier valor entre estos números). En algunas realizaciones, puede ser deseable clonar células T usando, por ejemplo, una dilución limitante o distribución celular, en el que puede ser necesario un tiempo de estimulación más prolongado. En algunas realizaciones, la estimulación y la expansión se pueden llevar a cabo durante 6 días o menos, 4 días o menos, 2 días o menos y en otras realizaciones durante un valor bajo de 24 o menos horas y, preferentemente 4-6 horas o menos (estos intervalos incluyen cualesquiera valores enteros entre ellos). Cuando la estimulación de células T se lleva a cabo durante períodos

de tiempo más cortos, la población de células T puede que no aumente en número tan pronunciadamente, pero la población proporcionará células T más estables y sanamente activadas que pueden continuar proliferando *in vivo* y se parecen más estrechamente a los grupos naturales de células T efectoras. Como la disponibilidad de una célula T helper a menudo es un factor limitante en las respuestas de anticuerpos a antígenos de proteínas, la capacidad de expandir selectivamente o infundir selectivamente una población con elevado contenido de CD 4^+ de células T en un sujeto es extremadamente ventajosa. Otras ventajas de estas poblaciones enriquecidas serán fácilmente evidentes en cuanto que las células T helper activadas que reconocen los antígenos presentados por linfocitos B suministran dos tipos de estímulos, contacto físico y producción de citoquinas, que dan lugar a la proliferación y diferenciación de células B.

Las células T que han sido expuestas a tiempos de estimulación variados pueden exhibir características diferentes. Por ejemplo, la sangre típica o los productos de células mononucleares de sangre periférica aferesados tienen una población de células T helper (T_H , CD 4^+) que es mayor que la población citotóxica o supresora de células T (T_C , CD 8^+). La expansión *ex vivo* de células T estimulando receptores CD3 y CD28 produce una población de células T que, antes de aproximadamente 8-9 días, consiste predominantemente en células T_H , mientras que después de aproximadamente 8-9 días, la población de células T comprende una población crecientemente mayor de células T_H . Consecuentemente, dependiendo de la finalidad del tratamiento, la infusión a un sujeto de una población de células T que comprende predominantemente células T_H puede ser ventajosa. Análogamente, si un subconjunto específico para antígenos de células T ha sido aislado, puede ser ventajoso expandir este subconjunto hasta un grado mayor.

Adicionalmente, además de los marcadores CD8, otros

marcadores fenotípicos varían significativamente pero, en gran parte de forma reproducible durante el transcurso del procedimiento de expansión celular.

La producción de citoquinas alcanza un valor pico en los pocos primeros días del procedimiento de expansión ex vivo. Consecuentemente, como se conoce que las citoquinas son importantes para mediar la activación de células T y funcionan también como una modulación de la respuesta inmune, estas citoquinas es probable que sean críticas en el desarrollo de un producto terapéutico de células T, es decir, que sean capaces de experimentar una reactivación tras un contacto con una estimulación adicional con antígenos. Las citoquinas importantes a este respecto incluyen, pero sin limitación IL-2, IL-4, TNF- α IFN- γ . Por tanto, obteniendo una población de células T durante los pocos primeros días de expansión o infundiendo estas células en un sujeto, se puede producir una ventaja terapéutica en la que se produce una activación y expansión adicionales de células T *in vivo*.

Además de las citoquinas y marcadores anteriormente expuestos, la expresión de moléculas de adhesión se conoce son importantes para la mediación de la activación de células T y la modulación de la respuesta inmune cambia también considerablemente, pero de forma reproducible, durante el transcurso del procedimiento de expansión ex vivo. Por ejemplo, el CD62L es importante para el alojamiento de células T en tejidos linfoides y para el tránsito de células T a sitios de inflamación. Bajo ciertas circunstancias de enfermedad o lesiones, la presencia de células T activadas en estos sitios puede ser desventajosa. Como la infra-regulación de CD62L se produce de forma temprana durante la activación, las células T podrían ser expandidas durante períodos de tiempo más cortos. Inversamente, unos períodos de tiempo más prolongados en el cultivo generarían

una población de células T con niveles superiores de CD62L y, por tanto, una mayor capacidad de dirigir a diana las células T activadas hasta estos sitios bajo otras condiciones preferidas. Otro ejemplo de un polipéptido cuya expresión varía a lo largo del tiempo es CD49d, una molécula de adhesión que está involucrada en el tránsito de linfocitos desde la sangre hasta espacios de tejidos en sitios de inflamación. La unión del ligando CD49d a CD4d permite también que la célula T reciba señales co-estimuladoras para la activación y proliferación a través de la unión mediante VCAM-1 o ligandos de fibronectina. La expresión de la molécula de adhesión CD54, involucrada en las interacciones de células T-APC y células T, así como el alojamiento para sitios de inflamación, cambia también en el transcurso de la expansión. Consecuentemente, las células T deben ser estimuladas durante períodos de tiempo seleccionados que coincidan con el perfil del marcador de interés y ser posteriormente recogidas e infundidas. Por tanto, las poblaciones de células T podrían ser adaptadas para expresar los marcadores que se cree que proporcionan la mayor ventaja terapéutica para la indicación que va a ser tratada.

En las diversas realizaciones, un experto en la técnica comprenderá que la supresión de la señal de estimulación de las células depende del tipo de superficie usada. Por ejemplo, si se usan gránulos paramagnéticos, entonces la separación magnética es la opción factible. Se describen en detalle técnicas de separación por medio de gránulos paramagnéticos en las instrucciones de los fabricantes (por ejemplo, DYNAL Inc., Oslo, Noruega). Adicionalmente, se puede usar una filtración si la superficie es un gránulo suficientemente grande para ser separado de las células. Además, está disponible en el comercio una diversidad de filtros de transfusión, que incluyen filtros de transfusión de 20 micrómetros y 80 micrómetros (Baxter) Consecuentemente, en la medida en que los gránulos sean más grandes que

el tamaño de malla del filtro, esta filtración es altamente eficaz. En una realización relacionada, los gránulos pueden pasar a través del filtro pero las células pueden permanecer, permitiendo así la separación. En una realización particular, la superficie biocompatible usada se degrada (es decir, es biodegradable) en el cultivo durante el período de exposición.

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que las metodologías de estimulación celular descritas en la presente memoria descriptiva se pueden llevar a cabo en una diversidad de entornos (es decir, recipientes). Por ejemplo, estos recipientes pueden ser matraces de cultivo, bolsas de cultivo o cualquier recipiente capaz de albergar células, preferentemente en un entorno esterilizado. En una realización de la presente invención, es útil también un bio-reactor. Por ejemplo, varios fabricantes preparan actualmente dispositivos que pueden ser usados para hacer crecer células y ser usados en combinación con los métodos de la presente invención. Véase, por ejemplo, Celdyne Corp., Houston, TX; Unisyn Technologies, Hopkinton, MA; Synthecon, Inc. Houston, TX; Aastrom Biosciences, Inc. Ann Arbor, MI; Wave Biotech LLC, Bedminster, NJ. Adicionalmente, las patentes que abarcan estos bio-reactores incluyen las patentes de EE.UU. n° 6.096.532, 5.985.653, 5.888.807 y 5.190.878.

En una realización, el imán usado para la estimulación y concentración simultánea de las células de la presente invención puede ser incorporado en la plataforma de base oscilante de un dispositivo bio-reactor como The Wave" (Wave Biotech LLC, Bedminster, NJ). El imán, o elemento magnetizable, puede estar incluido también en un recipiente de bio-reactor estándar como una unidad de aplicación cilíndrica. Este elemento magnético internamente constituido puede ser capaz de ser activado y desactivado en la medida deseada en diversos puntos en el procedimiento de cultivo

celular. El imán integrado, o elemento magnetizado, se coloca de forma que permita que emane un campo magnético a partir del mismo que pase a través del recipiente de cultivo. En ciertas realizaciones el imán, o elemento magnetizable es incorporado en una pared o, alternativamente en la estructura del recipiente de cultivo. En una realización adicional, las células pueden ser magnéticamente concentradas y/o activadas, magnéticamente separadas o aisladas en un punto deseado durante el cultivo, sin necesidad de transferir las células a una unidad de cultivo diferente o de separación magnética. El uso de este elemento magnético internamente constituido puede facilitar el cultivo, estimulación y concentración y el procedimiento de separación, para hacer posible la expansión y adaptación de poblaciones de células funcionales específicas para una infusión inmunoterapéutica en pacientes en terapias basadas en células o genes. Adicionalmente, este dispositivo proporciona un medio mejorado para la producción específica de moléculas, tanto moléculas internas como su secreción al exterior de las células.

El dispositivo magnético o magnetizable integrado como se describe anteriormente puede ser usado para separar los gránulos magnéticos del cultivo, reteniéndolos en el recipiente de cultivo, mientras las células deseadas y/o moléculas deseadas presentes en el medio de cultivo son separadas. Alternativamente, las células y/o moléculas deseadas pueden ser específicamente retenidas en la bolsa de cultivo u otro recipiente de cultivo adecuado, mediante interacción con los gránulos magnéticos que han sido revestidos con moléculas específicas, como se describe en la presente memoria descriptiva, que se unen a las células y/o moléculas deseadas. El dispositivo magnético o magnetizable de construcción interna hace posible el lavado de poblaciones celulares y la sustitución de medios en la bolsa de cultivo celular inmovilizando/concentrando magnéticamente células

con partículas específicas y haciendo fluir medios y otras soluciones a través de la bolsa. Este dispositivo elimina eficazmente la necesidad de un dispositivo de separación magnética separado proporcionando un sistema completamente
5 integrado, reduciendo así el tiempo de tratamiento y las operaciones manuales para los conectores tubulares, reduciendo el número de recipientes usados en el tratamiento y reduciendo la probabilidad de contaminación través del número de conexiones tubulares y de recipientes necesarios.
10 Este sistema de cultivo con dispositivo magnético o magnetizable integrado reduce también los volúmenes necesarios en el tratamiento y la formulación del cultivo.

Como se mencionó anteriormente, un aspecto de la presente invención se dirige al descubrimiento sorprendente de
15 que la combinación de una fuerza que induce la concentración de células, la ligadura de restos de superficies celulares y el cultivo de células en un sistema oscilante cerrado, da lugar a una mejora profunda en la activación y expansión de estas células. Consecuentemente, en una realización, se usa un bio-reactor con una plataforma de base
20 oscilante, por ejemplo, como el "The Wave" (Wave Biotech LLC, Bedminster, NJ), que permite velocidades variables de oscilación y a una diversidad de ángulos de oscilación diferentes. El experto en la técnica reconocerá que cualquier
25 plataforma que permita el movimiento apropiado para una expansión óptima de las células está dentro del contexto de la presente invención. En ciertas realizaciones, los métodos de estimulación y expansión de la presente invención proporcionan una oscilación del recipiente de cultivo du-
30 rante el procedimiento de cultivo a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 oscilaciones por minuto.

En ciertas realizaciones, la capacidad del recipiente del bio-reactor varía en el intervalo de aproximadamente
35 0,1 litro a aproximadamente 200 litros de medio. El experto

en la técnica apreciará fácilmente que el volumen usado para el cultivo variará dependiendo del número de células de partida y del número final de células deseadas. En realizaciones particulares, las células de la presente invención son sembradas a una concentración inicial de aproximadamente $0,2 \times 10^6$ células/ml a aproximadamente 5×10^6 células/ml y cualquier concentración entre ellas. En una realización particular, las células pueden ser cultivadas inicialmente en un entorno estático y transferida a un bio-reactor en una plataforma oscilante después de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más días de cultivo. En una realización relacionada, el procedimiento completo de estimulación, activación y expansión tiene lugar en un bio-reactor que comprende una plataforma oscilante y un imán integrado, como se describió anteriormente. Los bio-reactores ilustrativos incluyen, pero sin limitación "The Wave".

En una realización particular, los métodos de estimulación de células de la presente invención se llevan a cabo en un sistema cerrado, como un bio-reactor, que permita la perfusión de medio a velocidades variables, como desde aproximadamente 0,1 ml/minuto hasta aproximadamente 3 ml/minuto. Consecuentemente, en ciertas realizaciones, el recipiente de este sistema cerrado comprende un filtro de salida, un filtro de entrada y un orificio de toma de muestras para una transferencia esterilizada hasta y desde el sistema cerrado. En otras realizaciones, el recipiente de este sistema cerrado comprende una bomba de jeringuilla y un sistema de control para la transferencia esterilizada hasta y desde el sistema cerrado. Otras realizaciones proporcionan un mecanismo, como una celda de carga, para controlar en el aporte y la salida de medios mediante una verificación continua del peso del recipiente del bio-reactor. En una realización, el sistema comprende un tubo de escape. En otra realización, el bio-reactor de la presente invención comprende un bastidor de mezcla de gas CO₂

que suministra una mezcla de aire del ambiente y CO₂ al recipiente del bio-reactor y mantiene el recipiente a una presión positiva. En otra realización, el bio-reactor de la presente invención comprende un elemento de calentamiento variable.

En una realización, se permite que el medio entre en el recipiente comenzando en el día 2, 3, 4, 5, o 6 a aproximadamente a 0,5 a 5,0 litros por día hasta que se consigue el volumen final deseado. En una realización preferida, el medio entra en el recipiente a 2 litros por día comenzando en el día 4 hasta que el volumen alcanza los 10 litros. Una vez que se consigue el volumen deseado, se puede iniciar la perfusión de medios. En ciertas realizaciones, la perfusión de medios a través del sistema se inicia aproximadamente en el día 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 de cultivo. En una realización, la perfusión se inicia cuando el volumen es de aproximadamente 0,1 litro a aproximadamente 200 litros de medio. En una realización particular, la perfusión se inicia cuando el volumen final es de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó 20 litros.

En una realización adicional de la presente invención, las células son cultivadas durante hasta 5 días en un sistema estático cerrado y seguidamente son transferidas a un sistema cerrado que comprende un elemento oscilante para permitir la oscilación del recipiente de cultivo a velocidades variables.

En ciertos aspectos, las metodologías de la presente invención proporcionan la expansión de las células a una concentración aproximadamente entre 6×10^6 células/ml y aproximadamente 90×10^6 células/ml en menos de aproximadamente dos semanas. En particular, las metodologías de la presente invención proporcionan la expansión de células T hasta una concentración de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o 85×10^6 células/ml y todas las concentraciones en las mismas. En cier-

tas realizaciones, las células alcanzan una concentración deseada, como cualquiera de las anteriormente citadas, en aproximadamente el día 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 de cultivo. En una realización, las células T se expanden al menos en 1,5 veces en aproximadamente 24 horas desde aproximadamente el día 4 hasta aproximadamente el día 12 de cultivo. En una realización, las células T se expanden desde un número de partida de células de aproximadamente 100×10^6 hasta un total de aproximadamente 500×10^9 células/ml en menos de aproximadamente dos semanas. En otras realizaciones, las células T se expanden desde un número de partida de células de aproximadamente 500×10^6 hasta un total de aproximadamente 500×10^9 células en menos de aproximadamente dos semanas. En realizaciones relacionadas, las células se expanden desde un número de partida de aproximadamente $100\text{--}500 \times 10^6$ hasta un total de aproximadamente $200, 300$ o 400×10^9 células en menos de aproximadamente dos semanas.

En otras realizaciones de la presente invención, los métodos de expansión celular descritos en la presente memoria descriptiva y el medio acondicionado generado usando estos métodos pueden ser usados para la producción de exosomas. En las células, se pueden formar vesículas injertando la membrana tendosomal en el lumen del compartimento; este procedimiento da lugar a la formación de estructuras multivesiculares (MVB). La fusión de las MVB con las membranas de plasma da lugar a la secreción de pequeñas vesículas internas, denominadas exosomas.

Aunque los anticuerpos usados en los métodos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser fácilmente obtenidos a partir de fuentes públicas, como la entidad ATCC, los anticuerpos para moléculas accesorias de células T y el complejo CD3 pueden ser producidos mediante técnicas estándar. Las metodologías para generar anticuerpos para ser usados en los métodos de la invención son bien conoci-

das en la técnica y se exponen más en detalle en la presente memoria descriptiva.

Inmovilización de ligandos en una superficie

Como se indicó anteriormente, los métodos de la presente invención usan preferentemente ligandos unidos a un
 5 gránulo. El gránulo puede ser capaz de tener un ligando unido al mismo o integrado en el mismo y que sea biocompatible, es decir sustancialmente no tóxico para las células dianas que van a ser estimuladas. El gránulo biocompatible
 10 puede ser biodegradable o no biodegradable. El gránulo puede ser sintético y un producto sintético puede ser un polímero. El gránulo puede comprender colágeno, proteínas purificadas, péptidos purificados, polisacáridos, glicosaminoglicanos o composiciones de matriz extracelular. UN poli-
 15 sacárido puede incluir por ejemplo, celulosa, agarosa, dextrano, quitosano, ácido hialurónico o alginato. Otros polímeros pueden incluir poliésteres, poliéteres, polianhídridos, polialquilcianoacrilatos, poliacrilamidas, poliortoésteres, polifosfacenos, poli(acetatos de vinilo), copolímeros
 20 de bloques, polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE) o poliuretanos. El polímero puede ser ácido láctico o un copolímero. Un copolímero puede comprender ácido láctico y ácido glicólico (PLGA). Los gránulos no biodegradables pueden incluir polímeros como polidimetilsiloxano y
 25 poli(etilenoacetato de vinilo). Los gránulos biocompatibles incluyen, por ejemplo, vidrio (por ejemplo, biovidrio), colágeno, metal, hidroxapatita, aluminato, materiales bio-cerámicos, polímeros de ácido hialurónico, alginato, polímeros de ésteres acrílicos, polímeros de ácido láctico,
 30 polímeros de ácido glicólico, polímeros de ácido láctico/ácido glicólico, proteínas purificadas, péptidos purificados o composiciones de matrices extracelulares. Otros polímeros pueden incluir vidrio, sílice, silicio, hidroxapatita, hidrogeles, colágeno, acroleína, poliacrilamida,
 35 polipropileno, poliestireno, nilón o cualquier número de

polímeros orgánicos plásticos o sintéticos, o similares. El gránulo puede comprender una estructura biológica, como un liposoma o una célula.

En las diversas realizaciones, son útiles gránulos disponibles en el comercio (por ejemplo, partículas Miltenyi, Miltenyi Biotec, Alemania; gránulos de Sepharose, Pharmacia Fine Chemicals, Suecia; DYNABEADS®, Dynal Inc., New York; PURABEADS™, Prometic Biosciences).

Cuando se usan gránulos, el gránulo puede ser de cualquier tamaño que efectúe una estimulación de células diana. En una realización, los gránulos tienen preferentemente de aproximadamente 5 nanómetros a aproximadamente 500 μm de tamaño. Consecuentemente, la elección del tamaño del gránulo depende del uso particular para el que servirá el gránulo. Por ejemplo si el gránulo es usado en un agotamiento de monocitos, se escoge un tamaño pequeño para facilitar la ingestión de monocitos (por ejemplo, 2,8 μm y 4,5 μm de diámetro o cualquier tamaño que pueda ser abarcado como tamaños nanométricos; sin embargo, cuando se desea una separación de gránulos por filtración, se usan normalmente tamaños de gránulos de no menos de 50 μm . Adicionalmente, cuando se usan gránulos paramagnéticos, estos gránulos varían normalmente en el intervalo de tamaños de aproximadamente 2,8 μm a aproximadamente 500 μm y, más preferentemente de aproximadamente 2,8 μm a aproximadamente 50 μm . Finalmente, se pueden escoger nanopartículas supermagnéticas que pueden ser tan pequeñas como de aproximadamente 10^{-5} nm. Consecuentemente, como es fácilmente evidente a partir de la exposición anterior, puede ser usado virtualmente cualquier tamaño de partículas.

Un agente puede ser unido o acoplado o integrado en un gránulo mediante una diversidad de métodos conocidos y disponibles en la técnica. El agente puede ser un ligando natural, un ligando de proteína o un ligando sintético. La unión puede ser covalente o no covalente, electrostática o

hidrófoba y se puede realizar mediante una diversidad de medios de unión que incluyen, por ejemplo, química, mecánica, enzimática, electrostática u otros medios mediante los cuales un ligando es capaz de estimular las células. Por ejemplo, el anticuerpo para un ligando puede ser unido primero a un gránulo, o se puede unir avidina o estreptavidina al gránulo para la unión a un ligando biotinilado. El anticuerpo para el ligando puede estar unido al gránulo a través de un anticuerpo anti-idiotipo. Otros medios incluyen el uso de proteína A o proteína G, o moléculas de unión a anticuerpos no específico, unidas a los gránulos para una unión a un anticuerpo. Alternativamente, el ligando puede estar unido al gránulo por medios químicos, como reticulación al gránulo, usando reactivos reticulantes disponibles en el comercio (Pierce, Rockford, IL) u otros medios. En ciertas realizaciones, los ligandos están unidos de forma no covalente al gránulo. Adicionalmente, en una realización, los DYNABEADS® activados con tosilo o DYNABEADS® con grupos reactivos superficiales epoxi disponibles en el comercio son incubados con el ligando polipéptido de interés según las instrucciones del fabricante. Brevemente, estas condiciones incluyen normalmente una incubación en un tampón de fosfato de pH 4 a pH 9,5 a temperaturas que varían en el intervalo de 4 a 37°C.

En un aspecto, el agente, como ciertos ligandos, puede ser de un origen singular o de orígenes múltiples y puede ser anticuerpos o sus fragmentos mientras que, en otro aspecto el ligando co-estimulador es una molécula B7 (por ejemplo B7-1, B7-2). Estos ligandos son acoplados a la superficie mediante cualquiera de los diferentes medios de unión anteriormente expuestos. La molécula B7 que va a ser acoplada a la superficie puede ser aislada de una célula que expresa la molécula co-estimuladora, o puede ser obtenida usando una tecnología de DNA recombinante estándar y sistemas de expresión que permitan la producción y aisla-

miento de molécula(s) co-estimuladora(s), como se describe en la presente memoria descriptiva. Pueden ser usados también fragmentos, mutantes o variantes de una molécula B7 que retenga la capacidad de provocar una señal co-estimuladora en células T cuando son acoplados a la superficie de una célula. Además de ello, un experto en la técnica reconocerá que cualquier ligando útil en la activación en inducción en la proliferación de un conjunto de células T puede ser también inmovilizado sobre gránulos o superficies de recipientes de cultivo o cualquier superficie. Además, aunque la unión covalente del ligando al gránulo es una metodología preferida, puede ser usada también la adsorción o captura mediante un anticuerpo monoclonal secundario. La cantidad de un ligando particular unido a un gránulo puede ser fácilmente determinada mediante un análisis citométrico de flujo.

En una realización particular, la forma estimuladora de un molécula B7 o un anticuerpo anti-CD28 o fragmento del mismo está unida a la misma superficie de fase sólida que el agente que estimula el complejo TCR/CD3, como un anticuerpo anti-CD3.

Los gránulos pueden ser revestidos con combinaciones de anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD28. En realizaciones adicionales, las superficies pueden ser revestidas con tres o más agentes, como combinaciones de cualesquiera de los agentes descritos en la presente memoria descriptiva, por ejemplo, anticuerpo anti-CD3, anticuerpos anti-CD28 anticuerpos anti-4-1BB.

Cuando están acoplados a un gránulo, los agentes están acoplados al mismo gránulo (es decir, en formación "cis"). Los dos agentes son inmovilizados sobre gránulos, sobre el mismo gránulo, es decir, "cis". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 y el agente que proporciona la señal co-estimuladora es un anticuerpo anti-CD28; y ambos agentes

son co-inmovilizados al mismo gránulo en cantidades moleculares equivalentes. En una realización, se usa una relación 1:1 de cada anticuerpo unido a los gránulos para la expansión de células T CD4⁺ y el crecimiento de células T. En ciertos aspectos de la presente invención, se usa una relación de anticuerpos CD3:CD28 unidos a los gránulos talque se observa un aumento en la expansión de células T en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una realización particular, se observa un aumento de aproximadamente 0,5 a aproximadamente tres veces en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En una realización la relación de anticuerpo CD3: CD28 unido a los gránulos varía en el intervalo de 1:1 a 1:100 y todos los valores enteros entre ellos. En un aspecto de la presente invención, está unido más anticuerpo anti-CD28 a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es de menos de uno. En ciertas realizaciones de la invención, la relación de anticuerpo anti-CD28 a anticuerpo anti-CD3 unido a los gránulos es de más de 2:1. En una realización particular, se usa una relación 1:100 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En otra realización, se usa una relación 1:75 de CD3: CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En una realización adicional, se usa una relación 1:50 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En otra realización, se usa una relación 1:30 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En una realización preferida se usa una relación 1:10 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos. En otra realización, se usa una relación 1:3 de CD3:CD28 de anticuerpo unido a los gránulos.

En ciertos aspectos de la presente invención, están acoplados tres o más agentes a una superficie. En ciertas realizaciones, los agentes pueden estar acoplados a la misma superficie (es decir, en formación "cis") o a superficies separadas, (es decir, en formación "trans"). Alternativamente,

tivamente, uno o más agentes pueden ser acoplados a una superficie y el otro agente o agentes pueden estar en solución.

Agentes

5 Los agentes contemplados por la presente invención incluyen ligandos de proteínas, ligandos naturales y ligandos sintéticos. Los agentes que se pueden unir a restos de superficies celulares y, bajo ciertas condiciones provocar la ligadura y agregación que conduce a la señalización incluyen, pero sin limitación lectinas (por ejemplo, PHA, len-
10 tin-lectinas, concanavalina A), anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, polipéptidos, glicopéptidos, receptores, receptor de células B y ligandos de receptores de células T, componentes de matrices extracelulares, esteroi-
15 des, hormonas, por ejemplo, hormona del crecimiento, corticoesteroides, prostaglandinas, tetra-yodo-tironina), restos bacterianos (como lipopolisacáridos), mitógenos, antígenos, superantígenos y sus derivados, factores del crecimiento, citoquinas, proteínas virales (por ejemplo, HIV Gp-120),
20 moléculas de adhesión (como L-selectina, LFA-3, CD54, LFA-1), quimioquinas y moléculas pequeñas. Los agentes pueden ser aislados a partir de fuentes naturales como células, productos sanguíneos y tejidos o pueden ser aislados a partir de células propagadas *in vitro* o preparadas de forma
25 recombinante o mediante otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

En un aspecto de la presente invención, los agentes útiles incluyen ligandos que sean capaces de unirse al complejo CD3/TCR y/o CD28 y que inicien una activación o pro-
30 liferación, respectivamente. Consecuentemente, el término ligando incluye las proteínas que son el ligando "natural" para la proteína de superficie celular, como una molécula B7 para CD28, así como ligandos artificiales como anticuerpos dirigidos a la proteína de superficie celular. Estos
35 anticuerpos y sus fragmentos pueden ser producidos de

acuerdo con técnicas convencionales, como métodos de hibridomas y DNA recombinante y técnicas de expresión de proteínas. Los anticuerpos y fragmentos útiles puede ser derivados de cualesquiera especies, incluidos seres humanos o se
 5 pueden formar como proteínas quiméricas, que emplean secuencias a partir de más de una especie.

Pueden ser usados métodos bien conocidos en la técnica para generar anticuerpos, antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales que sean específicos para un ligando.
 10 Pueden ser producidos también anticuerpos en forma de inmunoglobulinas (Ig) tratadas por ingeniería genética o fragmentos de Ig diseñados para tener propiedades deseables. Por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, los anticuerpos pueden incluir una Ig recombinante que es una
 15 proteína de fusión quimérica que tiene al menos un dominio de región variable (V) de una primera especie de mamífero y al menos un dominio de región constante de una segunda especie de mamífero distinta. Lo más comúnmente, un anticuerpo quimérico tiene secuencias de regiones variables de
 20 muridos y secuencias de regiones constantes humanas. Esta inmunoglobulina quimérica de muridos/humana puede ser "humanizada injertando las regiones determinantes complementarias (CDR) que confieren especificidad de unión para un antígeno derivado de un anticuerpo de murido, en regiones de marcos para regiones V derivadas de humanos y regiones constantes derivadas de humanos. Los fragmentos de estas moléculas pueden ser generados mediante digestión proteolítica o, opcionalmente, mediante digestión proteolítica seguida de reducción suave de enlaces disulfuro y alquilación o mediante técnicas de ingeniería genética recombinante.
 25
 30

Los anticuerpos se define que son "inmunoespecíficos" si se unen específicamente al ligando con una constante de afinidad, K_a , mayor o igual a aproximadamente 10^4 M^{-1} , preferentemente mayor o igual a aproximadamente 10^5 M^{-1} , más
 35

preferentemente mayor o igual a aproximadamente 10^6 M^{-1} y, todavía más preferentemente mayor o igual a aproximadamente 10^7 M^{-1} . Las afinidades de los asociados o anticuerpos de unión se pueden determinar fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas por Scatchard et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci. USA 51:660, 1949) o mediante resonancia en una plasmón de superficie (BIAcore, Biosensor, Piscataway, NJ) See, e.g., Wolff et al., Cancer Res., 53:2560-2565, 1993).

Los anticuerpos pueden ser preparados generalmente mediante cualquiera de una diversidad de técnicas conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory). En una de estas técnicas, un animal es inmunizado con el ligando como antígeno para generar anti-sueros policlonales. Los animales adecuados incluyen conejos, ovejas, cabras, cerdos, ganado y pueden incluir especies de mamíferos más pequeños como ratones, ratas y hamsters.

Un inmunógeno puede estar comprendido por células que expresan el ligando, polipéptidos de ligandos purificados o parcialmente purificados o variantes o fragmentos de los mismos, o péptidos ligandos. Los péptidos ligandos pueden ser generados mediante escisión proteolítica o pueden ser químicamente sintetizados. Los péptidos para una inmunización pueden ser seleccionados analizando la estructura primaria, secundaria o terciaria del ligando según métodos conocidos por los expertos en la Técnica con el fin de determinar las secuencias de aminoácidos que generen más probablemente una respuesta antigénica en un animal hospedante (véase, por ejemplo, Novotny, Mol. Immunol. 28:201-207, 1991; Berzoksky, Science 229:932-40, 1985).

La preparación del inmunógeno puede incluir un acoplamiento covalente del polipéptido ligando o variante o fragmento del mismo, o péptido a otra proteína inmunógena, como

hemocianina de lapa californiana o albumina de suero bovino. Además, el péptido, polipéptido o células pueden ser emulsionados en un adyuvante (véase Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 1988 Cold Spring Harbor Laboratory). En general, después de la primera inyección, los animales reciben una o más inmunizaciones de refuerzo según un esugema preferible para la especie de animal. La respuesta inmune puede ser verificada periódicamente tomando sangre del animal, separando el suero y analizando el suero en un inmunoensayo, como un ensayo de Ouchterlony, para valorar el título de anticuerpos específicos. Una vez que se establece el título de anticuerpos, se pueden tomar muestras de sangre periódicamente de los animales para acumular los antisueros policlonales. Los anticuerpos policlonales que se unen específicamente al polipéptido o péptido del ligando pueden ser seguidamente purificados a partir de estos antisueros, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad usando proteína A o usando el polipéptido o péptido del ligando acoplado a un soporte sólido adecuado.

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a polipéptidos de ligandos o fragmentos o variantes de los mismos pueden ser preparados, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein (*Nature*, 256:495-497, 1975; *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976) y las mejoras para la misma. Los hibridomas, que pueden ser líneas celulares eucarióticas inmortales, pueden ser generados para que produzcan anticuerpos que tengan la especificidad deseada para el polipéptido del ligando o variante o fragmento del mismo. Un animal, por ejemplo, una rata o un hámster o preferentemente un ratón es inmunizado con el inmunógeno del ligando preparado como se describió anteriormente. Las células linfoides, lo más comúnmente células de bazo obtenidas de un animal inmunizado, pueden ser immortalizadas mediante fusión con un asociado de fusión de células de mieloma sensibilizadas con fármacos, preferentemente una que sea sin-

geneica con el animal inmunizado. Las células de bazo y las células de mieloma pueden ser combinadas durante unos pocos minutos con un agente favorecedor de la fusión de membranas, como polietilenglicol o un detergente no iónico, y seguidamente dispuestas en una placa a una baja densidad en un medio selectivo que soporte el crecimiento de células de hibridoma, pero no de células de mieloma. Un medio de selección preferido es HAT (hipoxantina, minoptericina, timidina). Después de un período de tiempo suficiente, habitualmente de aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de células. Las colonias únicas son aisladas y los anticuerpos producidos por las células pueden ser ensayados en cuanto a la actividad de unión al polipéptido del ligando o variante o fragmento del mismo. El anticuerpo productor de hibridomas con una afinidad y especificidad elevadas por el antígeno del ligando son los preferidos. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un polipéptido de ligando o variante o fragmento del mismo están contemplados por la presente invención.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser aislados de las materias sobrenadantes de cultivos de hibridomas. Un método alternativo para la producción de un anticuerpo monoclonal de muridos es inyectar las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un ratón singeneico. El ratón produce fluido de ascitos que contiene el anticuerpo monoclonal. Los contaminantes pueden ser separados del anticuerpo mediante técnicas convencionales como cromatografía, filtración sobre gel, precipitación o extracción.

Los anticuerpos monoclonales humanos pueden ser generados mediante cualquier número de técnicas. Los métodos incluyen, pero sin limitación, la transformación del virus Epstein Barr (EBV) de células de sangre periférica humana (véase la patente de EE.UU. n° 4.464.456), inmunización *in vitro* de células B humanas (véase, por ejemplo, Boerner et

al., J. Immunol. 147:86-95, 1991), fusión de células de bazo de ratones transgénicos inmunizados que portan genes de inmunoglobulina humana y fusión de células de bazo de ratones transgénicos inmunizados que portan genes de inmunoglobulina insertados mediante el cromosoma artificial de levadura (YAC) (véase, por ejemplo la patente de EE.UU. n° 5.877.397; Bruggemann et al., Curr. Opin. Biotechnol. 8:455-58, 1997; Jakobovits et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 764: 525-35, 1995) o aislamiento de bibliotecas de fagos de la región V de inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados para ser usados en la presente invención pueden ser generados. Un anticuerpo quimérico tiene al menos un dominio de región constante derivado de una primera especie de mamífero y al menos un dominio de región variable derivado de una segunda especie de mamífero distinta (véase, por ejemplo, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-55, 1984). Los más comúnmente, un anticuerpo quimérico puede ser construido clonando las secuencias de polinucleótidos que codifican al menos un dominio de región variable derivado de un anticuerpo monoclonal no humano, como la región variable derivada de un anticuerpo monoclonal de murino, rata o hámster en un vector que contiene secuencias que codifican al menos una región constante humana. (véase, por ejemplo, Shin et al., Methods Enzymol. 178:459-76, 1989; Walls et al., Nucleic Acids Res. 21:2921-29, 1993). La región constante humana escogida puede depender de las funciones efectoras deseadas para el anticuerpo particular. Otro método conocido en la técnica para generar anticuerpos quiméricos es la recombinación homologa (patente de EE.UU. n° 5. 482.856). Preferentemente, los vectores serán transfectados en células eucarióticas para la expresión estable del anticuerpo quimérico.

Un anticuerpo quimérico no humano/humano puede ser adicionalmente por ingeniería genética para crear un anti-

cuerpo "humanizado". Este anticuerpo tiene una pluralidad de CDR derivados de una inmunoglobulina de una especie de mamífero no humano al menos una región marco variable humana y al menos una región constante de inmunoglobulina humana. La humanización puede producir un anticuerpo que tiene una afinidad de unión disminuida en comparación con el anticuerpo monoclonal no humano o el anticuerpo quimérico. Por lo tanto, los expertos en la técnica usarán una o más estrategias para diseñar anticuerpo humanizados.

En ciertas realizaciones, el uso de fragmentos de unión a antígenos o anticuerpos puede ser preferido. Estos fragmentos incluyen fragmentos Fab o fragmentos $F(ab')_2$ que pueden ser preparados mediante digestión proteolítica con papaína o pepsina, respectivamente. Los fragmentos de unión a antígenos pueden ser separados de los fragmentos Fc mediante cromatografía de afinidad, por ejemplo,, usando proteína A inmovilizada o polipéptido de ligando inmovilizado o una variante o fragmento de los mismos. Un método alternativo para generar fragmentes Fab incluye reducción suave de fragmentos $F(ab')_2$ seguida de alquilación (véase, por ejemplo, Weir, Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston).

Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera no humanas, humanas o humanizadas de cualquiera de las moléculas de Ig anteriormente descritas pueden ser construidas como fragmentos de cadena única Fv (sFv) (anticuerpos de cadena única). Véase, por ejemplo, Bird et al., Science 242:423-426, 1988; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988. Las proteínas de fusión multifuncionales pueden ser generadas enlazando secuencias de polinucleótidos que codifican un marco interno sFv con secuencias de polinucleótidos que codifican diversas proteínas efectoras. Estos materiales son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento EP-B1-0318554, patente de EE.UU n° 5.132.405, patente de EE.UU. n°

5.091.513 y patente de EE.UU. n° 5.476.786.

Un método adicional para seleccionar anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de ligando o variante o fragmento de los mismos es mediante exhibición de fagos (véase, por ejemplo, Winter et al., *Annul. Rev. Immunol.* 12:433-55, 1994; Burton et al., *Adv. Immunol.* 57:191-280, 1994). Se pueden crear bibliotecas combinatoriales de genes de regiones variables de inmunoglobulina humana o de múridos en vectores de fagos que se pueden separar para seleccionar fragmentos de Ig (Fab, Fv, sFv, o multimeros de los mismos) que se unan específicamente a un polipéptido de ligando o variante o fragmento del mismo (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.223.409; Huse et al., *Science* 246: 1275-81, 1989; Kang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363-66, 1991; Hoogenboom et al., *J. Molec. Biol.* 227: 381-388, 1992; Schlebusch et al., *Hybridoma* 16:47-52, 1997 y referencias citadas en las mismas).

Poblaciones celulares

Con respecto a las células T, las poblaciones de células T que resultan de las diversas metodologías de expansión descritas en la presente memoria descriptiva pueden tener una diversidad de propiedades fenotípicas específicas dependiendo de las condiciones empleadas. Estas propiedades fenotípicas incluyen la expresión aumentada de CD25, CD154, IFN- γ y GM-CSF, así como la expresión alterada de CD137, CD34, CD62L y CD49d. La capacidad de controlar diferencialmente la expresión de estos restos puede ser muy importante. Por ejemplo, los niveles más elevados de expresión superficial de CD154 sobre "células T adaptadas", a través del contacto con moléculas CD40 expresadas en células que presentan antígenos (como células dendríticas, monocitos e incluso células B leucémicas o linfomas), mejorarán la presentación de antígenos y la función inmune. Estas estrategias están siendo actualmente empleadas por diversas empre-

sas para ligar CD40 a través de anticuerpos o CD40L recombinante. La aproximación descrita en la presente memoria descriptiva permite que esta misma señal sea suministrada de una manera más fisiológica, por ejemplo, mediante la

5 célula T. La capacidad de aumentar la secreción de IFN- γ adaptando el procedimiento de activación de células T (XCELLERATE) podría ayudar a favorecer la generación de respuestas inmunes de tipo TH1, importantes para las respuestas anti-tumorales y anti-virales. Como el CD154, la

10 expresión aumentada de GM-CSF puede servir para mejorar la función de APC, particularmente a través de su efecto favorecedor de la maduración de progenitores de APC en forma de APC más funcionalmente competente, como las células dendríticas. La alteración de la expresión de CD137 y CD134 puede

15 afectar la capacidad de una célula T para resistir o ser susceptible a señales apoptóticas. El control de la expresión de receptores de adhesión/alojamiento, como CD62L y/o CD49d puede determinar la capacidad de células T infundidas para albergar órganos linfoides, sitios de infección o si-

20 tios de tumores.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una población o composición de células T que ha sido agotada de células CD8⁺ antes de la expansión. En una realización, las células CD8⁺ son agotadas por anticuerpos dirigidos al marcador CD8⁺. Un experto en la técnica será capaz fácilmente de identificar una diversidad de metodologías particulares para agotar una muestra de células CD8⁺ o, inversamente enriquecer el contenido de células CD8⁺.

25

Las propiedades fenotípicas de las poblaciones de

30 células T de la presente invención pueden ser verificadas mediante una diversidad de métodos que incluyen métodos de citometría de flujo estándar y métodos ELISA conocidos por los expertos en la técnica.

Métodos de uso

Generalmente, las células estimuladas mediante los métodos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser utilizadas en el tratamiento y prevención de cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, disfunción inmune relacionada con el envejecimiento u otro estado de enfermedad en el que se deseen estas células para el tratamiento.

Además de los métodos anteriormente descritos, las células estimuladas mediante los métodos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser utilizadas en una diversidad de contextos.

Con respecto al ejemplo prototípico de células T, las metodologías descritas en la presente memoria descriptiva pueden ser usadas para expandir selectivamente una población de células T CD8⁺ para ser usadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas cáncer e inmunoterapia. Como consecuencia, puede ser producida una población fenotípicamente única de células T, que es policlonal con respecto a la reactividad de antígenos, pero esencialmente homogénea con respecto a CD8⁺. Además, el método permite la expansión de una población de células T en números suficientes para reconstituir la población de células T CD8⁺ total de un individuo (la población de linfocitos en un individuo es de aproximadamente $3-5 \times 10^{11}$). La población de células T resultante puede ser también genéticamente transducida y usada para inmunoterapia o puede ser usada en métodos de análisis *in vitro* de agentes infecciosos. Por ejemplo, una población de linfocitos de infiltración en tumores puede ser obtenida a partir de un individuo afectado de cáncer y las células T pueden ser estimuladas para proliferar hasta números suficientes. La población de células T resultante puede ser genéticamente transducida para el factor de necrosis tumoral (TNF) u otras proteínas (por ejemplo, cualquier número de citoquinas, inhibidores de apoptosis (por ejemplo, Bcl-2), genes que protegen las células de una in-

fección por HIV como RevM10 o intraquinas y similares, moléculas de dirección a diana, moléculas de adhesión y/o alojamiento y cualquier variedad de anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, Scfv) y ser proporcionada
5 al individuo.

Los métodos para estimular y expandir una población de células T específica para antígenos son útiles en situaciones terapéuticas en las que es deseable sobre-regular una respuesta inmune (por ejemplo, inducir una respuesta o mejorar una respuesta existente) tras la administración de
10 las células T a un sujeto. Por ejemplo, el método puede ser usado para mejorar una respuesta de células T contra antígenos asociados a un tumor. Las células tumorales de un sujeto expresan normalmente antígenos asociados a tumores pero
15 pueden ser incapaces de estimular una señal co-estimuladora en células T (por ejemplo, porque carecen de expresión de moléculas co-estimuladoras). Por tanto, las células tumorales se pueden poner en contacto con células T del sujeto *in vitro* y expandir células T específicas para
20 antígenos según el método de la invención y hacer volver las células T al sujeto.

Consecuentemente, en una realización, pueden ser tratadas enfermedades malignas como linfoma que no es de Hodgkins (NHL) y leucemia linfocítica crónica de células B (B-
25 CLL). Aunque han sido ensayados estudios iniciales usando células T expandidas en NHL (véase Liebowitz et al., Curr. Opin. Onc. 10:533-541, 1998), las poblaciones de células T de la presente invención ofrecen características fenotípicas únicas que pueden mejorar enormemente el éxito de una
30 inmunoterapia proporcionando un injerto y una reactividad aumentados (probablemente suministrados por la estimulación de la señal de CD28). Sin embargo, los pacientes con B-CLL presentan dificultades especiales, que incluyen números de células T relativamente bajos con una elevada carga de
35 células leucémicas en la sangre periférica, acompañado de

una inmunosupresión general de células T. Las poblaciones de células T de la presente invención pueden proporcionar una eficacia enormemente mejorada para tratar esta enfermedad y, especialmente, cuando se combinan con una terapia de trasplante de células madre. Consecuentemente, el aumento de la función de células T y la actividad de células T anti-CLL con gránulos co-inmovilizados anti-CD3 y anti-CD28 sería ventajoso.

Por ejemplo, dada la expresión deficiente de CD154 el ligando para CD40 sobre pacientes de B-CLL ha sido citado como un defecto inmunológico principal de la enfermedad, las poblaciones de células T de la presente invención que pueden proporcionar niveles elevados sostenidos de expresión de CD154 tras una re-infusión podrían ayudar en su tratamiento. Los investigadores informan que en las CLL, la capacidad de las células T de un paciente para expresar CD154 es escasa, así como la capacidad de las células B leucémicas para expresar CD80 y CD86. El fallo de las células B leucémicas en las CLL para expresar adecuadamente los ligando para CD28 podría dar lugar a un fallo para activar completamente células T con respuesta a tumores y, por lo tanto, puede representar el mecanismo que subyace en el estado de tolerancia aparente de las células T. Unos estudios en los que las CD40 están involucradas en las células B CLL, a través de anticuerpos anti-CD40 solubles o través de células B leucémicas transducidas con CD154, parece que corrige la escases de la expresión de CD80 y CD86 y sobre-regula la expresión de superficie de MHC. Kato et al., J. Clin. Invest. 101:1133-1141, 1998; Ranheim and Kipps, J. Exp. Med. 177:925-935, 1993. Las células tratadas de esta forma fueron capaces de estimular respuestas anti-tumorales específicas de células T.

Con la expresión mejorada de CD154 sobre la superficie de la población de células de la presente invención, sería de esperar que estas células T interaccionen con células B-

CLL autólogas y que aumentaría la inmunogenicidad del tumor dirigiendo en sentido ascendente la expresión de MHC, CD80 y CD86. Esto a su vez, debe conducir a una fuerte respuesta antitumoral. Adicionalmente, un experto en la técnica comprenderá fácilmente que el tratamiento de un paciente con células T expandida ex vivo de la presente invención puede ser combinado con terapias de cáncer tradicionales como la quimioterapia. A este respecto, por ejemplo, un paciente puede ser tratado con un agente como Fludarabine o Campath (Berlex Laboratories, Montville, NJ, USA) seguido de infusión con poblaciones de células T de la presente invención o ambos.

La invención proporciona adicionalmente métodos para expandir selectivamente una subpoblación específicas de células T a partir de una población mixta de células T. En particular, la invención proporciona poblaciones específicamente enriquecidas de células T que tienen una relación mucho mayor de células T doble positivas CD8⁺.

La observación de la presente memoria descriptiva de que los tratamientos fenotípicos de células T activadas varían a lo largo del tiempo durante el procedimiento de expansión, combinado con el hecho de que las células T se ha demostrado que son activadas en pocas horas (Iezzi et al., Immunity 8: 89-95, 1998). Consecuentemente, en combinación con las metodologías descritas en la presente memoria descriptiva, esto proporciona la capacidad de expandir un subconjunto que ha sido adaptado de una población de células T en un período de tiempo corto. En una realización, esta técnica puede ser utilizada junto al lecho de un sujeto, en una modalidad de tratamiento en ambulatorio, o en el hogar del sujeto, de forma análoga al uso de una diálisis de riñón. Por ejemplo, un método o dispositivo en el que las células T son incubadas en contacto con señales de activación (por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 y similares) y hechos retornar al paciente de forma inmediata

en un flujo continuo o después de un período de expansión de pocas horas. En un aspecto, estas técnicas de expansión podrían usar cámaras aisladas con componentes de filtración, como los gránulos 3x28 o micropartículas análogamente
5 revestidas mezcladas con un flujo continuo de células sanguíneas/concentradas. En otra realización, los gránulos con un aparato pueden estar revestidos o conjugados directamente (incluido monovalentemente) o indirectamente (por ejemplo, estreptavidina/biotina y similares) con anticuerpos u
10 otros componentes para estimular la activación y expansión de células T. Por ejemplo, puede ser utilizada una trayectoria continua de fluido desde el paciente a través de un dispositivo de recogida de sangre/células y/o un dispositivo desechable que contiene dos o más anticuerpos inmovili-
15 zados (por ejemplo, anti-CD3 y anti-CD28) u otros componentes para estimular receptores necesarios para la activación de células T antes de hacer retornar las células al sujeto (inmovilizado en superficies de plástico o sobre micropartículas separables). Este sistema podría incluir un ins-
20 trumento de leucaferesis con un conjunto desechable esterilizado adosado al conjunto desechable existente del fabricante, o puede ser una adaptación al conjunto desechable del fabricante (por ejemplo, la plataforma de gránulos en la que los anticuerpos/componentes de activación son inmo-
25 vilizados/contenidos está en la bolsa/recipiente para la recogida de células mononucleares de sangre periférica durante la aferesis). Adicionalmente, la superficie sólida/plataforma de superficie puede formar parte de una inserción desprendible que es insertada en un de las cámaras
30 del dispositivo o estar físicamente presente en uno de los componentes desechable. En otra realización del aspecto de flujo continuo anteriormente expuesto, el sistema puede comprender poner en contacto las células con los compo-
35 nentes activantes a temperatura ambiente o a temperatura fisiológica, usando una cámara con un dispositivo de recogida

de sangre o una cámara de incubación ajustada en serie con la trayectoria de flujo al paciente.

En otro ejemplo, se extrae sangre en un dispositivo desechable autónomo directamente desde el paciente que contiene dos o más anticuerpos inmovilizados (por ejemplo anti-CD3 y anti-CD28) u otros componentes para estimular los receptores necesarios para la activación de células T antes de que las células sean administradas al sujeto (por ejemplo, inmovilizadas sobre superficies de plástico o sobre micropartículas separables). En otra realización, el dispositivo desechable puede comprender un recipiente (por ejemplo, una bolsa de plástico o un frasco) con conexiones tubulares apropiadas que sean adecuadas para una combinación/acoplamiento con jeringuillas y dispositivos de acoplamiento esterilizados. Este dispositivo contendrá una superficie sólida para la inmovilización de componentes de activación de células T (por ejemplo, anticuerpo anti-CD3 y anti-CD28); estos pueden ser las superficies del propio recipiente o una inserción y normalmente tendrán una superficie lisa, una superficie lisa mateada, una superficie irregular, una tableta porosa, fibra, ferro-fluido clínicamente aceptable/seguro, gránulos, etc.). Adicionalmente, cuando se usa el dispositivo autónomo, el sujeto puede permanecer conectado al dispositivo o el dispositivo puede ser separable del paciente. Adicionalmente, el dispositivo puede ser utilizado a temperatura ambiente o incubado a temperatura fisiológica, usando un incubador portátil.

Como los dispositivos y métodos para recoger y tratar sangre y productos sanguíneos son bien conocidos, un experto en la técnica reconocerá fácilmente que con las explicaciones proporcionadas en la presente memoria descriptiva, puede ser fácilmente diseñada una diversidad de dispositivos que cumplan las necesidades anteriormente expuestas o dispositivos existentes modificados. Consecuentemente, como estos dispositivos y métodos no están limitados por las

realizaciones específicas expuestas en la presente memoria descriptiva, sino que incluirían cualquier dispositivo o metodología capaz de mantener la esterilidad y que mantenga la sangre en forma fluida de forma que la activación del complemento es reducida y en que los componentes necesarios para la activación de células T (por ejemplo, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 o ligando para los mismos) pueden ser inmovilizados o separados de la sangre o producto sanguíneo antes de la administración al sujeto. Adicionalmente, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica, puede ser utilizada una diversidad de productos sanguíneos conjuntamente con los dispositivos y métodos descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, los métodos y dispositivos podrían ser usados para proporcionar una activación rápida de células T a partir de sangre completa crioconservada, células mononucleares de sangre periférica, otras células derivadas de sangre crioconservada o líneas de células T crioconservadas tras una descongelación y antes de la administración al sujeto. En otro ejemplo, los métodos y dispositivos pueden ser usados para acelerar la actividad de un producto de células T previamente expandido ex vivo o una línea de células T antes de la administración al sujeto, proporcionando así un producto de células T altamente activado. Finalmente, como se apreciará fácilmente, los métodos y dispositivos anteriores pueden ser utilizados para una terapia celular autóloga o alogeneica simultáneamente con el sujeto y el donante.

Los métodos de la presente invención pueden ser utilizados también con vacunas para aumentar la reactividad del antígeno y aumentar el efecto *in vivo*. Adicionalmente, como las células T expandidas mediante la presente invención tienen una semi-vida relativamente larga en el cuerpo, estas células podrían actuar como vehículos perfectos para una terapia génica, portando una secuencia deseada de ácidos nucleicos de interés y albergándola potencialmente en

sitios de cáncer, enfermedad o infección. Consecuentemente, las células expandidas mediante la presente invención pueden ser suministradas a un paciente en combinación con una vacuna, una o más citoquinas, uno o más anticuerpos terapéuticos, etc. Virtualmente cualquier terapia que se aproveche de una población de células T más estable está dentro del contexto de los métodos de uso descritos en la presente memoria descriptiva.

En ciertas realizaciones, las células estimuladas y las células expandidas usando los métodos descritos en la presente memoria descriptiva, u otros métodos conocidos en la técnica, en los que las células T sean estimuladas y expandidas hasta niveles terapéuticos, pueden ser usadas para prevenir o tratar enfermedades provocadas por organismos infecciosos. Las células T pueden ser estimuladas y expandidas como se describe en la presente memoria descriptiva o usando otros métodos conocidos en la técnica en los que las células T son estimuladas y expandidas hasta niveles terapéuticos, para inducir o mejorar la respuesta a organismos infecciosos como virus, bacterias, parásitos y hongos. Los organismos infecciosos pueden comprender virus (por ejemplo, virus de RNA, virus de DNA, virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de hepatitis A, B y C, virus simple de herpes (HSV), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (EBV), virus de papiloma humano (HPV)), parásitos (por ejemplo, agentes patógenos protozoareos y metazoareos como especies de *Plasmodia*, especies de *Leishmania*, especies de *Schistosoma*, especies de *Trypanosoma*), bacterias (por ejemplo, *Mycobacteria*, en particular, *M. tuberculosis*, *Salmonella*, *Streptococci*, *E. coli*, *Staphylococci*), hongos (por ejemplo, especies de *Candida*, especies de *Aspergillus*), *Pneumocystis carinii*, y priones (Los priones se conoce que infectan animales para provocar tembladera, una enfermedad degenerativa transmisible del sistema nervioso de ovejas y cabras, así como la encefalopatía espongiforme bovina (BSE)

o "enfermedad de las vacas locas" y la encefalopatía espon-
giforme felina de los gatos. Cuatro enfermedades de priones
que se conoce que afectan a seres humanos son (1) kuru (2)
enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), (3) enfermedad de
5 Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), y (4) insomnio fami-
liar fatal (FFI)). Como se usa en la presente memoria des-
criptiva "Prion" incluye todas las formas de priones que
provocan la totalidad o cualquiera de estas enfermedades y
otras en animales usados y, en particular, en seres humanos
10 y animales de granja domesticados.

Las células T pueden ser estimuladas y expandidas como
se describe en la presente memoria descriptiva o usando
métodos conocidos en la técnica en los que las células T
son estimuladas y expandidas hasta niveles terapéuticos,
15 para inducir o mejorar la respuesta inmune en un sujeto o
para la prevención o tratamiento de una diversidad de
cánceres. Las células T de la presente invención son útiles
para prevenir o tratar melanoma, linfoma que no es de Hodg-
kin, linfoma de células T cutáneas, enfermedad de Hodgkin,
20 leucemia, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, cáncer de
mamas, cáncer de próstata, cáncer colo-rectal, cáncer de
riñón, carcinoma de células renales, cáncer uterino, cáncer
pancreático, cáncer esofágico, cáncer de cerebro, cáncer de
pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, cáncer
25 testicular, cáncer gástrico, cáncer esofágico, mieloma
múltiple, hepatoma, leucemia linfoblástica aguda (ALL),
leucemia mielogenosa aguda (AML), leucemia mielogenosa
crónica (CML) y leucemia linfocítica crónica (CLL) u otros
cánceres.

30 En ciertas realizaciones, las células T estimuladas y
activadas usando los métodos de la presente invención, u
otros métodos conocidos en la técnica, en los que las célu-
las T son estimuladas y expandidas hasta niveles terapéuti-
cos, pueden ser usadas para el tratamiento de enfermedades
35 que portan nódulos linfáticos. A este respecto, esta enfer-

medad incluye una diversidad de cánceres y enfermedades infecciosas como se describe en la presente memoria descriptiva. Los estados ilustrativos incluyen, pero sin limitación, linfoma que no es de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, 5 linfadenopatía angioinmunoblástica y leucemia linfocítica crónica. Las enfermedades infecciosas ilustrativas incluye, pero sin limitación toxoplasmosis, histoplasmosis, CMV, EBV, coccidiomicosis, tuberculosis, HIV y similares. Las enfermedades no infecciosas que incluyen nódulos linfáticos se pueden aprovechar también del tratamiento con las células 10 descritas en la presente memoria descriptiva, como la sarcoidosis. Los cánceres diana incluyen tumores sólidos que han tenido metástasis desde un sitio primario hasta un nódulo linfático y que pueden estar sistémicamente extendidos (por ejemplo, tumores sólidos de cualquier número de 15 cánceres, como se describe en la presente memoria descriptiva). En ciertas realizaciones, el tratamiento es para pacientes con una enfermedad documentada mediante técnicas estándar como exploraciones CT o para pacientes que se conocen que están en riesgo elevado de tener una enfermedad 20 de nódulos linfáticos. En ciertas realizaciones, las células T estimuladas y activadas usando los métodos de la presente invención, u otros métodos conocidos en la técnica en los que las células T son estimuladas y expandidas hasta niveles terapéuticos, son proporcionados conjuntamente con 25 agentes que albergan nódulos linfático (dianas). En ciertas realizaciones, las vacunas, adyuvantes o células dendríticas pueden ser administrados en las cercanías o en un nódulo linfático a continuación de la administración de las células T. En una realización adicional, las células T son 30 usadas como un portador para suministrar agentes a nódulos linfáticos (por ejemplo DNA, RNA, proteínas, toxinas, agentes de quimioterapia, etc.).

En ciertas realizaciones, las células T estimuladas y 35 activadas usando los métodos de la presente invención, u

otros métodos conocidos en la técnica en los que las células T son estimuladas y expandidas hasta niveles terapéuticos pueden ser usados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como, pero sin limitación, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina, enfermedad de Addison, enfermedad celiaca, síndrome de agotamiento crónico, enfermedad de inflamación intestinal, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, fibromialgia, lupus sistémico eritematoso, soriasis, síndrome de Sjogren, enfermedad de hipertiroidismo/Graves, enfermedad de hipotiroidismo/Hashimoto, diabetes dependiente de insulina (tipo 1), miastenia grave, endometriosis, escleroderma, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Wegener, glomerulonefritis, anemia aplástica, hemoglobinuria nocturna paroxismal, síndrome mielodisplástico, purpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, síndrome de Evan, síndrome inhibidor de Factor VIII, vasculitis sistémica, dermatomiositis, polimiositis y fiebre reumática.

20 Composiciones farmacéuticas

Las poblaciones de células T de la presente invención pueden ser administradas aisladamente o en forma de una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes como IL-2 u otras citoquinas o poblaciones celulares. Brevemente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender una población de células diana como se describe en la presente memoria descriptiva, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Estas composiciones pueden comprender tampones como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; hidratos de carbono como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos como glicina; antioxidantes; 35 agentes quelantes como EDTA o glutatión; adyuvantes (por

ejemplo hidróxido de aluminio) y conservantes. Las composiciones de la presente invención son formuladas preferentemente para una administración intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas de una manera apropiada para la enfermedad que va a ser tratada (o prevenida). La cantidad y frecuencia de la administración se determinarán mediante factores como el estado del paciente, el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosificaciones apropiadas pueden ser determinadas mediante ensayos clínicos.

La respuesta inmune inducida en un sujeto administrando células T estimuladas y activadas usando los métodos descritos en la presente memoria descriptiva, u otros métodos conocidos en la técnica y en los que las células T son estimuladas y expandidas hasta niveles terapéuticos, pueden incluir respuestas inmunes celulares mediadas por células T citotóxicas, capaces de destruir células tumorales e infectadas, células T reguladoras y respuestas de células T helper. Pueden ser inducidas respuestas inmunes humorales, mediadas principalmente por células T de helper capaces de activar células B, que conducen por tanto a la producción de anticuerpos. Se puede usar una diversidad de técnicas para analizar el tipo de respuestas inmunes inducidas por las composiciones de la presente invención, que están bien descritas en la técnica, por ejemplo, por Coligan et al. *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons Inc. (1994).

Cuando se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad anti-tumoral eficaz", "una cantidad eficaz inhibidora de tumores" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención que va a ser administrada puede ser determinada mediante un facultativo teniendo en consideración las diferencias individuales de edad, peso, tamaño tumoral, alcance

de la infección o metástasis y estado del paciente (sujeto). Se puede establecer generalmente que una composición farmacéutica que comprende las células T descritas en la presente memoria descriptiva puede ser administrada a una dosificación de 10^4 a 10^7 células/kg de peso corporal, preferentemente 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, que incluyen todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de células T pueden ser administradas también muchas veces a estas dosificaciones. Las células pueden ser administradas usando técnicas de infusión que son comúnmente conocidas en inmunología (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988). La dosificación óptima y el régimen de tratamiento para un paciente particular pueden ser fácilmente determinados por un experto en la técnica de la medicina verificando el paciente en cuanto a indicios de enfermedad y ajustando consecuentemente el tratamiento.

Normalmente, en estudios de inmunoterapia adoptiva, las células T específicas para antígenos son administradas aproximadamente a 2×10^9 hasta 2×10^{11} células al paciente (véase, por ejemplo la patente de EE.UU. n° 5.057.423). En algunos aspectos de la presente invención, particularmente en el uso de células alogeneicas o xenogeneicas, pueden ser administrados números inferiores de células, en el intervalo de 10^6 /kilogramo (10^6 - 10^{11} por paciente). En ciertas realizaciones, las células T son administradas a 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 2×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , o 1×10^{12} células al sujeto. Las composiciones de células T pueden ser administradas muchas veces a dosificaciones dentro de estos intervalos. Las células pueden ser autólogas o heterólogas para el paciente que experimenta la terapia. Si se desea, el tratamiento puede incluir también la administración de mitógenos (por ejemplo, PHA) o linfoquinas, citoquinas y/o quimioquinas (por ejemplo, GM-CSF, IL-4, IL-3, Flt3-L, RANTES, MIP1 α , etc.) como

se describe en la presente memoria descriptiva para mejorar la inducción de la respuesta inmune.

La administración de las presentes composiciones se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, que incluye inhalación de aerosol, inyección ingestión transfu-
5 sión, implantación o trasplante. Las composiciones descri-
tas en la presente memoria descriptiva pueden ser adminis-
tradas a un paciente por vía subcutánea intradermal, intra-
tumoral, intranodal, intramedular, intramuscular por inyec-
10 ción intravenosa (I.V.) o intraperitoneal. En una realiza-
ción, las composiciones de células T de la presente inven-
ción se administran a un paciente mediante inyección intra-
dermal o subcutánea. En otra realización, las composiciones
de células T de la presente invención se administran prefe-
15 rentemente mediante inyección I.V. Las composiciones de
células T pueden ser inyectadas directamente en un tumor,
nódulo linfático o sitio de infección.

Todavía, en otra realización, la composición farmacéu-
tica puede ser suministrada en un sistema de liberación
20 controlada. En una realización, puede ser usada una bomba,
(véase Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Sefton 1987,
CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980;
Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med.
321:574). En otra realización, pueden ser usados materiales
25 polímeros (véase Medical Applications of Controlled Re-
lease, 1974, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton,
Fla.; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design
and Performance, 1984, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New
York; Ranger and Peppas, 1983; J. Macromol. Sci. Rev. Ma-
30 cromol. Chem. 23:61; véase también Levy et al., 1985,
Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351;
Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105). Todavía en otra
realización, un sistema de liberación controlada puede ser
colocado en las proximidades del agente terapéutico, requi-
35 riendo así solamente una fracción de la dosis sistémica

(véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, 1984, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., vol. 2, pág. 115-138).

Las composiciones de células T de la presente invención puede ser administradas también usando cualquier número de matrices. Las matrices han sido utilizadas durante un cierto número de años dentro del contexto de la ingeniería de tejidos (véase, por ejemplo, Principles of Tissue Engineering (Lanza, Langer, and Cluck (eds.)), 1997. La presente invención utiliza estos materiales dentro del nuevo contexto de actuar como un órgano linfoide artificial para soportar, mantener o modular el sistema inmune, normalmente a través de la modulación de células T. consecuentemente, la presente invención puede utilizar estas composiciones y formulaciones de matrices que han demostrado utilidad en la ingeniería de tejidos. Consecuentemente, el tipo de matriz que puede ser usado en las composiciones, los dispositivos y métodos de la invención son virtualmente ilimitados y pueden incluir matrices tanto biológicas como sintéticas. En un Ejemplo particular, se utilizan las composiciones y dispositivos expuestos en las patentes de EE.UU. n° 5.980.889, 5.913.998, 5.902.745, 5.843.069, 5.787.900 y 5.626.561. Las matrices comprenden características comúnmente asociadas con ser biocompatibles cuando son administradas a un hospedante mamífero. Las matrices pueden estar formadas por materiales tanto naturales como sintéticos. Las matrices pueden ser no biodegradables en los casos en que sea deseable dejar la estructura permanente o estructuras desprendibles en el cuerpo de un animal, como un implante; o pueden ser biodegradables. Las matrices pueden adoptar la forma de esponjas, implante, tubos, tabletas telfa, fibras, fibras huecas, componentes liofilizados, geles, polvos, composiciones vertibles o nanopartículas. Además, las matrices pueden ser diseñadas para permitir la liberación sostenida de células sembradas o citoquinas pro-

ducidas u otro agente activo. En ciertas realizaciones, la matriz de la invención es flexible y elástica y puede ser descrita como un soporte semisólido que sea permeable a sustancias como sales inorgánicas, fluidos acuosos y agentes gaseosos disueltos, incluido oxígeno.

Una matriz es usada en la presente memoria descriptiva como un ejemplo de una sustancia biocompatible. Sin embargo, la presente invención no está limitada a matrices y, por tanto, siempre que el término matriz o matrices aparece, estos términos se debe interpretar que incluyen dispositivos y otras sustancias que permitan una retención celular o transversal celular que sean biocompatibles y sean capaces de permitir el paso transversal de macromoléculas directamente a través de la sustancia, de forma que la propia sustancia es una membrana semi-permeable o es usada conjuntamente con una sustancia semi-permeable particular.

En ciertas realizaciones de la presente invención, las células activadas y expandidas usando los métodos descritos en la presente memoria descriptiva son administradas a un paciente conjuntamente (por ejemplo, antes, simultáneamente o a continuación) con cualquier número de modalidades de tratamientos relevantes que incluyen, pero sin limitación un tratamiento con agentes como agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes immunoablativos como CAMPATH y anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citotoxinas, fluodarivina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citoquinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio (ciclosporina y FK506 o inhiben la p70S6 quinasa que es importante para la señalización inducida por factor de crecimiento (rapamicina). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993;

Isoniemi (supra)). En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente invención son administradas a un paciente conjuntamente (antes, simultáneamente o a continuación) con un trasplante de médula ósea, terapia
 5 ablativa de células T usando agentes de quimioterapia como fludaravina, terapia de radiación con haces externos (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos como OKT3 o CAMPATH. En otra realización, las composiciones celulares de la presente invención son administradas a continuación de una terapia
 10 ablativa de células B como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan. Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden experimentar un tratamiento estándar con una quimioterapia de dosis elevada seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertas realizaciones,
 15 a continuación del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunes expandidas de la presente invención. En una realización adicional, las células expandidas son administradas antes o a continuación de una cirugía.

20 La dosificación de los tratamientos anteriores para ser administrada a un paciente variarán con la naturaleza precisa del estado que esté siendo tratado y el receptor del tratamiento. La extrapolación de las dosificaciones para una administración a seres humanos se puede realizar
 25 según prácticas aceptadas en la técnica. La dosis para CAMPATH, por ejemplo, estará generalmente en el intervalo de 1 a aproximadamente 100 mg para un paciente adulto, habitualmente administrada diariamente durante un período entre 1 y 30 días. La dosis diaria preferida es de 1 a 100 mg por
 30 día, aunque en algunos casos se pueden usar dosis mayores de hasta 40 mg por día (descrito en la patente de EE.UU. n° 6.120.766):

35 En una realización adicional, las composiciones celulares que comprenden células T estimuladas y activadas usando los métodos descritos en la presente memoria des-

criptiva son administradas a un paciente conjuntamente con un trasplante de células madre alogeneicas (como un ajuste de mini-trasplante) o un trasplante de órganos. Sin estar vinculados a consideraciones teóricas, estas células T pueden aumentar y favorecer el injerto y los efectos anti-tumorales. Estas células T pueden tener efectos favorecedores para injerto de células madre mejoradas y efectos anti-tumorales que permitan que se utilice un régimen de acondicionamiento de trasplantes muy reducido y menos tóxico.

Todos los intervalos numéricos utilizados en la presente memoria descriptiva incluye explícitamente todos los valores enteros dentro del intervalo y los valores numéricos específicos dentro del intervalo son contemplados dependiendo del uso particular. Por ejemplo, los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración pero en modo alguno como una limitación.

EJEMPLOS

EJEMPLOS PRELIMINARES I-XVIII

EJEMPLO I

ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS T

En ciertos experimentos descritos en la presente memoria descriptiva, el procedimiento preferido utilizado fue el de XCELLERATED I®. Brevemente, en este procedimiento, las células T Xcelleradas® se fabrican a partir de un producto de aféresis de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Después de la recogida de un paciente en un sitio clínico, la aféresis de PBMC se lavó y seguidamente se incubó con DYNABEADS® M-450 epoxi T "sin revestir". Durante este período de tiempo, las células fagocíticas como los monocitos ingieren los gránulos. Después de la incubación, las células y gránulos son tratados sobre un separador magnético MaxSep con el fin de separar los gránulos y cualesquiera células monocíticas/fagocíticas que estén unidas a los gránulos. Después de esta etapa de agotamiento de monocitos, se toma un volumen que contiene un total de 5 x

10^8 células T $CD3^+$ y se ajustan con $1,5 \times 10^9$ DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T para iniciar el procedimiento XCELLERATE® (aproximadamente 3:1 gránulos a células T). La mezcla de células y DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T se incubaba seguidamente a 37°C, 5% de CO₂, durante aproximadamente 8 días para generar células T XCELLERADAS durante una primera infusión. Las PBMC con monocitos agotados restantes son crioconservadas hasta una segunda o adicional expansión del producto celular (aproximadamente 21 días después) en cuyo momento son descongeladas, lavadas y seguidamente se toma un volumen que contiene un total de 5×10^8 células T $CD3^+$ y se ajustan con $1,5 \times 10^9$ DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T para iniciar el procedimiento XCELLERATE para una segunda infusión. Durante el período de incubación de ~ 8 días a 37°C, 5% de CO₂, las células T $CD3^+$ se activan y expande. El mAb anti-CD3 es usado en BC3 (XR-CD3; Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA), y el mAb anti-CD28 (B-T3, XR-CD28) es obtenido de la entidad Diaclone, Besançon, Francia.

Con un procedimiento modificado denominado XCELLERATE II®, se utilizó el procedimiento anteriormente descrito con algunas modificaciones en las que no se utilizó ninguna etapa separada de agotamiento de monocitos y en ciertos procedimientos las células fueron congeladas antes del contacto inicial con los gránulos y se realizó una concentración y estimulación adicionales. (véanse las Figuras 5A y 5B). En una versión de este procedimiento, las células T se obtuvieron de sangre en circulación de un donante o paciente por medio de aféresis. Los componentes de un producto de aféresis incluyen normalmente linfocitos, monocito, granulocitos, células B, otras células nucleadas, glóbulos blancos) glóbulos rojos y plaquetas. Un producto de aféresis típico contiene $1,2 \times 10^{10}$ células nucleadas. Las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato exenta de calcio exenta de magnesio, para separar proteínas de

plasma y plaquetas. La etapa de lavado se realiza centrifugando las células y separando el fluido sobrenadante, que es seguidamente sustituido con PBS. El procedimiento se realizó usando una centrifugadora semiautomática de "flujo transversal" (COBE 2991 System, Baxter). Las células se mantienen en un sistema cerrado mientras son tratadas.

Las células pueden ser adicionalmente tratadas agotando las células que no son de unión que incluyen monocitos (enriquecidos para células activadas) y continuando seguidamente con la estimulación. Alternativamente, las células lavadas pueden ser congeladas, almacenadas y posteriormente tratadas, que se demuestra en la presente invención que aumenta la estabilidad de proliferación así como el agotamiento de granulocitos. En un ejemplo, para congelar las células, se coloca una suspensión de 35 ml de células en una bolsa de congelación Cryocyte de 250 ml junto con 35 ml de la solución congelante. La suspensión celular de 35 ml contiene normalmente $3,5 \times 10^9$ a $5,0 \times 10^9$ células en PBS. Se añade un volumen igual de solución congelante (20% de DMSO y 8% de albumina de suero humano en PBS). Las células están a una concentración final de 50×10^6 células/ml. La bolsa Cryocyte puede contener volúmenes en el intervalo de 30-70 ml y la concentración celular puede variar en el intervalo de 10 a 200×10^6 células/ml. Una vez que la bolsa Cryocyte se rellena con las células y solución congelante, la bolsa se coloca en un congelador a velocidad controlada y las células se congelan a $1^\circ\text{C}/\text{minuto}$ descendiendo -80°C . Las células congeladas se colocan seguidamente en un sistema de almacenamiento de nitrógeno líquido hasta que sean necesarias.

Las células se retiran del sistema de almacenamiento de nitrógeno líquido y se descongelan a 37°C . Para separar el DMSO, las células descongeladas son seguidamente lavadas con PBS exento de calcio y exento de magnesio en el sistema COBE 2991. Las células lavadas se hacen pasar seguidamente

a través de un filtro de malla de 80 micrómetros.

Las células descongeladas, aproximadamente $0,5 \times 10^9$ células CD3⁺, se colocan en unas bolas de plástico Lifecell de 1 l que contiene 100 ml de PBS exento de calcio y exento de magnesio. El CBS contiene 1%-5% de suero humano. SE colocan también en la bolsa $1,5 \times 10^9$ gránulos 3x28 (DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T) con las células (3:1 DYNABEADS M-450 células T CD3/CD28: T CD3⁺). Los gránulos y células se mezclan a temperatura ambiente a aproximadamente ~ 1 rpm (rotación de extremo sobre extremo durante aproximadamente 30 minutos. La bolsa que contiene los gránulos y las células se coloca en un separador magnético MaxSep ((Nexell Therapeutics, Irvine, CAb. Entre la bolsa y el dispositivo MaxSep, se coloca un separador de plástico (de aproximadamente 6 mm de grosor). (para aumentar la resistencia magnética se retira el separador). Los gránulos y cualesquiera células unidas a los gránulos son retenidos en el imán mientras que el PBS y las células sin unir son bombeados fuera.

Los gránulos 3x28 y las células concentradas unidas a los gránulos son aclarados con medios de cultivo celulares (1 litro que contiene X-vivo 15, BioWhittaker; con 50 ml de suero humano reagrupado e inactivado con calor, 20 ml de Hepes 1 M, 200 ml de L-glutamina 200 mm con o sin aproximadamente 100 mil U.I. de IL-2) en una bolsa de cultivo Lifecell de 3 l. Después de transferir los gránulos 3x28 y las células positivamente seleccionadas en la bolsa Lifecell, se añade medio de cultivo hasta que la bolsa contenga 1.000 ml. La bolsa que contiene la células se coloca en un incubador (37°C y 5% de CO₂ y se deja que las células se expandan.

Las células se dividen 1 a 4 en cada uno de los días 3 y 5. Se midieron la activación y proliferación de células T recolectando células después de 3 días y 8 días en cultivo. La activación de las células T se valoró midiendo el tamaño de las células, el nivel de expresión de marcadores de su-

perficie celular, particularmente la expresión de CD25 y CD154 en el día 3 de cultivo. En el día 8 se permitió que las células fluyeran bajo la gravedad (aproximadamente 150 ml/minuto) sobre un imán MaxSep para separar las partículas magnéticas y las células se lavaron y concentraron usando el dispositivo COBE anteriormente indicado y se volvieron a poner en suspensión en una solución de electrolito equilibrada adecuada para una administración intravenosa, como Plasma-Lyte A® (Baxter-Healthcare).

Como se describe en la presente memoria descriptiva XCELLERATE® I se refiere a condiciones análogas a las anteriores, con la excepción de que no se realizaron la estimulación y concentración y el agotamiento de monocitos se realizó antes de la estimulación.

Se realizaron ambos procedimientos XCELLERATE® I y II y se midió la proliferación de células T después de 8 días en cultivo. El rendimiento de células T expandidas fue mayor cuando se concentraron células CD3⁺ antes del cultivo celular. (véase la Tabla I). Además, la población celular tenía más de 90% de células CD3⁺.

Tabla 1. Expansión del rendimiento de células T
el día 8

Experimento	Concentración de no CD3 ⁺ (XCELLERATE® I)	Concentración de CD3 ⁺ (XCELLERATE® II)
NDa079	33 x 10 ⁹	36 x 10 ⁹
NDa081	38 x 10 ⁹	42 x 10 ⁹
NDa082	28 x 10 ⁹	38 x 10 ⁹
promedio	33 ± 5 x 10 ⁹	39 ± 3 x 10 ⁹

Se realizaron experimentos adicionales a este respecto y referidos al número total de células expandidas así como la expansión en número de veces de nueve tandas de células estimuladas sin concentración de CD3⁺ y cinco tandas de

células estimuladas con concentración de CD3⁺ (véanse las Figuras 1 y 2).

La concentración de las células mediante la aplicación de una fuerza magnética antes del cultivo aumenta eficazmente la pureza de las células CD3⁺ así como proporciona niveles crecientes de CD154. (La Tabla 2 y las Figuras 3 y 4 representan gráficamente los niveles de CD154). Además de ello, la comparación de la proliferación de células T cuando las poblaciones de células T fueron expuestas a imanes de resistencias diferentes mostraron que la exposición a un imán más fuerte dio lugar a un rendimiento mayor de células CD3⁺ (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de la proliferación de células T y marcadores de superficies celulares después de una concentración usando imanes débiles y fuertes

Experimento	Imán	Día	CD3	Tamaño	CD25	CD154	CD3
				(FSC)	(MFI)	(MFI)	X 10 ⁹
NDa087							
Pre-selección		0	47%	318	8	4	0,5
Post-selección		0	56%				0,37
Post-selección		0	61%				0,35
Sin selección		3		533	758	19	
Post-selección	Débil	3	90%	570	846	41	
Post-selección	Fuerte	3	92%	558	1006	45	
Post-	Ninguno						

Experimento	Imán	Día	CD3	Tamaño	CD25	CD154	CD3
				(FSC)	(MFI)	(MFI)	$\times 10^9$
cultivo							
Post-cultivo	Débil	8	92%	412	110	9	17,7
	Fuerte	8	93%	413	89	7	37,8
NDa089							
Pre-selección		0	44%	312	6	4	0,5
Post-Selección	Débil	0	46%				0,39
Post-Selección	Fuerte	0	55%				0,3
Post-selección	Débil	3	83%	589	685	67	
Post-selección	Fuerte	3	83%	600	720	115	
Post-Cultivo	Débil	8	89%	409	58	18	25,3
	Fuerte	8	87%	371	65	13	42,1
NDa087							
Sin selección	Ninguno	8		758	4	19	31
selección	Débil	8		846	4	41	18
selección	Fuerte	8		1006	4	45	38
NDa089							
Sin selección	Ninguno	6		309	4	12	26
Selección	Débil	6		685	4	67	25
Selección	Fuerte	6		720	4	115	42

Se realizaron cinco experimentos adicionales que com-

paraban el procedimiento de XCELLERATE® I con el XCELLERATE® II. Para las células activadas y expandidas en cultivo según los dos procedimientos, los marcadores de activación celular (tamaño celular, expresión de CD25 y expresión de CD154) en los días 3 y 8 de cultivo se muestran a continuación en la Tabla 3 y en la Figuras 6-7.

Tabla 3: Marcadores de activación celular en el día 3

Número de experimento (donante)	Procedimiento	Tamaño celular (FSC)		CD25 (MFI)		CD154 (MFI)	
		Día 0	Día 3	Día 0	Día 3	Día 0	Día 3
NDa104 (PC071)	XCELLERATE® I	282	526	7	625	5	50
	XCELLERATE® II	315	531	7	750	5	162
NDa107 (PC074)	XCELLERATE® I	243	578	5	287	4	23
	XCELLERATE® II	272	587	6	311	5	120
NDa110 (PC076)	XCELLERATE® I	262	588	6	497	4	59
	XCELLERATE® II	284	625	6	580	5	197
NDa110 (PC076)	XCELLERATE® I	271	662	5	726	4	54
	XCELLERATE® II	291	660	6	741	5	177
NDa115 (PC073)	XCELLERATE® I	253	560	6	202	6	25
	XCELLERATE® II	252	582	6	448	6	83
Promedio ± Desv. Ti.	XCELLERATE® I	262± 15	583 ±50	6±1	467±221	5±1	42±17
	XCELLERATE® II	283±23	595±47	6±1	566± 189	5±1	148±17
Todos los cultivos de la Tabla 3 se iniciaron con células que fueron congeladas/descongeladas.							

Los datos en la Tabla 3 y las Figuras 6-7 muestran que el procedimiento XCELLERATE® II generó células cuyo tamaño celular y marcadores de activación de expresión de CD25 en el días 3 estaban cerca del promedio, pero normalmente superiores y continuaron siendo superiores a continuación de la estimulación. Sin embargo, la activación de marcador de activación de CD154 en el día 3 para células T del procedimiento XCELLERATE® II era mucho mayor que el de células T

del procedimiento XCELLERATE® I. Además de ello, como se demostró anteriormente, el procedimiento XCELLERATE® II generó niveles de CD25 y CD154 que eran consistentemente mayores por donante que los otros métodos.

5 La expresión de CD154 en el día 3 del procedimiento XCELLERATE® II es realmente mucho mayor que para el XCELLERATE® I. Esta observación sugiere que las células T están en un estado de activación superior durante el procedimiento XCELLERATE® II que en el procedimiento XCELLERATE® I. Se
10 puede predecir que esto se plasme en un producto más eficaz cuando es administrado *in vivo*.

La pureza de células CD3⁺, relación de células CD4/células CD8 y viabilidad celular en el día 3 de cultivo se determinaron también para cinco muestras de pacientes.
15 El fenotipo y la viabilidad de las células usadas sometidas al procedimiento XCELLERATE® I y el procedimiento XCELLERATE® II se muestran a continuación en la Tabla 4, cuando se midieron mediante citometría de flujo o mediante tinción con azul de tripano

20

Tabla 4

NDA	Pureza de células CD3 ⁺ en Día 0 (%)	Viabilidad celular día 0 (%)	Relación de CD4:CD8 día 0 ψ	Pureza de células CD3 ⁺ en Día 3 (%)	Viabilidad celular día 3 (%)	Relación de CD4:CD8 día 3
103 XCELLERATE® I	70	92	1,91	79	82	1,3
103 XCELLERATE® II	85	99	2,3	91	95	2,4
104 XCELLERATE® I	67	95	3,2	84	78	2,7
104 XCELLERATE® II	110	99	3,7	93	87	2,9
107 XCELLERATE® I	69	99	2,3	85	82	2,3

107 XCELLERA- TE® II	119	99	2,7	95	92	2,8
110 XCELLERA- TE® I	63	99	2,9	91	82	2,6
110 XCELLERA- TE® II	83	99	3,9	93	92	4,5
115 XCELLERA- TE® I	60	99	1,9	92	91	2,7
115 XCELLERA- TE® II	72	99	2,2	96	94	2,8
* = pureza de células T CD3⁺ en el día 0 después de un agotamiento de monocitos en el procedimiento XCELLERATE I o después de una concentración magnética en el procedimiento XCELLERATE II ψ = relación de células T CD4⁺:CD8⁺ en el día 0 después de un agotamiento de monocitos en el procedimiento XCELLERATE I o después de una concentración magnética en el procedimiento XCELLERATE II						

EJEMPLO II

EFICACIA DEL ENRIQUECIMIENTO DE CÉLULAS T CD3⁺, AGOTAMIENTO DE MONOCITOS Y AGOTAMIENTO DE GRANULOCITOS

5 Para este estudio, tras su recepción en el laboratorio de desarrollos de terapias Xcyte el producto de aféresis de PBMC que entró se lavó, se dividió y:

1. Para el procedimiento XCELLERATE® I, se llevó a cabo una etapa de agotamiento de monocitos y las PBMC de CD14⁺ con agotamiento de monocitos fueron crioconservadas y almacenadas en la fase de vapor de un congelador de N² líquido (como se indicó en el ejemplo I). En el día del establecimiento del procedimiento XCELLERATE® I, las PBMC CD14⁺ con agotamiento de monocitos fueron descongeladas y se inició el procedimiento XCELLERATE con DYNABEADS M-450 CD3/CD28 T como se detalla en el Ejemplo I. La composición celular edia y la eficacia media de enriquecimiento de células T CD3⁺, el agotamiento de monocitos CD14⁺ y el agotamiento de granulocitos para los donantes N= 5 en estas etapas iniciales se muestran en la Tabla 5.1 y los datos

para cada donante individual se muestran en la Tabla 5.2. Para el procedimiento XCELLERATE® II, las células del producto de aféresis de PBMC se crioconservaron y almacenaron en fase de vapor en un congelador de N² líquido. En el día

5 del establecimiento del procedimiento XCELLERATE® II, las células del producto de aféresis de PBMC crioconservadas se descongelaron y las células T CD3⁺ se concentraron magnéticamente y se inició el procedimiento XCELLERATE® II con DYNABEADS M-450 CD3/CD28 T, como se detalla en el Ejemplo I.

10 La composición celular media y la eficacia media del enriquecimiento de células T CD3⁺, agotamiento de monocitos CD14⁺ y agotamiento de granulocitos para los donantes N= 5 en estas etapas iniciales se muestran en la Tabla 5.1 y los datos para cada donante individual se muestran en la Tabla

15 5.2.

Como se demuestra en las Tabla 5.1 y 5.2, la combinación de congelación/descongelación del producto de aféresis de PBMC seguida de la concentración magnética de células T CD3⁺ directas del producto de aféresis de PBMC descongelado

20 en la configuración del procedimiento XCELLERATE® II da lugar a una eliminación eficaz de monocitos CD14⁺ y granulocitos (tabla 5.1 y tabla 5.2). La eficacia de la eliminación de los monocitos CD14⁺ y los granulocitos en el procedimiento XCELLERATE® II son tan buenas como las del procedimiento XCELLERATE® I, con la ventaja de que elimina la

25 necesidad de una etapa de agotamiento separada usando el reactivo DYNABEADS M-450 T "sin revestir" y, consecuentemente, conduce a una relación superior de CD4/CD8.

Tabla 5.1: Eficacia media (N=5) de enriquecimiento de

30 células T CD3⁺, agotamiento de monocitos CD14⁺ y agotamiento de granulocitos en las etapas iniciales de las configuraciones de los procedimientos XCELLERATE® I y XCELLERATE® II

Preparación celular	Composición celular media $\pm$ Desv. Tip. (%)			
	CD3 ⁺	CD14 ⁺	granu- locitos	CD4/CD8*
Producto de aféresis de PBMC de entrada	49 $\pm$ 6	16 $\pm$ 3	8 $\pm$ 7	2,2 $\pm$ 0,3
XCELLERATE® I				
PBMC con agotamiento de monocitos	51 $\pm$ 6	5,5 $\pm$ 3	5,7 $\pm$ 5	2,4 $\pm$ 0,6
PBMC con agotamiento de monocitos congelado/descongelado	64 $\pm$ 4	6 $\pm$ 3	0,4 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,6
XCELLERATE III				
Producto de aféresis de PBMC congelado-descongelado	56 $\pm$ 5	11 $\pm$ 2	0,4 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,8
Concentración	92 $\pm$ 22	2,4 $\pm$ 3,7	0 $\pm$ 0	2,86 $\pm$ 0,86
Las composiciones celulares se determinaron mediante citometría de flujo según protocolos estándar.				

5 Tabla 5.2: Comparación de la eficacia del enriquecimiento de células T CD3⁺, agotamiento de monocitos CD14⁺ y agotamiento de granulocitos en las etapas iniciales de las configuraciones de los procedimientos XCELLERATE® I y XCELLERATE® II

Número de experimento (donante)	Preparación celular	Composición celular (%)			
		CD3 ⁺	CD14 ⁺	granulocitos	CD4/CD8
NDa104 (PC071)	Producto de aféresis de PBMC de entrada	43%	11%	14%	2,2

Número de experimento (donante)	Preparación celular	Composición celular (%)			
		CD3 ⁺	CD14 ⁺	granulocitos	CD4/CD8
	XCELLERATE® I				
	PBMC con agotamiento de monocitos	54%	5%	12,5%	3,2
	PBMC con agotamiento de monocitos congelado / descongelado	67%	4%	0%	3,2
	XCELLERATE® II				
	Producto de aféresis de PBMC congelado - descongelado	64%	7%	0%	3,1
	Concentración magnética post- CD3	110%	1%	0%	3,7
NDa107 (PC074)	Producto de aféresis de PBMC de entrada	51%	16%	1%	2,1
	XCELLERATE® I				
	PBMC con agotamiento de monocitos	64%	5%	1%	2,3
	PBMC con agotamiento de monocitos congelado/ descongelado	69%	3%	0%	2,3
	XCELLERATE® II				
	Producto de aféresis de PBMC congelado - descongelado	55%	11%	0%	2,0

Número de experimento (donante)	Preparación celular	Composición celular (%)			
		CD3 ⁺	CD14 ⁺	granulocitos	CD4/CD8
	Concentración magnética post- CD3 ⁺	120%	0%	0%	2,7
NDa110 (PC076)	Entrada	44%	18%	15%	2,5
	XCELLERATE® I				
	PBMC con agotamiento de monocitos	63%	3,5%	10%	2,9
	PBMC con agotamiento de monocitos congelado/ descongelado	63%	7%	0%	2,9
	XCELLERATE® II				
	Producto de aféresis de PBMC congelado - descongelado	55%	13%	0%	3,2
	Concentración magnética post-CD3 ⁺	83%	1%	0%	3,8
NDa113 (PC060)	Producto de aféresis de PBMC de entrada	47%	17%	6%	2,3
	XCELLERATE® I				
	PBMC con agotamiento de monocitos	61%	4%	3%	1,8
	PBMC con agotamiento de monocitos congelado/ descongelado	61%	4%	1%	1,8

Número de experimento (donante)	Preparación celular	Composición celular (%)			
		CD3 ⁺	CD14 ⁺	granulocitos	CD4/CD8
	XCELLERATE® II				
	Producto de aféresis de PBMC congelado - descongelado	51 %	13%	1%	1,5
	Concentración magnética post-CD3 ⁺	76%	1%	0%	1,9
NDa115 (PC073)	Producto de aféresis de PBMC de entrada	59%	17%	2%	1,7
	XCELLERATE® I				
	PBMC con agotamiento de monocitos	60%	10%	2%	1,8
	PBMC con agotamiento de monocitos congelado/ descongelado	60%	11 %	1%	1,9
	XCELLERATE® II				
	Producto de aféresis de PBMC congelado/ descongelado	53%	12%	1%	2,0
	Concentración magnética post-CD3 ⁺	72%	9%	0%	2,2
Las composiciones celulares se determinaron mediante citometría de flujo según protocolos estándar.					

Además de la simplificación y racionalización del procedimiento mediante la eliminación de la etapa de agota-

miento de monocitos ($CD14^+$) y los reactivos asociados, la etapa de concentración magnética en el procedimiento XCELLERATE® II proporciona también una mayor pureza de células T $CD3^+$ y una mayor relación de células T $CD3^+ CD4^+$: $CD3^+ CD8^+$ en el inicio de la activación de células T (Tabla 5.1 y Tabla 5.2).

Se compararon también el rendimiento, pureza, viabilidad y composición de células T $CD3^+$ activadas previamente recolectadas en el día 8 del procedimiento XCELLERATE® I y el procedimiento XCELLERATE® II.

Como se muestra en la Tabla 5.3, el rendimiento medio, pureza y viabilidad de las células T $CD3^+$ antes de la recolección en el día 8, normalmente mejoran para el procedimiento XCELLERATE® II en comparación con el XCELLERATE® I.

Tabla 5.3: Rendimiento, pureza y composición de células T $CD3^+$ activadas previamente recolectadas en el día 8 del procedimiento XCELLERATE® I y el procedimiento XCELLERATE® II

Número de experimento (donante)	Configuración del procedimiento XCELLERATE	Propiedades de producto de células T $CD3^+$ previamente recolectadas			
		Células T $CD3^+$	Pureza de células T $CD3^+$ (%)	Viabilidad (%)	Relación $CD4/CD8^*$
NDa104 (PC071)	XCELLERATE® I	65×10^9	95	97	1,2
	XCELLERATE® II	50×10^9	97	97	1,7
NDa107 (PC074)	XCELLERATE® I	57×10^9	98	98	0,8
	XCELLERATE® II	52×10^9	98	98	1,5
NDa110 (PC076)	XCELLERATE® I	41×10^9	96	96	1,6
	XCELLERATE® II	41×10^9	99	99	2,4
NDa113 (PC060)	XCELLERATE® I	41×10^9	96	96	1,3
	XCELLERATE® II	43×10^9	98	98	2,0

Número de experimento (donante)	Configuración del procedimiento XCELLERATE	Propiedades de producto de células T CD3 ⁺ previamente recolectadas			
		Células T CD3 ⁺	Pureza de células T CD3 ⁺ (%)	Viabilidad (%)	Relación CD4/CD8*
NDa115 (PC073)	XCELLERATE® I	31x10 ⁹	96	96	1,3
	XCELLERATE® II	48x10 ⁹	97	97	1,4
Promedio Des. Tip.	XCELLERATE® I	7±14	96 ± 2	97±1	1,2±0,3
	XCELLERATE® II	45±6	98 ± 1	98±1	1,8±0,4
*= Relación de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ :CD3 ⁺ CD8 ⁺					

También, como se muestra en la Tabla 5.3, el procedimiento XCELLERATE® II mantiene relaciones más elevadas de células T CD3⁺CD4⁺: CD3⁺CD8⁺ a lo largo del procedimiento.

5 Esto se puede deber a la concentración preferencial de células CD3⁺CD4⁺ durante la etapa de concentración magnética (Tablas 5,1 y 5.2).

“De entrada” se refiere a células de aféresis de entrada, lavadas y de nueva aportación. Las células de partida citadas en la Tabla 5.2 para el procedimiento XCELLERATE® I fueron células aferesadas que habían sido lavadas, sometidas a agotamiento de monocitos y/o congeladas/descongeladas. Las células de partida citadas en la Tabla 5.2 para el procedimiento XCELLERATE® II fueron células de aféresis que habían sido lavadas y/o congeladas /descongeladas.

***=relación de células T CD3⁺CD4⁺: CD3⁺CD8⁺**

20 La Tabla 5.3 muestra que el procedimiento XCELLERATE® II dio lugar a un producto celular que era más puro (en términos de % de células CD3⁺) que el producto celular del procedimiento XCELLERATE® I. Es decir, las células del pro-

ducto del procedimiento XCELLERATE® II tenían una pureza media de células CD3⁺ ($\pm$ Desv. Tip.) de 96% $\pm$ 1% mientras que las células del procedimiento XCELLERATE® I tenían una pureza media de 93% $\pm$ 2%.

5 También, como se muestra en la Tabla 5.3, el procedimiento XCELLERATE® II mantuvo una relación más elevada de células CD4/CD8. Las células de entrada tenían una relación media de células CD4/CD8 de 2,2 y las células del producto del procedimiento XCELLERATE® II tenían una relación
10 CD4/CD8 de 1,8, mientras que las células del producto del procedimiento XCELLERATE® I tenían una relación CD4/CD8 de 1,2.

Los datos de la tabla 5.3 muestran también que el procedimiento XCELLERATE® II dio lugar a células del producto
15 con una viabilidad media de 98% mientras que el procedimiento XCELLERATE® I dio lugar a células del producto con una viabilidad media de 97%.

EJEMPLO III

AGOTAMIENTO DE MONOCITOS

20 Los monocitos (células fagocíticas CD14⁺) son separados de las preparaciones de células T a través de un agotamiento magnético usando una variedad de gránulos Dynal "irrelevantes" (es decir, no revestidos con anticuerpos ni revestidos con anticuerpos diana). El agotamiento se rea-
25 lizó mediante la preincubación de sangre completa después de una separación en ficol o sangre periférica aferesada con gránulos M-450 anti-ratón de cabra Dynal, o gránulos revestidos con albumina de suero humano Dynal (M-450) o con gránulos epoxi Dynal (M-450) a una relación aproximada de
30 gránulos a células de 2:1. Las células y los gránulos se incubaron durante períodos de 1-2 horas a 22-37°C, seguido de una separación magnética de las células que se habían unido a los gránulos o que habían sido abarcada por los gránulos. Las células restantes se colocaron en un cultivo

junto con células sinmanipular. Las células fueron caracterizadas mediante citometría de flujo en cuanto al fenotipo celular antes y después del agotamiento.

EJEMPLO V

5 AJUSTES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

Se usó un citómetro Becton Dickinson FACSCALIBUR para la totalidad de los datos recogidos y presentados. Podría ser usado cualquier citómetro de flujo capaz de realizar un análisis en 3 colores por un operario experto para adquirir
10 datos idénticos. Por ejemplo, un dispositivo FACSCAN, Vantage Cell Sorter y otro producto de BD podrían funcionar para recoger datos similares. También, los productos Coulter, como el Coulter Epic Sorter podrían funcionar también.

Se puede usar el ajuste del instrumento proporcionado
15 a continuación como una norma general para la conformación del instrumento para reunir datos, como se hizo en estos estudios. Estos ajustes se usaron en los ejemplos proporcionados en la presente memoria descriptiva; sin embargo, se pueden y se deben hacer modificaciones de estos ajustes
20 por un experto en manejar el instrumento para ajustar apropiadamente en cuanto a la compensación y voltajes del detector. También, el uso de diferentes anticuerpos de detección con etiquetas fluorescentes diferentes requiere un ajuste único para cualquier instrumento particular para
25 proporcionar una separación óptima de señales (voltaje) con "pérdidas" mínimas en otros canales (por ejemplo, compensación). Un operario de flujo experto, con conocimientos en el uso de los controles de compensación, controles de isotipos y con una comprensión general de la biología de las
30 células T debería ser capaz de reproducir cualquiera de los datos presentados a continuación. Adicionalmente, debe apreciarse que diversos ajustes, particularmente los ajustes de voltaje, pueden variar dependiendo de la eficacia del láser del instrumento. Por ejemplo, los láseres más antiguos
35 pueden requerir más voltaje para generar una señal

comparable a la de un láser más nuevo. Sin embargo, los datos obtenidos, ya sea con más o menos voltajes, deben reflejar modelos similares en biología.

Los ajustes usados sobre el dispositivo FACSCALIBUR®
5 (Becton Dickinson) son:

<u>Detector/ Amps:</u>				
Parámetro	Detector	Voltaje	Amp/ganancia	Modo
P1	FSC	EOO	1,30	Lin
P2	SSC	370	1,00	Lin
P3	FL1	610	1,00	Log
P4	FL2	550	1,00	Log
P5	FL3	520	1,00	Log

Aunque los voltajes paramétricos generalmente son constantes, P3, P4 y P5 pueden ser ajustados ligeramente
10 hacia arriba o hacia abajo con el fin de conseguir una separación máxima de señales, al mismo tiempo que mantienen un valor de señal testigo negativa dentro o en las proximidades de la primera década 0-10) en la resistencia de la señal en el modo Log.

15 Umbral:

Parámetro primario: FSC (dispersión hacia adelante)

Valor: 52

Parámetro secundario: ninguno

Compensación:

20 FL1 - 4,0% FL2

FL2 - 21,4% FL1

FL2 - 2,6% FL3

FL3 - 15,2% FL2

Aunque los ajustes proporcionaron una aproximación de
25 los ajustes usados para recoger la mayoría de los datos presentados a continuación, los ajustes pueden ser alterados y deben ser generados datos aproximadamente equivalentes sobre las células T estimuladas. Los intervalos generales aceptables para la compensación a los voltajes citados

anteriormente se muestran a continuación.

FL1-FL2 0,4-4%

FL2-FL1 18-27%

FL2-FL3 2-8%

5 FL3-FL2 10-16%

La determinación de la compensación particular de valores de los voltajes se ha hecho por un operador de citómetros de flujo con experiencia con los siguientes objetivos:

10 1) Voltaje: Maximización de la separación de señales entre señales positivas y negativas (por ejemplo, marcador de antígenos de superficies negativo frente a niveles bajos de antígeno de superficie frente a niveles elevados de antígeno de superficie).

15 2) compensación: Minimización de la interferencia entre canales (pérdidas) mediante el uso de controles de compensación.

A medida que cambian los ajustes de voltaje, igualmente lo hacen los ajustes de compensación

20 EJEMPLO V

ENSAYOS PROLIFERACIÓN CELULAR Y DE VIABILIDAD

La proliferación celular y la viabilidad se midió mediante tinción con azul de Tripano estándar y recuento celular, usando un hemocitómetro. Véanse las Figuras 5A-5B.

25 EJEMPLO VI

ENSAYOS DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN

El CD154 es expresado en células T activadas de una manera temporal y se ha mostrado que es un elemento clave en las interacciones de células T a través de CD40 sobre APC. El bloqueo de la interacción de estos dos receptores puede alterar efectivamente, e incluso desactivar, una respuesta inmune. Partes alícuotas de células T que fueron estimuladas mediante concentración con gránulos paramagnéticos 3x28 fueron retiradas del cultivo celular en los días
30 3, 5 y 8 y fueron analizadas en cuanto al nivel de expre-
35

sión de CD154. El nivel de expresión de CD154 se comparó
 con células T que fueron sometidas a agotamiento de monocí-
 tos pero no fueron incubadas con gránulos paramagnéticos
 3x28 (Es decir, las células T no fueron magnéticamente con-
 5 centradas al inicio del cultivo. La activación significati-
 va de las células T estipuladas mediante concentración
 magnética con gránulos anti-CD3 y anti-CD28 se mostró por
 medio de un aumento de tres veces en el nivel de expresión
 de CD154 en el tercer día de cultivo, en comparación con
 10 las células que no fueron análogamente estimuladas al ini-
 cio del cultivo. (véanse las Figuras 4 y 7). Los niveles de
 CD25 medidos de una manera similar (Figura 6) muestran una
 tendencia hacia una activación superior.

En general, la expresión de marcadores se verificó so-
 15 bre diversos valores del tiempo. A este respecto, las célu-
 las son marcadas con CD4 anti-humano (Immunotech, Fuller-
 ton, CA), CD11a anti-humano acoplado a FITC (Pharmingen),
 CD26 anti-humano acoplado a FITC (Pharmingen), CD49d anti-
 humano acoplado a FITC (Coulter), CD54 anti-humano acopla-
 20 do a FITC (Pharmingen and Becton Dickinson), CD95 anti-
 humano acoplado a FITC (Pharmingen), CD134 anti-humano aco-
 plado a FITC (Pharmingen), CD25 Ab anti-humano acoplado a
 FITC (Becton Dickinson, Fullerton, CA), CD69 Ab anti-humano
 acoplado a FITC (Becton Dickinson), CD154 Ab anti-humano
 25 acoplado a FITC o PE (Becton Dickinson), o testigo Ab de
 isotipo de IgG1 acoplado a FITC o PE. Las células, 2×10^5 ,
 se marcan durante 20 minutos a 4°C con 2 µl de cada anti-
 cuerpo de un volumen final de 30 µl, se lavan y se vuelven
 a poner en suspensión en paraformaldehído al 1% (Sigma, St.
 30 Louis, MO).

La comparación de los niveles de expresión de moléculas
 de marcadores de superficies celulares se puede llevar
 a cabo mediante una diversidad de métodos y, por tanto, los
 valores absolutos pueden diferir. Sin embargo, cuando se
 35 comparan dos valores, se pueden calcular fácilmente los va-

lores en veces relativas. Por ejemplo, los niveles de expresión de CD154 sobre células T generadas mediante diferentes métodos de "activación" pueden ser medidos con una exactitud relativa por medios citométricos de flujo. Usando un reactivo, como un conjugado anti-CD154-PE de Becton Dickinson (catalogo n° 340477) se pueden teñir células T en estados de reposo o activados y calibrar los niveles de expresión para este marcador (u otros por medios bien conocidos por los operarios de citómetros de flujo con experiencia). En la presente memoria descriptiva se describen métodos que proporcionan una expresión aumentada de CD154 sobre células T, tanto CD4⁺ como CD8⁺. Mediante la estimulación y concentración simultánea de células T al inicio del cultivo, como se describe en la presente memoria descriptiva, los niveles de expresión pueden ser llevados hasta más allá de los valores obtenidos mediante una activación 3x28 estándar, del orden de un 20% hasta por encima de 100% de aumento en niveles, según se mide mediante la intensidad fluorescente media (MFI) usando citometría de flujo (BD FACSCalibur y anticuerpo, descrito con anterioridad). Por ejemplo, una célula T CD4⁺ sin estimular sería negativa para CD154 y, por lo tanto produciría valores de MFI entre 1-10. Tras una activación mediante XCELLERATE® I, en 3 días posteriores a la activación, los valores de MFI para CD154 sobre células T CD4⁺ pueden estar en el intervalo de 20-40, mientras que el procedimiento XCELLERATE® II puede producir valores de MFI de CD154 de 60-200. Aunque estos no son valores absolutos en términos del número de moléculas de CD154 expresadas en células T, hay suficiente para determinar los niveles relativos de expresión aumentada. Consecuentemente, se puede demostrar que un aumento aproximado de 1,1 a 20 veces en niveles de CD154 entre 1-4 días, y puede ser demostrada una post-activación con el procedimiento XCELLERATE® II en comparación con el procedimiento

XCELLERATE® I.

EJEMPLO VII

ENSAYOS DE CITOQUINAS

Se preparan células como se describió anteriormente.
 5 Las materias sobrenadantes de las células estimuladas durante diversos período de tiempo se someten a una IL-2, IL-4, IFN-gamma o TNF- α ELISA según la instrucciones del fabricante (Biosource International, Sunnyvale, CA).

En un ensayo alternativo la IL-2 se mide mediante te-
 10 ñido intracelular de células T CD4 usando citometría de flujo. Para un marcado intracelular de IL-2 o IFN- γ , las células se incuban en primer lugar con 1 μ l de Monensin (Calbiochem) durante 4 horas antes del ensayo. Las células se tiñen posteriormente para las proteínas superficiales
 15 como se describió anteriormente, se fijan y se permeabilizan usando un estuche de ensayo de teñido intracelular Becton Dickinson marcado con IL-2 Ab anti-humano acoplado a PE e IFN- γ anti-humano acoplado a FITC o el correspondiente testigo Abs como se describe por el fabricante. La adquisición de datos y los análisis citométricos de flujo se rea-
 20 lizan en un citómetro de flujo FACSCalibur Becton Dickinson usando un programa de ordenador Cellquest siguiendo el protocolo del fabricante (Becton Dickinson).

Las concentraciones IFN-gamma fueron de aproximadamente
 25 te 2, 3, 4 y en algunos casos 5 veces superiores en el día 3 cuando se usó la metodología XCELLERATE® II, contrariamente a XCELLERATE® I (datos no mostrados). Adicionalmente, los niveles de TNF- α fueron también considerablemente superiores (entre 1,5 3 veces superiores) hasta el día 5 a con-
 30 tinuación de la estimulación (datos no mostrados) en comparación con XCELLERATE® I.

EJEMPLO VIII

ANÁLISIS DE CÉLULAS FENOTÍPICAS DESPUÉS DE UNA RE-
 ESTIMULACIÓN

Para los análisis de re-estimulación, se toman aproximadamente 5×10^6 células del cultivo en el día de terminación. En diversos ejemplos, la fecha de terminación es el día 8 de cultivo. Las células se colocan en 5 ml de medio X vivo 15 con suero y con o sin IL_2, como se indicó anteriormente, en un pocillo de una placa de seis pocillos. Se colocan aproximadamente 5×10^6 gránulos Dynabeads M-450 CD3/CD28 T que contienen las células y las células y gránulos se colocan en un incubador a 37°C, 5% de CO₂. Después de dos días, las muestras se retiran y se ensayan en cuanto a la viabilidad y se analizan mediante FACC para determinar el tamaño celular y los niveles de expresión de marcadores celulares y/o citoquinas, como los niveles de expresión de CD25 o niveles de expresión de CD154. La Tabla 6 demuestra estos resultados a continuación para 5 muestras de pacientes sometidos al procedimiento XCELLERATE® I y XCELLERATE® II.

Tabla 6: resultados del ensayo de re-estimulación para células T XCELLERADAS producidas usando los procedimientos XCELLERATE® I y XCELLERATE® II

Número de experimento (donante)	Configuración del procedimiento	Tamaño celular (FCS)		CD25 (MFI)		CD154 (MFI)	
		T=0	T=48 h	T=0	T=48 h	T=0	T=48 h
NDa104 (PC071)	XCELLERATE® I	393	607	104	478	6	37
	XCELLERATE® II	404	659	115	544	12	70
NDa107 (APC074)	XCELLERATE® I	386	596	59	585	6	121
	XCELLERATE® II	380	607	62	721	10	109
NDa110 (PC076)	XCELLERATE® I	425	501	111	600	10	39
	XCELLERATE® II	390	445	97	434	15	36
NDa113 (PC060)	XCELLERATE® I	399	630	66	659	8	32
	XCELLERATE® II	411	633	113	816	12	145
NDa115 (PC073)	XCELLERATE® I	433	514	105	247	13	10
	XCELLERATE® II	408	569	81	369	20	36

Desv. Tip. media (n=5)	XCELLERATE® I	407±21	570±58	89±24	514±163	9±3	48±43
	XCELLERATE® II	399±13	583±84	94±22	577±189	14±4	79±48

EJEMPLO IX

RECOGIDA DE CÉLULAS Y PROTOCOLOS DE CULTIVOS ALTERNATIVOS
XCELLERATE®

5 Las células aisladas de sangre humana se hacen crecer en medio X-vivo (Biowhittaker Inc., Walkersville, MD) y, dependiendo del uso, se complementan con o sin 20 U/ml de Il-2 (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) y se complementan con 5% de suero humano (Biowhittaker), glutamina 2
10 mm (Life Technologies, Rockville, MD) y HEPES 20 mM (Life Technologies). Se hacen crecer células Jurkat E6-1 (ATCC, Manassas, VA) en RPMI 1640 (Life Technologies) complementado con 10% de FBS (Biowhittaker), glutamina 2 mm (Life Technologies), penicilina 2 mM (Life Technologies) y estreptomisina 2 mM (Life Technologies).

Se obtuvieron células mononucleares de cultivo de donantes voluntarios humanos ((American Red Cross, Portland, OR). Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando medio de separación de linfocitos (ICN
20 Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) según las instrucciones del fabricante.

Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica (PBL) de la fracción de PBMC mediante incubación en un matraz de cultivo (Costar, Pittsburgh, PA) con Dynabeads sin revestir
25 (Dynal, Oslo, Noruega), 10^8 células/ml, 2 gránulos/célula, 2 h a 37°C. Los monocitos y los macrófagos pueden ser retirados mediante adherencia al matraz de cultivo. Alternativamente, pueden ser separados mediante fagocitación de los gránulos paramagnéticos y agotando seguidamente estas células
30 mediante separación celular magnética según las instrucciones del fabricante (Dynal). Las células CD4⁺ se purifican a partir de la fracción de PBL mediante incubación con 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales contra CD8 (clon

G10-1), CD20 (clon IF5), CD14 (clon F13) y CD16 (Coulter), 10^8 células/ml, 20 minutos a 4°C. Después de lavar, las células se tratan con Dynabeads acoplados a Ig anti-ratón de oveja (10^6 células/ml, 6 gránulos/célula, 20 minutos a 4°C) y seguidamente se someten a agotamiento 2 veces a través de una separación celular magnética. La pureza de las células CD4⁺ es rutinariamente de 91-95% según se mide mediante citometría de flujo.

Se generan células dendríticas adhiriendo en primer lugar PBMC a un matraz de cultivo (Costar), 10^8 células/ml, 2 h a 37°C (sin Dynabeads). Después de un lavado intensivo, las células adherentes se cultivan durante 7 días en un medio que contiene 500 U/ml de GM-CSF (Boehringer Mannheim) y 12,5 U/ml de IL-4 (Boehringer Mannheim). La población celular resultante es débilmente adherente y expresa marcadores de superficie característicos de células dendríticas (por ejemplo, expresa HLA-DR, CD86, CD83, CD11c y carece de expresión de CD4). (Todos los anticuerpos son obtenidos de la entidad Becton Dickinson, San Jose, CA).

Otras técnicas pueden utilizar linfocitos de sangre periférica humana que contienen células T que son incubadas en placas de cultivo de tejidos y/o matraces de cultivo de tejidos (bolsas Baxter) u otros recipientes de cultivo comunes en medios, que podrían estar compuestos por RPMI, X-vivo 15 o algunos otros medios de cultivo de células T. Aunque no es necesario para la activación y crecimiento de células T, se añaden glutamina y HEPES al medio de cultivo. Se añaden suero bovino fetal (10% final), suero A/B humano (5%) o suero humano autólogo (5%) a los medios de cultivo. El porcentaje de suero puede variar sin afectar grandemente a la biología de las células T o el resultado del cultivo. En algunos casos, se añade IL-2 humana recombinante a los cultivos. En algunos casos, las células CD14⁺ fagocíticas y otras células fagocíticas se separan mediante agotamiento magnético, como se describe con posterioridad. Los gránulos

que tienen co-inmovilizados sobre su superficie anti-CD3 y anti-CD28 (gránulos 3x28) son añadidos a una relación 3:1 de gránulos:células. En algunos casos, se añaden gránulos 3x28 a una relación 1:1 de gránulos:células. En otros casos, los gránulos 3x28 son añadidos secuencialmente durante los 5 primeros días de cultivo con relaciones finales de 1:1 el día 1, 1:5 los días 3 y 5. Los cultivos se mantienen a 37°C y 5-7% de CO₂. Las células son retiradas en diversos valores del tiempo durante un período de 14 días para determinar la densidad celular (número de células), tamaño celular y fenotipo de la superficie celular, medidos mediante análisis citométrico de flujo de una diversidad de antígenos superficiales. Las materias sobrenadantes se recogen también de los cultivos para determinar los perfiles de secreción de citoquinas que incluyen, pero sin limitación IL-2, IL-4, IFN-γ y TNF-α. Como las células activadas crecen y se dividen, los cultivos se mantienen a 0,2-2 x 10⁶ células T CD3⁺/ml. Cuando la densidad de células T sobrepasa aproximadamente los 1,5 x 10⁶/ml, los cultivos se dividen y son alimentados con medios de nueva aportación con el fin de proporcionar una densidad celular en el intervalo de 0,2-1,4 x 10⁶/ml. De aproximadamente 2 horas a aproximadamente 14 días a continuación de la estimulación inicial, cuando las células T activadas se muestra que entran en una fase más estático (por ejemplo, niveles de CD25 disminuyendo, tamaño celular disminuyendo según se determina mediante dispersión frontal, la velocidad de división celular puede ser reducida), las células son infundidas en el sujeto o se vuelven a estimular con 1 o más de los siguientes estímulos:

- 1) sin estímulo
- 2) Citohemaglutinina (PHA) 2 µg/ml
- 3) (gránulos 3x28) a una relación 1:1 de gránulo/célula.

Las células se analizan nuevamente a lo largo del tiempo en cuanto al fenotipo celular y el estado de activación/funcional. Se recogen nuevamente materias sobrenadantes para un análisis de las citoquinas secretadas.

5 Las células fueron estimuladas mediante 3 metodologías diferentes 1) Dynabeads (M-450) covalentemente acoplados anticuerpos anti-Cd3 (OKT-3) y anti-CD28 (9.3) según las instrucciones del fabricante (Dynal), 3 gránulos/célula, 2) Ionomicina (Calbiochem, La Jolla, CA) (100 ng/ml) y 12-
10 miristato-13acetato de forbol (PMA) (Calbiochem) (10 ng/ml), 3) células dendríticas alogeneicas (25.000 células dendríticas/ 200.000 células CD4). Todas las células son estimuladas a una concentración de 10^6 célula/ml. Se realizan ensayos de proliferación por cuadruplicado en placas de
15 fondo liso de 96 pocillos. Las células son estimuladas a 10^6 células/ml en un volumen final de 200 μ l. La proliferación se mide mediante un ensayo MTT (estuche de ensayo MTT, Chemicon International Inc., Temecula, CA) en el día 3 (método de estimulación 1 y 2) o en el día 6 (método de es-
20 timulación 3) y los resultados se presentan como el valor medio de cuadruplicados. Los cultivos de PBL o cultivos de células CD4⁺ purificadas se estimulan con gránulos 3x28, ionomicina/PMA o células dendríticas alogeneicas.

Como se demuestra mediante las Figuras 8A-8B, el número de células (contador Coulter) aumenta enormemente a con-
25 tinuación de la estimulación con PHA, gránulos 3x28 (anti-CD3 y anti-CD28 co-inmovilizados en gránulos) unidos a gránulos a través de gránulos 3x28 anti-ratón de oveja (SAM) con los anticuerpos covalentemente unidos a los
30 gránulos, o anticuerpos inmovilizados de forma única o dual sobre una placa. La Figura 9 demuestra también los aumentos de números de células a continuación de una estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 covalentemente inmovilizados en gránulos $\pm$ agotamiento de monocitos y $\pm$ 20 unidades de
35 IL-2.

EJEMPLO X

AGOTAMIENTO DE MONOCITOS A TRAVÉS DE AGOTAMIENTO MAGNÉTICO

Se retiran monocitos (Células fagocíticas CD14⁺) de preparaciones de células T mediante agotamiento magnético, usando una variedad de gránulos Dynal "irrelevantes" (es decir, no revestidos con anticuerpos o no revestidos con anticuerpos dianas). El agotamiento se realizó preincubando sangre completa en Ficol, o sangre periférica aferesada con una relación de gránulo a célula de aproximadamente 2:1 de gránulos M-450 anti-ratón de oveja Dynal, o gránulos revestidos con albumina de suero humano Dynal (M-450) o con gránulos (M-450) epoxi Dynal durante períodos de 1-2 horas a 22-37°C, seguido de separación magnética de las células que se habían unido a los gránulos o habían sido abarcadas por los gránulos. Las células restantes se colocaron en cultivo junto con células sin manipular. Las células fueron caracterizadas mediante citometría de flujo en cuanto al fenotipo celular antes y después del agotamiento. La Figura 9 demuestra la proliferación aumentada en ausencia de monocitos.

EJEMPLO XI

ESTUDIOS CINÉTICOS A LO LARGO DEL TIEMPO PRE-ACTIVACIÓN Y POST-ACTIVACIÓN

Se realizó una serie de experimento en los que las células T humanas, aisladas de sangre completa o de sangre periférica aferesada, fueron cultivados bajo una diversidad de estados. Los estados incluían:

- 1) Sin estimulación
- 2) Estimulación con fitohemaglutinina (PHA) a 2 µg/ml
- 3) Estimulación con Dynabeads 3x28 (gránulos que tenían conjugados a los mismos gránulos-anti-CD23 y anti-C28) a una relación de gránulo a célula T de 3:1 o 1:1
- 4) estimulación o cultivo en presencia o ausencia de IL-2 humana recombinante añadida por vía exógena a 10 U/ml

(5 ng/ml)

5) cultivo en presencia de monocitos (células fagocíticas CD14⁺) o cultivadas a continuación de la separación de las células anteriormente mencionadas a través de un agotamiento magnético usando una variedad de Dynabeads "irrelevantes". El agotamiento se realizó como se ilustra en el Ejemplo II.

Los siguientes marcadores de superficies celulares se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el fenotipo celular y el estado de activación: CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD25, CD45RA, CD45RO, CD54, CD62L, CDw137 (41BB), CD154. Se examina también el tamaño celular, determinado mediante perfiles de dispersión frontal a través de citometría de flujo.

Los marcadores, como CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD45RA, y CD45RO se usan para determinar alineaciones T, B y de monocitos y subpoblaciones, mientras que la dispersión frontal, CD25, CD62L, CD54, CD137, CD154 se usan para determinar el estado de activación y las propiedades funcionales de las células.

Se prepararon linfocitos de sangre periférica humana que contenían células T como se describe en el Ejemplo IX. Las células se analizan a lo largo del tiempo en cuanto al fenotipo celular y estado de activación/funcional. Las materias sobrenadantes se recogen para un análisis de las citoquinas secretadas. Las Figuras 8 y 9 muestran las características generales de crecimiento de células T humanas a continuación de una activación con gránulos 3x28 ± IL-2 humana recombinante a 10 µ/ml y ± agotamiento de monocitos. Todas las células fueron cultivadas en matraces Baxter Lifecell (3.000 ml). El gráfico marcado con "extrapolación" se refiere a un cultivo en matraz de 300 ml (sin IL-2/monocitos agotados) que se expandió hasta un matraz de 3 litros Baxter Lifecell. El gráfico demuestra una expansión de Log 2-4 aproximadamente de células T bajo las diversas

condiciones.

La Figura 10 muestra los análisis cinéticos del tamaño celular determinados mediante perfiles de citometría de flujo de dispersión frontal a lo largo del tiempo. Las células T se observa que aumentan de tamaño poco después de la activación y posteriormente disminuyen de tamaño, de forma que en el día 14 demuestran perfiles de dispersión frontal más pequeños, indicando un estado más estático.

La Figura 11 muestra la expresión de receptor de IL-2 (CD25) a lo largo del tiempo a continuación de una estimulación de gránulos 3x28. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ muestran un aumento temprano en el nivel de receptores. En el día 14, los niveles de expresión de CD25 se reducen grandemente en una mayoría de células T, indicando un estado más estático.

Cuando las células T estimuladas 3x28 se hacen más estáticas (CD25 bajo), dispersión frontal baja), fueron nuevamente estimuladas como se muestra a continuación:

- 1) Sin estimulación
- 2) PHA 2 µmg/ml
- 3) Estimulación con haz 3x28 (XCELLERATE) a 1 gránulo/célula T CD3⁺.

Seguidamente se realizó un análisis cinético del tamaño celular (dispersión frontal), fenotipo superficial, expresión de marcadores de activación y secreción de citoquinas. La Figura 12 muestra la cinética de dispersión frontal (tamaño celular a continuación de una estimulación primaria y secundaria. La Figura 13 muestra la cinética de expresión de CD25 (receptor de IL-12) a continuación de una estimulación primaria y secundaria. La Figura 16 muestra la expresión de CD54 (1-CAM) a continuación de una estimulación secundaria sobre células T CD4⁺ (A) y sobre células T CD8⁺ (B) en que la estimulación primaria fue con gránulos PHA o 3x28 y la re-estimulación fue: ninguna, gránulos de PHA o 3x28. Se usaron también marcadores que delineaban entre

células positivas CD4 y CD8 para determinar su proporción relativa durante la activación con gránulos de anticuerpos 3x28 (Figuras 19 y 22).

EJEMPLO II

5 ANÁLISIS DE MODELOS DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS DE CÉLULAS T CO-ESTIMULADAS

La función de una diversidad de citoquinas, que incluyen IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-4 ha sido intensivamente estudiada ya que se relacionan con el mantenimiento, expansión
10 y diferenciación de células T. Apreciablemente, la IL-2 ha mostrado que es capaz de soportar el mantenimiento y expansión de células T. EL IFN- γ ha estado implicado en la conducción de células T a la diferenciación en un respondedor inmune de tipo T_{H1}, mientras que la IL-4 ha estado implica-
15 da en la conducción de células T a respuestas de tipo T_{H2}. Los niveles de liberación de citoquinas en células T humanas primarias activadas mediante gránulos de PHA o 3x28 se analizaron estimulando células T como en el Ejemplo IX, lo que incluye estudios cinéticos de respuestas a una estimu-
20 lación primaria y respuestas a un estímulo secundario. Los datos se muestran en la Figuras 18A-C y las Figuras 23-24 demuestran una característica única de la estimulación de gránulos 3x28. Entre el día 2 y el día 4 a continuación de la estimulación inicial (el día uno no fue valorado), se
25 observaron niveles extremadamente elevados tanto de IL-2 como de IFN- γ . Se observó un aumento cercano a 5 veces en los niveles absolutos de IL-2 secretada para las células T estimuladas con gránulos 3x28 en comparación con los niveles observados para células estimuladas con PHA. Se observó
30 también un aumento aproximado de 7 veces en los niveles de IFN- γ en células T estimuladas con 3x28 en comparación con sus correspondientes de PHA. En el caso de IL-4, el aumento no fue tan considerable para la estimulación primaria. De forma interesante y posiblemente muy significativa, las

células después se hicieron estáticas (ya no se dividían ni secretaban las tres citoquinas anteriormente mencionadas) a continuación de la estimulación primaria, y fueron nuevamente estimuladas con gránulos 3x28 PHA o se dejaron sin
 5 estimular. Las células T que habían recibido una señal inicial de activación/expansión a través de los gránulos 3x28 secretaron niveles incluso superiores de IFN- γ a los observados a continuación de la estimulación primaria. Por el contrario, las células que fueron inicialmente estimuladas
 10 con PHA secretaron niveles de IFN- γ mucho más bajos que los observados para sus correspondientes de 3x28. Se observó también una diferencia similar para los niveles de IL-4.

Estos datos sugieren que las células obtenidas a continuación de una activación/expansión mediada a través de
 15 gránulos 3x28 son funcionalmente diferentes de las obtenidas a partir de otros medios de expansión como PHA. Las células resultantes parece que tienen una respuesta alterada a la secreción de citoquinas, lo cual favorece niveles muy elevados de citoquinas tanto T_{H1} como T_{H2} , con un favorecimiento posible del perfil de tipo T_{H1} (IFN- γ). La secreción de estos niveles elevados de estas citoquinas en cultivo puede tener muchos efectos, que incluyen: conducir las células T a una trayectoria de diferenciación de T_{H1} , que es una que favorece respuestas anti-tumorales y anti-
 20 virales y también alterando la funcionalidad básica de las células T resultantes (como rebajando el umbral de activación e inhibiendo las trayectorias de muerte celular programada).

EJEMPLO XIII

30 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD54 DE CÉLULAS T CO-ESTIMULADAS

La Figura 16 muestra la activación de CD54 (I-CAM) a continuación de una estimulación secundaria, sobre células T $CD4^+$ (A) y sobre células T $CD8^+$ (B), en la que la estimu-

lación primaria fue de PHA o gránulos 3x28 y la re-estimulación fue: ninguna, PHA o gránulos 3x28.

EJEMPLO XIV

ENSAYOS DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN A CORTO PLAZO

5 La expresión de marcadores fue verificada sobre diversos valores del tiempo a continuación de una estimulación de células T como se expone en el Ejemplo IX. A este respecto, las células son marcadas CD4 anti-humano (Immunotech, Fullerton, CA), CD11a anti-humano acoplado a FITC (Pharmigen), CD26 anti-humano acoplado a FITC (Pharmigen),
10 CD49d anti-humano acoplado a FITC (Coulter), CD54 anti-humano acoplado a FITC (Pharmigen and Becton Dickinson), CD95 anti-humano acoplado a FITC (Pharmigen), CD134 anti-humano acoplado a FITC (Pharmigen), CD25 Ab anti-humano
15 acoplado a FITC (Becton Dickinson, Fullerton, CA), CD69 Ab anti-humano acoplado a FITC (Becton Dickinson), CD154 Ab anti-humano acoplado a FITC o PE (Becton Dickinson) o Ab testigo de isotipo de IgG1 acoplado a FITC o PE. Las células 2×10^5 , son marcadas durante 20 minutos a 4°C con 2 µl
20 de cada anticuerpo en un volumen final de 30 µl, se lavan y se vuelven a poner en suspensión en paraformaldehído al 1% (Sigma, St. Louis, MO). Véanse las Figuras 21-22 y 26A-26L, ya que mediante estas figuras parece que hay diferencias significativas sobre el tiempo de activación así como entre
25 células CD4⁺ y CD8⁺.

EJEMPLO XV

EXPANSIÓN DE CÉLULAS T USANDO DIVERSAS RELACIONES DE CD3:CD28

La expansión de células T se evaluó usando concentraciones variables de las relaciones de CD3:CD28 sobre los
30 gránulos 3x28 DYNABEADS® M-450. En los experimentos descritos en la presente memoria descriptiva, se usó el procedimiento denominado XCELLERATE® II, como se describe en el ejemplo I. Como se muestra en la Figura 27, sorprendentemente, se observó una expansión de aproximadamente 68 veces
35

después de 8 días de cultivo con una relación de CD3:CD28 de 1:10 en los gránulos. Se observó una expansión de 35 veces de células T después de 8 días de cultivo con una relación CD3:CD28 de 1:3 en los gránulos. A una relación de 1:1 se observó una expansión de aproximadamente 24 veces.

EJEMPLO XVI

EXPANSIÓN DE CÉLULAS T USANDO RELACIONES VARIABLES DE GRÁNULOS:CÉLULAS T PARA UNA SELECCIÓN POSITIVA SEGUIDA DE CANTIDADES VARIABLES DE ADICIÓN SECUENCIAL DE GRÁNULOS

Este ejemplo describe modificaciones del procedimiento XCELLERATE® II (véase el Ejemplo I) para determinar las relaciones más eficaces de gránulos:células T para una selección positiva una expansión óptima de células T durante los 10 primeros días de estimulación.

En el primer experimento, se hicieron comparaciones de células positivamente seleccionadas con una relación 1:1 de gránulos 3x28: células y estimuladas con relaciones variables de gránulos 3x28 secuencialmente añadidos en los 10 primeros días de estimulación. Las células fueron positivamente seleccionadas con 3x28 DYNABEADS® M-450 a relaciones de gránulos:células T de 3:1 y 1:1. Para la relación de 3:1 se aislaron 2×10^6 células (suponiendo un 50-60% de células T) y se volvieron a poner en suspensión en 1 ml de PBS + 5% de suero humano. Se añadieron 30×10^6 gránulos lavados para un volumen total de 2 ml. Para la relación 1:1, se añadieron 10×10^6 gránulos lavados a las 10×10^6 células totales. Las células se cultivaron en matraces T-25 en el día 3, se contaron y se dividieron en placas de 6 pocillos en un volumen de 5 ml. En el día 5, todos los pocillos se dividieron en $1,25 \times 10^6$ células/pocillo. En los días 3, 4 y 6-9, todos los pocillos se dividieron en $2,5 \times 10^6$ células/pocillo. Seguidamente se añadieron secuencialmente gránulos 3x28 a las células positivamente seleccionadas a relaciones 1:1 de gránulos:células. Como se resume en la Tabla 7, los rendimientos celulares en el día 10 fueron los

más elevados con la adición secuencial de gránulos en los días 3, 4 y 5 a una relación final de 0,2:1.

Tabla 7: rendimiento células en el día 10 a continuación de la adición secuencial variable de gránulos 3x28

Relación de selección positiva (gránulos:células)	Relación de gránulos secuencialmente añadidos (gránulos:células)	Rendimiento celular $\times 10^6$ en el día 10
Selección 3:1	Ninguno	4.300
Selección 1:1	Ninguno	2.600
Selección 1:1	0,33:1 en D1 y 2	6.700
Selección 1:1	0,2:1 en D1 y 2	4.000
Selección 1:1	0,2:1 en D1-5	9.600
Selección 1:1	0,2:1 en D3-5	11.400

5

En un segundo experimento, los tiempos de selección positivos se hicieron variar de 0,5-1,0 hora y las relaciones de gránulos:células variaron de 3:1 a 1:1. Como se resume en la Tabla 8, el rendimiento celular más elevado en el día 10 se obtuvo con una relación 1:1 de gránulos:células durante 60 minutos y la adición secuencial de gránulos a una relación 0,2: 1 en los días 3 y 5. Sin embargo, debe apreciarse que la selección con una relación de gránulos:células de 3: 1 durante 30 minutos proporcionó los rendimientos de selección positiva más elevados.

10

15

Tabla 8: Rendimiento celular en el día 10 a continuación de relaciones de selección positiva, tiempos y adiciones secuenciales variables de gránulos 3x28

Relación de selección positiva de células: gránulos	Tiempo de selección positiva	Relación de gránulos secuencialmente añadidos (gránulos :	Rendimiento celular $\times 10^6$ en el día 10
---	------------------------------	--	--

		células)	
3:1	30 minutos	0,2:1 en D3	5.100
1:1	30 minutos	ninguno	3.300
1:1	30 minutos	0,2:1 en D3	4.400
1:1	30 minutos	0,2:1 en D3 y D5	5.700
1:1	30 minutos	0,2:1 en D3, 4 y 5	6.700
1:1	60 minutos	ninguno	3.400
1:1	60 minutos	0,2:1 en D3	4.800
1:1	60 minutos	0,2:1 en D3 y D5	9.000
1:1	60 minutos	0,2:1 en D3, 4 y 5	7.900

EJEMPLO XVII

EXPANSIÓN DE CÉLULAS T USANDO XCELLERATE® II Y EL BIO-REACTOR WAVE

- 5 Este ejemplo describe la expansión de células T usando el procedimiento Xcellerate Iib seguido de sembrar células en el bio-reactor Wave.

Día 0 en el procedimiento Xcellerate- En el primer día del procedimiento Xcellerate, esencialmente como se describe en el Ejemplo I, se retiró el número requerido de recipientes Cryocte® crioconservados del congelador de almacenamiento, se descongelaron, se lavaron y se filtraron.

Día 0 - seguidamente se mezcló un volumen de células que contenía aproximadamente $0,5 \times 10^9$ células CD3⁺ con gránulos Dynabeads M-450 CD3/CD28 T a una relación 3:1 de Dynabeads M-450 CD3/CD28 T: células T CD3⁺ y se incubaron con rotación. Después de la incubación, las células T CD3⁺ se concentraron magnéticamente y simultáneamente se activaron. Seguidamente las células T CD3⁺ se volvieron a poner en suspensión en medio completo en una bolsa de cultivo de

células Lifecell. La bolsa que contenía las células y los gránulos se colocó seguidamente en un incubador dedicado a pacientes (37°C, 5% de CO₂).

Aproximadamente en el día 3 - Las células CD3⁺ se cultivaron-expandieron durante $\approx$ 3 días, momento en el cual el contenido de la bolsa única se dividió en 4 bolsas Lifecell. Las 4 bolsas se hicieron retornar seguidamente al incubador dedicado al paciente (37°C, 5% de CO₂).

En el día 5 o sus proximidades - Las células CD3⁺ fueron cultivadas-expandidas durante $\approx$ 2 días adicionales, en cuyo momento el contenido de las bolsas de cultivos se sembró seguidamente en un bio-reactor Wave de 20 l que contenía un volumen de 10 l de medios. Las células se cultivaron seguidamente a 37°C, 5% de CO₂ con el movimiento de ondulación 15 oscilaciones/minuto y con una perfusión a 1 ml/minuto.

Los recuentos celulares se determinaron cada día y se compararon con las células estimuladas y expandidas usando el procedimiento XCELLERATE® II. Como se muestra en la figura 28, la expansión mejoró enormemente cuando las células se cultivaron en el bio-reactor Wave. Adicionalmente, las densidades celulares alcanzaron valores elevados de 50×10^6 células/ml en el bio-reactor Wave, en comparación con una densidad celular máxima de 5×10^6 observada en el procedimiento estático XCELLERATE® II. Se consiguió un recuento celular total de aproximadamente 800 mil millones en el día 12 de cultivo a partir del recuento celular de partida de aproximadamente $0,5 \times 10^9$ células usando el bio-reactor Wave.

Por tanto, el bio-reactor Wave proporciona una mejora inesperada y enorme para el procedimiento de expansión. Además de ello, se consiguieron densidades celulares y rendimiento celulares absolutos finales no observados hasta ahora cuando se usó el bio-reactor Wave.

EJEMPLO XVIII

PROTOCOLOS ALTERNATIVOS PARA LA EXPANSIÓN DE CELULAS T
USANDO EL BIO-REACTOR WAVE

Se desarrollaron estrategias alternativas de estimulación/activación y expansión de células T usando el bio-reactor Wave, o sistemas de bio-reactores comparables, para conseguir densidades celulares elevadas y rendimientos celulares finales elevados.

En una estrategia, las células se descongelan y se lavan y se inicia la selección positiva como se describe en el procedimiento XCELLERATE® II. Las células positivamente seleccionadas se transfieren a una bolsa Wave de 2 litros en la plataforma Rocker. El volumen se aumenta hasta 1 litro introduciendo medio completo en la bolsa a través del tubo de salida. La bolsa seguidamente se incubaba en la plataforma Wave, sin oscilaciones, a 37°C y 5% de CO₂. En el día 3 se inició una oscilación suave (5-10 oscilaciones/minuto). En el día 4-5, el contenido se transfiere a una bolsa Wave de 20 litros y el volumen se aumenta hasta 4 litros. El sistema de suministro de fluido se ajusta para aumentar el volumen de la bolsa en 2 litros por día. En el día 7-8 se inicia la perfusión desde aproximadamente 0,5-3 ml/ minuto y se ajusta la bomba de salida para mantener el volumen de la bolsa en 10 litros. En el día 9 hasta el día 12 se recolectan las células, se desconecta el sistema de suministro de fluido y se retiran 5 litros de materia sobrenadante a través de la bomba de salida. El imán angular se une al conducto de salida. El producto celular expandido se deja fluir al exterior de la bolsa de 20 litros en el interior de envases de transferencia. El producto celular expandido desgranulado es tratado y crioconservado.

En una estrategia alternativa, las células son descongeladas y lavadas y son positivamente seleccionadas como se describe en el procedimiento XCELLERATE® II pero al doble de concentración de células y gránulos. Las células positi-

vamente seleccionadas se transfieren a una bolsa Wave de 20 litros en la plataforma de oscilación. El volumen se aumenta hasta 2 litros introduciendo medio completo en la bolsa a través del tubo de salida. Seguidamente la bolsa se incubaba en la plataforma Wave, sin oscilación a 37°C y 5% de CO₂. En el día 3 se inicia una oscilación suave (5-10 oscilaciones/minuto) y el volumen se aumenta hasta 6 litros. En el día 4, el sistema de suministro de fluido se ajusta para aumentar el volumen de la bolsa en 2 litros por día. En el día 6, se inicia la perfusión desde aproximadamente 0,5-3 ml/minuto y se ajusta la bomba de salida para mantener el volumen de la bolsa en 10 litros. En el día 9 y hasta el día 12 se recolectan las células: se desconecta el sistema de suministro de fluido y se retiran 5 litros de materia sobrenadante a través de la bomba de salida. El imán magnético es unido al conducto de salida. El producto celular expandido se deja fluir fuera de la bolsa de 20 litros hasta envases de transferencia. El producto celular expandido y desgranulado es tratado y criopreservado.

20 EJEMPLO REPRESENTATIVO IX-XX

EJEMPLO XIX

LAS RELACIONES VARIABLES DE GRÁNULOS:CÉLULAS PUEDEN EXPANDIR O SUPRIMIR SELECTIVAMENTE LA MEMORIA DE CÉLULAS T CD8

25 Este ejemplo muestra que la relación de gránulos:células puede tener un efecto profundo sobre la expansión de diferentes poblaciones de células T. En particular, una relación elevada de gránulos:células (3:1- 10:1) tiende a inducir la muerte en células T específicas para antígenos, mientras que una relación de gránulos:células inferior (1:1-1:10) conduce a la expansión de células T específicas para antígenos. Además, los datos descritos con posterioridad muestran que las relaciones inferiores de gránulos:células conducen a una expansión celular mejorada también en poblaciones de células policlonales. Por tanto, es-

te ejemplo muestra que las relaciones inferiores de gránulos:células mejoran la expansión celular global.

Se prepararon y estimularon células usando el procedimiento XCELLERATE® I esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Antes de disponer en placas y cultivar, las células con agotamiento de monocitos se mezclaron mediante rotación durante 30 minutos con cantidades variables de gránulos, como se resume a continuación en la Tabla 9. Los gránulos usados en este ejemplo comprendían los DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T con una relación 1:1 de anticuerpos CD3:CD8 en los gránulos.

Tabla 9: Las relaciones variables de gránulos:células pueden expandir o suprimir selectivamente células T CD8 de memoria

Relación de gránulos:células	Aumento en veces	
	Células T policlonales	Células T específicas para antígenos CMV
10:1	149	0
5:1	294	0
3:1	346	1,4
1:1	562	20,6
1:5	113	53
1:10	79	45,8

15

Los resultados resumidos en la Tabla 9 y mostrados gráficamente en la Figura 29 demuestran que las células T específicas para antígenos pueden ser selectivamente suprimidas usando relaciones elevadas de gránulos:células y expandidas usando relaciones bajas de gránulos:células. Aunque no se desean vinculaciones teóricas, se cree que las células T específicas para antígenos están sensibilizadas para una estimulación adicional. La estimulación con rela-

20

ciones elevadas de gránulos:células proporciona una concentración elevada de anticuerpo estimulador, conduciendo a una sobre-estimulación de células T específicas para antígenos, provocando que mueran, ya sea mediante apoptosis u
 5 otros mecanismos. El uso de relaciones inferiores de gránulos:células proporciona una señal de estimulación para células T específicas para antígenos que no sobre-estimula, sino que en lugar de ello induce una proliferación rápida de estas células. Se puede observar también un aumento en
 10 la proliferación en la población policlonal de células T usando relaciones inferiores de gránulos:. En particular, los resultados indican que una relación de gránulos:células de 1:1 es óptima para la expansión de células T policlonales.

15 Por lo tanto, en este ejemplo se proporciona una evidencia para apoyar el uso de relaciones diferentes de gránulos:células dependiendo del resultado deseado. Para la expansión de células T específicas para antígenos, es preferible una relación inferior de gránulos:células. Es preferida una relación superior de gránulos:células si el resultado deseado es la supresión de células T específicas para antígenos.

EJEMPLO XX

EL PROCEDIMIENTO XCELLERATE® III

25 Este Ejemplo describe estudios adicionales de cualificación llevados a cabo usando lo que se denomina el procedimiento XCELLERATE® III. Este procedimiento es esencialmente como se describe en los Ejemplos XVII y XVIII. Brevemente, el producto de leucaféresis PBMC es tratado como se describe para el procedimiento XCELLERATE® II. Sin embargo,
 30 las células T CD3⁺ magnéticamente concentradas son transferidas a una bolsa de cultivo de 20 l (como una Cellbag® de 20 l, Wave Biotech, Bridgewater, NJ), en una plataforma oscilante (como una plataforma WaveBio-reactor™ 20XE, Wave

Biotech, Bridgewater, NJ) en un medio X-vivo® 15 (exento de rojo de fenol y exento de gentamicina) en presencia de IL-2 recombinante. Las células T se activan y se expanden a 37°C durante un período de 10 días con movimiento oscilante y perfusión. Los gránulos Xcyte® Dynabeads® son seguidamente retirados y las células XCELLERADAS® T son recolectadas, formuladas y crioconservadas.

El procedimiento XCELLERATE® III se desarrolló usando productos de aféresis de PBMC de donantes sanos. Durante el desarrollo y posterior cualificación para un uso en operaciones de fabricación de GMP, se llevó a cabo una comparación del procedimiento XCELLERATE® III con el procedimiento XCELLERATE® II estático con donantes sanos. Como se muestra en la Tabla 10, la pureza y la viabilidad de los productos de células T XCELLERADAS® producidas por los diferentes procedimientos son muy similares. Sin embargo, la densidad celular conseguida en el procedimiento XCELLERATE® III es 5 veces mayor que la del procedimiento XCELLERATE® II, proporcionando un rendimiento de $188 \pm 50 \times 10^9$ células T XCELLERADAS® en un volumen de 10 L comparadas con $223,2 \pm 47,4 \times 10^9$ células T XCELLERADAS® en un volumen de 60 l. El rendimiento elevado de células T XCELLERADAS® en un volumen pequeño con el procedimiento XCELLERATE® III hace posible un cierto número de eficacia que incluyen la reducción de: a) laboriosidad global; (b) número de recipientes de cultivo necesarios de 60 a 1; (c) número de conexiones esterilizadas y (d) volumen de procedimiento de 60 l a 10 l, mientras que aumentan: (a) densidad celular final ≥ 4 veces y (b) capacidad de la instalación: 2 veces. Además, hay también una reducción significativa en el coste de los artículos.

Tabla 10. Comparación de rendimiento, pureza y viabilidad de células T XCELLERADAS® producidas a partir del procedimiento XCELLERATE® II estático y el procedimiento XCELLERATE® III basado en bio-reactor Wave usando donantes

sanos

	Configuración del procedimiento XCELLERATE®	Propiedades del producto de células XCELLERADAS® pre-recolectadas				
		Densidad de células T CD3 ⁺ (x 10 ⁶ ml)	Volumen del cultivo	Rendimiento de células T CD3 ⁺ (x 10 ⁹ ml)	Pureza de células T CD3 ⁺ (%)	Viabilidad celular
Promedio ± Desv. Tip.	Donantes sanos de XCELLERATE® II (n=12)	3,7±0,8	60 l	223,2±47,4	99,0±2,0	97,0±3,0
	Donantes sanos de XCELLERATE® III (n=10)	18,8±5,0	10 l	188±50,2	100±0,0	96,0±2,0
Las células T XCELLERADAS® se fabricaron a partir de PBMC de donante sano usando el procedimiento XCELLERATE® II o XCELLERATE® III (n=10). Antes de la recolección, los cultivos fueron evaluados en cuanto al número de células, viabilidad y pureza de células T CD3⁺ La densidad y el rendimiento de células T CD3⁺ se calcularon a partir de estos valores						

Tras la activación en el procedimiento XCELLERATE® ex vivo, las células t experimentan cambios físicos, biológicos y fenotípicos que son paralelos a los observados durante la estimulación y activación inicial de células T en reposo desprovistas de inmunidad en el nódulo linfático. Estas características proporcionan herramientas útiles en el procedimiento con las que verificar la activación de células T durante el procedimiento XCELLERATE® ex vivo. Como se muestra en la Figuras 30 y 31, la activación de células T en el procedimiento XCELLERATE® III es muy similar a la del procedimiento XCELLERATE® II según se determina mediante el tamaño celular, expresión de CD25, expresión de CD154 y expresión de citoquinas. Como se muestra en la Figuras 32 y 33, las características cinéticas en el procedimiento y la magnitud de activación observada para pacientes de mieloma múltiple durante la fabricación de GMP para ensayos clíni-

cos es esencialmente idéntica. En términos de composición del producto final, la pureza, viabilidad y relación de células T CD4⁺ helper: CD8⁺ citotóxicas es estrechamente similar a la de células T XCELLERADAS® elaboradas usando
5 los diferentes procedimientos.

Desde la re-estimulación de células T activadas en el acontecimiento biológico natural durante una respuesta inmune eficaz, se usó un ensayo de re-estimulación para valorar la actividad biológica *in vitro* de células T XCELLERADAS®. En este ensayo, las células T XCELLERADAS® fueron re-estimuladas con XR-CD3 y XR-CD28 o estimuladas con miristato-acetato de forbol (PMA)/ ionomicina; y se midió la sobre-regulación de la secreción de citoquinas, la expresión de CD25 y la expresión de CD154. Los resultados en la Figura 34 indican, sorprendentemente, que tras la re-estimulación, las células T XCELLERADAS® en el procedimiento XCELLERATE® III basado en un bio-reactor exhiben niveles superiores de secreción de citoquinas y un sobre-regulación/inducción mayor de CD154 y CD25 que la producida en el procedimiento XCELLERATE® II estático. Adicionalmente, el aumento en la actividad biológica *in vitro* de células T XCELLERADAS® elaboradas usando el procedimiento XCELLERATE® III parece que se correlaciona con el efecto biológico *in vivo* aumentado a continuación de una infusión en pacientes con mieloma múltiple (Figura 35).
10
15
20
25

Se observa una diversidad disminuida de receptores de células T expresada en la superficie de células T en la sangre periférica de pacientes con muchas enfermedades, que incluyen cáncer ((Peggs KS, et al. Brit J Haematol 2003: 120; 154-165.; Mariani S, et al., Brit J Haematol.2001: 113; 1051-1059; Roux E, et al. Blood 2000: 96; 2299-2303.; Claret EJ, et al., J Clin Invest 1997: 100; 855-866.; Kluin-Nelemans HC, et al., Blood 1998: 91; 4224-4231.; Ey-rich M, et al.; Blood 2002: 100; 1915-1918.; Gorski J, et
30

al.; J Immunol 1994: 152; 5109-5119.), virus de inmunodeficiencia humana (HIV) ((Gorochoff G, et al.; Nature Med 1998: 4; 215-221) y enfermedades autoinmunes (Kuchroo VK, et al.; Annu Rev Immunol 2002: 20; 101-123.; Ria F, et al.; Curr Mol Med 2001: 1; 297-304.; Vergelli M, et al.; J Neurosci Res 2001: 66; 517-524.; Wong S, et al.; Autoimmunity 1994: 18; 77-83). Este espectro disminuido de receptores de células T estrecha la capacidad de las células T para reconocer una amplia gama de antígeno, que pueden reducir la capacidad de un paciente a responder y eliminar enfermedades de cáncer e infecciosas. La capacidad de la tecnología XCELLERATE® para ensanchar la diversidad del repertorio estrecho de células T ha sido previamente demostrado en pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) (véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. 2004/005,298). Tanto el procedimiento XCELLERATE® II como el procedimiento XCELLERATE® III restauran un amplio repertorio de receptores de células T amplio a partir del modelo asimétrico estrecho que es característico cuando se parte de PBMC para casi todos los pacientes de mieloma múltiple tratados hasta la fecha para este ensayo clínico.

Hasta la fecha, la infusión de células T XCELLERADAS® elaboradas con el procedimiento en pacientes con mieloma múltiple ha sido bien tolerada sin acontecimientos adversos graves ni toxicidad. Los estudios clínicos previos han mostrado que la recuperación de recuentos de linfocitos de sangre periférica hasta $\geq 500/\text{mm}^3$ en el día 14 o anterior a continuación de una quimioterapia de dosis elevada y un trasplante de células madre autólogo (sin infusión de células) se correlaciona con una supervivencia aumentada. Como se muestra en la Figura 35, la infusión de células T XCELLERADAS® conduce a una recuperación muy rápida de linfocitos en sangre periférica hasta $> 500/\text{mm}^3$ en el día 4-5 a continuación de una quimioterapia y trasplante de células

madre autólogas (día 1-2 a continuación de una infusión de las células T XCELLERADAS®) que es sostenido durante un período prolongado.

Sorprendentemente, los datos de la Figura 35 muestran
5 que la recuperación de recuentos de linfocitos en sangre periférica es de hecho más rápido que a continuación de una infusión de células T XCELLERADAS® elaboradas usando el procedimiento XCELLERATE® III (n= 10 pacientes infundidos hasta la fecha) en comparación con las fabricadas usando el
10 procedimiento XCELLERATE® II (n = 18 pacientes infundidos). Estos datos se correlacionan con la mayor actividad biológica *in vitro* observada para donantes sanos durante el desarrollo y cualificación del procedimiento XCELLERATE® III y sugieren que las células T XCELLERADAS® fabricadas usando
15 el bio-reactor Wave® pueden tener una actividad biológica mejorada.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para expandir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria, que comprende:

poner en contacto una población de células en la que
 5 al menos una parte de las mismas comprende células T CD8⁺
 con un gránulo, en que dicho gránulo tiene unido al mismo
 un primer agente que se liga al complejo de células T de
 receptor de antígeno de células T (TCR)/CD3 y el mismo
 gránulo tiene unido al mismo un segundo agente que se liga
 10 a la molécula accesoria de CD28 de células T,

en que el primer agente es un anticuerpo anti-CD3 o un
 fragmento de unión a antígeno del mismo y el segundo agente
 es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antí-
 geno del mismo, y expandir así selectivamente una población
 15 de células T CD8⁺ de memoria,

caracterizado porque dicha relación de gránu-
 los:células es de 1:1 a 1:10.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha
 relación de gránulos:células es de 1:5 a 1:10.

20 3. El método de la reivindicación 1, en el que la re-
 lación de anticuerpos anti-CD3:anticuerpos anti-CD28 es de
 1:1 a 1:100.

4. Una composición, que comprende una población de
 células T de CD8⁺ de memoria activadas producidas según el
 25 método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

5. Una composición farmacéutica, que comprende una po-
 blación de células T CD8⁺ de memoria producida según el
 método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 junto
 con un vehículo, diluyente o tampón farmacéuticamente acep-
 30 table.

6. El uso de una población de células T CD8⁺ de memo-
 ria producida según el método de una cualquiera de las rei-
 vindicaciones 1-3 en la elaboración de un medicamento para
 el tratamiento de cáncer.

35 7. Población de células T CD8⁺ de memoria producida

según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para ser usada en el tratamiento de cáncer.

8. Los usos según la reivindicación 6 o la población según la reivindicación 7, en que dicho cáncer es un melanoma, linfoma que no es de Hodgkin, linfoma de células T cutáneas, enfermedad de Hodgkin, leucemia, plasmacitoma, sarcoma, glioma, timoma, cáncer de mamas, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer uterino, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, cáncer gástrico, cáncer esofágico, mieloma múltiple, hepatoma, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mielogénica aguda (AML), leucemia mielogénica crónica (CML) o leucemia linfocítica crónica (CLL).

9. Los usos según la reivindicación 6 o la población según la reivindicación 7, en los que dicho cáncer es mieloma múltiple o CLL.

10. Un método *in vitro* para suprimir selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria, que comprende:

poner en contacto una población de células en la que al menos una parte de las mismas comprende células T CD8⁺ con un gránulo, en que dicho gránulo tiene unido al mismo un primer agente que se liga al complejo de células T de receptor de antígeno de células T (TCR)/CD3 y el mismo gránulo tiene unido al mismo un segundo agente que se liga a la molécula accesoria CD28 de células T,

en que el primer agente es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el segundo agente es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y suprimir así selectivamente una población de células T CD8⁺ de memoria,

caracterizado porque dicha relación de gránulos:células es de de 3:1 a 10:1.

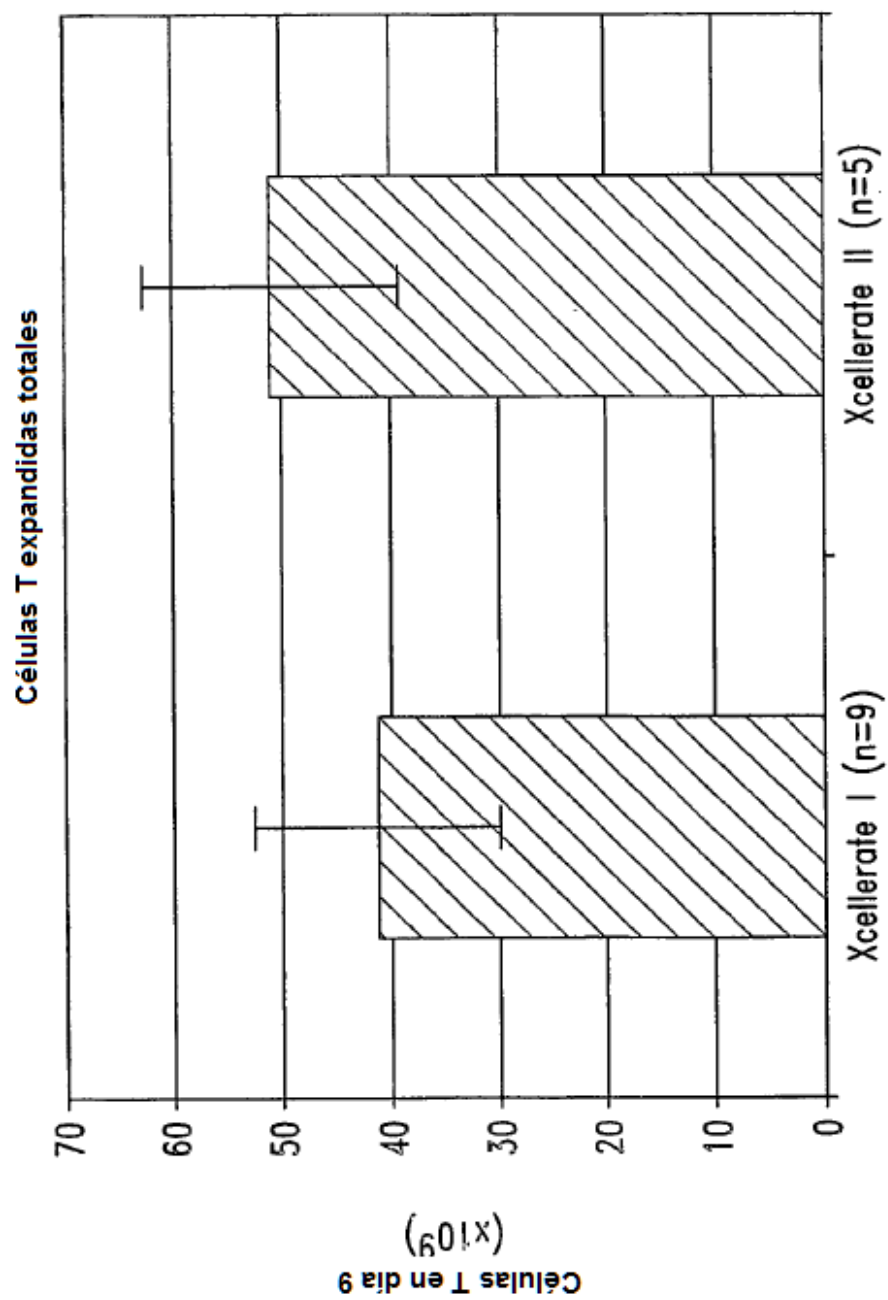
11. El método de la reivindicación 10, en el que dicha

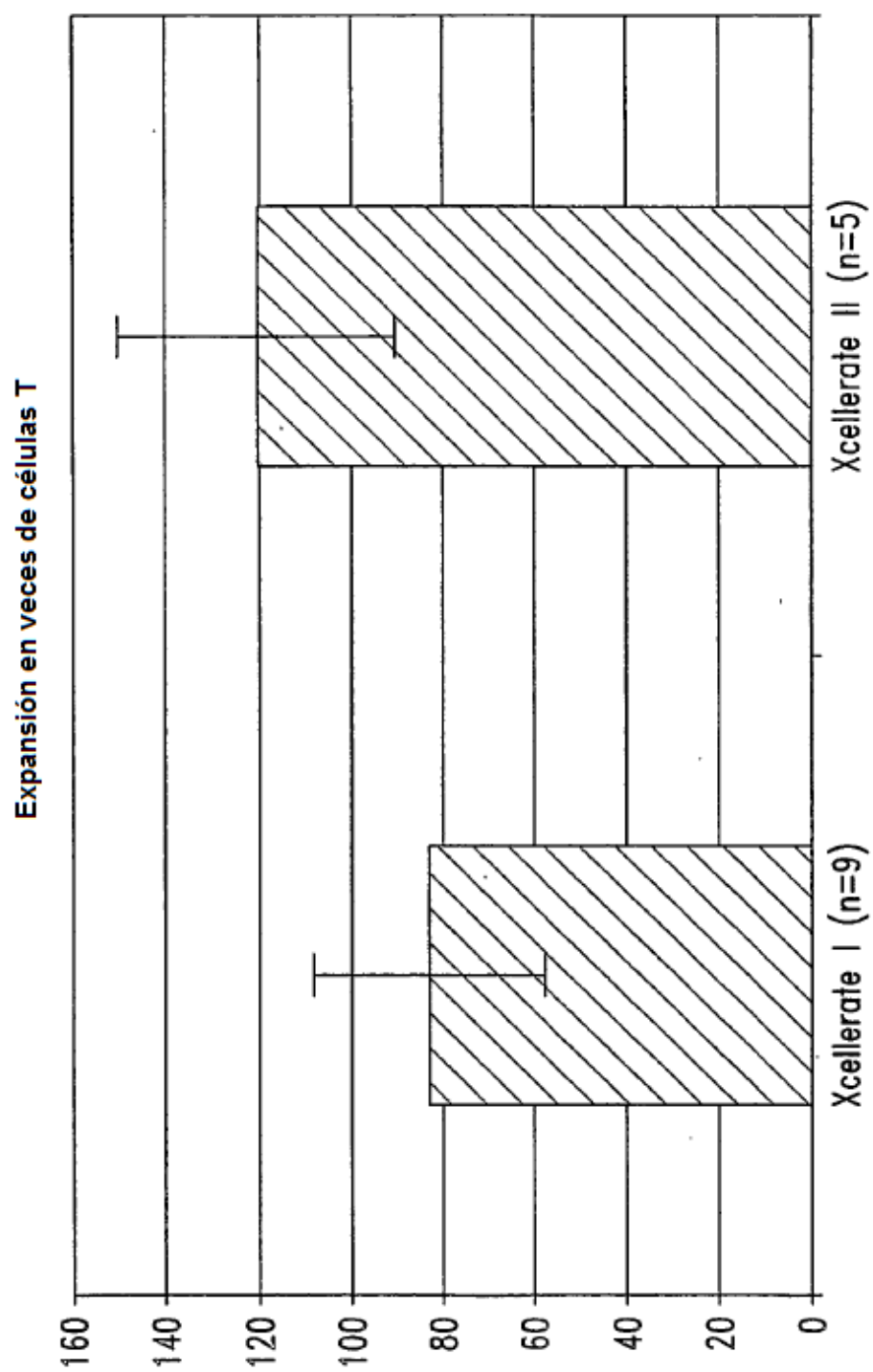
relación de gránulos:células es de 5:1 a 10:1.

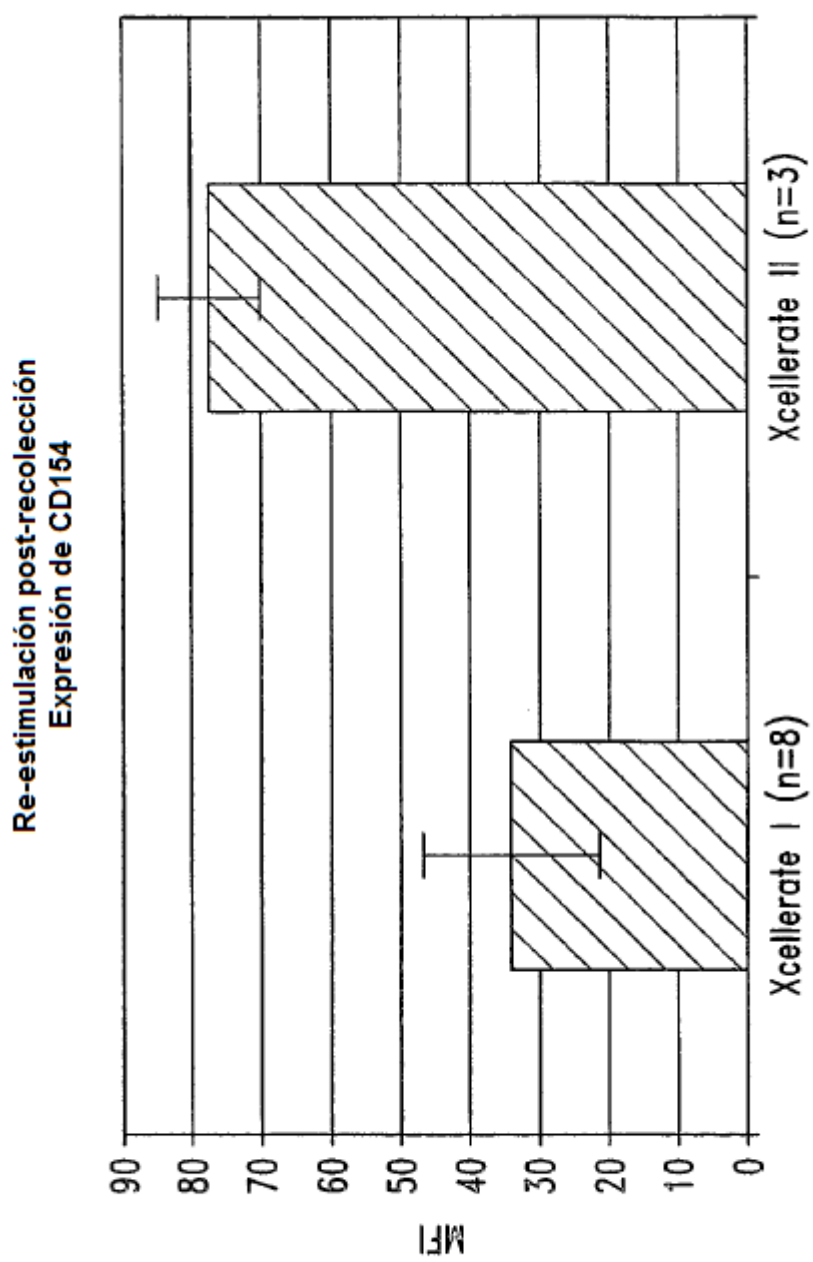
12. El método de la reivindicación 10, en el que la relación de anticuerpos anti-CD3:anticuerpos anti-CD28 es de 1:1 a 1:100.

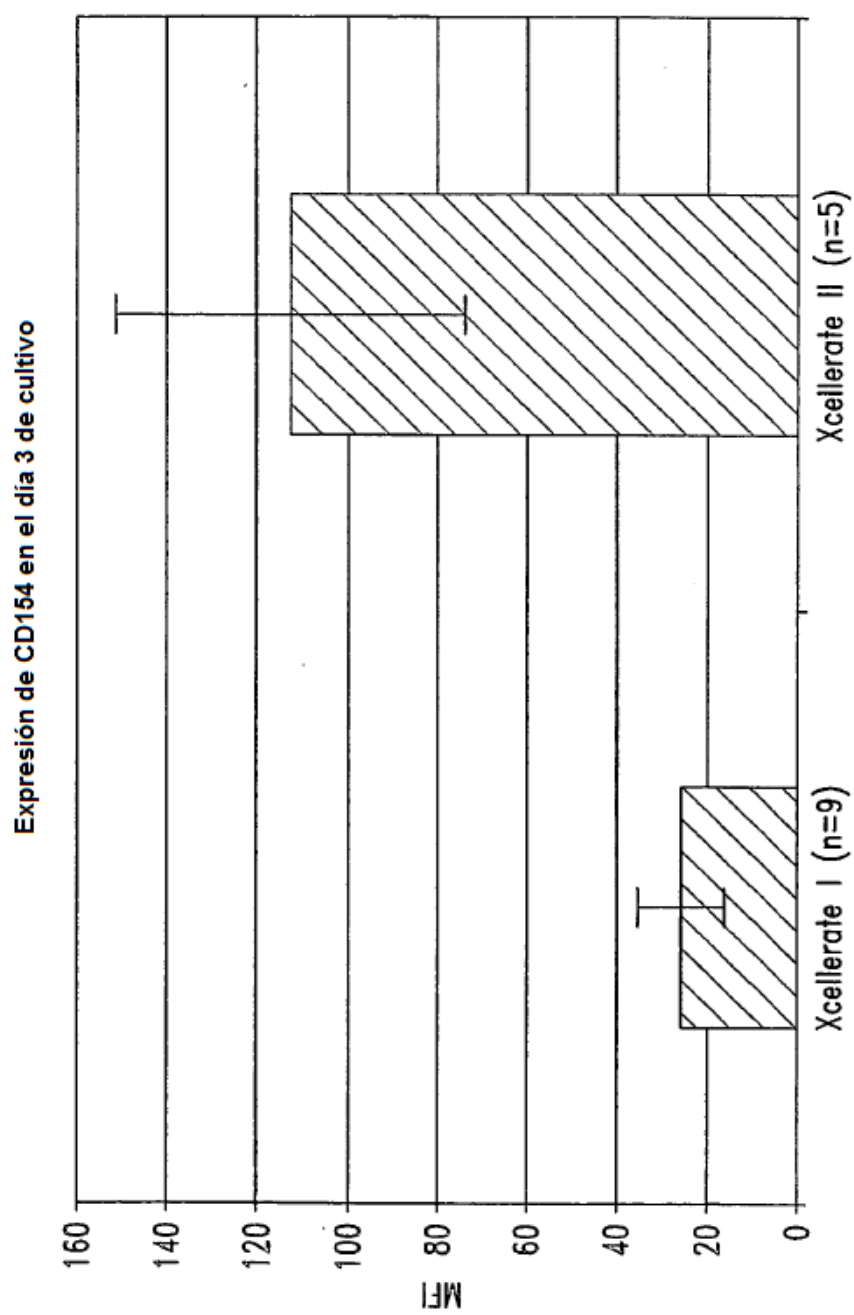
5 13. Una composición que comprende una población de células T CD8⁺ activadas, con agotamiento de células de memoria, producida según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

10 14. Una composición farmacéutica que comprende una población de células T CD8⁺, con agotamiento de células de memoria, producida según el método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, junto con un diluyente, tampón o medio farmacéuticamente aceptable.

*Fig. 1*

*Fig. 2*

*Fig. 3*

*Fig. 4*

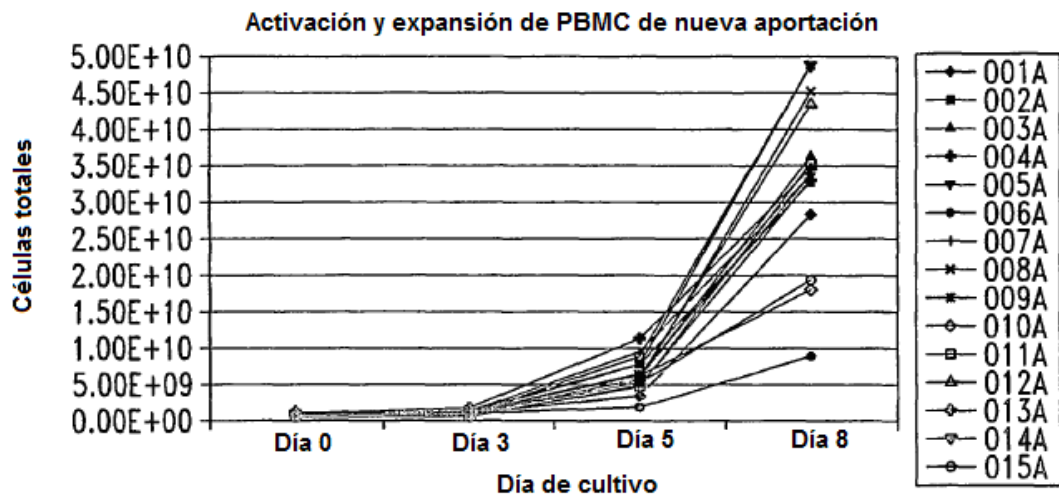


Fig. 5A

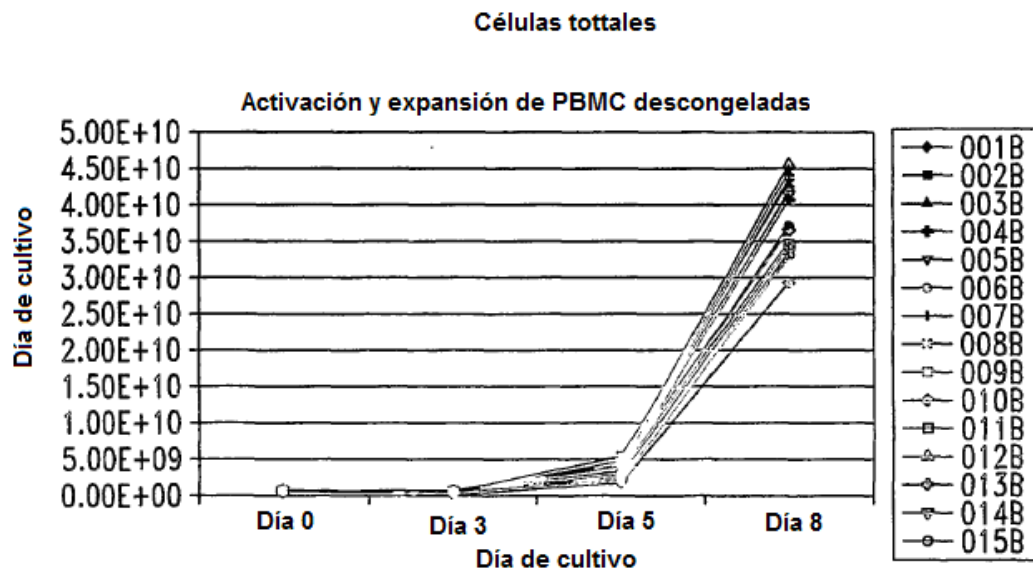


Fig. 5B

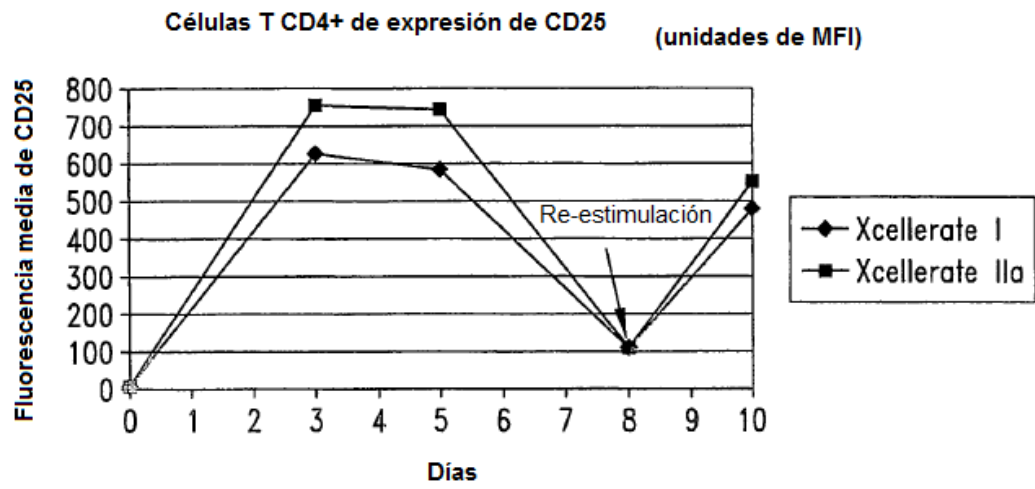


Fig. 6A

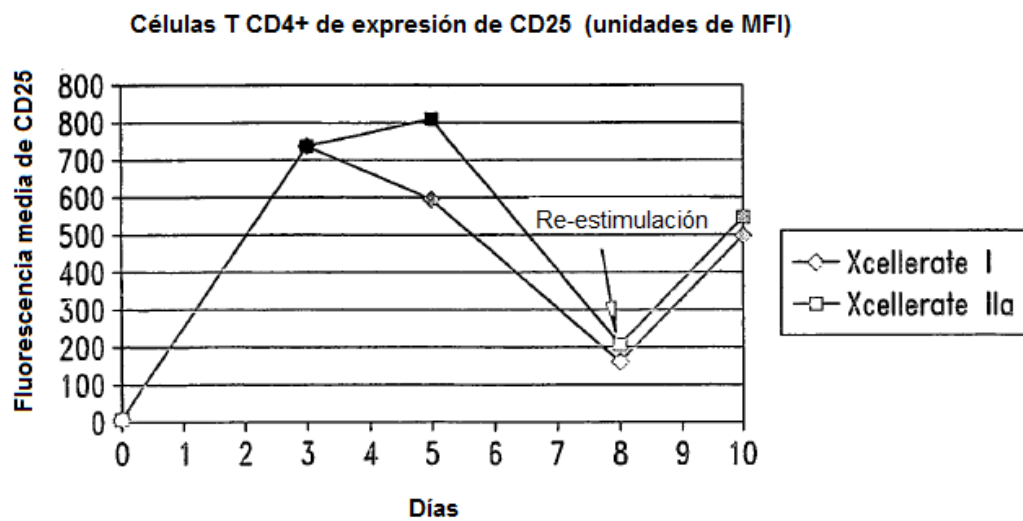


Fig. 6B

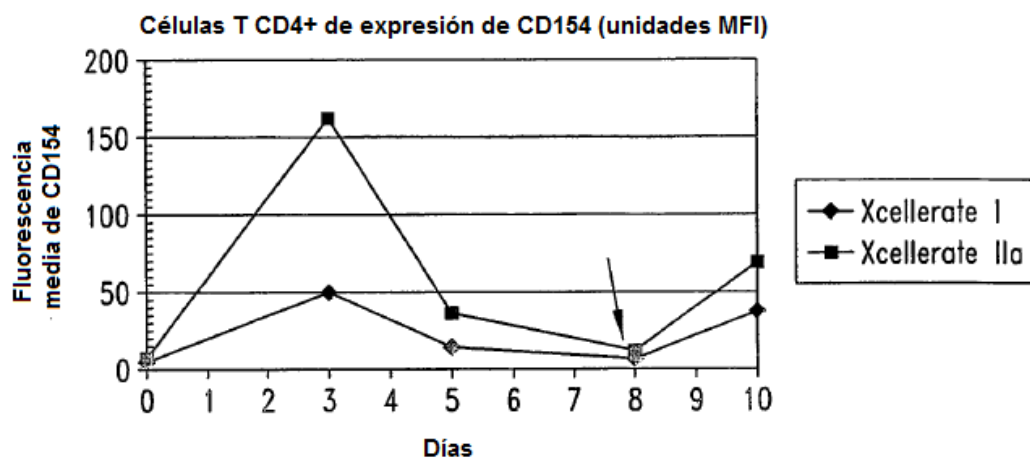


Fig. 7A

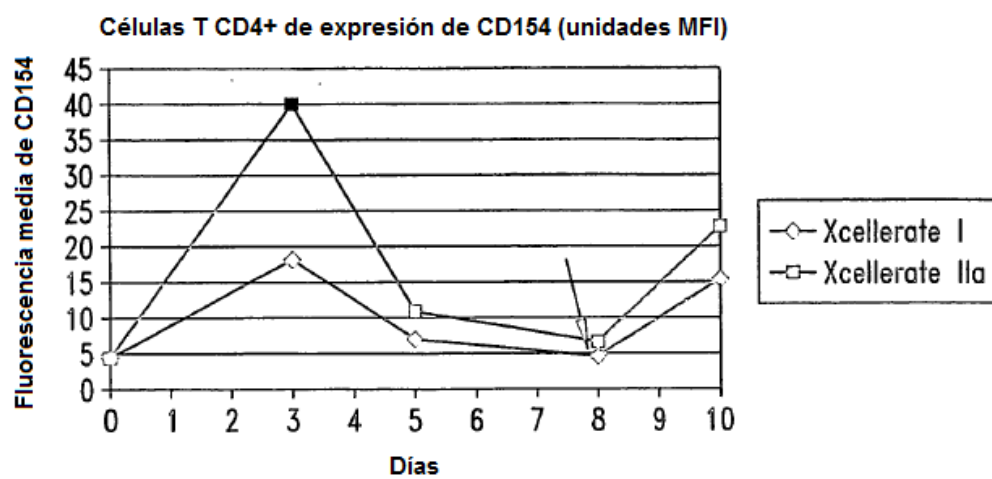


Fig. 7B

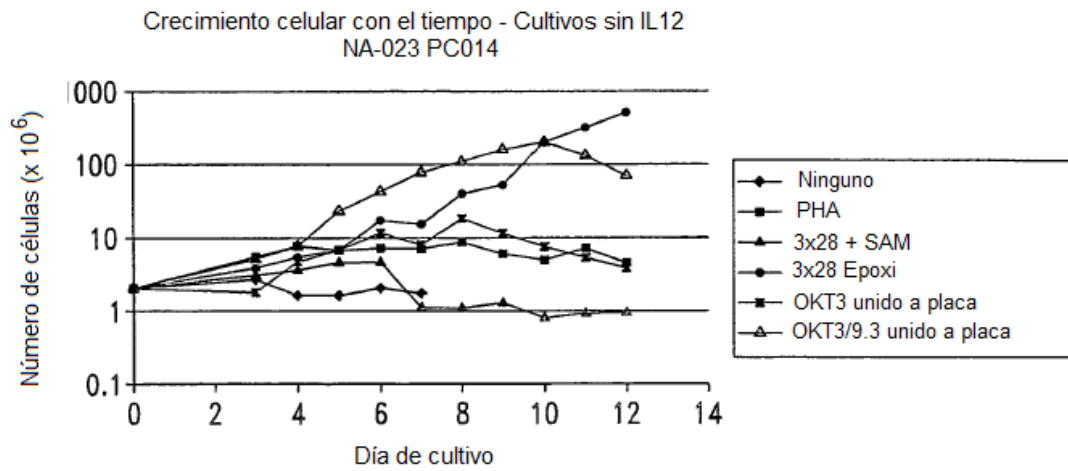


Fig. 8A

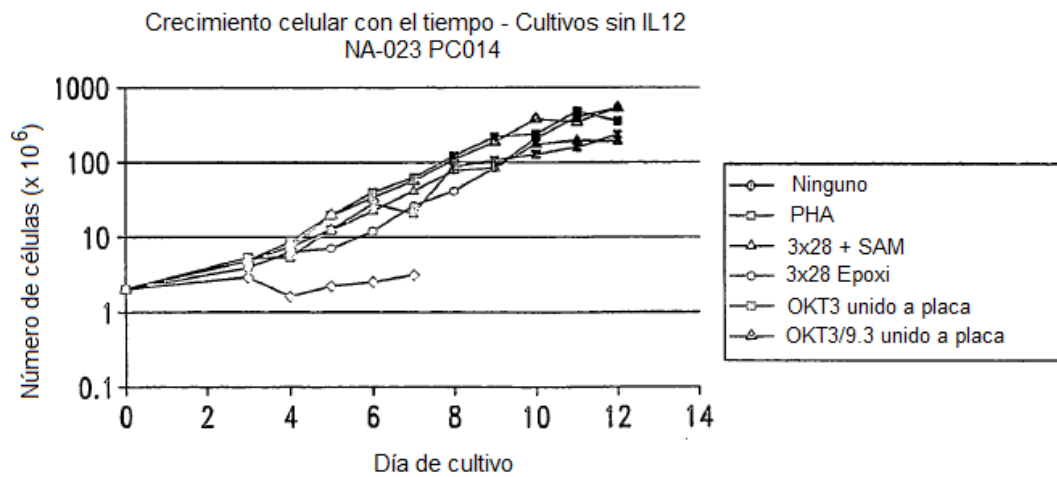


Fig. 8B

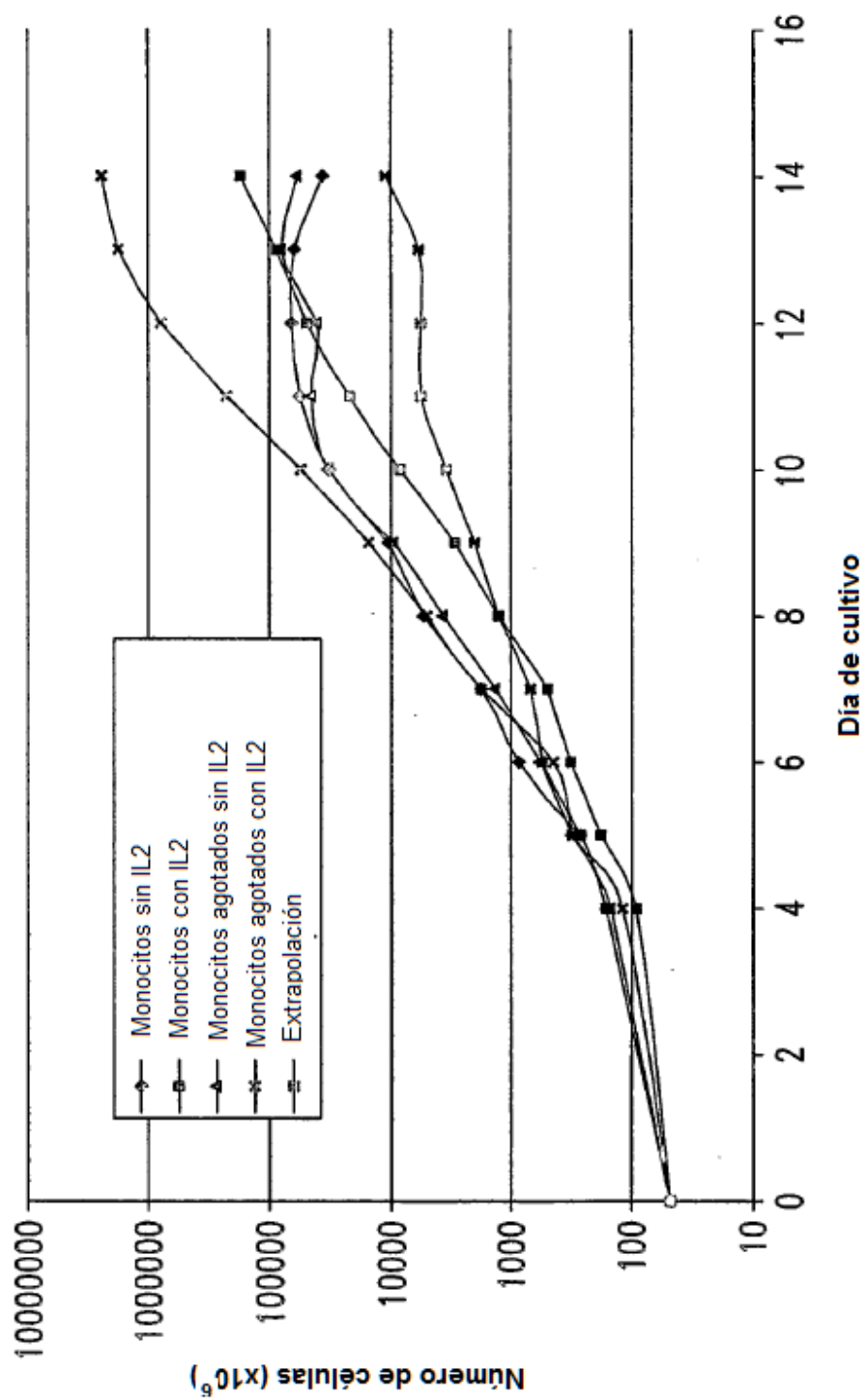


Fig. 9

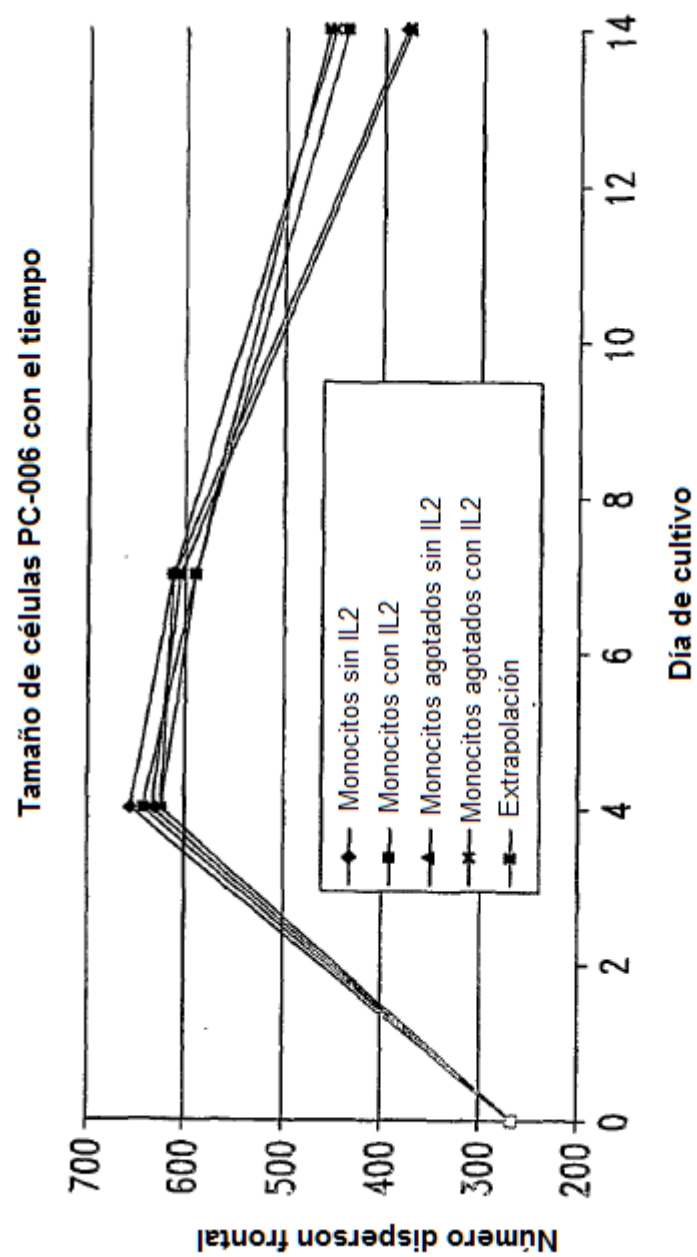


Fig. 10

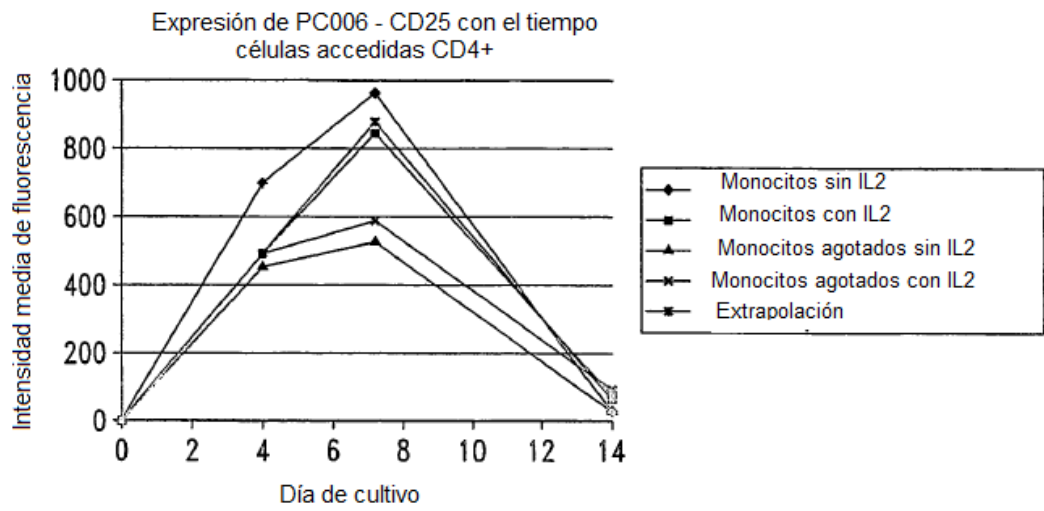


Fig. 11A

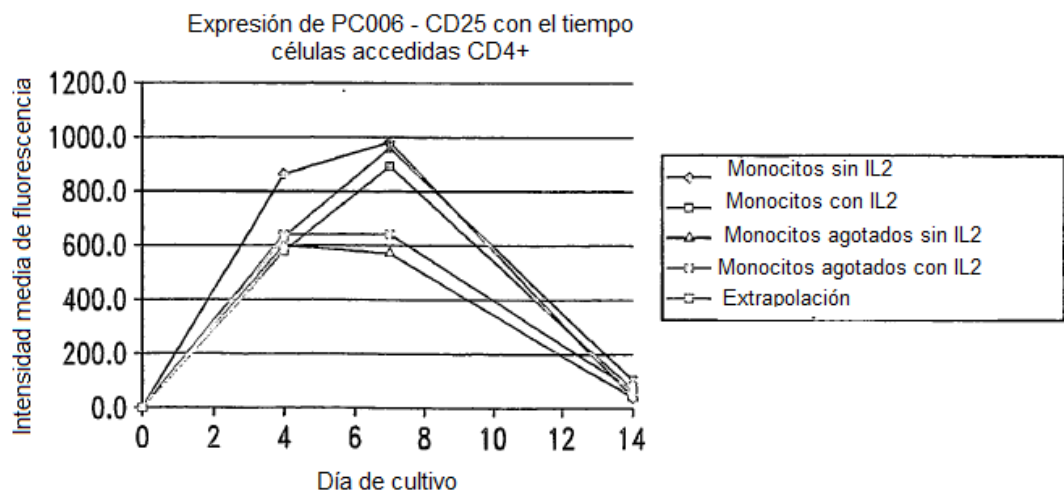


Fig. 11B

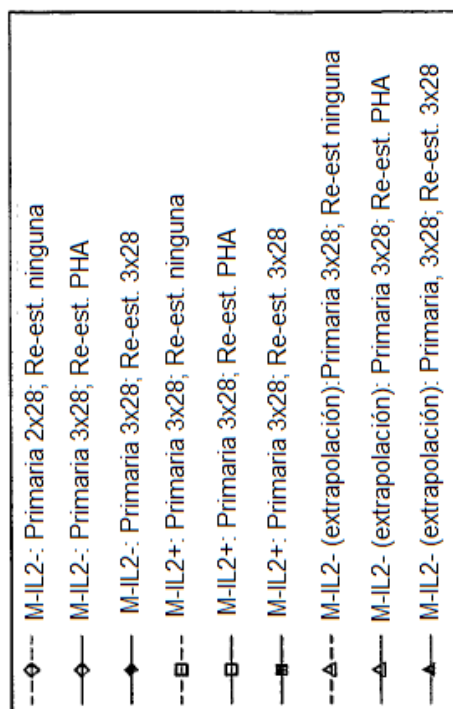
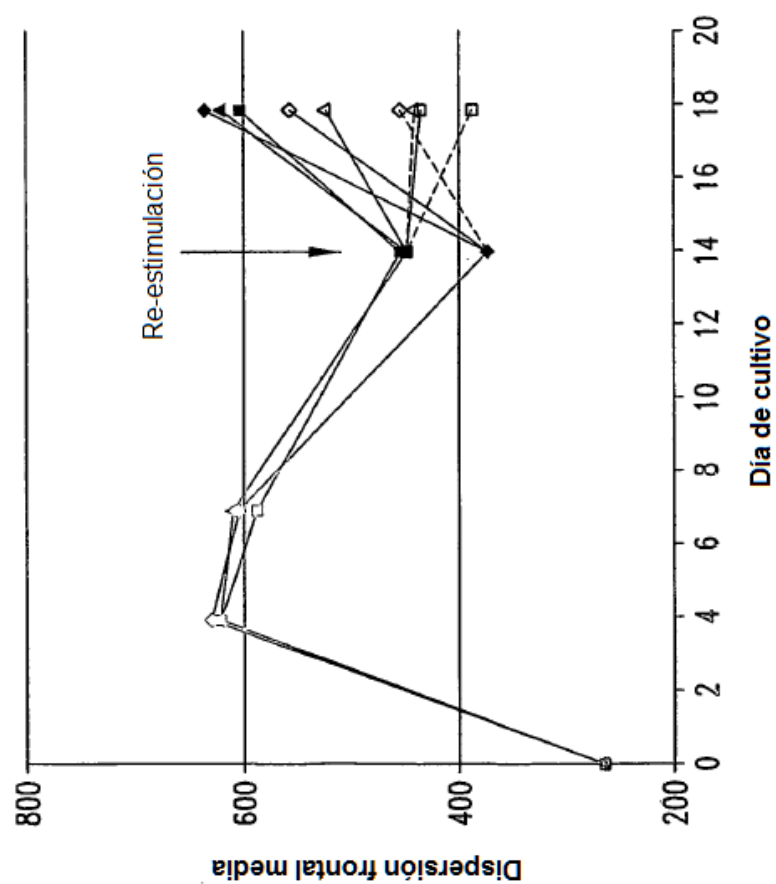


Fig. 12

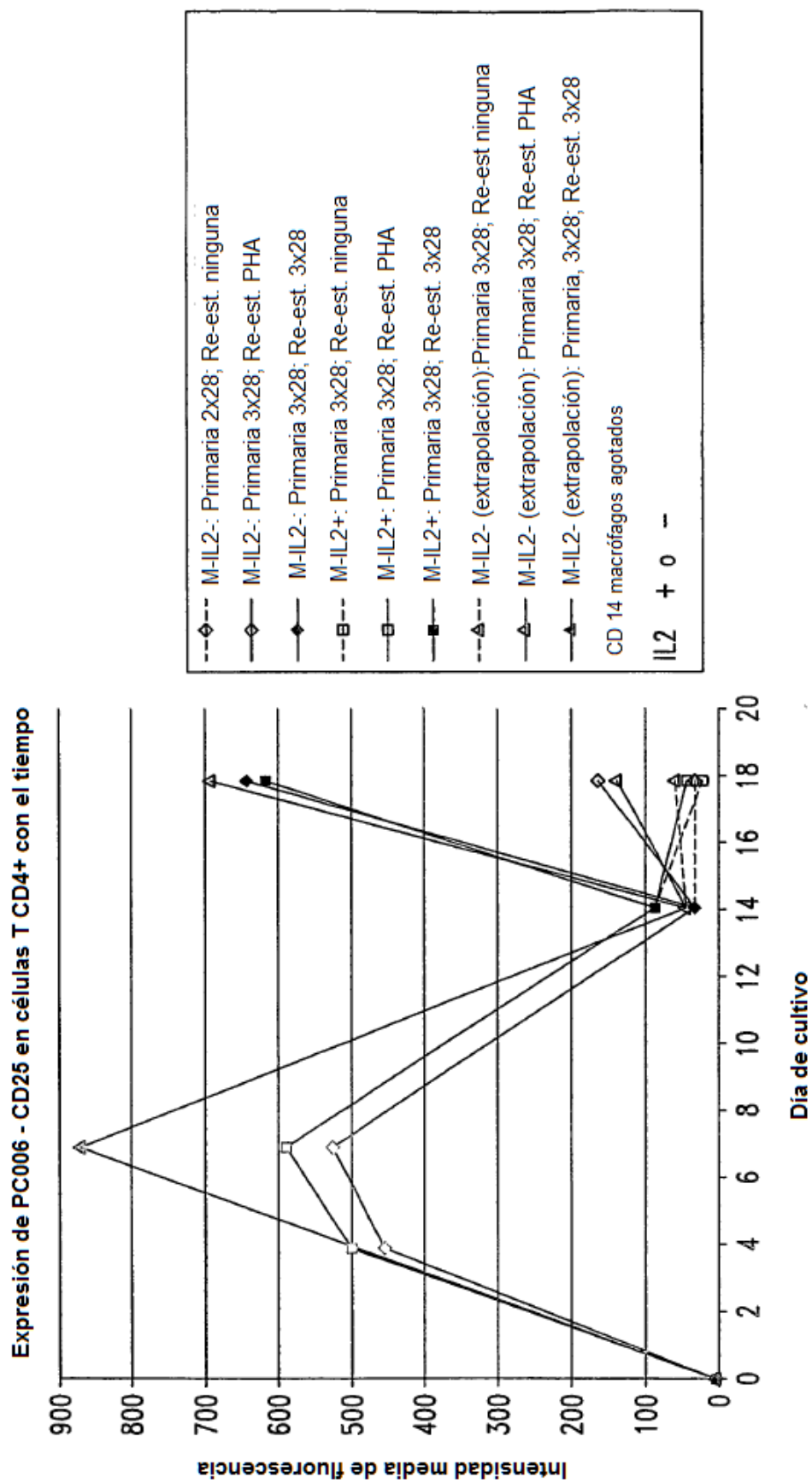


Fig. 13A

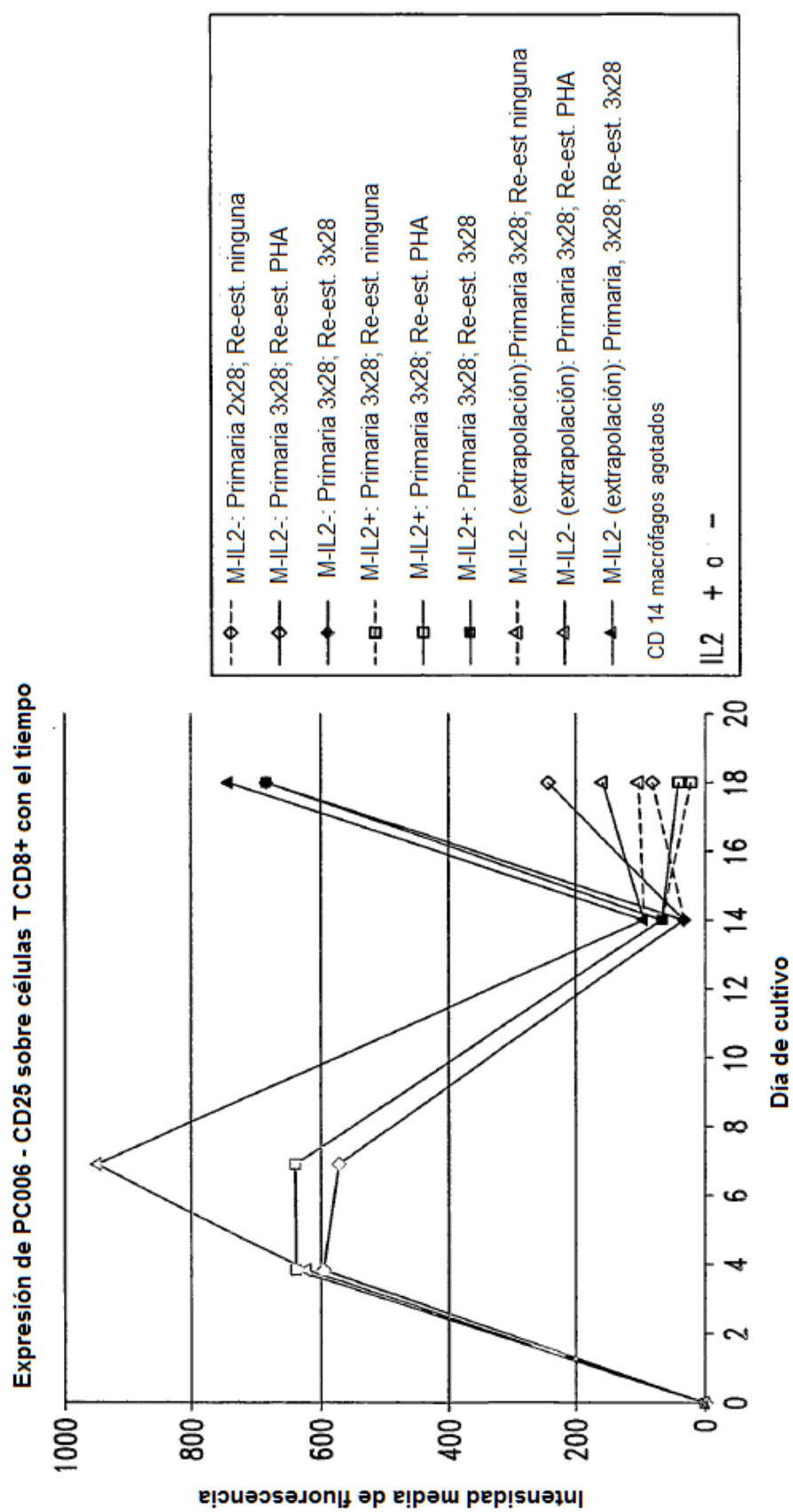


Fig. 13B

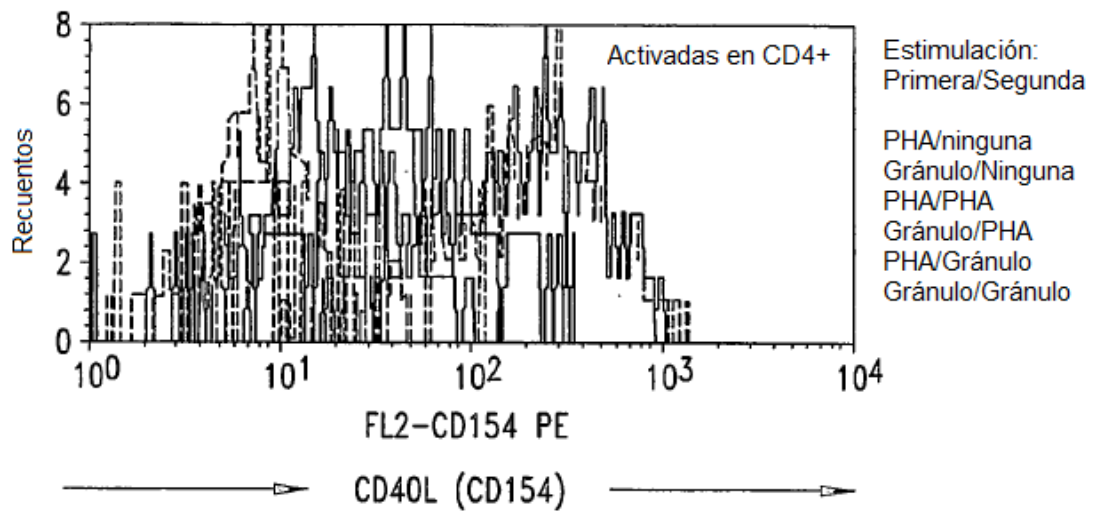


Fig. 14A

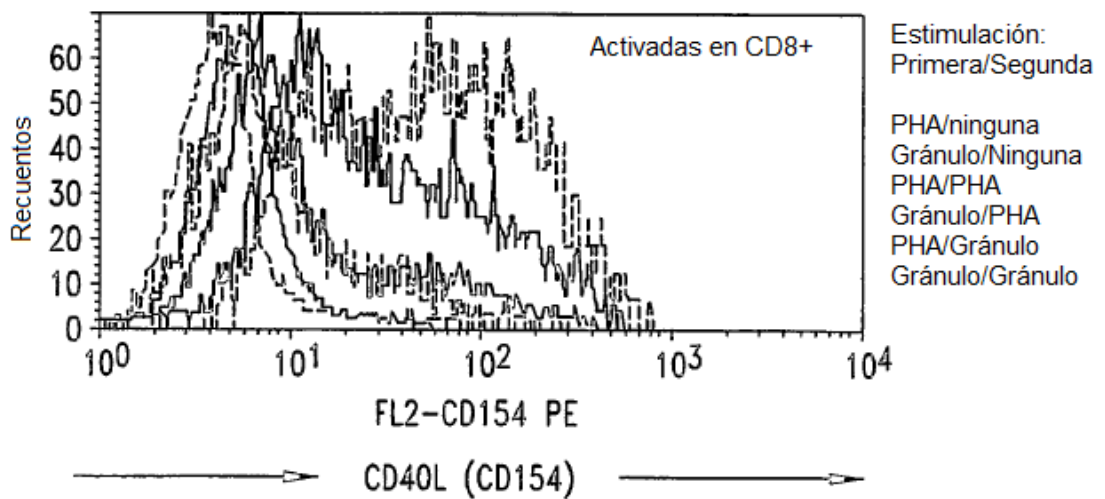


Fig. 14B

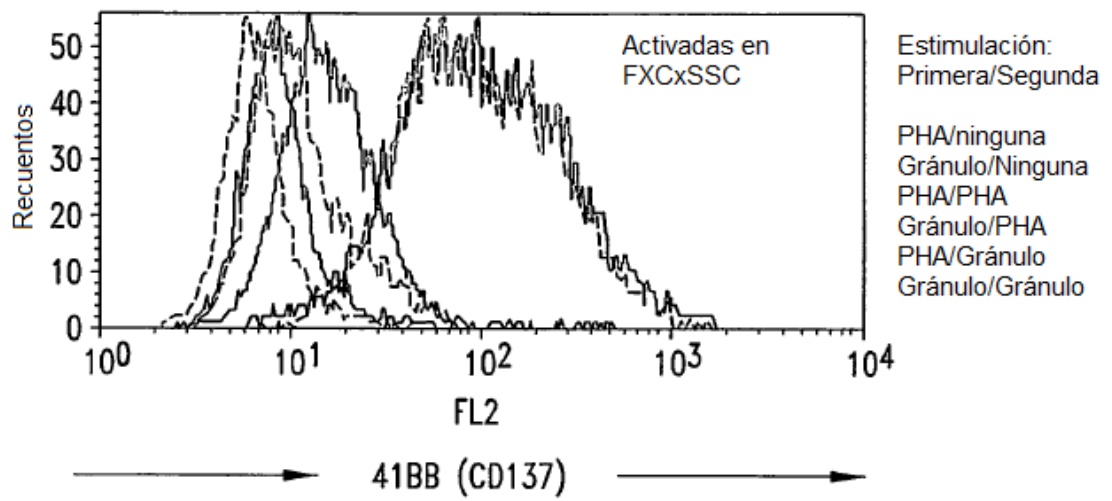


Fig. 15

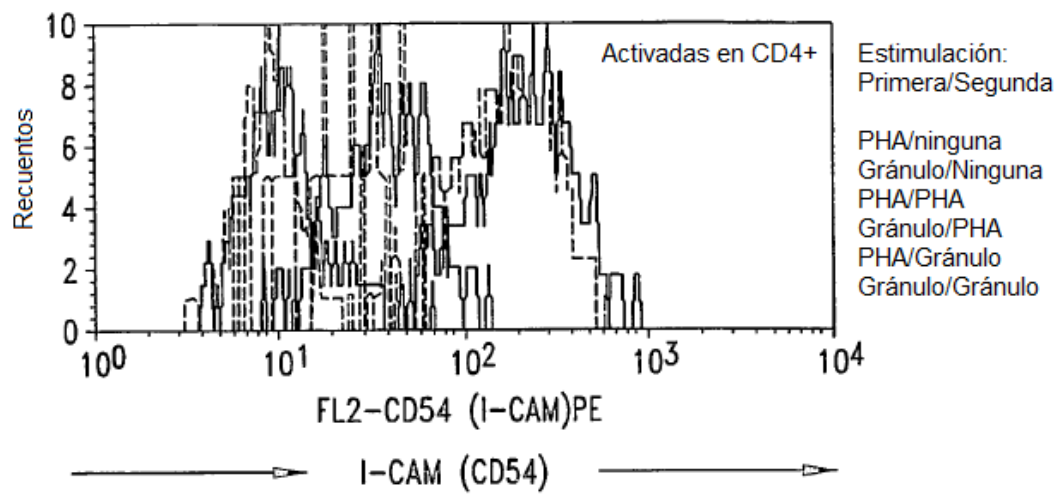


Fig. 16A

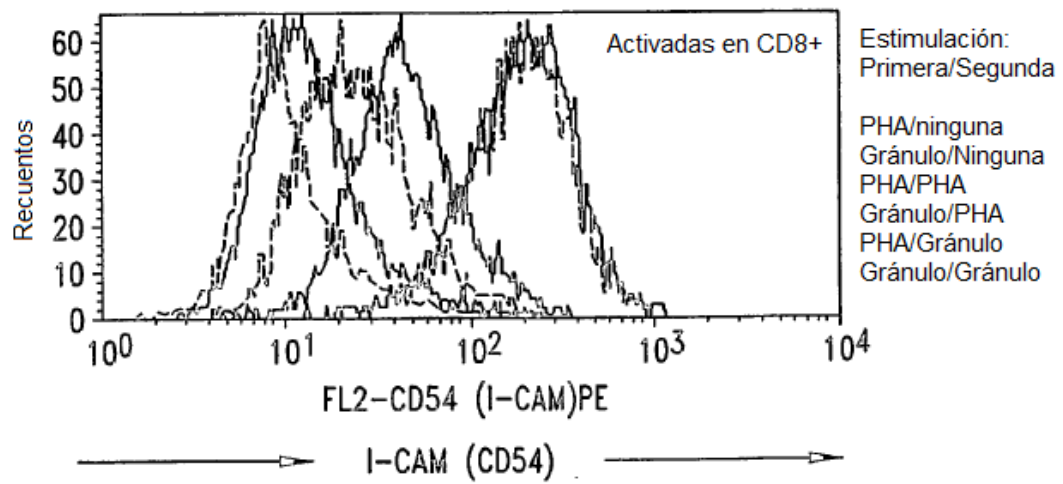


Fig. 16B

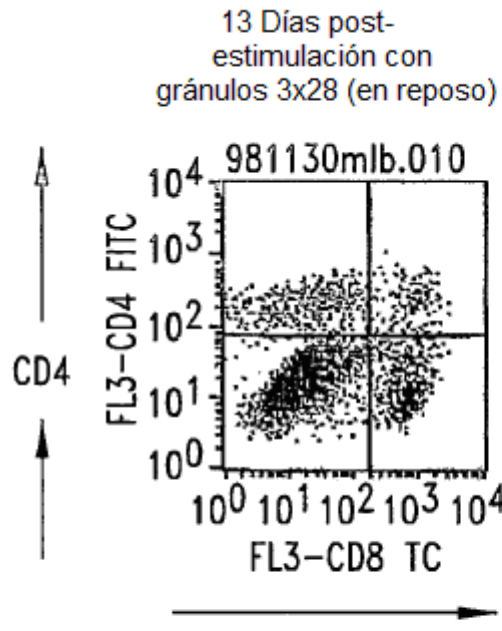


Fig. 17A

18 Días de post-estimulación primaria y 7 días de post-estimulación secundaria con gránulos 3x28 (activados)

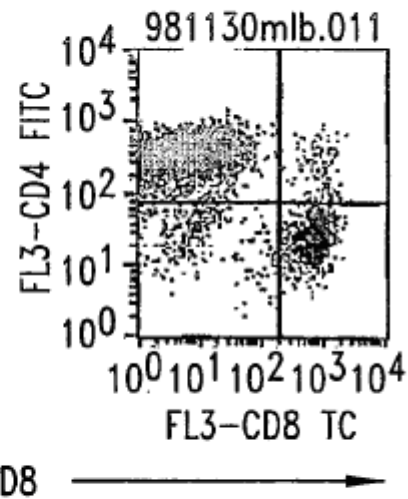


Fig. 17B

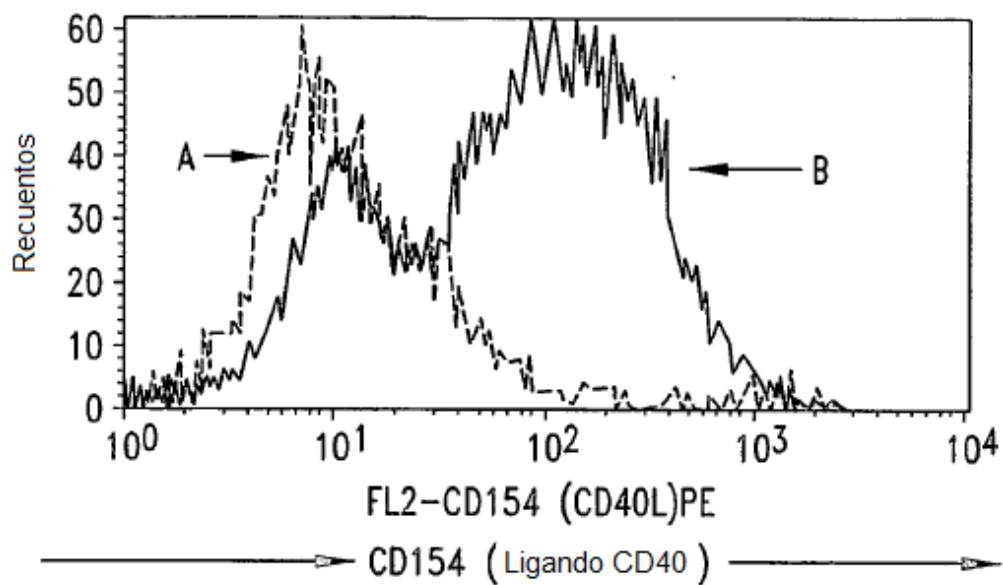


Fig. 17C

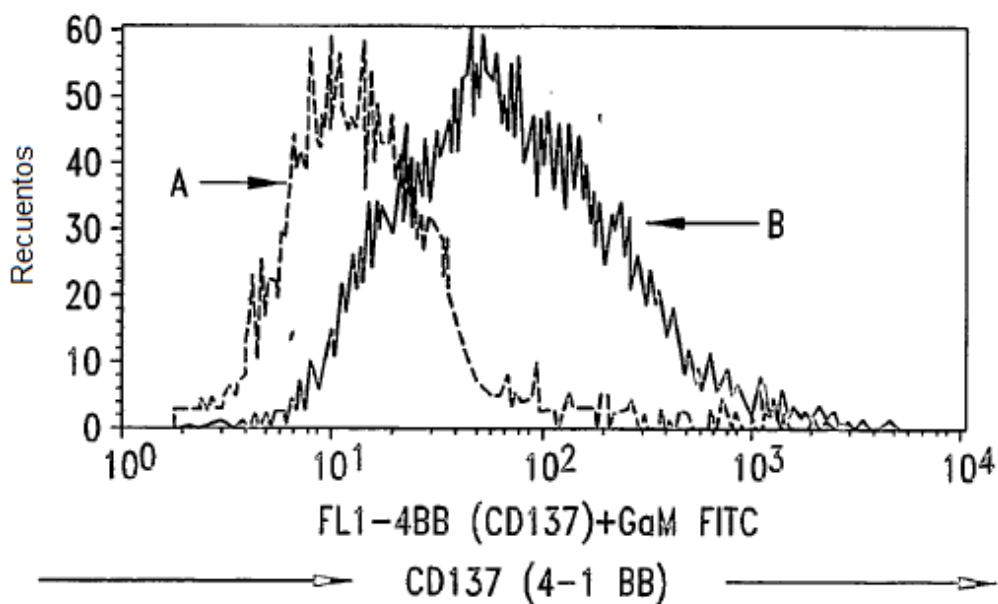


Fig. 17D

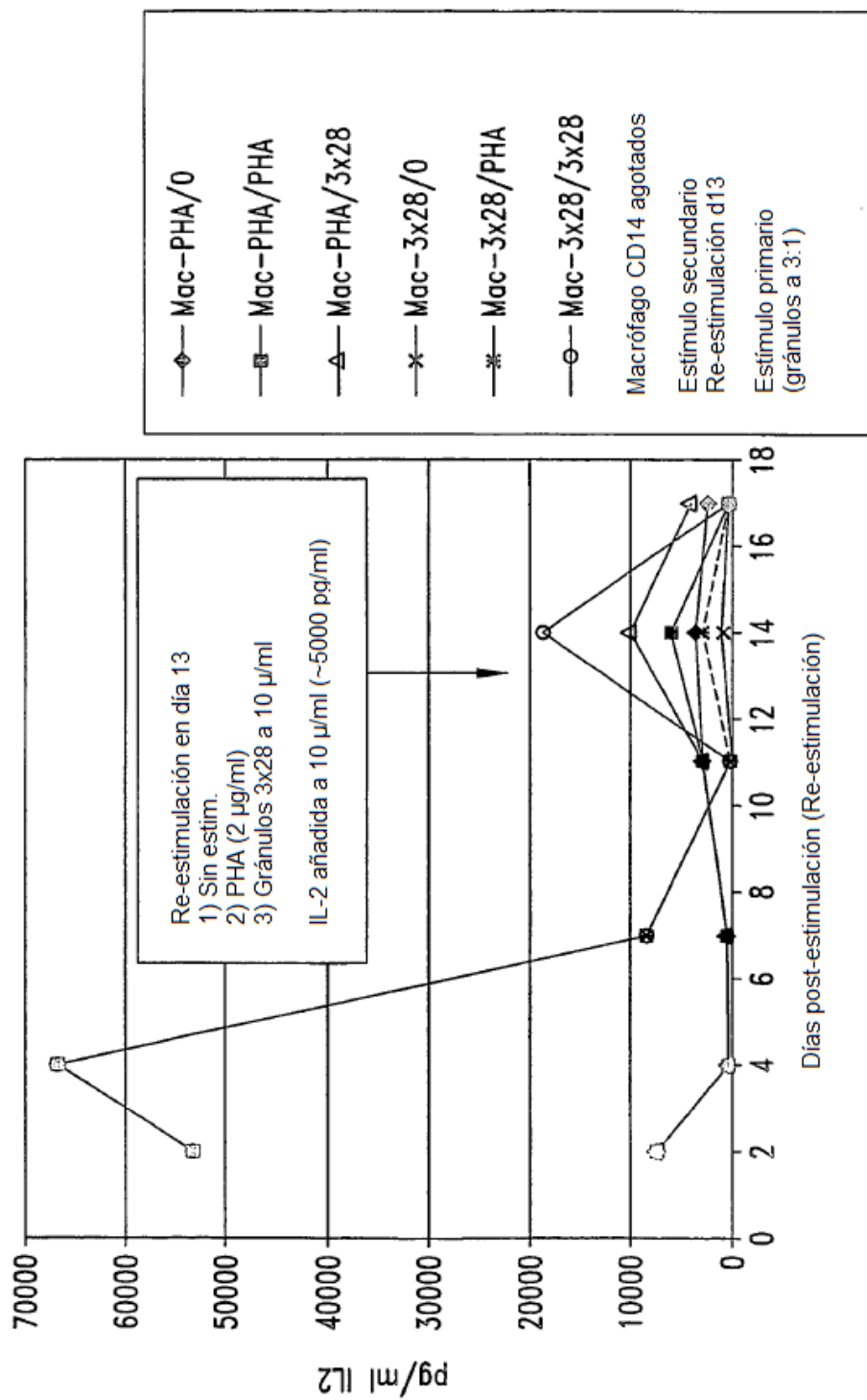


Fig. 18A

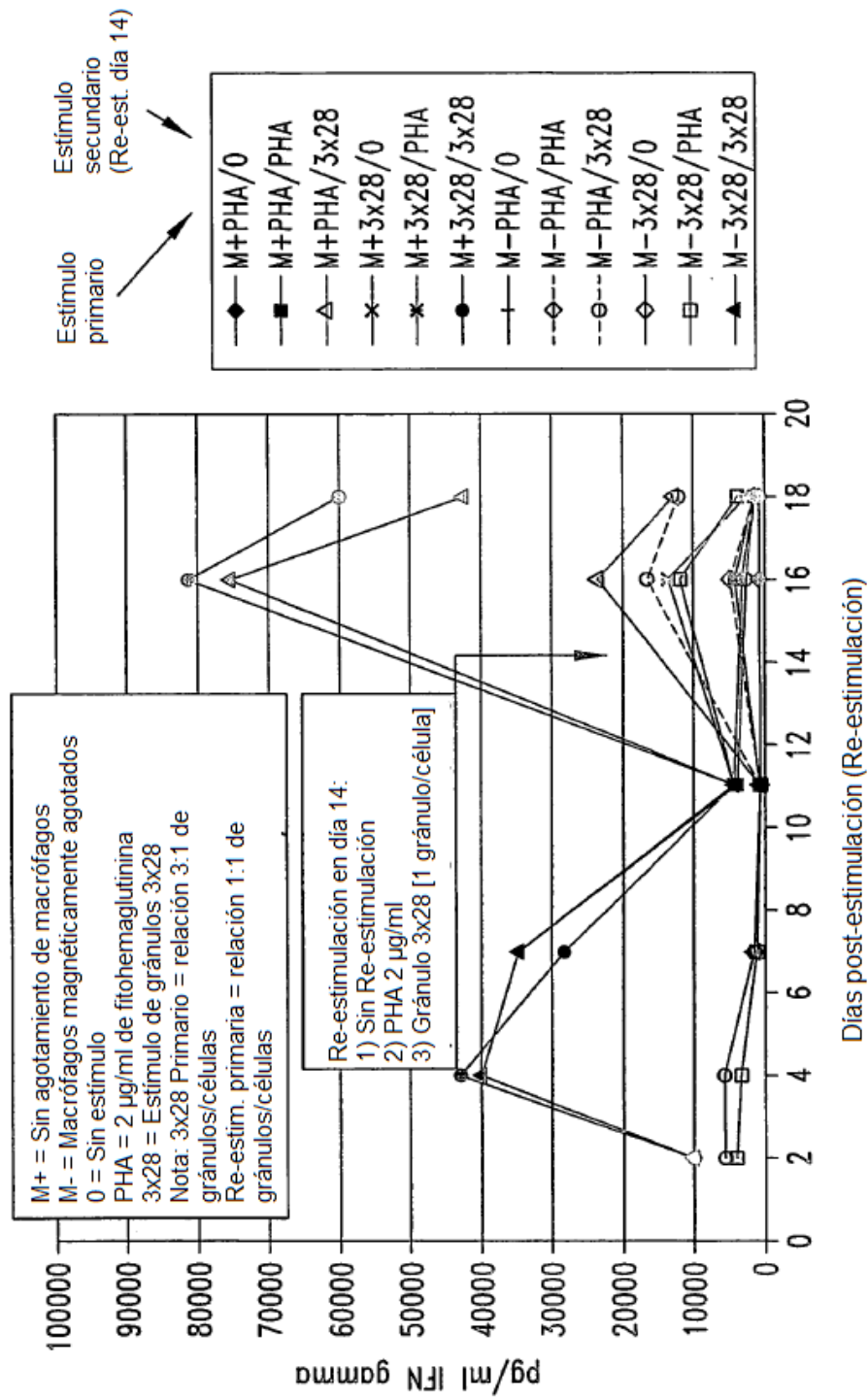


Fig. 18B

PC003: Cinética de IL4 secretada a continuación de estimulación y re-estimulación primaria

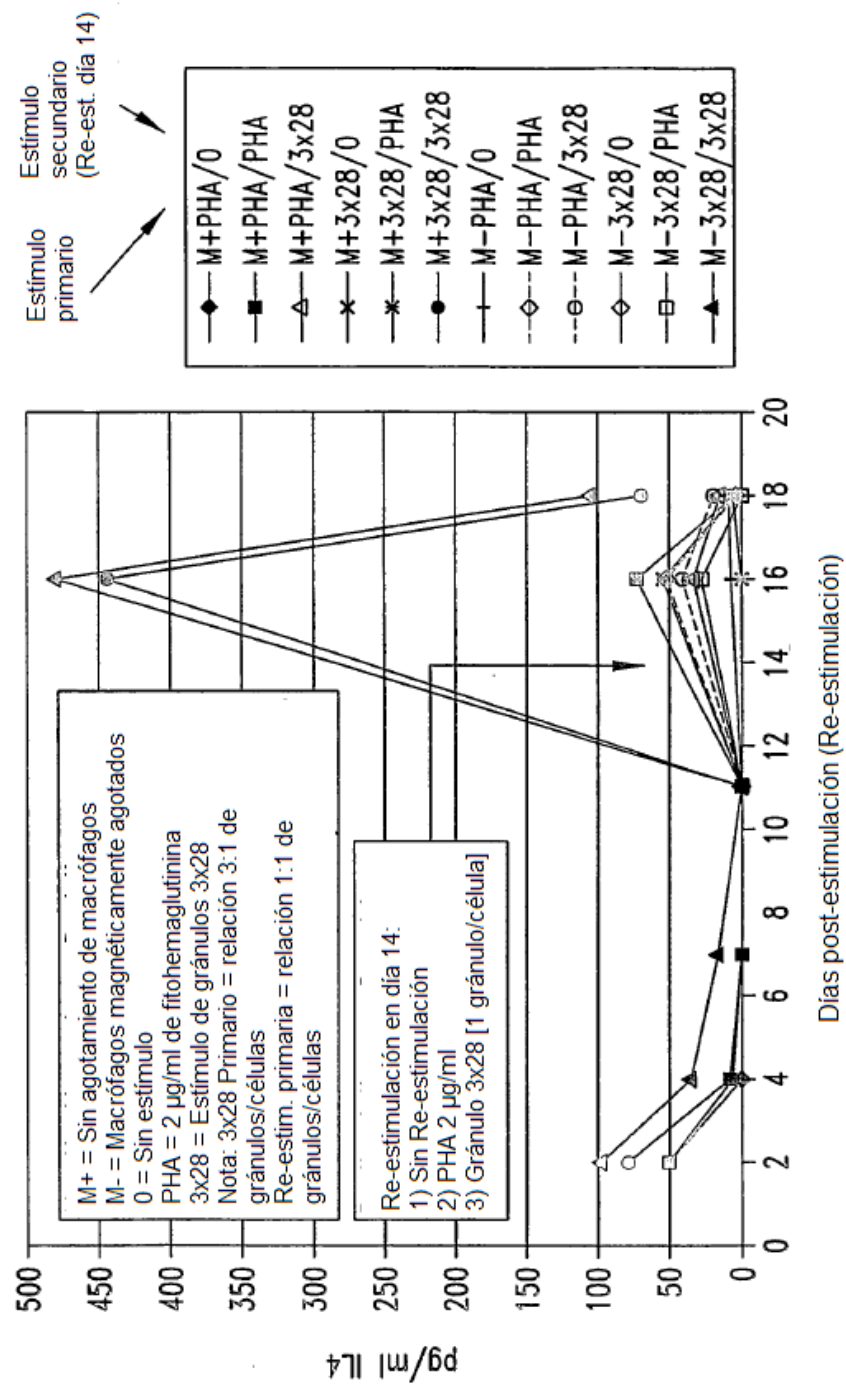


Fig. 18C

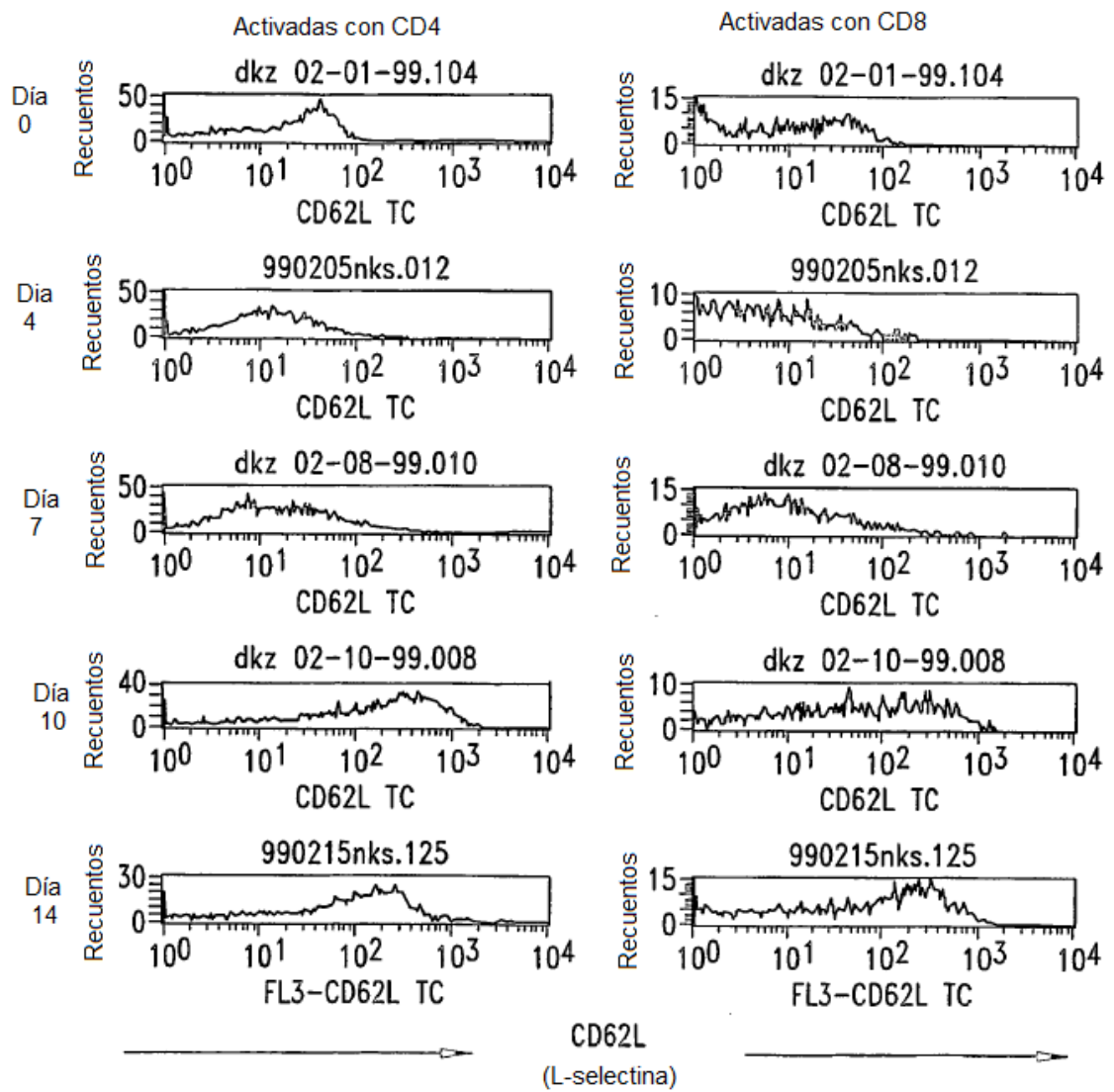
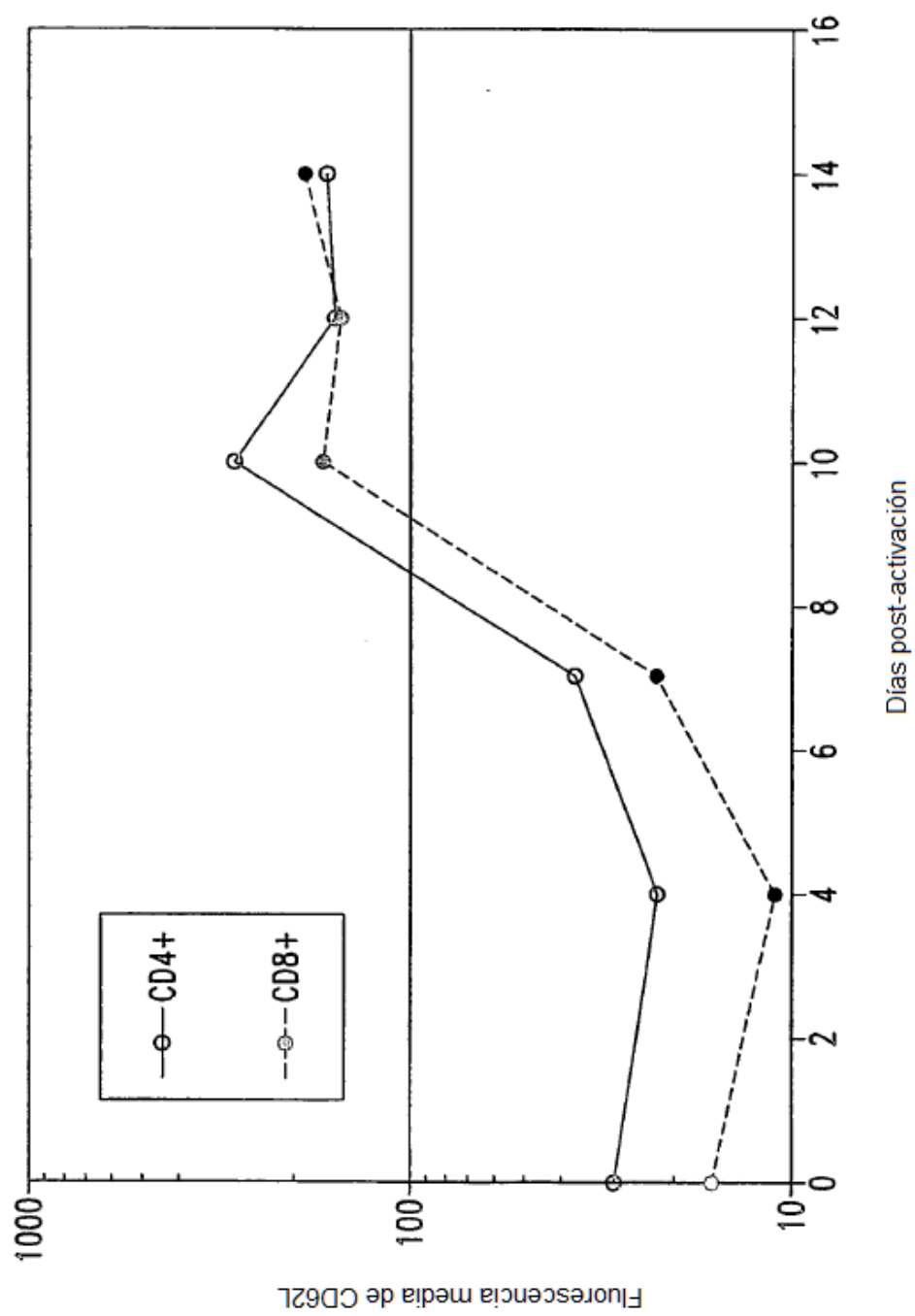


Fig. 19A

*Fig. 19B*

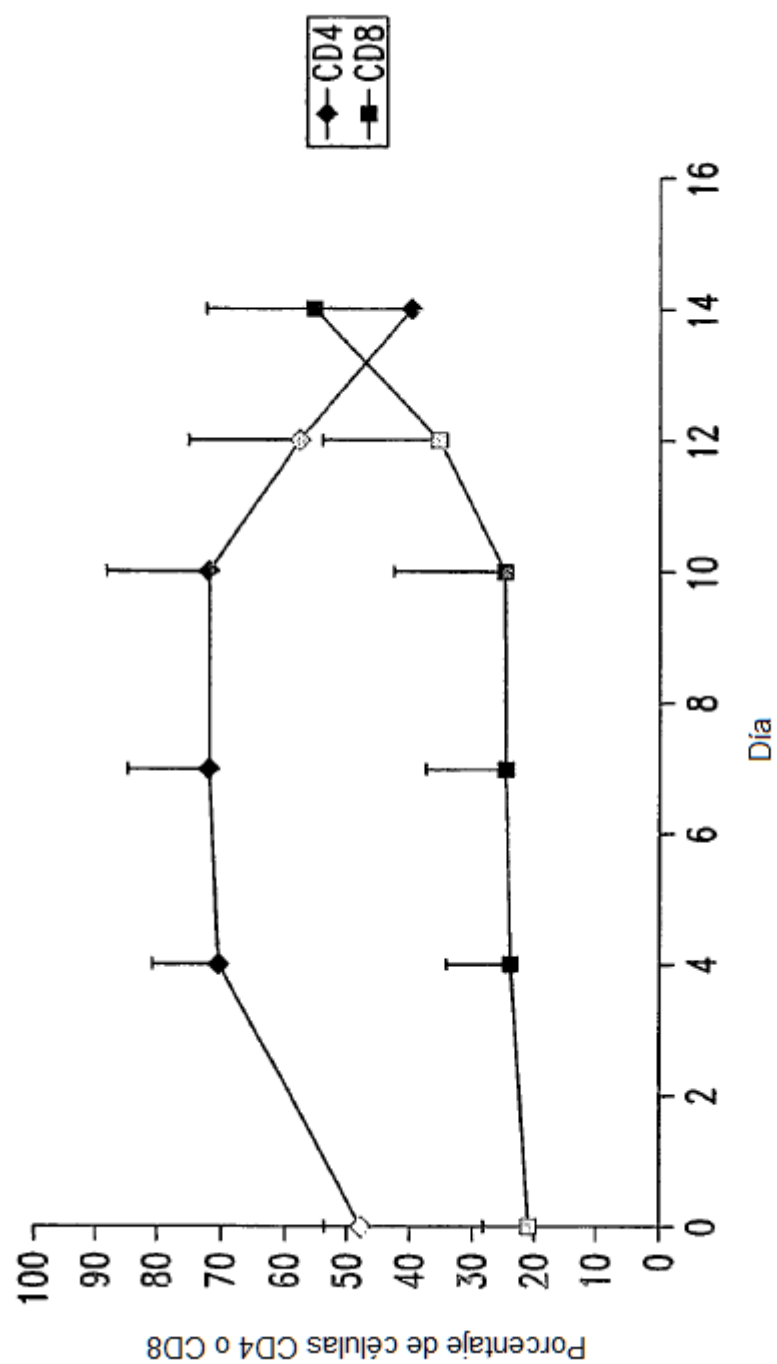


Fig. 20

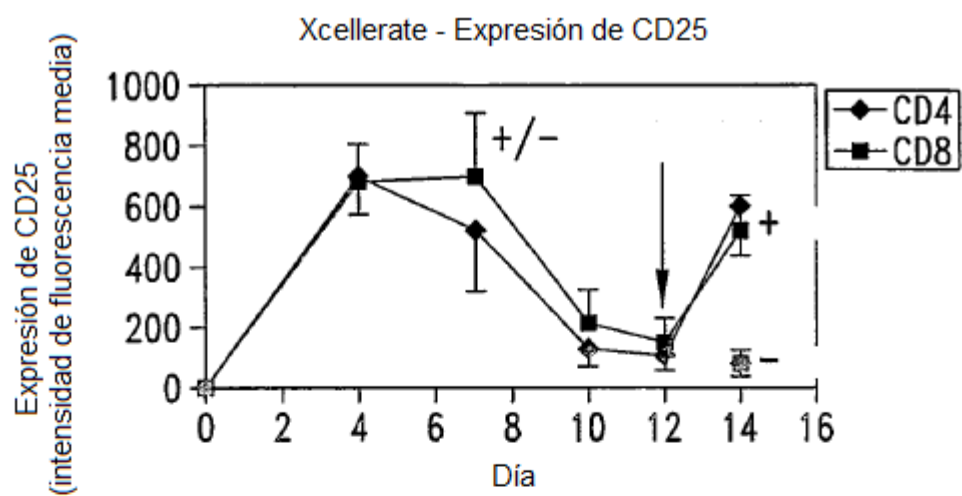


Fig. 21A

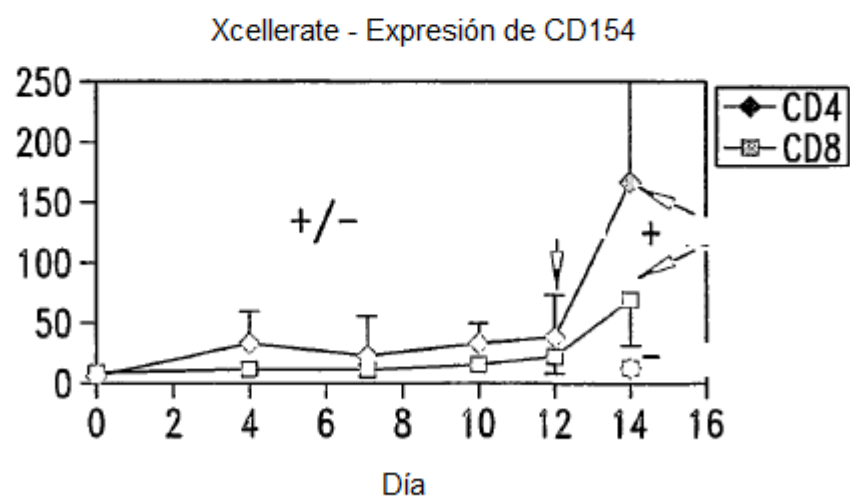


Fig. 21B

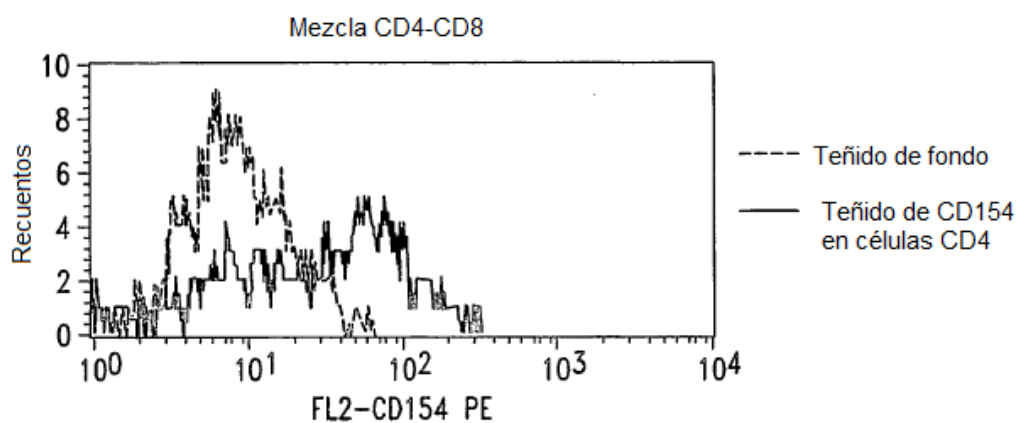


Fig. 22A

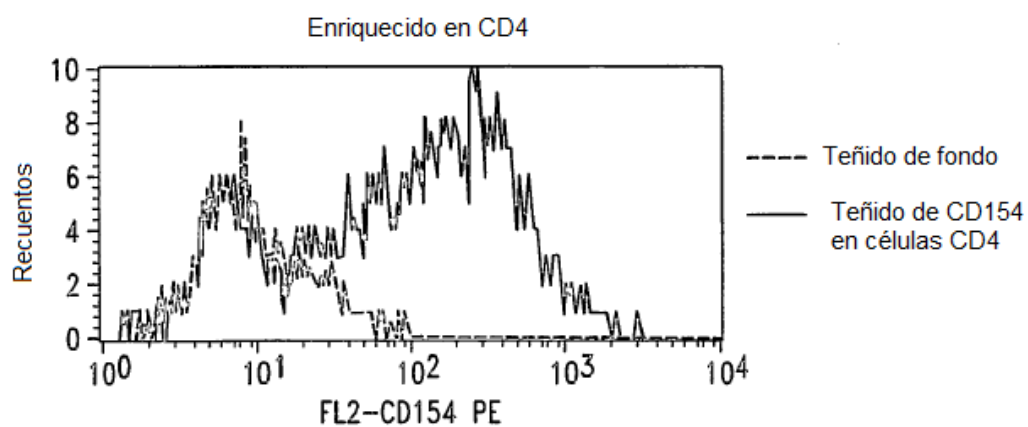
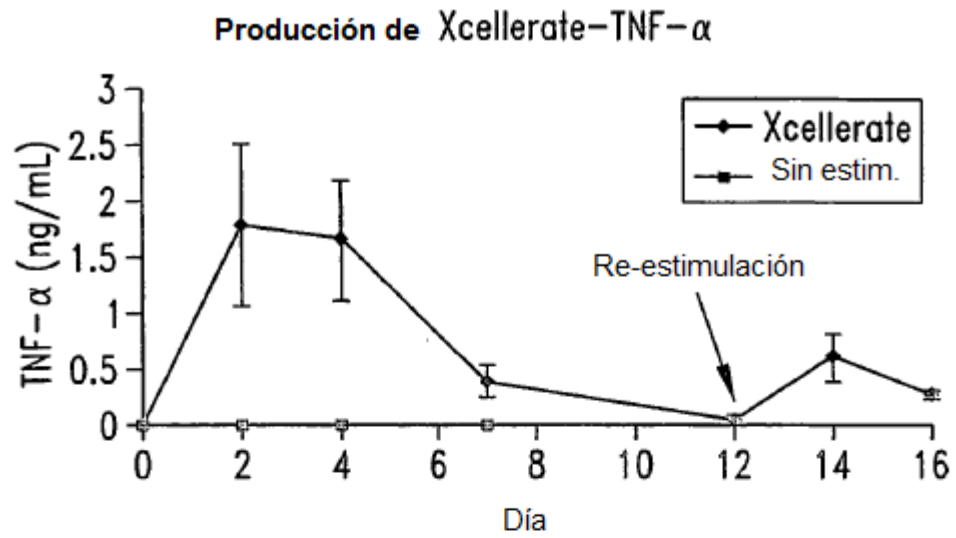
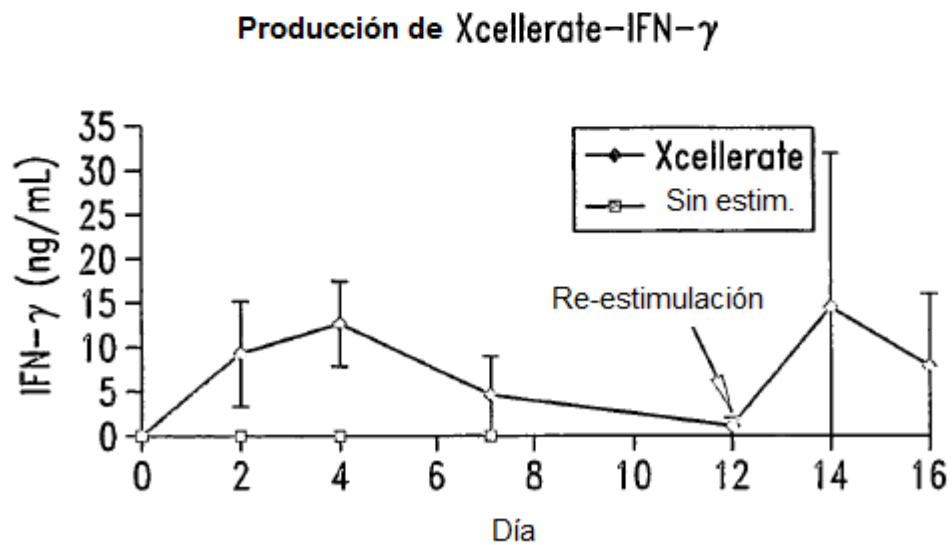
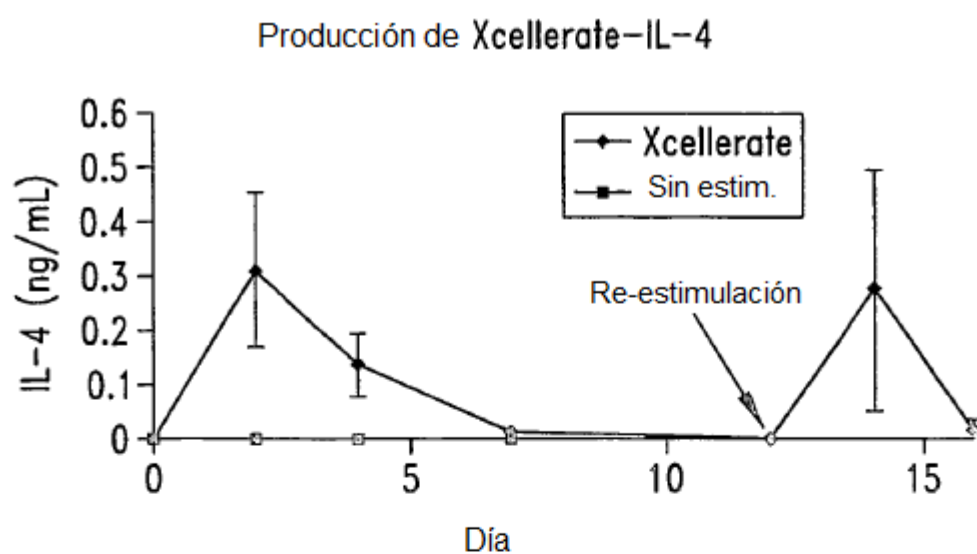
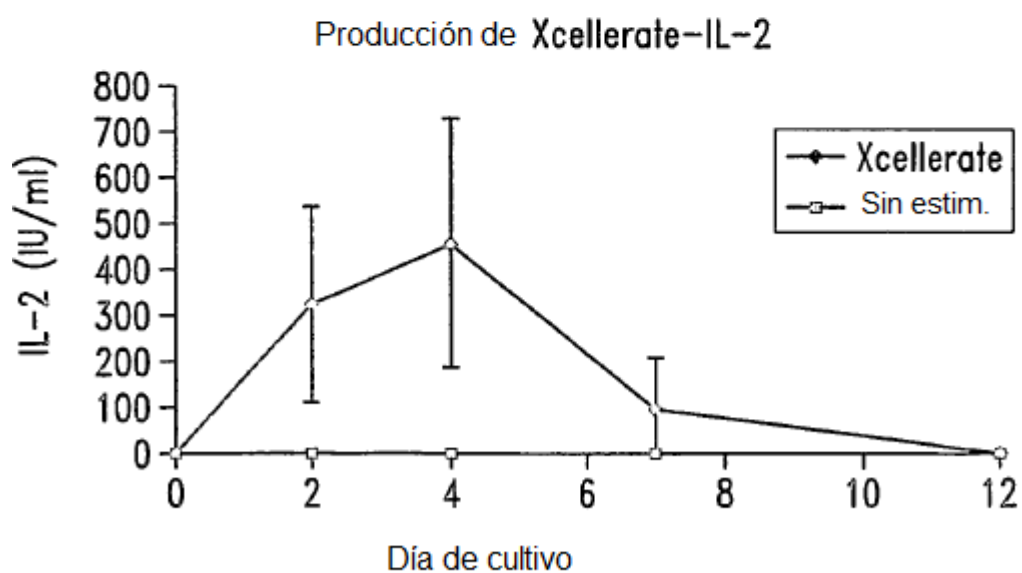
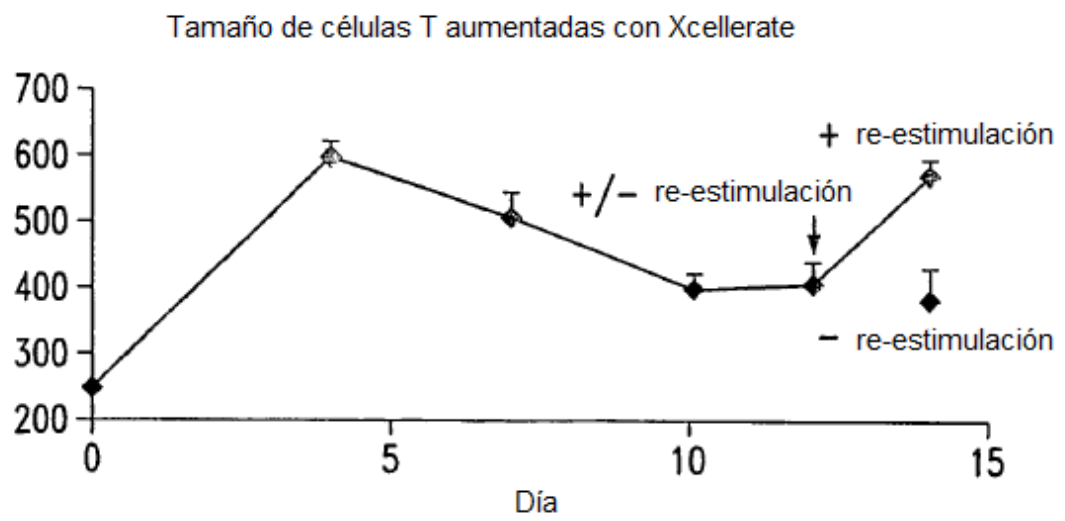
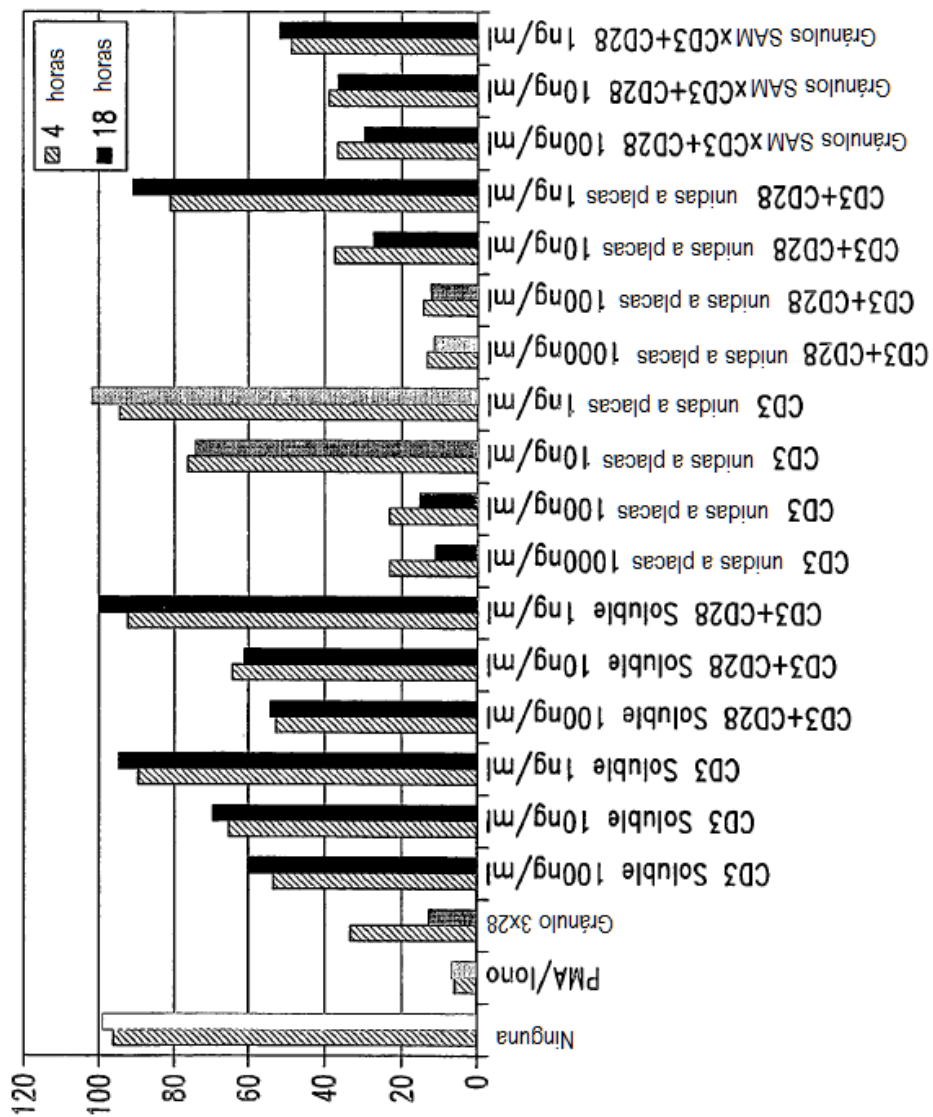


Fig. 22B

*Fig. 23A**Fig. 23B*

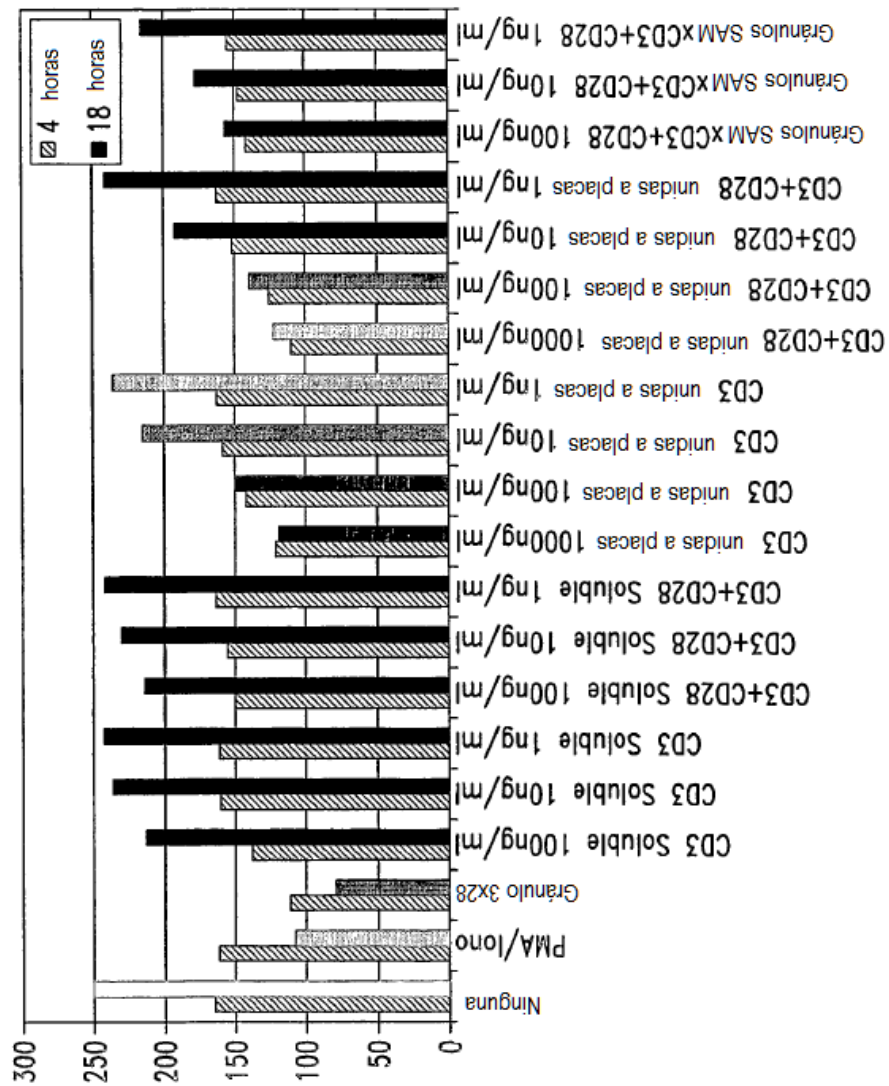
*Fig. 24A**Fig. 24B*

*Fig. 25*



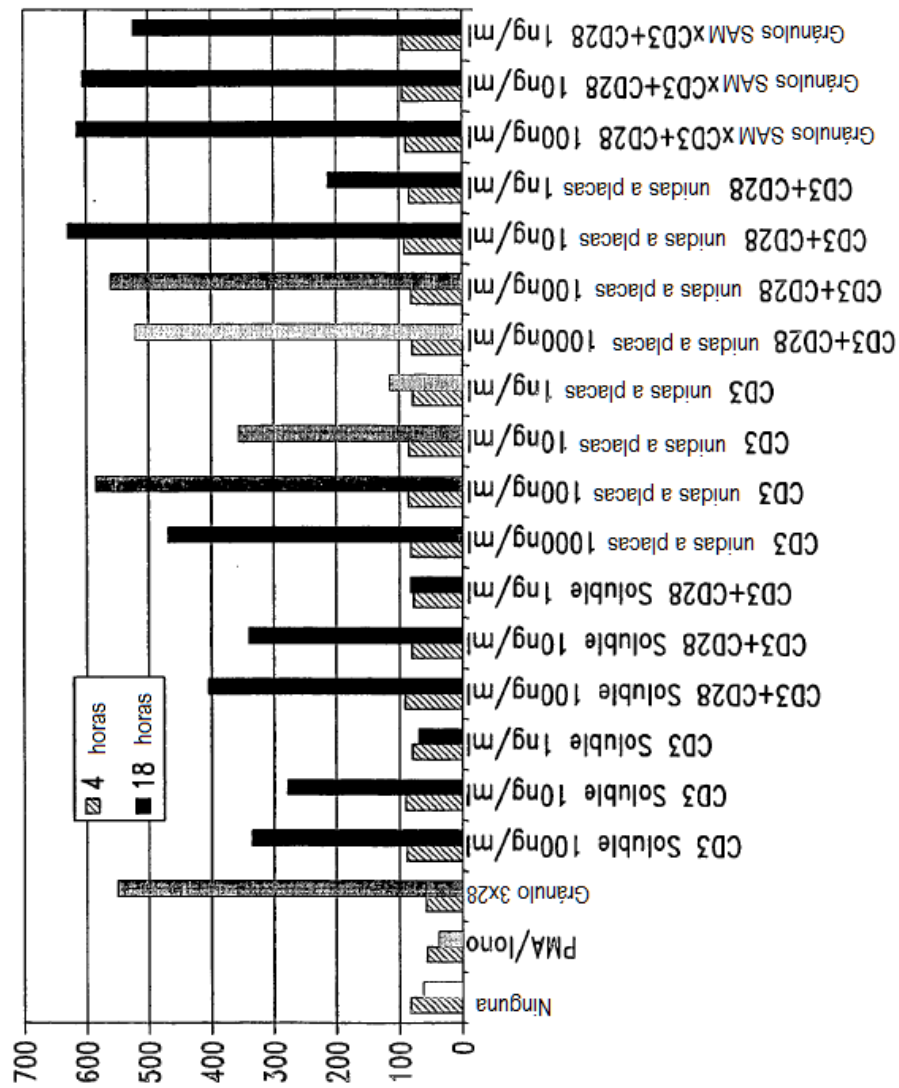
Re-estimulación de NDa055 (Día 8)
Expresión de CD62L (L-selectina) en células T CD4+

Fig. 26A



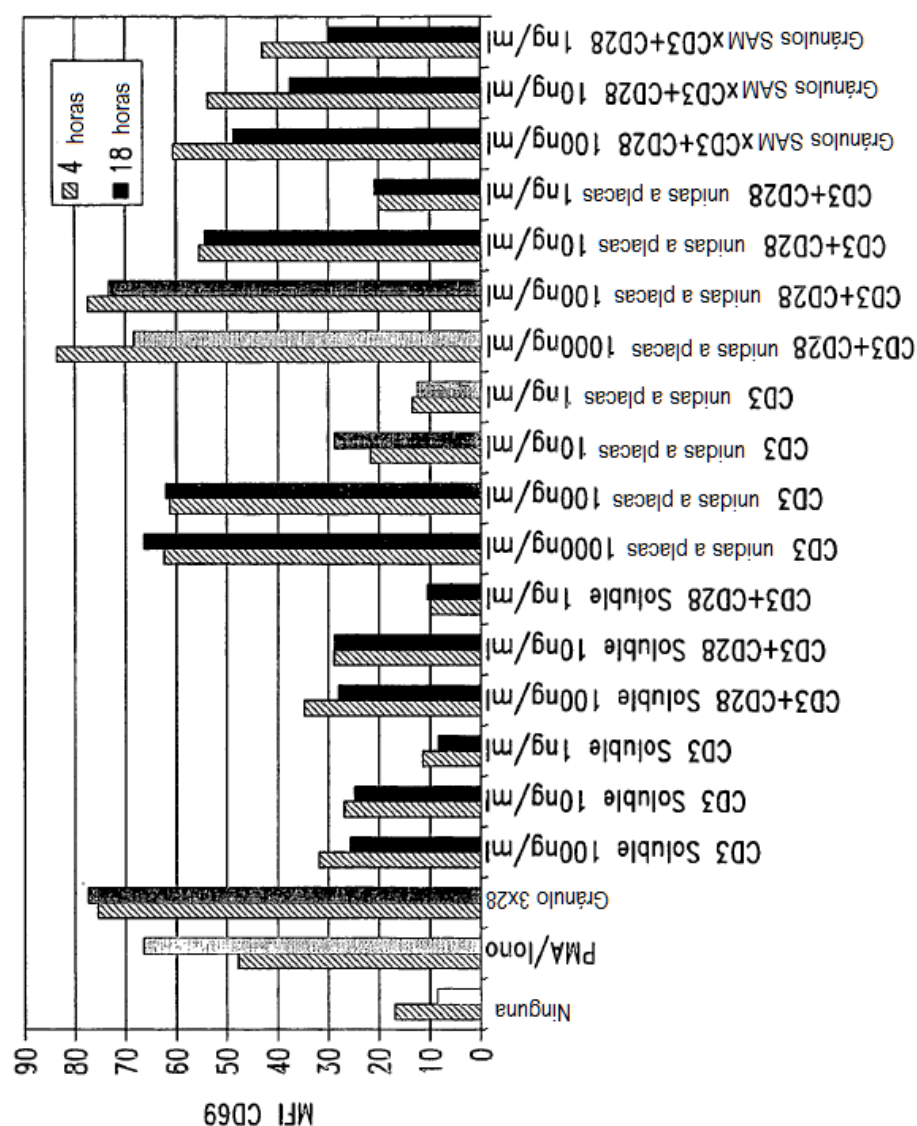
Re-estimulación e NDa055 (Día 8)
Expresión de CD49d (VLA4) en células T CD4+

Fig. 26B



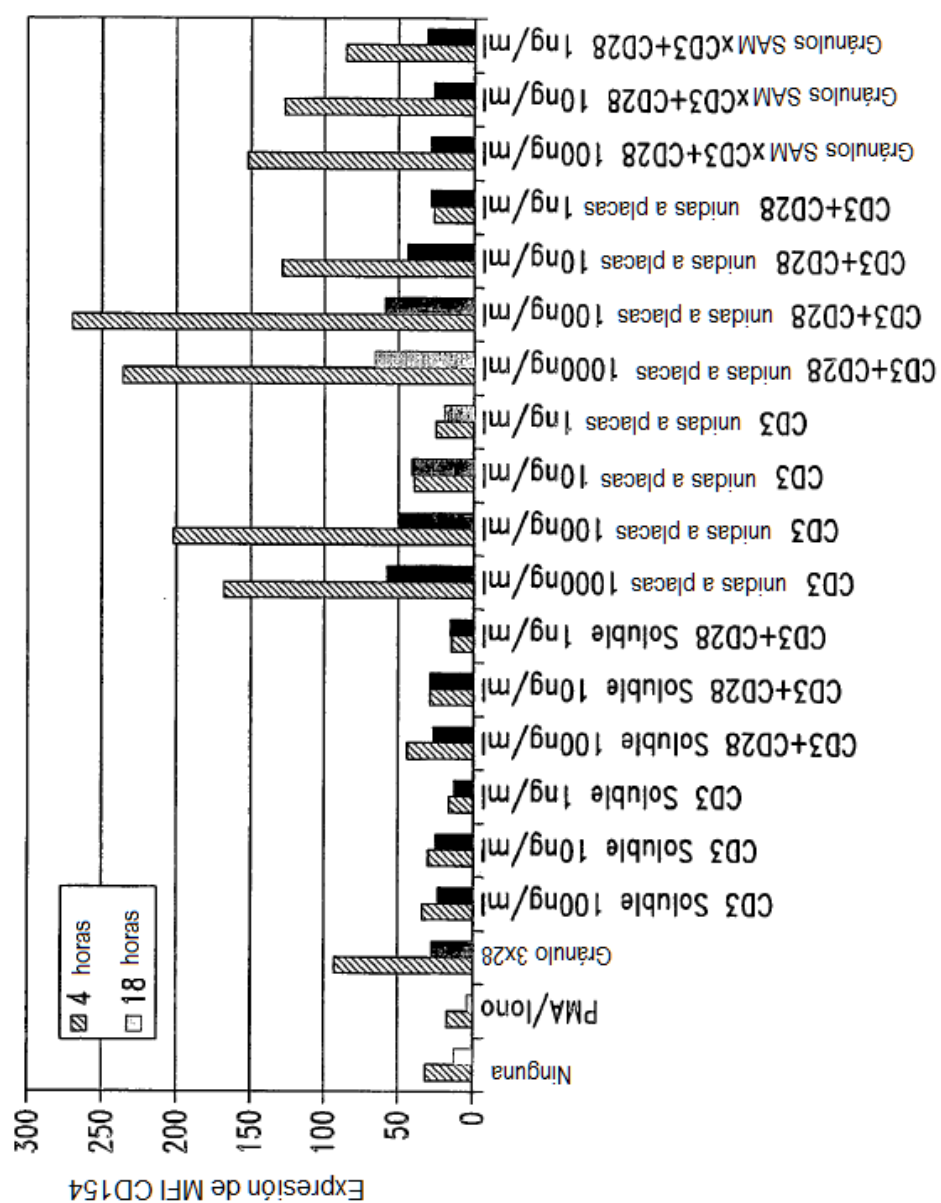
Re-estimulación de NDα055 (Día 8):
Expresión de CD25 (IL2-R) en células T CD4+

Fig. 26C



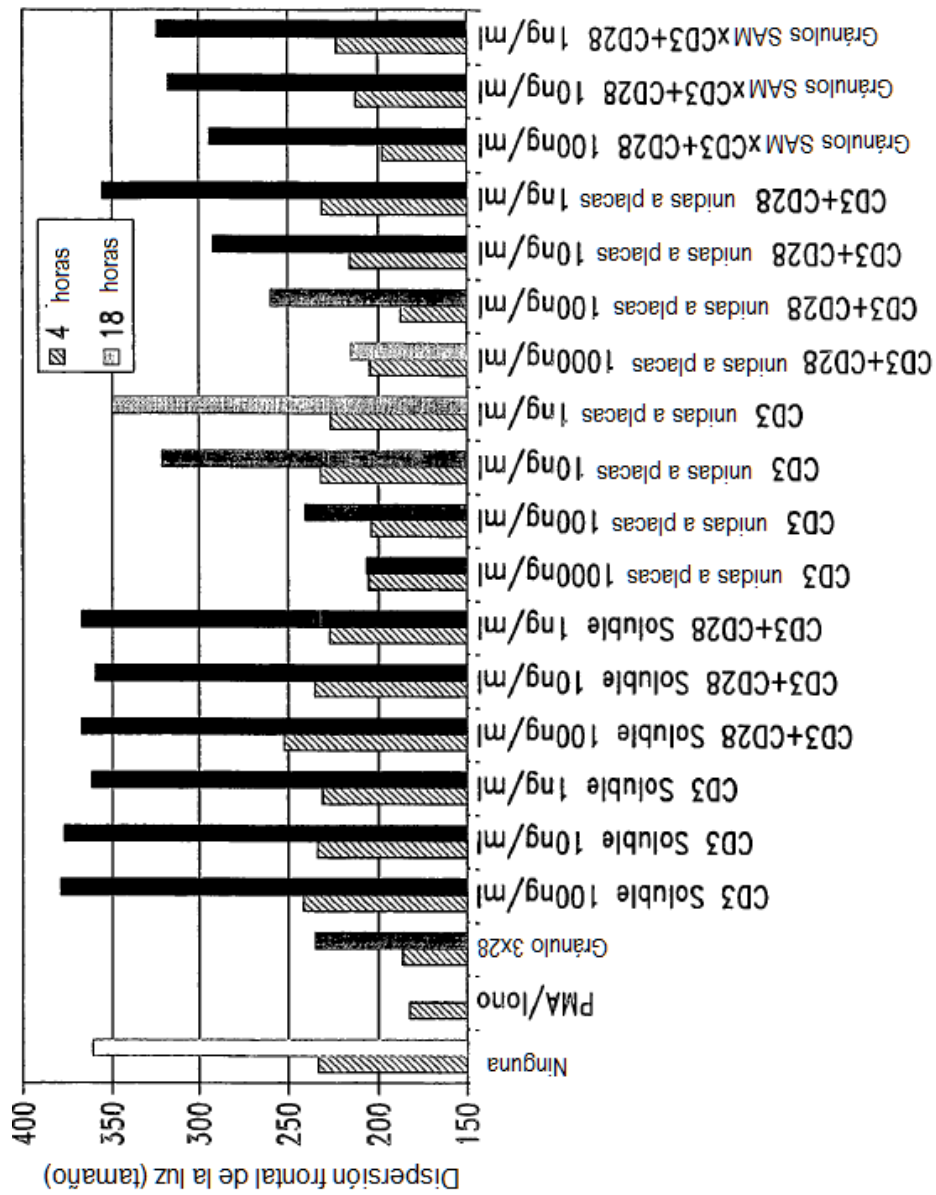
Re-estimulación de NDa055 (Día 8)
Expresión de CD9 en células T CD4+

Fig. 26D



Re-estimulación de NDa055 (Día 8):
Expresión de CD154 (CD40L) sobre células T CD4+

Fig. 26E



Re-estimulación de NDa055 (Día 8):
Dispersión frontal de la luz (tamaño)

Fig. 26F

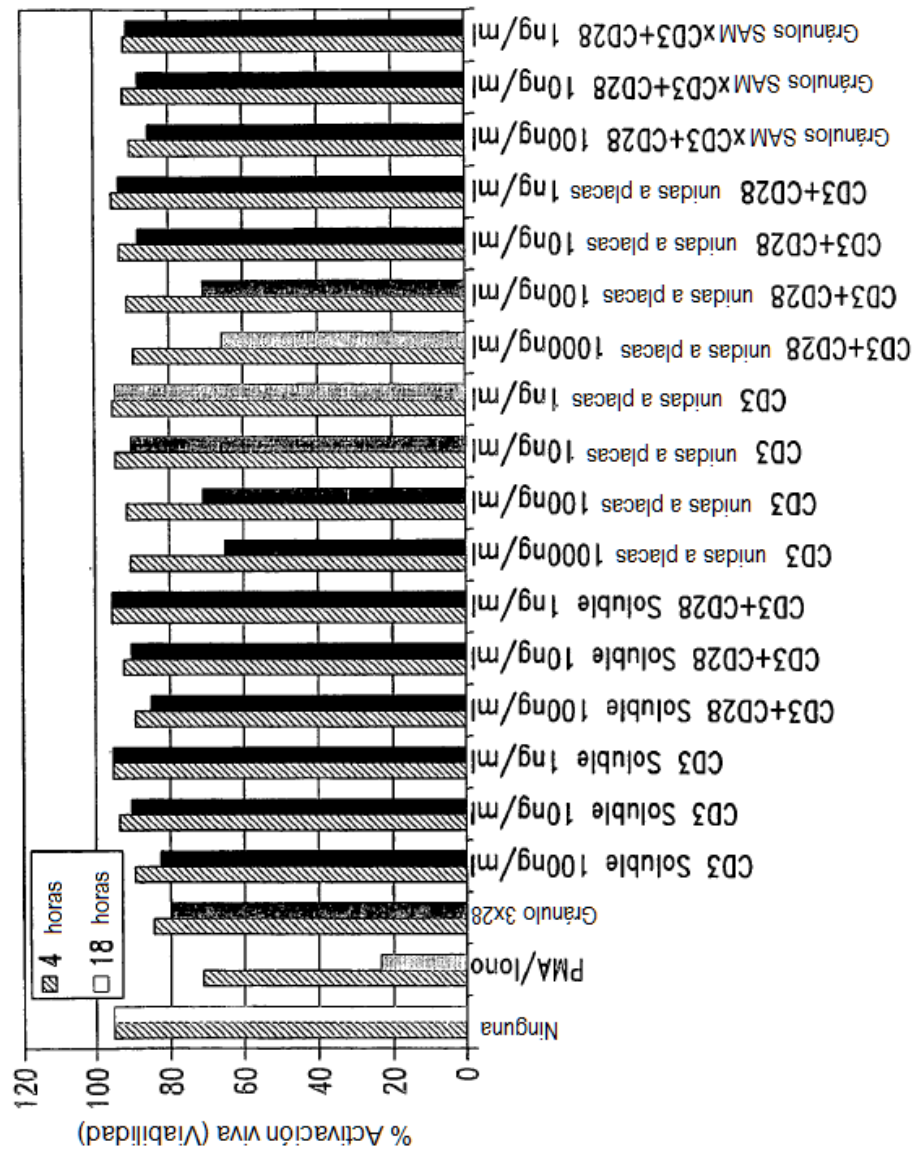


Fig. 26G

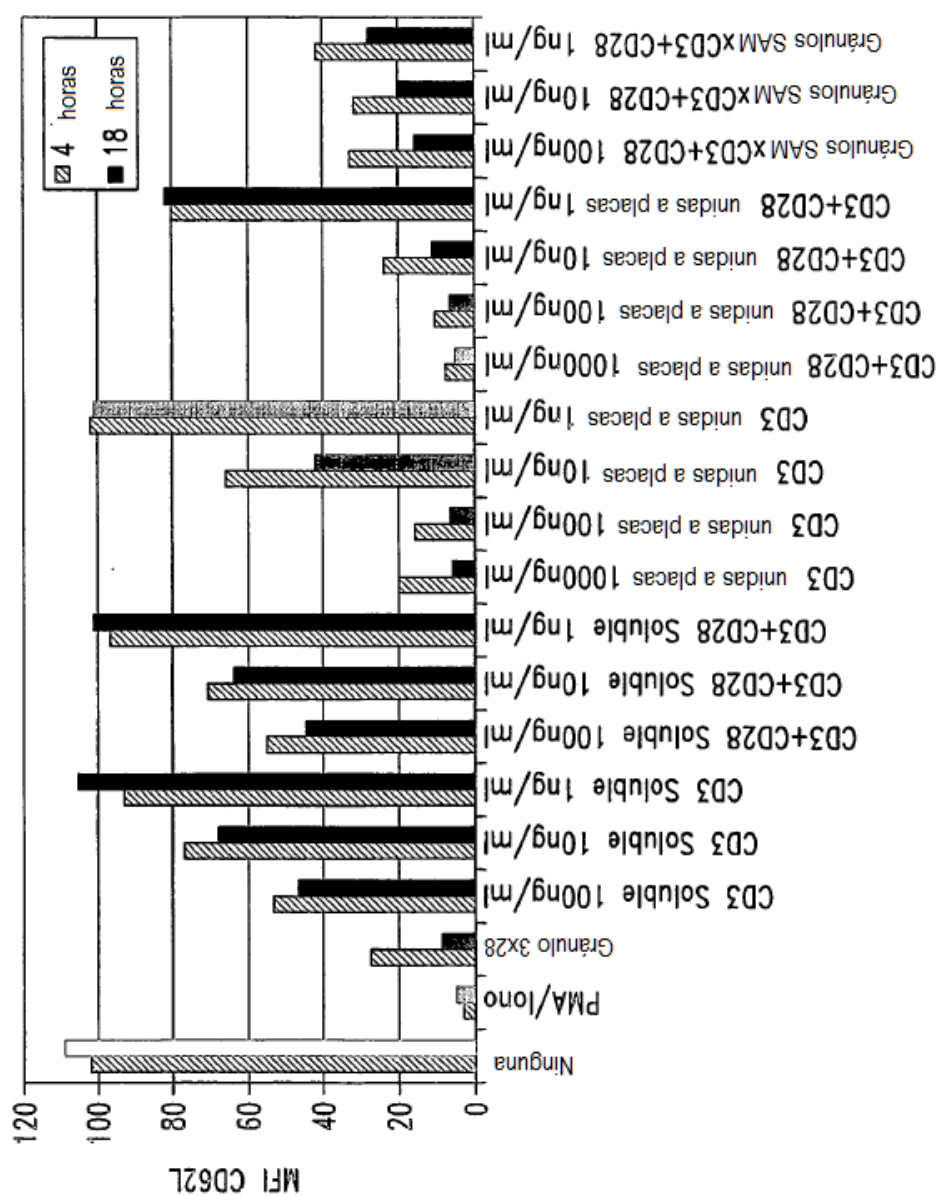


Fig. 26H

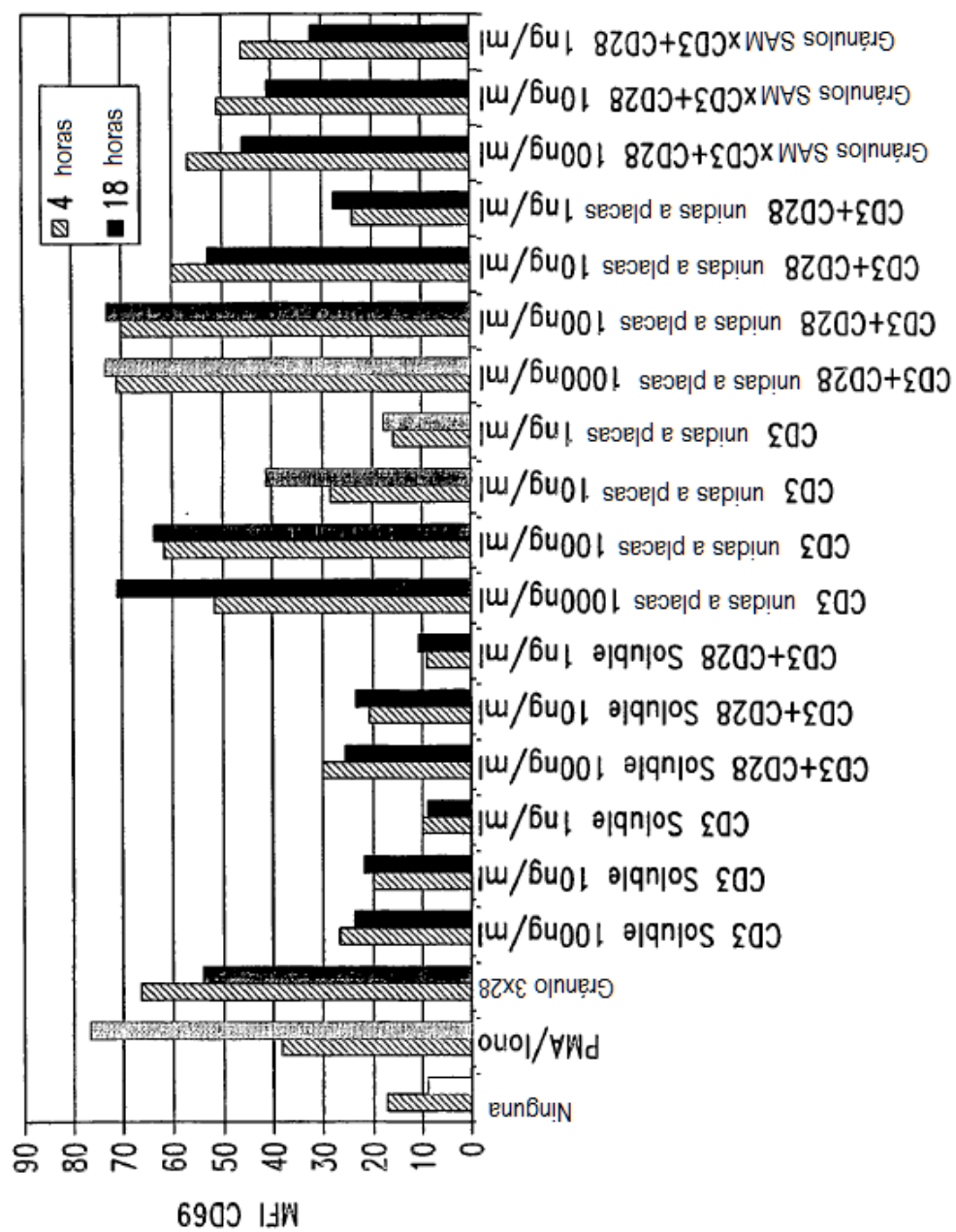


Fig. 26I

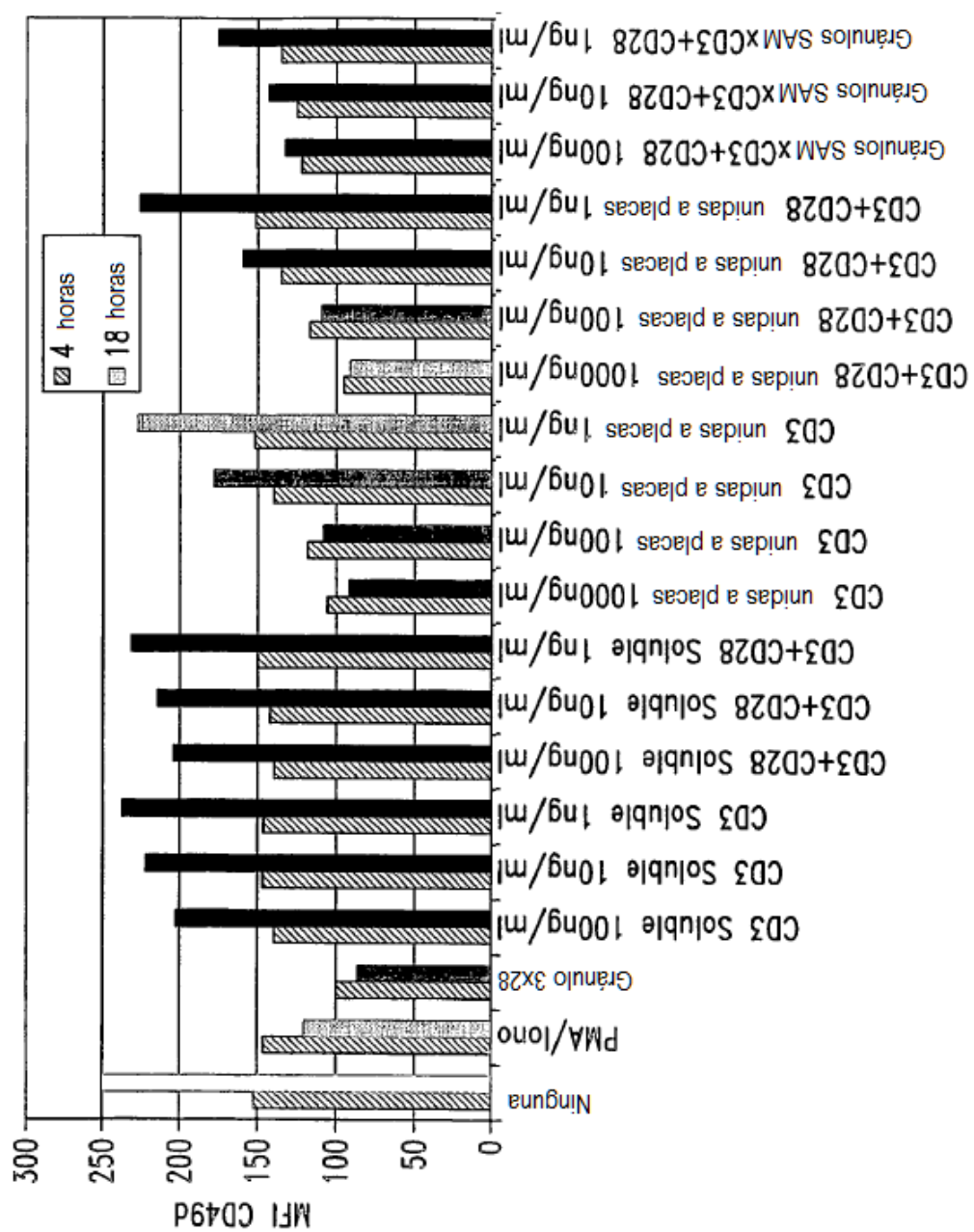


Fig. 26J

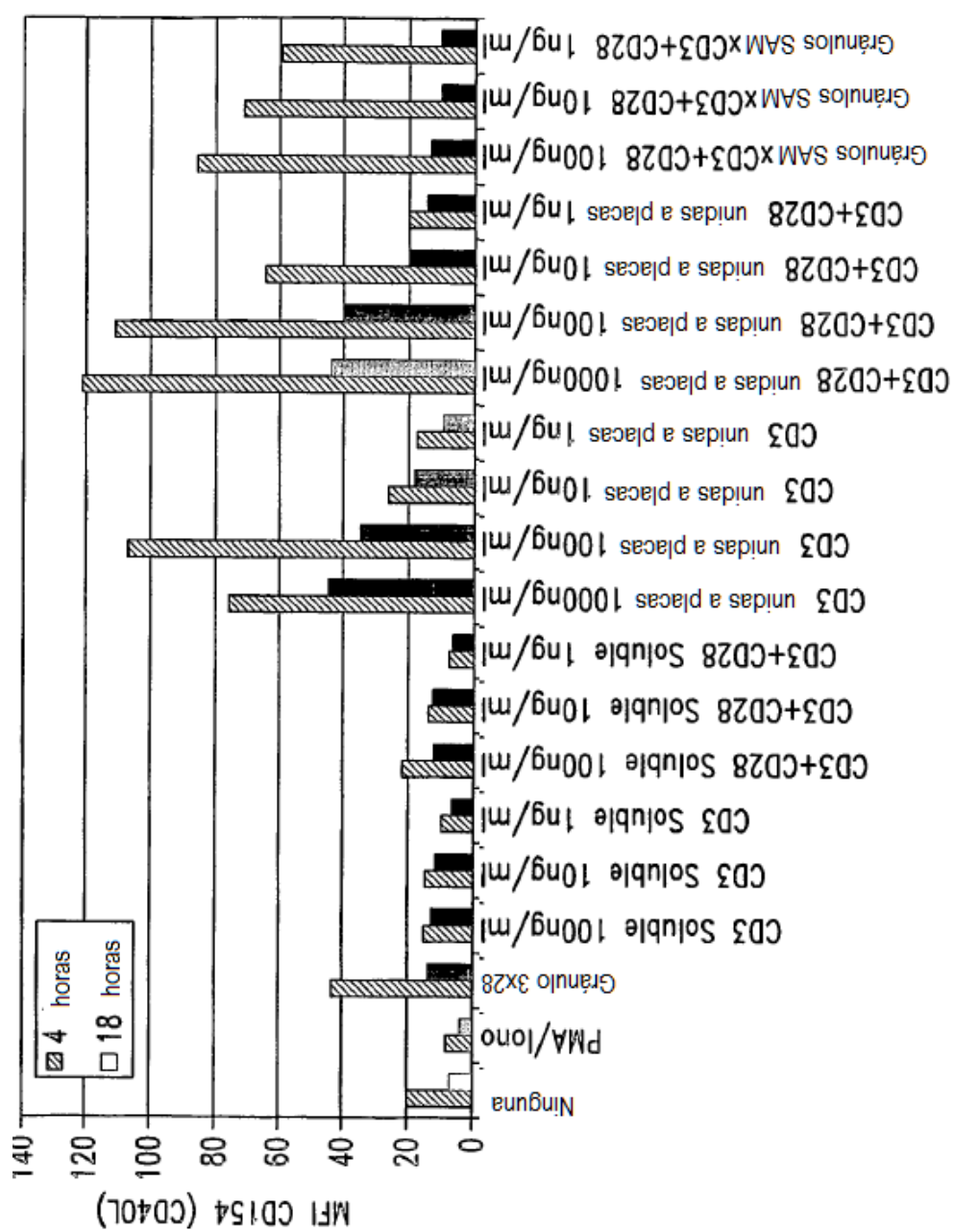


Fig. 26K

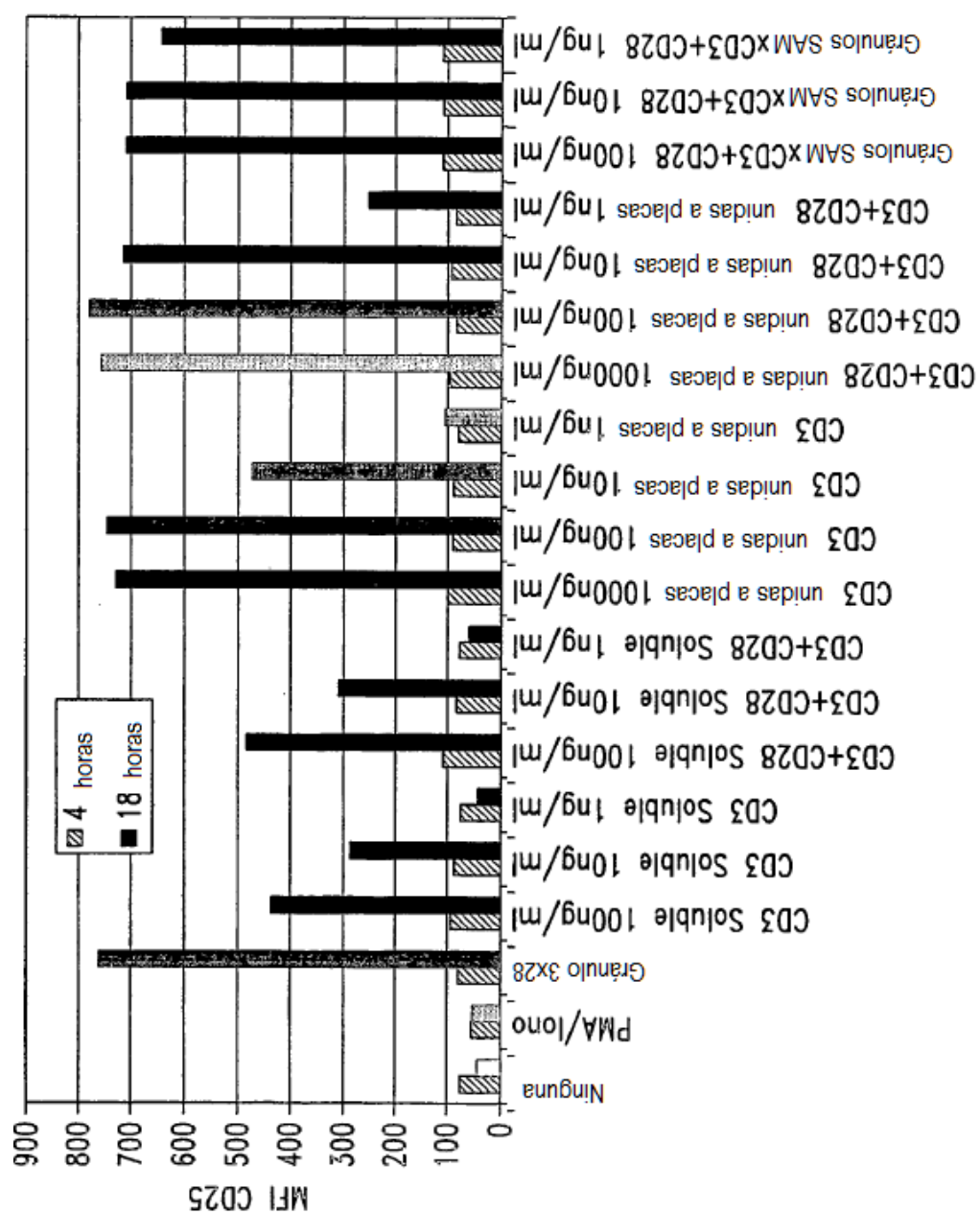


Fig. 26L

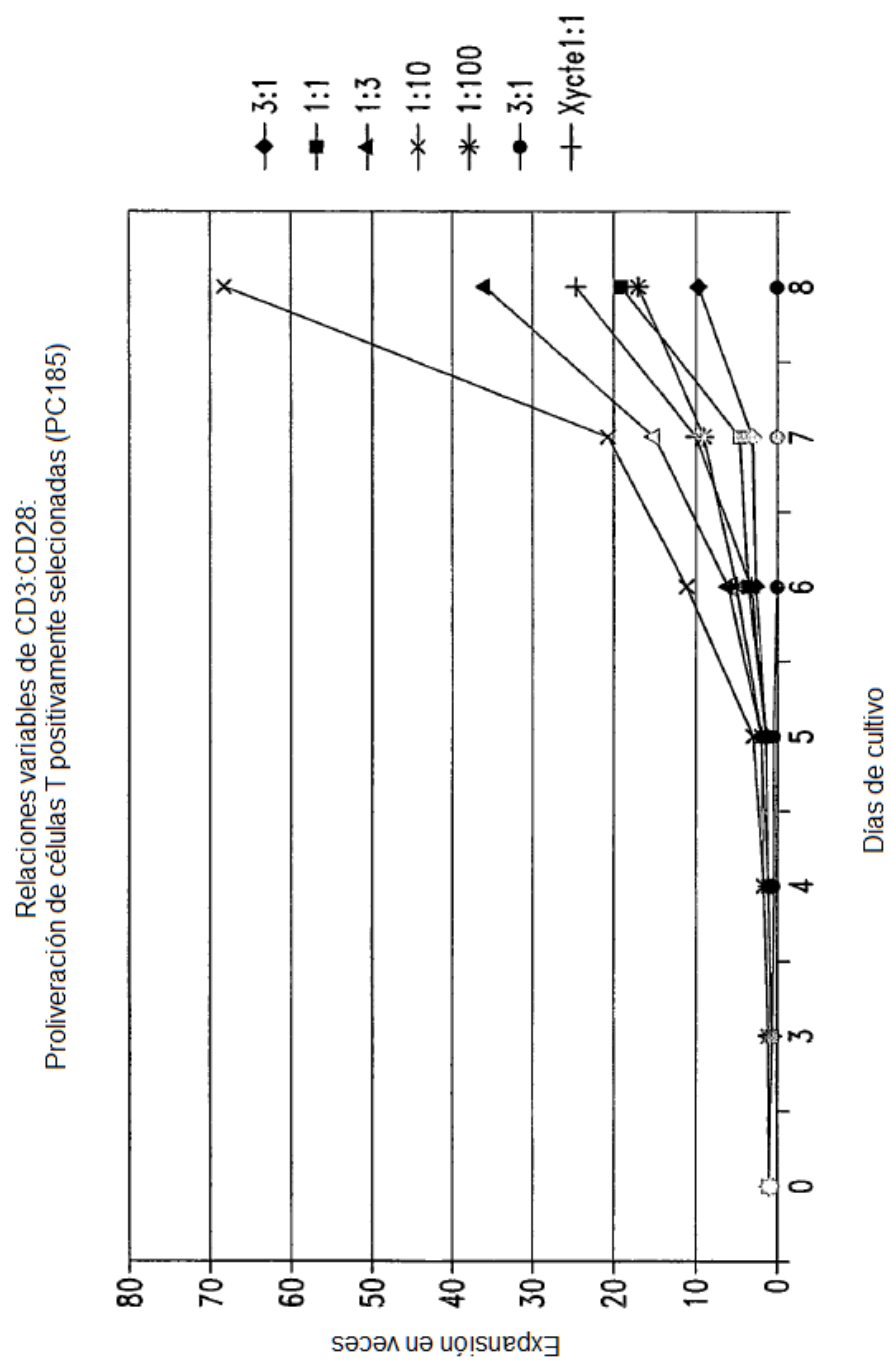
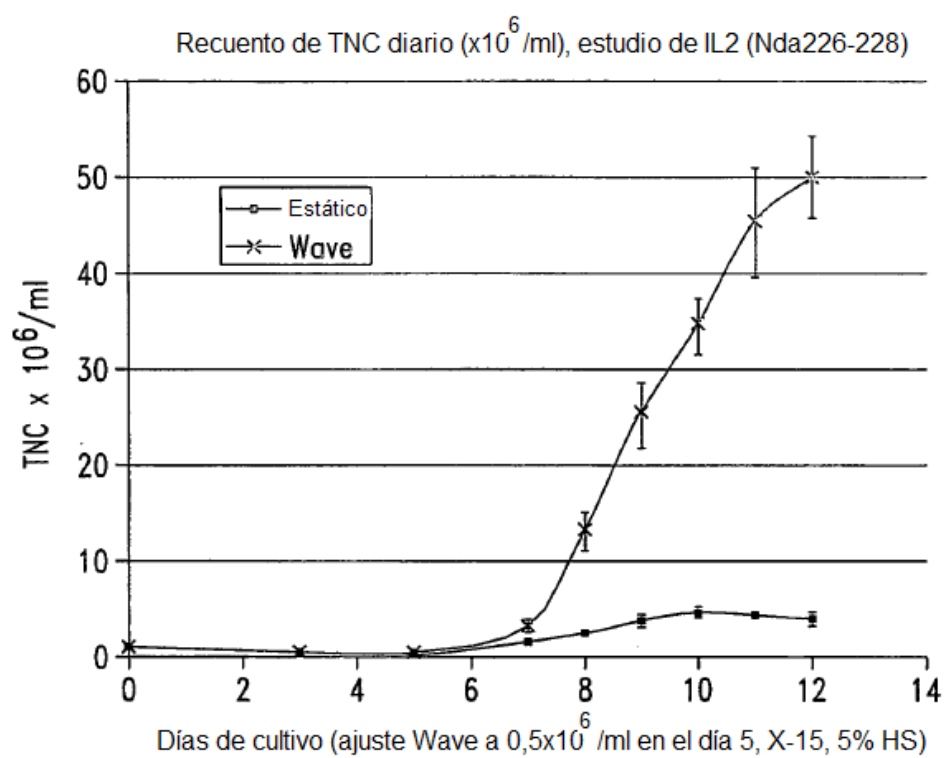


Fig. 27

*Fig. 28*

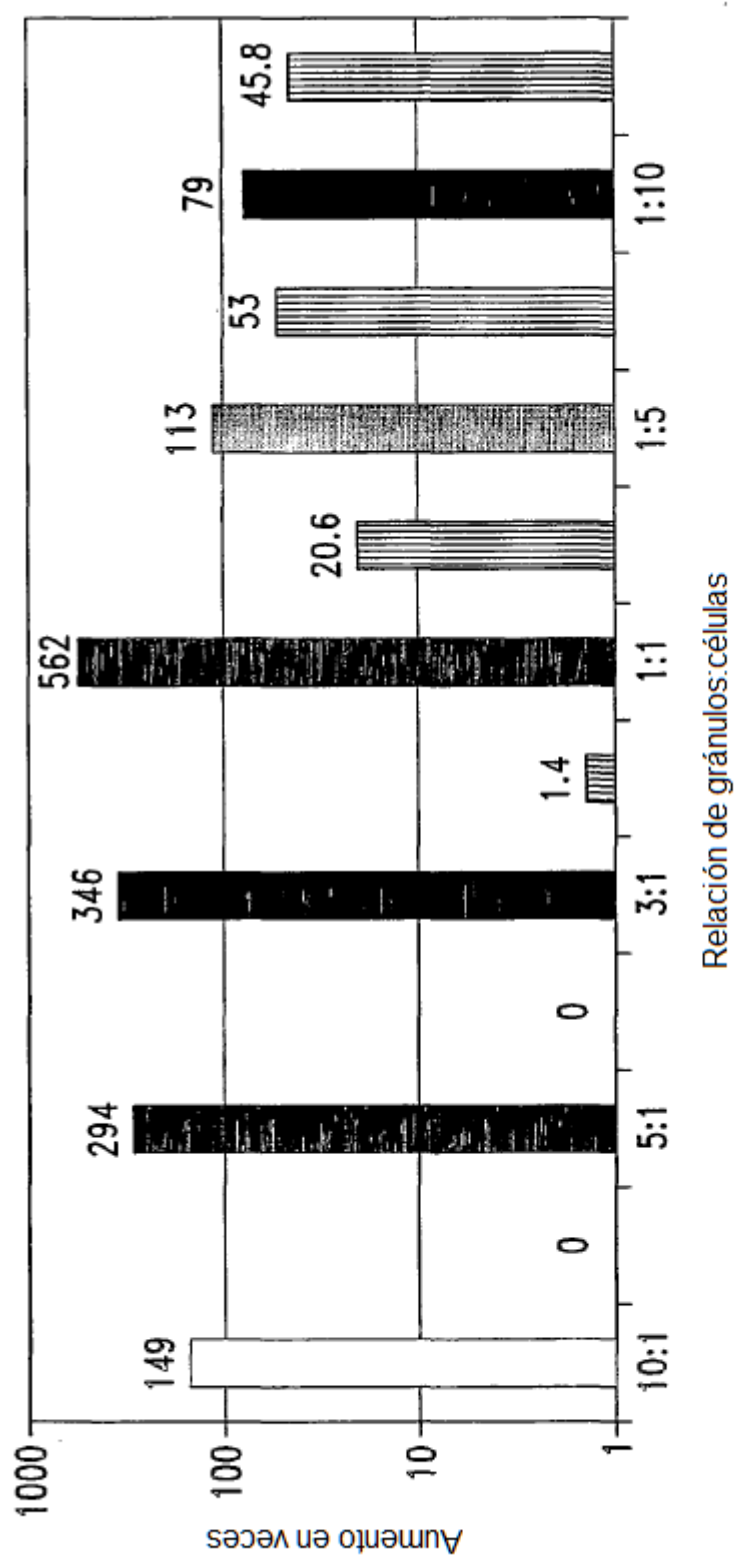


Fig. 29

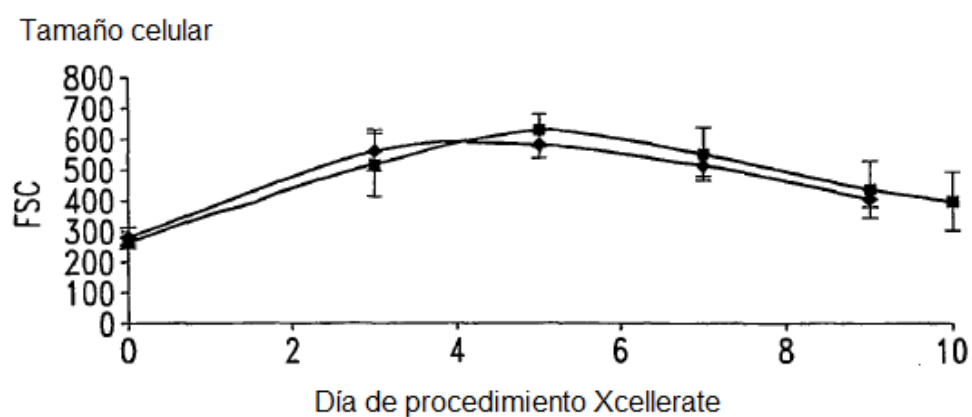


FIG. 30A

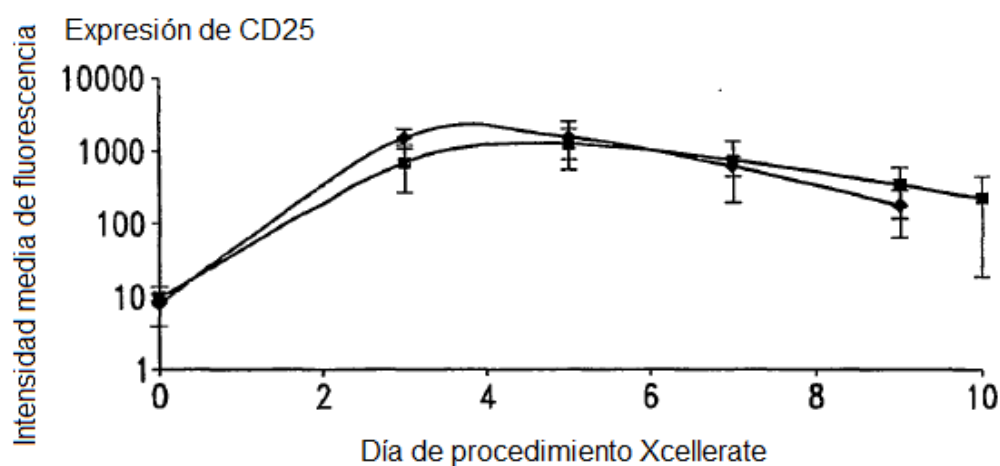


FIG. 30B

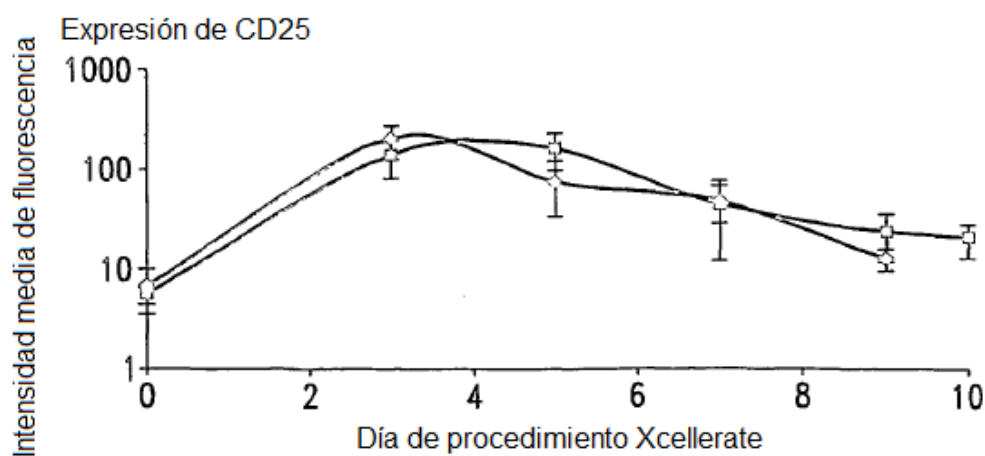
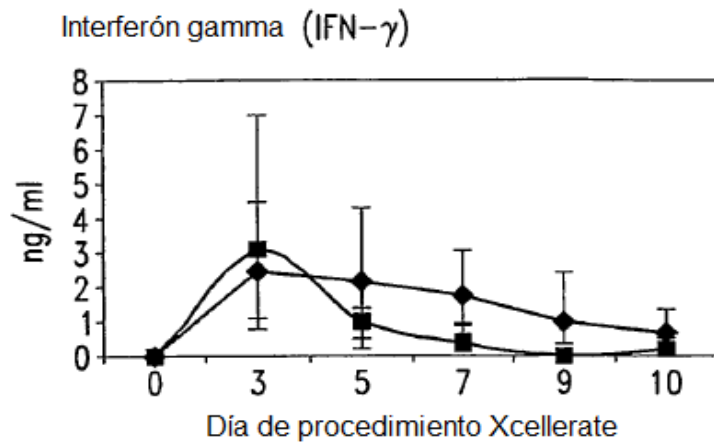
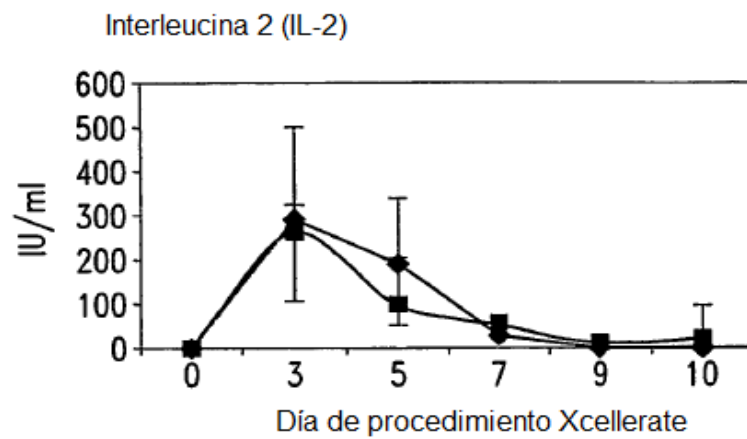
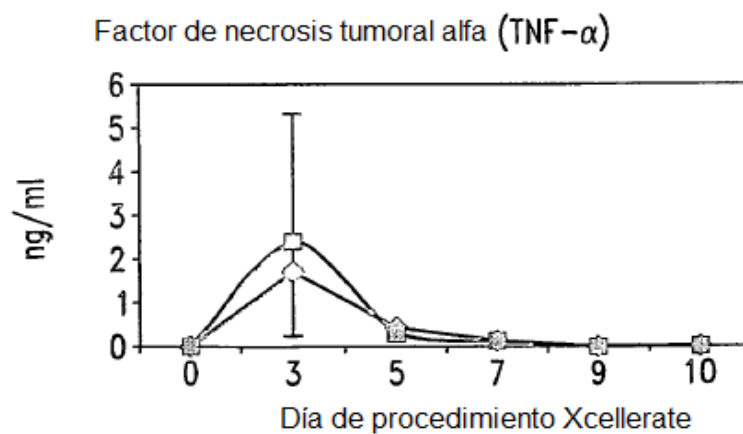


FIG. 30C

*FIG. 31A**FIG. 31B**FIG. 31C*

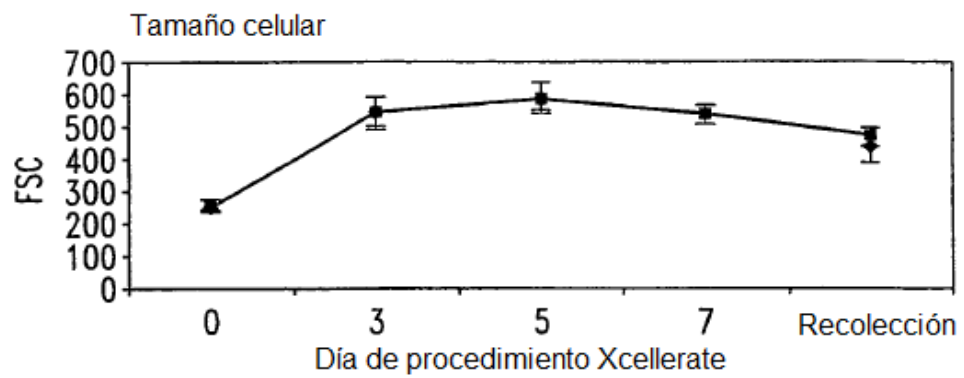


FIG. 32A

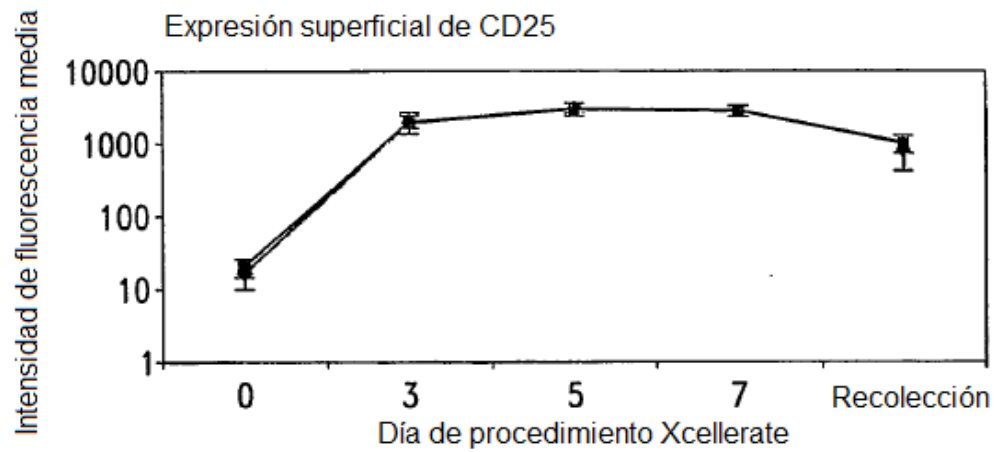


FIG. 32B

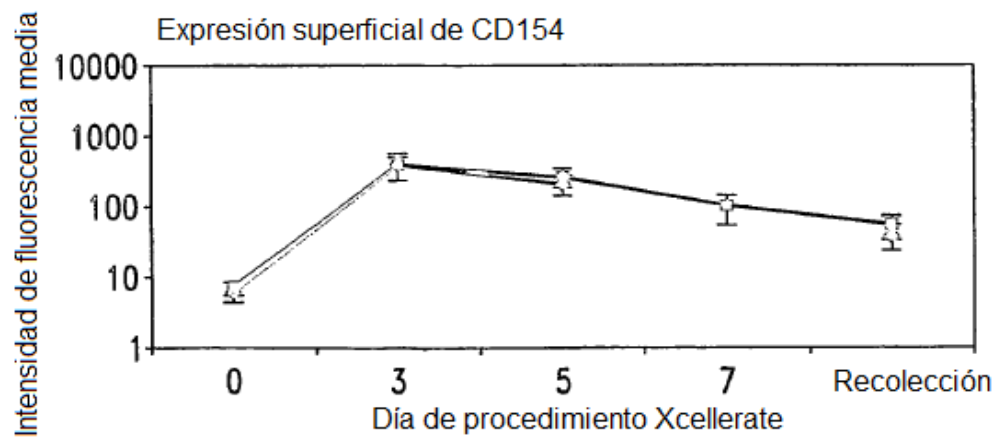


FIG. 32C

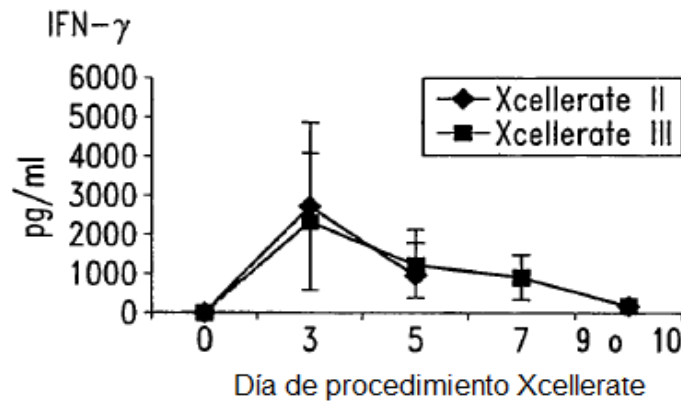


FIG. 33A

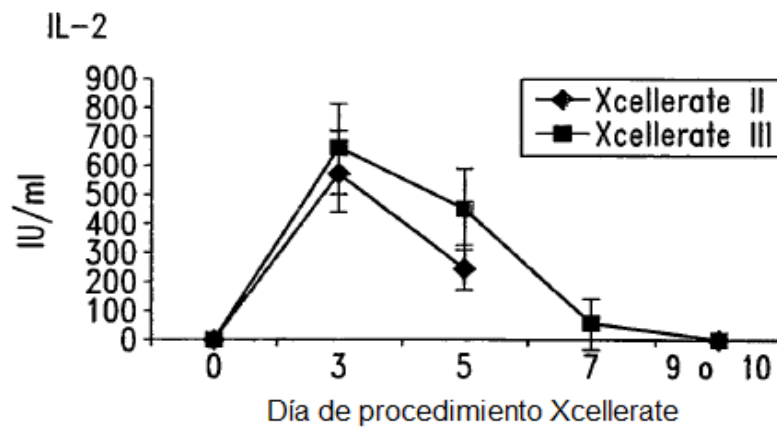


FIG. 33B

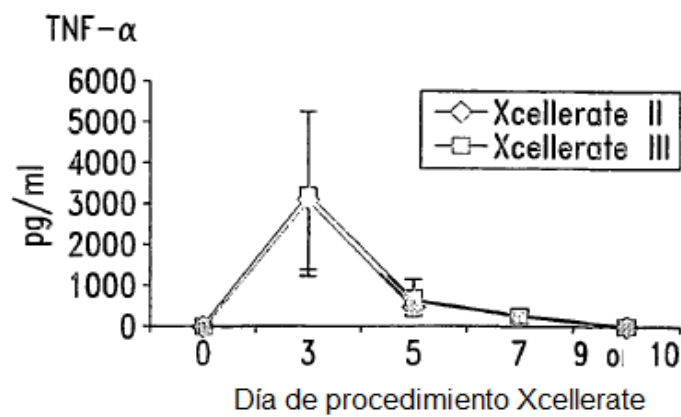


FIG. 33C

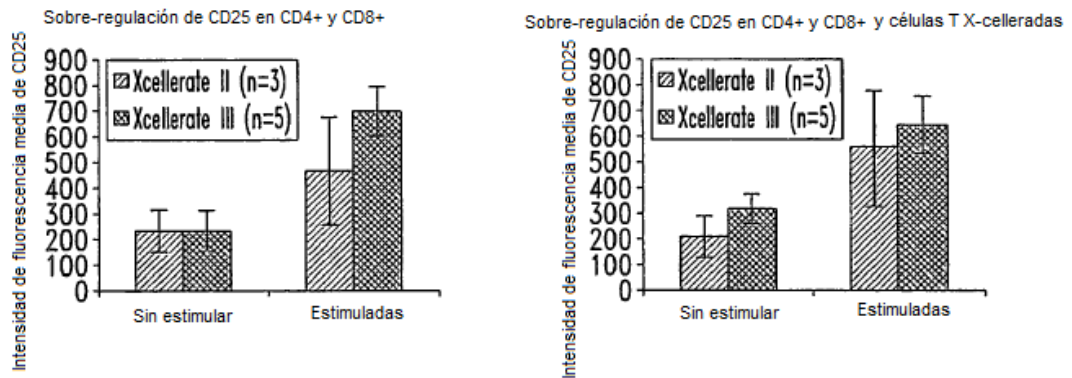


FIG. 34A

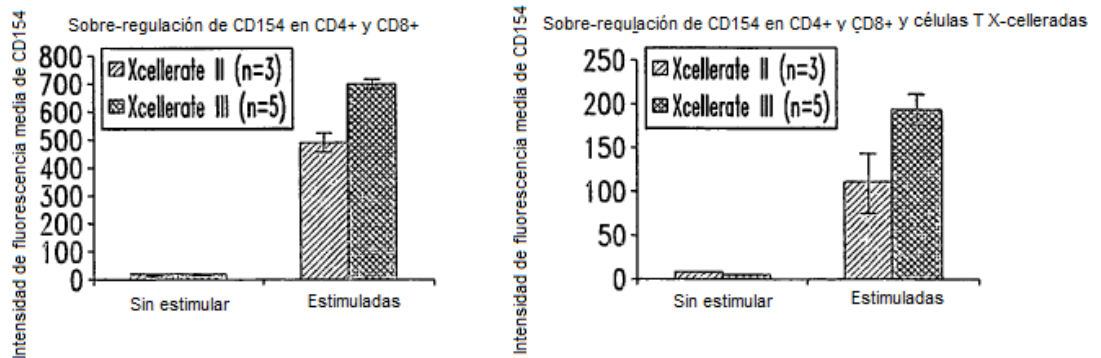
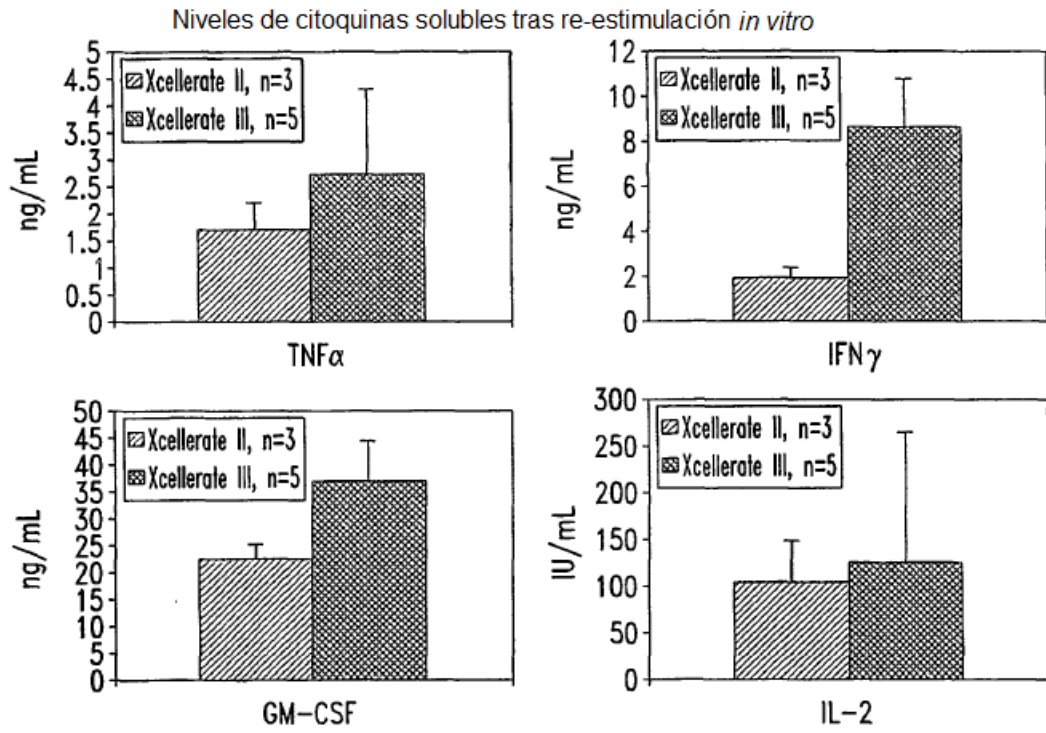
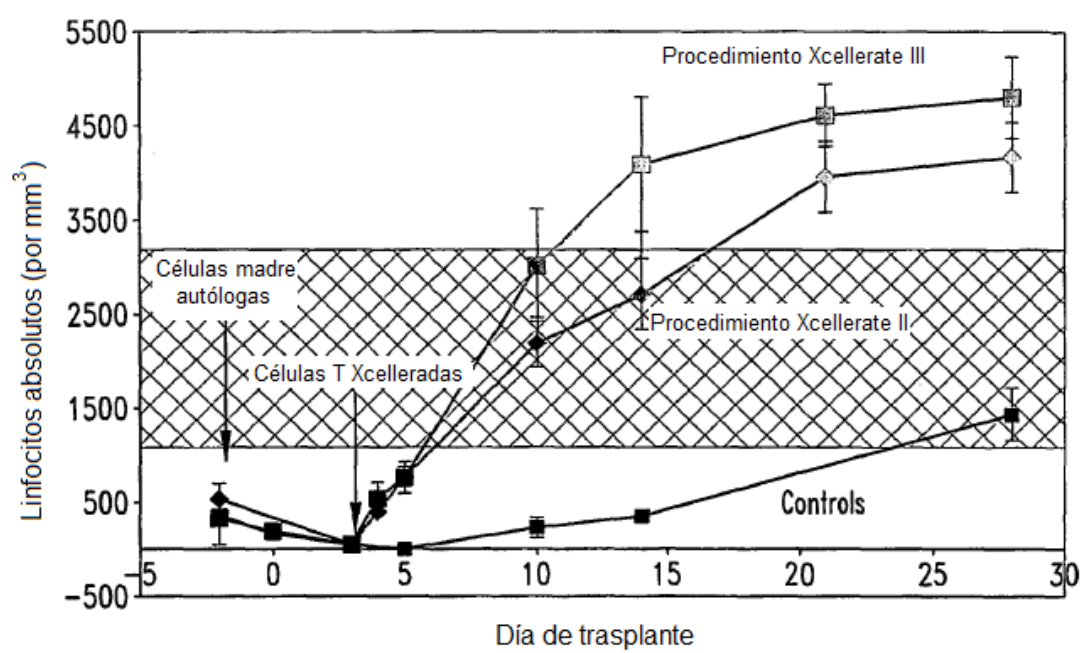


FIG. 34B

*FIG. 34C*

*FIG. 35*