



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 319 942**

⑤① Int. Cl.:
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **99953463 .9**
⑨⑥ Fecha de presentación : **04.11.1999**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1127107**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2001**

⑤④ Título: **Procedimientos para la producción de células T TcR $\gamma\delta$.**

③⑩ Prioridad: **04.11.1998 US 107006 P**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.05.2009

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.05.2009

⑦③ Titular/es: **Therapure Biopharma Inc.**
2585 Meadowpine Blvd.
Mississauga ON L5N 8H9, CA

⑦② Inventor/es: **Bell, David, Nicholson;**
Skea, Danna Lynn y
Hedge, Phyllis Robin

⑦④ Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 319 942 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para la producción de células T TcR $\gamma\delta$.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos de cultivo para la expansión *ex vivo* de células T TcR $\gamma\delta^+$.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Las células TcR $\gamma\delta^+$ son un pequeño subconjunto de linfocitos T circulantes que se distingue de las células T TcR $\alpha\beta^+$ que reconocen, con una gran especificidad, los péptidos de antígenos foráneos en el contexto de los elementos de restricción de los complejos mayores de histocompatibilidad clase I o clase II clásicos (MHC). Por el contrario, las células T TcR $\gamma\delta^+$ son capaces de reconocer tanto los antígenos peptídicos como no peptídicos que se pueden derivar
15 de los microorganismos foráneos o los productos celulares endógenos inducidos por el estrés tales como la infección vírica o la transformación. Además, contrariamente al reconocimiento de antígenos por las células T TcR $\alpha\beta^+$, el reconocimiento de antígenos por las células T TcR $\gamma\delta^+$ no está restringido a MHC.

20 Los receptores de células T de las células TcR $\alpha\beta^+$ y células T TcR $\gamma\delta^+$ se distinguen por los diferentes elementos genéticos que los codifican. La mayoría de las células T TcR $\gamma\delta^+$ se clasifican en dos subconjuntos principales, V $\delta 1^+$ y V $\delta 2^+$, con base en los genes que codifican sus cadenas δ . El subconjunto principal de células T TcR $\gamma\delta^+$ en la sangre periférica humana expresa V $\delta 2$ en combinación con V $\gamma 9$, mientras que el resto expresa V $\delta 1$ en combinación con V $\gamma 2$, V $\gamma 3$, V $\gamma 4$, V $\gamma 5$ o V $\gamma 8$ (Salerno, A y Dieli, F., 1998).

25 Debido a que las células T TcR $\gamma\delta^+$ no disponen de las finas características de especificidad de las células T TcR $\alpha\beta^+$, se ha propuesto que deben representar un mecanismo inmune más primitivo que proporciona una función de vigilancia de primera línea contra las infecciones y tumores (Boismenu, R. *et al.*, 1997). Múltiples estudios han documentado la respuestas de las células T TcR $\gamma\delta^+$ a múltiples virus, bacterias y parásitos (Bukowski, J.F., *et al.*, 1994; Wallace, M. *et al.*, 1995; Lang, F., *et al.*, 1995; Elloso, M.M., *et al.*, 1996) así como también su capacidad para participar en la lisis de las células tumorales de diverso orígenes (Zocchi, M.R. *et al.*, 1990; Kitayama, J. *et al.*, 1993; Choudhary, A. *et al.*, 1995). Los tumores hematopoyéticos pueden ser particularmente susceptibles a los efectos líticos de las células T TcR $\gamma\delta^+$, ya que los ratones transgénicos que expresan el transgén V $\gamma 1.1$ despliegan resistencia espontánea a las leucemias de células T inyectadas y los hibridomas de célula T TcR $\gamma\delta^+$ derivados de dichos ratones responden a las células hematopoyéticas malignas preferentemente a las células tumorales no-hematopoyéticas (Penninger, J., *et al.*, 1995). Además, los clones de células T TcR $\gamma\delta^+$ humanas derivados de la sangre periférica de pacientes y la médula ósea se ha demostrado que destruyen células de leucemia antológicas en la leucemia leucoblástica aguda y la leucemia mielóide aguda, respectivamente (Bensussan, A., *et al.*, 1989; Jahn, B. *et al.*, 1995). Además, se ha demostrado que la mejoría en la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes de leucemia después de un trasplante de médula ósea alogénica, está asociado a un incremento en el número de células T TcR $\gamma\delta^+$ en la sangre periférica (Lamb, L.S., *et al.*, 1996). Colectivamente, estos resultados sugieren que las células T TcR $\gamma\delta^+$ pueden tener un potencial terapéutico
40 en el tratamiento del cáncer y las enfermedades infecciosas.

Muchos de los procedimientos publicados describen que la expansión *ex vivo* de las células T TcR $\gamma\delta^+$ requiere la presencia de antígeno. Se ha demostrado que las células infectadas por virus o las líneas celulares transformadas, bacterias y parásitos estimulan la expansión de las células T TcR $\gamma\delta^+$ *ex vivo*, así como también las líneas tumorales establecidas. Por ejemplo, las células infectadas por el virus herpes simples (HSV) se utilizaron con el fin de estimular la expansión de células V $\delta 2^+$ (Bukowski, J.F., *et al.*, 1994), mientras que se utilizaron líneas celulares linfoblastoides-B transformadas por el virus Epstein-Barr (EBV) con el fin de estimular la expansión de células V $\delta 1^+$ (Orsini, D.L.M. *et al.*, 1993). Los extractos de *Micobacterium tuberculosis* y los antígenos de malaria de *Plasmodium falciparum* en la etapa sanguínea han demostrado ser capaces de estimular la proliferación de las células T TcR $\gamma\delta^+$ (Constant, P., *et al.*, 1994; Elloso, M.M. *et al.*, 1996) Daudí, una línea celular inmortalizada de linfoma de Burkitt humano, también puede estimular la proliferación de las células T TcR $\gamma\delta^+$ (Kaur, I. *et al.*, 1993). Además, los antígenos bien caracterizados, antígenos no peptídicos de la familia de prenil fosfato, por ejemplo, isopentenil pirofosfato, han demostrado estimular la expansión *ex vivo* de las células T TcR $\gamma\delta^+$ (Garcia, V.E. *et al.*, 1998). En algunos de estos sistemas, los cultivos de células T TcR $\gamma\delta^+$ estimulados con antígeno se suplementaron con IL-2, IL-4 u otras citocinas.
55

Las células T TcR $\gamma\delta^+$ se han expandido también *ex vivo* a partir de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) mediante cultivo con IL-2 (Zocchi, M.R. *et al.*, 1990) o IL-2 en combinación con anticuerpo anti-CD3 inmovilizado (Kitayama, J. *et al.*, 1993) o anticuerpo anti- TcR $\gamma\delta^+$ (Yu, S. *et al.*, 1999). En estos sistemas, la estimulación selectiva de las células T TcR $\gamma\delta^+$ por los antígenos tumorales se presume que ha tenido lugar *in vivo* antes del aislamiento de las células T del tejido canceroso.
60

En otro sistema, las células T TcR $\gamma\delta^+$ se expandieron a partir de sangre periférica de pacientes de glioblastoma utilizando un anticuerpo anti-CD3 inmovilizado en fase sólida en combinación con IL-2 seguido de cultivo en IL-2 solamente (Yamaguchi, T., *et al.*, 1997). Estos autores reportan que las células T TcR $\gamma\delta^+$ purificadas posteriormente no proliferaron más que por una semana en presencia de IL-2 solamente y por consiguiente, concluyeron, que este procedimiento sería aplicable solamente a estudios a corto plazo. Asimismo, mostraron que el procedimiento resultó en la expansión y enriquecimiento de tanto las células T TcR $\gamma\delta^+$ como las TcR $\alpha\beta^+$, logrando purezas de células T
65

ES 2 319 942 T3

TcR $\gamma\delta^+$ del orden del 28%. En una publicación posterior, los mismos autores demostraron que este procedimiento expandió selectivamente el subconjunto V $\delta 2^+$ (Suzuki, Y., *et al.*, 1999).

5 De este modo, existen limitaciones a la proliferación celular y/o el requerimiento de estimulación antigénica en los procedimientos existentes de cultivo *ex vivo* y expansión de células T TcR $\gamma\delta^+$. Además, mientras que múltiples publicaciones reportan la expansión del subconjunto de células V $\delta 2^+$, pocas publicaciones reportan la expansión del subconjunto de células V $\delta 1^+$ y ninguna reporta la expansión simultánea de tanto las células T V $\delta 2^+$ como las V $\delta 1^+$ en un solo cultivo.

10 En vista de lo anterior, existe la necesidad en la materia de un procedimiento destinado al cultivo selectivo de grandes cantidades de células TcR $\gamma\delta^+$ *in vitro*.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona nuevos procedimientos para la expansión de células TcR $\gamma\delta^+$ en cultivo en ausencia de antígeno exógeno. En consecuencia, la presente invención proporciona un procedimiento de expansión de células TcR $\gamma\delta^+$ en una muestra inicial que comprende:

20 (1) cultivar las células de una muestra inicial en un primer medio de cultivo que comprende (a) un mitógeno para células T, (b) interleucina-2 y (c) interleucina-4; y

(2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende (i) interleucina-2 y (ii) interleucina-4 para expandir las células T TcR $\gamma\delta^+$.

25 En una forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento destinado a la expansión de células T TcR $\gamma\delta^+$ de una muestra inicial que comprende:

30 (1) cultivar las células de una muestra inicial en un primer medio de cultivo que comprende un medio condicionado, siendo dicho medio condicionado preparado mediante la estimulación de células de la sangre de cordón umbilical humano con mezereína y concanavalina A; y

(2) cultivar las células obtenidas en (1) en un segundo medio de cultivo que comprende (i) interleucina-2 y (ii) interleucina-4 con el fin de expandir las células T TcR $\gamma\delta^+$.

35 En otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento destinado a obtener células T TcR $\gamma\delta^+$ a partir de una muestra de un paciente con leucemia mielógena crónica que comprende:

(1) obtener células mononucleares de baja densidad (LDMNC) de la muestra;

40 (2) eliminar las células CD33+ de las células obtenidas en la etapa (1);

(3) cultivar las células obtenidas en la etapa (2) en un primer medio de cultivo que comprende (a) un mitógeno de células T, (b) interleucina-2 y (c) interleucina-4; y

45 (4) cultivar las células obtenidas en la etapa (3) en un segundo medio de cultivo que comprende (i) interleucina-2 e (ii) interleucina-4 con el fin de expandir las células T TcR $\gamma\delta^+$.

Las células T TcR $\gamma\delta^+$ obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención se pueden utilizar en una multiplicidad de aplicaciones experimentales, terapéuticas y comerciales.

50 Otras características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

55 A continuación se describirá la invención en relación con los dibujos en los que:

La Figura 1 es una gráfica que muestra el rendimiento total en células y el porcentaje de células T TcR $\gamma\delta^+$ y V $\delta 1^+$ a diversos tiempos durante el cultivo de células enriquecidas en CD4 con XLCM/P.

60 La Figura 2 es una gráfica que muestra el rendimiento total de células y el porcentaje de células T TcR $\gamma\delta^+$ y V $\delta 1^+$ a diferentes tiempos durante el cultivo de células enriquecidas en células T/sin células TcR $\alpha\beta$ con XLCM/P.

La Figura 3 es una gráfica que muestra el rendimiento total en células a múltiples tiempos durante el cultivo de LDMNC con XLCM seguido de subcultivo con XLCM/P, IL-2/IL-4/P, IL-2/P, IL-4/P o P solamente.

65 La figura 4 es una gráfica que muestra los rendimientos totales en células y los porcentajes de células T TcR $\gamma\delta^+$ a múltiples tiempos durante el cultivo de LDMNC con XLCM/P o con XLCM/P seguido de subcultivo con IL-2/IL-4/P.

La Figura 5 es una gráfica que muestra los rendimientos totales en células y los porcentajes de células T $TcR\gamma\delta^+$ a múltiples tiempos durante el cultivo de LDMNC con $\alpha/IL-2/IL-4/P$ o $\alpha/IL-2/IL-4/P$ seguido de subcultivo con $IL-2/IL-4/P$.

5 La Figura 6a es una gráfica que muestra el número total de células viables contra el tiempo durante el cultivo de células enriquecidas en células T/sin células $TcR\alpha\beta$ con $\alpha/IL-2/IL-4/P$ seguido de subcultivo con $IL-2/IL-4/P$.

Las Figuras 6b-f son unas gráficas que muestran los porcentajes de muerte de múltiples dianas por los efectadores $TcR\gamma\delta^+$ a diferentes proporciones efector:diana.

10 Las Figuras 6g-k son unas gráficas que muestran el porcentaje de muerte de múltiples dianas por los efectadores $TcR\gamma\delta^+$ a múltiples proporciones efector:diana después de la criopreservación de los efectadores.

15 La Figura 7a es una gráfica que muestra el número total de células viables con el tiempo durante el cultivo de células enriquecidas en células T/sin células $TcR\alpha\beta$ /sin células CD33 derivadas de un paciente de CML cultivadas con $\alpha/IL-2/IL-4/P$ seguido de subcultivo con $IL-2/IL-4/P$.

La Figura 7b es una gráfica que muestra el porcentaje viable contra el tiempo después de la retirada de citocinas.

20 Las Figuras 7c-g son unas gráficas que muestran el porcentaje de muerte de múltiples dianas por los efectadores $TcR\gamma\delta^+$ a múltiples proporciones de efector:diana.

Las Figuras 7h-l son gráficas que muestran los porcentajes de muerte de múltiples dianas por los efectadores $TcR\gamma\delta^+$ a múltiples proporciones de efector:diana después de la criopreservación de los efectadores.

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona nuevos procedimientos para expandir selectivamente las células T $TcR\gamma\delta^+$ en cultivo. Los procedimientos pueden utilizar muestras iniciales no fraccionadas o muestras iniciales que han sido enriquecidas en células T. Ventajosamente, los procedimientos de la presente invención no necesitan la utilización de estimulación antigénica que es necesaria en la mayoría de los demás procedimientos.

En consecuencia, la presente invención proporciona

35 Un procedimiento destinado a la expansión de células T $TcR\gamma\delta^+$ en una muestra inicial que comprende:

(1) cultivar las células en una muestra inicial en un primer medio de cultivo que comprende (a) un mitógeno de células T, (b) interleucina-2 y (c) interleucina-4; y

40 (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende (i) interleucina-2 y (ii) interleucina-4 con el fin de expandir las células T $TcR\gamma\delta^+$.

La muestra inicial puede ser una muestra cualquiera que comprenda células T $TcR\gamma\delta^+$ o precursores de las mismas comprendiendo, pero sin que ello sea limitante, sangre, médula ósea, tejido linfoide, epitelio, timo, hígado, bazo, tejido canceroso, tejido de nódulo linfático, tejido infectado, tejido fetal y fracciones o porciones enriquecidas de los mismos. La muestra inicial es preferentemente sangre comprendiendo sangre periférica o sangre de cordón umbilical o fracciones de las mismas, comprendiendo células del "buffy coat", células mononucleares y células mononucleares de baja densidad (LDMNC). Las células se pueden obtener a partir de muestras iniciales de sangre utilizando procedimientos conocidos en la materia tales como centrifugación en gradientes de densidad. Por ejemplo, se puede producir una capa de sangre completa sobre un volumen igual de Ficoll-HypaqueTM seguido de centrifugación a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. El material en la interfase contendrá las células mononucleares de baja densidad que se pueden recoger y lavar in medio de cultivo y centrifugar a 100 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Antes de cultivar para células $TcR\gamma\delta^+$, las células se pueden mantener un medio cualquiera adecuado para mamíferos tal como AIM-VTM, RPMI 1640 o IMDM.

55 Antes del cultivo de las muestras iniciales o fracciones de las mismas (tales como LDMNC) en el primer medio de cultivo, la muestra o fracción de la misma se puede enriquecer en ciertos tipos celulares y/o eliminar otros tipos celulares. En particular, la muestra inicial o fracción de la misma puede ser enriquecida en células CD4⁺ o se puede enriquecer en células T junto con la eliminación de células T $TcR\alpha\beta^+$. La muestra se puede enriquecer o disminuir de ciertos tipos celulares utilizando procedimientos conocidos en la materia. En una forma de realización, las células de un fenotipo particular se pueden eliminar mediante el cultivo de la muestra inicial o fracción de la misma con un cocktail de anticuerpos que comprende anticuerpos específicos a los marcadores de las células a eliminar. Preferentemente, los anticuerpos en el cocktail son complejos tetraméricos de anticuerpos tal como se describe en la patente US nº 4.868.109 de Lansdorp.

65 Una vez que las células en la muestra inicial han sido fraccionadas y enriquecidas, si se desea, las células se cultivan en un primer medio de cultivo que comprende un mitógeno de célula T y por lo menos dos citocinas, preferentemente interleucina-2 (IL-2) e interleucina-4 (IL-4). Preferentemente, el mitógeno de célula T se encuentra presente en una

ES 2 319 942 T3

cantidad comprendida entre el 0,01 y 100 $\mu\text{g/ml}$, la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 ng/ml; la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 ng/ml. Más preferentemente, el mitógeno de célula T se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 50 $\mu\text{g/ml}$; la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 1 y 100 ng/ml; la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 1 y 100 ng/ml. Todavía más preferentemente, el mitógeno de célula T se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,5 y 10 $\mu\text{g/ml}$; la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 2 y 50 ng/ml; la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 2 y 50 ng/ml. Lo más preferible, el medio comprende 1 $\mu\text{g/ml}$ de un mitógeno de célula T, 10 ng/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-4.

Las células se cultivan preferentemente en el primer medio de cultivo durante un período de tiempo comprendido entre 3 días y aproximadamente 21 días. Mas preferentemente, en un periodo comprendido entre 5 días y aproximadamente 14 días.

El mitógeno de célula T puede ser un agente cualquiera que estimule las células T comprendiendo, pero sin que ello sea limitante, lectinas de origen vegetal y no vegetal, anticuerpos monoclonales que activen las células T y otros mitógenos no-lectinas/no-anticuerpo. Una lectina vegetal preferida es la concanavalina A (ConA) aunque también se pueden utilizar otras lectinas vegetales tales como la fitohemaglutinina (PHA). Un anticuerpo preferido es un anticuerpo anti-CD3 tal como OKT3. Otros mitógenos comprenden el 12-miristato-13-acetato de forbol (TPA) y sus compuestos relacionados, mezereina, enterotoxina A Estafilococal (SEA) y proteína A estreptococal. El mitógeno de célula T se añade preferentemente al cultivo en forma soluble, por ejemplo, disuelto en medio de cultivo.

Después del cultivo en el primer medio de cultivo, las células se lavan mediante centrifugación y se subcultivan en un segundo medio de cultivo que comprende por lo menos dos citocinas, preferentemente interleucina-2 (IL-2) e interleucina-4 (IL-4). En el segundo medio de cultivo, tanto la IL-2 como la IL-4 son necesarias para la máxima expansión celular. Si las células se subcultivan con IL-2 solamente, la proliferación continúa durante unos pocos días pero luego disminuye rápidamente; si las células se subcultivan con IL-4 solamente la continuación de la proliferación es todavía inferior. Así, para una proliferación celular prolongada después de la eliminación del mitógeno, son esenciales tanto IL-2 como IL-4 en el segundo medio de cultivo.

La etapa de subcultivo es importante para la expansión de las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$ mediante el procedimiento de la presente invención, en particular, si la muestra inicial o el LDMNC no han sido fraccionados con anterioridad al cultivo en el primer medio de cultivo. Si los LDMNC han sido fraccionados entonces la etapa de subcultivo puede ser opcional. Si los LDMNC se cultivan continuamente en conA/IL-2/IL-4 (sin subcultivo en IL-2/IL-4), entonces solamente se expandirán las células T $\text{TcR}\alpha\beta^+$ (ver el Ejemplo 4). El subcultivo en IL-2/IL-4 (es decir la eliminación del mitógeno de célula T, conA) produce el crecimiento de las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$. Por el contrario, si se omite ConA en el primer medio de cultivo, no se producirá expansión celular en absoluto. La eliminación de conA mediante el subcultivo tiene la ventaja adicional de hacer que las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$ sean más adecuadas para la utilización terapéutica, ya que la administración de concanavalina residual al paciente no es deseable. La eliminación del mitógeno de célula T en la etapa de subcultivo puede no ser necesaria si las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$ son para utilizaciones diagnósticas, experimentales o no terapéuticas.

Preferentemente, en el segundo medio de cultivo, la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 ng/ml; y la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 ng/ml. Más preferentemente, la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 1 y 100 ng/ml; y la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 1 y 100 ng/ml. Todavía más preferentemente, la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 2 y 50 ng/ml; y la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 2 y 50 ng/ml. Lo más preferible, el segundo medio de cultivo comprende 10 ng/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-4.

Los LDMNC se cultivan preferentemente en un segundo medio de cultivo durante un período de tiempo comprendido entre aproximadamente 3 días y aproximadamente 21 días. Más preferentemente, en un periodo comprendido entre aproximadamente 9 días y aproximadamente 13 días.

El primer y segundo medio de cultivo puede adicionalmente comprender otros ingredientes que pueden ayudar al crecimiento y expansión de las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$. Los ejemplos de otros ingredientes que se pueden añadir, comprenden, pero sin que ello sea limitante, plasma o suero, factores de crecimiento adicionales que comprenden citocinas tales como IL-12, IL-15, factores necrosantes tumorales (TNF) e interferones (IFN), proteínas purificadas tales como albúmina, una fuente de lípido tal como una lipoproteína de baja densidad (LDL), vitaminas, aminoácidos, esteroides y todo tipo de suplementos que apoyen o promuevan el crecimiento y/o la supervivencia.

Preferentemente, tanto el primero como el segundo medio de cultivo se suplementan con suero o plasma (P). La cantidad de P en el primer y segundo medio de cultivo esta preferentemente comprendido entre el 1% y el 25%, Más preferentemente, la cantidad de P en el primer y segundo medio de cultivo se encuentra comprendida entre el 2% y el 20%. Todavía más preferentemente, la cantidad de P en el primer y segundo medio de cultivo se encuentra comprendida entre el 2,5% y el 10%. Lo más preferible, la cantidad de P en el primer y segundo medio de cultivo es del 5%. El suero o plasma (P) se puede obtener a partir de una fuente cualquiera que comprende, pero sin que ello sea limitante, sangre periférica humana, sangre de cordón umbilical o sangre derivada de otra especie de mamífero. El plasma puede ser de un solo donante o puede ser de un conjunto de múltiples donantes. Si se deben utilizar células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$ antólogas clínicamente, es decir, reinfundidas en el mismo paciente del cual se obtuvo la muestra inicial original, entonces es

ES 2 319 942 T3

preferible utilizar también P antólogo (es decir, del mismo paciente) con el fin de evitar la introducción de productos extraños (p.ej., virus) en el paciente. Si las células T TcR $\gamma\delta^+$ se utilizarán alogénicamente (es decir, infundidas en una persona distinta de la cual se obtuvo la muestra inicial original) entonces es preferible utilizar plasma de uno u otro con el fin de minimizar la introducción producto extraños en el paciente; por lo menos el plasma debería ser de origen humano con el fin de evitar la administración de productos animales al paciente.

En otro aspecto de la presente invención, el mitógeno de célula T y por lo menos dos citocinas en el primer medio de cultivo se pueden derivar de un medio condicionado de leucocitos tales como XLCM. XLCMTM es un medio condicionado preparado a partir de sangre de cordón umbilical tal como se describe en el Ejemplo 1 y comprende un mitógeno de célula T (ConA) y múltiples citocinas. XLCM comprende solamente pequeñas cantidades de IL-2 y cantidades casi indetectables de IL-4.

En consecuencia, se describe asimismo un procedimiento destinado a la expansión de células T TcR $\gamma\delta^+$ en una muestra inicial que comprende:

- (1) cultivar células de la muestra inicial en un primer medio de cultivo que comprende un medio de cultivo condicionado de leucocitos; y
- (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende (i) interleucina-2 y (ii) interleucina-4 con el fin de expandir las células T TcR $\gamma\delta^+$.

Preferentemente, antes de cultivar las células de la muestra inicial en la etapa (1), las células se enriquecen en células T tal como se describió anteriormente.

En una forma de realización preferida, el medio condicionado de leucocitos es XLCM. El XLCM se encuentra presente preferentemente en el primer medio de cultivo en una cantidad comprendida entre el 1% y el 25%. Más preferentemente, el XLCM se encuentra presente en el primer medio de cultivo en una cantidad comprendida entre el 2% y el 20%. Todavía más preferentemente, el XLCM se encuentra presente en el primer medio de cultivo en una cantidad comprendida entre el 2,5% y el 10%. Lo más preferible, el primer medio de cultivo comprende 5% de XLCM. Las cantidades de IL-2 e IL-4 en el segundo medio de cultivo son preferentemente tal como se describieron anteriormente. El primer y segundo medio de cultivo preferentemente comprende suero o plasma tal como se describió anteriormente.

Los procedimientos de la presente invención producen poblaciones expandidas de células T TcR $\gamma\delta^+$. El término "Expandidas" se refiere a que el número de las células deseadas o diana (es decir, células T TcR $\gamma\delta^+$) en la preparación final es superior al número de células en la población inicial o del comienzo.

Las células T TcR $\gamma\delta^+$ obtenidas según los procedimientos de la presente invención se pueden separar de otras células que se pueden encontrar presentes en el cultivo final utilizando procedimientos conocidos en la materia, que comprenden fraccionamiento celular activado por fluorescencia, separación inmunomagnética, cromatografía en columna de afinidad, centrifugación en gradiente de densidad y barrido celular.

Se describen las células T TcR $\gamma\delta^+$ obtenidas mediante los procedimientos de la presente invención. En consecuencia, se describe también una preparación de células T TcR $\gamma\delta^+$. Preferentemente, las células T TcR $\gamma\delta^+$ comprenden más de un 60%, más preferentemente, más del 80% y lo más preferible, más del 90%, de las células totales en la población enriquecida.

Contrariamente a los procedimientos de la técnica anterior, tanto las células T TcR $\gamma\delta^+$ V $\delta 1^+$ como V $\delta 2$ se expanden mediante los procedimientos de la presente invención. En consecuencia, se describe una preparación de células de células T TcR $\gamma\delta^+$ que comprende células T TcR $\gamma\delta^+$ V $\delta 1^+$ y V $\delta 2^+$. Preferentemente, la preparación de células comprende entre el 50 y el 90% de células T TcR $\gamma\delta^+$ V $\delta 1^+$ y entre el 10 y el 50% de células T TcR $\gamma\delta^+$ V $\delta 2^+$ del total de células T TcR $\gamma\delta^+$ en la preparación. Más preferentemente la preparación de células comprende un 70% de células T TcR $\gamma\delta^+$ V $\delta 1^+$ y un 30% de células T TcR $\gamma\delta^+$ V $\delta 2^+$ del total de células T TcR $\gamma\delta^+$ en la preparación.

Ventajosamente, la preparación de células T TcR $\gamma\delta^+$ está libre o sustancialmente libre de mitógeno de célula T.

Se describe la utilización de células T TcR $\gamma\delta^+$ obtenidas mediante el procedimiento de la presente invención en una cualquiera y todas las aplicaciones. Las células T TcR $\gamma\delta^+$ se considera que son la primera línea de defensa contra los patógenos infecciosos. Además, las células T TcR $\gamma\delta^+$ presentan actividad citolítica intrínseca contra las células transformadas de diferentes orígenes, comprendiendo linfomas de célula B, sarcomas y carcinomas. En consecuencia, las células T TcR $\gamma\delta^+$ obtenidas y cultivadas *ex vivo* según el procedimiento de la presente invención, se pueden transfundir en un paciente con el fin de tratar o prevenir una infección, cáncer o enfermedad resultante de inmunosupresión. Ventajosamente, las células T TcR $\gamma\delta^+$ no comprenden ConA o suero bovino fetal lo que las hace de utilidad en aplicaciones terapéuticas.

Las células T TcR $\gamma\delta^+$ aisladas según la presente invención se pueden utilizar en modelos experimentales, por ejemplo, para el estudio adicional y el descubrimiento de la función de las células. Además, estas células se pueden

ES 2 319 942 T3

utilizar para estudios dirigidos a la identificación de antígenos/epítomos reconocidos por las células T TcR $\gamma\delta^+$ y para el diseño y desarrollo de vacunas.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran la presente invención.

5

Ejemplos

Los siguientes procedimientos se refieren a la expansión *ex vivo* a gran escala de células T TcR $\gamma\delta^+$ en cultivo líquido en ausencia de antígeno o células accesorias. El material inicial comprende células mononucleares de baja densidad (LDMNC) de sangre periférica humana. Las LDMNC se pueden fraccionar adicionalmente mediante (1) enriquecimiento en células T CD4 $^+$, (2) enriquecimiento en células T junto con eliminación de células T TcR $\alpha\beta^+$, o (3) no fraccionado adicionalmente. Las células se cultivan preferentemente en medio que comprende alguna combinación de XLCM, suero humano o plasma (P), concanavalina A (con A), interleucina-2 (IL-2) e interleucina-4 (IL-4). A intervalos frecuentes se cuentan las células y se resiembran con medio reciente, y alguna combinación de XLCM, P, con A, IL-2 y IL-4. El porcentaje de células que expresa un marcador de superficie en particular se determina utilizando anticuerpos específicos y citometría de flujo.

Ejemplo 1

20 *CD4e: XLCM/P => células T TcR $\gamma\delta^+$*

Se aislaron células mononucleares de baja densidad (LDMNC) de un cultivo de sangre periférica adulta mediante centrifugación en gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque (densidad = 1,077 g/ml). Se dispuso un volumen de 15 ml de sangre total sobre un volumen igual de Ficoll-Hypaque en un tubo cónico de cultivo de tejidos de 50 ml, que se centrifugó a 400 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente. El material de la interfase que comprende las células mononucleares se recogió y se lavaron las células dos veces en medio de cultivo (AIM-V que comprendió 20 unidades/ml de heparina y 50 μ M de 2-mercaptoetanol; medio libre de suero = HCBM-2) mediante centrifugación a 100 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se diluyeron en HCBM-2 con 10% suero bovino fetal (FBS) y se incubaron en frascos de cultivo de tejidos de poliestireno durante la noche a 37° C y 5% CO $_2$. A la mañana siguiente, se lavaron las células dos veces mediante centrifugación y se resuspendieron en HCBM-2. Una muestra de suspensión celular se diluyó 1:20 con 2% ácido acético y se determinó el número total de células nucleadas mediante un hemocitómetro.

Las células T CD4 $^+$ (CD4e) se enriquecieron de las LDMNC mediante selección negativa utilizando anticuerpos específicos al linaje y cromatografía inmunomagnética de afinidad (StemSep, Stem Cell Technologies, Vancouver, BC). Se precipitó un total de $1,7 \times 10^7$ LDMNC mediante centrifugación y se lavo dos veces en tampón fosfato disolución salina (PBS) con 2% FBS (PBS/FBS). Se suspendieron las células en 1 ml de PBS/FBS y se añadió un cocktail de anticuerpos monoclonales específicos al linaje. El cocktail comprendió anticuerpos específicos a CD8 (células T citotóxicas), CD14 (monocitos), CD16 (células NK), CD19 (células B), CD56 (células NK) y glicoforina A (células eritroides). Estos fueron anticuerpos biespecíficos con especificidad por los marcadores linaje específicos indicados y especificidad por el dextrano. Los LDMNC se incubaron con los anticuerpos biespecíficos en hielo durante 30 minutos después de lo cual se añadió un coloide de dextrano hierro y se continuó la incubación durante 30 minutos adicionales. La suspensión se sometió a cromatografía inmunomagnética un procedimiento que elimina las células que se habían unido a los anticuerpos y a las partículas de hierro dextrano. De este modo, las células recuperadas fueron una población enriquecida en células T CD4 $^+$ (CD3 $^+$, TcR $\alpha\beta^+$) así como en otras células sin los antígenos diana, comprendiendo las células T TcR $\gamma\delta^+$. El rendimiento en CD4e obtenido fue de 2×10^6 células.

Las células CD4e se expandieron en HCBM-2 con 5% (volumen) de XLCM y 5% plasma de sangre de cordón umbilical humano (P). El XLCM es un medio condicionado preparado por estimulación de las células de la sangre de cordón umbilical humano con mezereina y concanavalina A (*J. Immunotherapy* 8:129(1999); *J. Immunotherapy and Stem Cell Research* 8:525 (1999); y WO 98 33891). XLCM es una mezcla compleja de factores estimulantes e inhibidores, de los que por lo menos 23 han sido medidos (*J. Hematotherapy and Stem Cell Research* 8:525 (1999)).

Las células CD4e se diluyeron a 1×10^5 células/ml en HCBM-2 con 5% XLCM y 5% P y se incubaron a 37°C en 5% CO $_2$ durante múltiples días durante los que las células sufrieron una expansión de 8 veces. La cuenta de células y la viabilidad se determinaron mediante el mezclado de una muestra de las células resuspendidas con un volumen igual de 0,4% azul trypan y contando las células no teñidas (viables) y azules (no viables) utilizando un hemocitómetro. Para pasar las células, un pequeño volumen del cultivo se diluyó a 1×10^5 células/ml con medio reciente y se añadió XLCM y P recientes a una concentración del 5% cada uno; el resto del cultivo se utilizó para análisis por citometría de flujo o se descartó. A continuación, las células se pasaron de modo similar cada pocos días en medio reciente suplementado con 5% XLCM y 5% P. La multiplicidad de expansión se calculó como el producto de la multiplicidad de expansión media en cada pase y el rendimiento teórico de células viables totales se calculó con base en la densidad inicial sembrada y el volumen y la multiplicidad de expansión de cada pase, asumiendo que todas las células se habían mantenido en cultivo continuo. Durante un período de aproximadamente tres o cuatro semanas, las células se expandieron más de 100.000 veces (Figura 1).

En cada pasaje, una porción de las células expandidas se analizó mediante citometría de flujo con el fin de determinar el porcentaje que expresaba TcR $\gamma\delta$ y el porcentaje que expresaba V δ 1. Después de 21 días en cultivo, más del

ES 2 319 942 T3

65% de las células cultivadas fueron TcR $\gamma\delta^+$ y la mayoría (>70%) de éstas células T TcR $\gamma\delta^+$ fueron V $\delta 1^+$ (Figura 1). La fracción de células T TcR $\gamma\delta^+$ incrementó todavía más al día 27 en el que más del 70% de las células cultivadas fueron TcR $\gamma\delta^+$ y aproximadamente el 90% de estas fue V $\delta 1^+$.

5 Estas células T TcR $\gamma\delta^+$ se cree que provienen de una pequeña población presente en las CD4e que se expande preferencialmente en estas condiciones.

Esto resultó ser un descubrimiento inesperado y nuevo porque:

10 (a) los LDMNC sin fraccionar expandidos continuamente en XLCM o XLCM + P, son casi por totalmente TcR $\alpha\beta^+$, con pocas, si algunas, células T TcR $\gamma\delta^+$ [J. Hematotherapy and Stem cell Research 8:525 (1999)].

(b) con XLCM solamente (sin plasma), no hay expansión del subconjunto de células T TcR $\gamma\delta^+$ [J. Hematotherapy and stem cell research (1999)]; y

15 (c) sin XLCM, no se produce expansión celular.

Ejemplo 2

20 *TeABd: XLCM/P => células T TcR $\gamma\delta^+$*

Se aislaron LDMNC de sangre periférica adulta tal como se describió en el Ejemplo 1. las células T TcR $\gamma\delta^+$ se enriquecieron de LDMNC mediante selección negativa utilizando un procedimiento semejante al descrito en el Ejemplo 1, excepto que el cocktail de anticuerpos comprendió un cocktail para enriquecer células T (Te) combinado con un anticuerpo para la eliminación de células TcR $\alpha\beta^+$ (ABd). El cocktail de enriquecimiento de células T comprendió anticuerpos específicos a CD14 (monocitos), CD16 (células NK), CD19 (células B), CD56 (células NK) y glicoforina A (células eritroides). A partir de un número inicial de $1,7 \times 10^7$ LDMNC, se obtuvo un total de $1,3 \times 10^5$ células TeABd.

30 Las células TeABd se cultivaron en HCBM-2 con 5% XLCM y 5% P tal como se describió en el Ejemplo 1.

Durante un período de aproximadamente 4 semanas, las células sufrieron una expansión de más de 100.000 veces (Figura 2). Desde el día 8 de cultivo, las células expandidas fueron >50% TcR $\gamma\delta^+$ y alcanzaron purzas >80% después de 12 días. De nuevo, la mayoría de las células T TcR $\gamma\delta^+$ fueron V $\delta 1^+$ (>70%).

El procedimiento del Ejemplo 2 es consecuencia lógica del procedimiento del Ejemplo 1: si las células T TcR $\gamma\delta^+$ se pueden expandir a partir de una pequeña subpoblación de células presentes en CD4e, entonces también se deben expandir a partir de una población relativamente más enriquecida presente en TeABd.

40 *Ventajas del procedimiento descrito en el Ejemplo 2*

Mediante el procedimiento del Ejemplo 2, las células T TcR $\gamma\delta^+$ se expandieron más rápidamente, se expandieron a un nivel superior y fueron más puras, en comparación con las obtenidas utilizando el procedimiento del Ejemplo 1.

45

Ejemplo 3

50 *LDMNC: XLCM/P -> IL-2/IL-4/P o IL-2/P o IL-4/P o P*

Se aislaron LDMNC a partir de sangre periférica adulta tal como se describió en el Ejemplo 1 y se cultivaron sin más fraccionamiento o enriquecimiento.

55 Los LDMNC se expandieron durante 4 días en HCBM-2 con 5% XLCM, después de lo cual se centrifugaron, lavaron y dividieron en cinco porciones iguales. Una porción se subcultivó en HCBM-2 con 5% XLCM y 5% P; una porción se subcultivó en HCBM-2 con 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P; una porción se subcultivó en HCBM-2 con 10 ng/ml IL-2 + 5% P; Una porción se subcultivó en HCBM-2 con 10 ng/ml IL-4 + 5% P; una porción se subcultivó en HCBM-2 con 5% P solamente.

60 Las células subcultivadas con IL-2 + IL-4 + P se expandieron también o mejor que las cultivadas continuamente en presencia de XLCM, mientras que las subcultivadas con P solamente expiraron rápidamente (Figura 3). Las células subcultivadas con IL-2 + P se expandieron durante un corto tiempo a una velocidad lenta y entonces pararon de crecer por completo. Las células subcultivadas con IL-4 + P se expandieron incluso menos que las subcultivadas con IL-2 + P.

65 Estos resultados demuestran que tanto IL-2 como IL-4 son necesarias para lograr la máxima expansión celular.

ES 2 319 942 T3

Ejemplo 4

LDMNC: XLCM/P -> IL-2/IL-4/P -> células T TcR $\gamma\delta^+$

- 5 Se aislaron LDMNC de sangre periférica adulta tal como se describió en el Ejemplo 1 y se cultivaron sin más fraccionamiento o enriquecimiento.

10 Los LDMNC se expandieron durante 5 días en HCBM-2 con 5% XLCM + 5% P después de lo que se dividieron y la mitad se continuó cultivando continuamente en HCBM-2 con 5% XLCM + 5% P, mientras que la otra mitad se lavó y subcultivó en HCBM-2 con 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P. En ambos casos, las células se expandieron más de 100.000 veces en cuatro semanas (Figura 4). Sin embargo, el análisis por citometría de flujo reveló que las diferentes condiciones dieron lugar a diferentes clases de células: menos del 5% de las células cultivadas continuamente en XLCM/P fueron TcR $\gamma\delta^+$, mientras que más del 50% de las células cultivadas en XLCM/P y luego subcultivadas en IL-2/IL-4/P fueron TcR $\gamma\delta^+$. Nótese que en estos experimentos, el análisis por citometría de flujo se realizó solamente el día 22.

15 El descubrimiento de expansión de células T TcR $\gamma\delta^+$ en estas condiciones fue completamente inesperado. El subcultivo en citocinas definidas se realizó con el fin de eliminar XLCM y más específicamente la mezerina y conca-
20 navalina A residuales, de las células cultivadas. Se descubrió que si este procedimiento mantuvo niveles de expansión comparables a los logrados mediante cultivo continuo en XLCM, pero que un diferente subconjunto, es decir el subconjunto de células T TcR $\gamma\delta^+$, se expandía preferentemente.

Ventajas

25 En comparación con los procedimientos descritos en los Ejemplos 1 y 2, el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 no requiere un fraccionamiento adicional o enriquecimiento de la población celular inicial, en consecuencia el número inicial de células puede ser extraordinariamente bajo (por ejemplo, 1×10^5). Además, el procedimiento de subcultivo elimina XLCM y sus componentes, por ejemplo conca-
30 navalina A, mezerina y otros factores conocidos o desconocidos de las células cultivadas.

Ejemplo 5

LDMNC: Con A/IL-2/IL-4/P -> IL-2/IL-4/P => células T TcR $\gamma\delta^+$

- 35 Se aislaron LDMNC a partir de sangre periférica adulta tal como se describió en el Ejemplo 1 y se cultivaron sin más fraccionamiento o enriquecimiento.

40 Los LDMNC se expandieron durante 5 días en HCBM-2 con 1 μ g/ml conca-
45 navalina A + 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P, después de lo cual se dividieron y la mita se cultivaron continuamente en HCBM-2 con 1 μ g/ml conca-
40 navalina A + 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P, mientras que la otra mitad se lavó y subcultivó en HCBM-2 con 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P. En ambos casos, las células se expandieron más de 100.000 veces en cuatro semanas (Figura 5). Sin embargo, el análisis por citometría de flujo reveló que las diferentes condiciones dieron lugar a diferentes tipos de células: menos del 5% de las células cultivadas continuamente en conca-
45 navalina A + IL-2 + IL-4 + P fueron TcR $\gamma\delta^+$, mientras que más del 50% de las células cultivadas en conca-
40 navalina A + IL-2 + IL-4 + P luego subcultivadas en IL-2 + IL-4 + P fueron TcR $\gamma\delta^+$. Nótese que en este experimento, el análisis por citometría de flujo se realizó solamente el día 22.

50 El descubrimiento de la expansión de las células T TcR $\gamma\delta^+$ en estas condiciones fue inesperado por las mismas razones descritas en el Ejemplo 4, es decir, el subcultivo en citocinas definidas se realizó con el propósito de eliminar XLCM y más específicamente la mezerina y conca-
50 navalina A residuales, de las células cultivadas. Se descubrió que este procedimiento mantenía unos niveles de expansión comparables a los logrados mediante cultivo continuo en XLCM o en conca-
45 navalina A + IL-2 + IL-4 + P, pero que un diferente subconjunto, es decir, el subconjunto de células T TcR $\gamma\delta^+$, era expandido selectivamente.

Ventajas

55 Tal como en el método descrito en el Ejemplo 4, el número inicial de células puede ser muy bajo ya que no se re-
50 quiere un fraccionamiento o enriquecimiento inicial de LDMNC y las células se expanden muy eficazmente. Además, las condiciones de cultivo son completamente definidas, no se utiliza XLCM en ninguna etapa del procedimiento y las
60 células subcultivadas nunca se exponen a mezerina.

Ejemplo 6

TeABd: Con A/IL-2/IL-4/P -> IL-2/IL-4/P => células T TcR $\gamma\delta^+$

- 65 Se aislaron LDMNC a partir de sangre periférica adulta tal como se describió en el Ejemplo 1 y se enriqueció para TeABd tal como se describió en el Ejemplo 2. Los TeABd se expandieron tal como se describió en el Ejemplo 5, es decir, se cultivaron en HCBM-2 con 1 μ g/ml conca-
60 navalina A + 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P y a continuación

ES 2 319 942 T3

se subcultivaron en HCBM-2 con 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P. Sin embargo, en lugar de pasar las células por dilución de un pequeño volumen del cultivo en medio reciente más citocinas y plasma a la vez que se descartaba el resto, se expandió el volumen completo del cultivo y se mantuvieron todas las células en un cultivo continuo de volumen creciente.

El volumen inicial de sangre completa fue de 50 ml. El número inicial de LDMNC fue de $3,6 \times 10^7$. El rendimiento de TeABd fue de 1×10^5 . Los TeABd se cultivaron en concanavalina A + IL-2 + IL-4 + P durante un total de 12 días, punto en el cual se habían expandido a un total de 3×10^6 células en un volumen total de 1,4 ml. En este punto, las células cultivadas se centrifugaron y se lavaron una vez con HCBM-2. Las células lavadas se sembraron de vuelta en cultivo a una densidad de 1×10^5 células/ml en un volumen total de 30 ml y se añadió 10 ng/ml de IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P. En este cultivo se utilizó plasma autólogo, en lugar de plasma de sangre de cordón umbilical. Las células se expandieron adicionalmente en HCBM-2 con 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P durante otros 9 días. La duración total del cultivo fue de 21 días. En este punto, las células se habían expandido a un total de $4,5 \times 10^8$ células en un volumen total de 300 ml (Figura 6a).

El análisis por citometría de flujo demostró que más del 85% de las células en el día 21 de cultivo fueron TcR $\gamma\delta^+$ y que la mayoría de estas (> 70%) fueron V $\delta 1^+$, mientras que una pequeña, pero significativa, fracción (~10%) fue V $\delta 2^+$. Además, mientras que aproximadamente el 10% de las células expresó CD56, menos del 3% expresó CD16, indicando que este procedimiento no produjo una expansión significativa de las células naturales asesinas (NK).

La actividad citotóxica de estas células T TcR $\gamma\delta^+$ expandidas se demostró utilizando un ensayo de liberación de calceína. Las células diana se marcaron con el sustrato fluorogénico calceína-AM y se incubaron con células efectoras TcR $\gamma\delta^+$ a múltiples proporciones de efectora:diana (E:T). Se ensayó la citólisis de las células diana mediante la medición de la calceína liberada en el sobrenadante. El porcentaje de muerte específica de las células diana por las efectoras se calculó a partir de las unidades de fluorescencia relativa (rfu) según la siguiente fórmula (en la que "rfu experimental" es la cantidad de fluorescencia medida debida a la calceína liberada por las células diana coincubadas con las células efectoras, la "rfu máxima" es la fluorescencia obtenida a partir de un número igual de células diana rotas con detergente (Triton X-100) y "rfu espontánea" es la fluorescencia obtenida de un número igual de células diana incubadas en ausencia de células efectoras o detergente):

$$\text{Porcentaje de lisis específica} = \frac{\text{rfu experimental} - \text{rfu espontánea}}{\text{rfu máxima} - \text{rfu espontánea}} \times 100$$

P815 es una línea celular de mastocitoma de ratón portadora de receptores para la región Fc de la IgG en su superficie. Mediante el recubrimiento de las células P815 diana con OKT3 (un anticuerpo monoclonal anti CD3 humano) se logra la unión de las células diana a las células T efectoras en virtud de la expresión de CD3 independientemente de la especificidad de las células T. Así, la muerte de las dianas P815 recubiertas de OKT3 da una indicación de la competencia citolítica de las células efectoras independientemente de su especificidad. Las EM-2 y K562 son líneas celulares derivadas de CML, mientras que Daudi es una línea de células B y Jurkat una línea celular T. Todas estas dianas requieren reconocimiento por las células efectoras para ser asesinadas. Las Figuras 6b a f muestran que las células T TcR $\gamma\delta^+$ expandidas mediante el procedimiento del Ejemplo 6 fueron citolíticamente competentes y además, fueron capaces de reconocer y matar células diana derivadas tanto de CML como de no CML.

Una parte de las células T TcR $\gamma\delta^+$ se criopreservó en nitrógeno líquido a una concentración de 2×10^7 células/ml en HCBM-2 con 10% de P autólogo y 10% de dimetil sulfoxido (DMSO). Después de descongelar, se recuperó aproximadamente el 71% de las células congeladas en estado viable y la viabilidad general de las células congeladas fue del 90%. Aproximadamente el 70% de las células descongeladas fue TcR $\gamma\delta$ y > 70% de estas fue V $\delta 1^+$. Un ensayo de liberación de calceína utilizando las células descongeladas como efectoras demostró que estas mantenían su actividad citolítica después de la criopreservación y descongelación, aunque esta actividad se redujo un poco para alguna de las células diana ensayadas (Figuras 6g a k). Estos resultados demuestran que las células T TcR $\gamma\delta^+$ se pueden criopreservar para su utilización más tarde.

Ejemplo 7

TeABd33d: Con A/IL-2/IL-4/P -> IL-2/IL-4/P => células T TcR $\gamma\delta^+$

Se aislaron LDMNC a partir de sangre periférica de un paciente con leucemia mielogénica crónica (CML) tal como se describió en el Ejemplo 1 y se enriqueció en TeABd tal como se describió en el Ejemplo 2. El volumen inicial de sangre total fue de 43 ml. El número inicial de LDMNC fue de $8,6 \times 10^7$ y el rendimiento de TeABd fue de $2,5 \times 10^7$ representando el 29% de los LDMNC iniciales. Este rendimiento fue extremadamente elevado en comparación con el obtenido de LDMNC de sangre periférica adulta normal (n = 3, promedio de LDMNC = $5,2 \times 10^7$, promedio de TeABd = $3,4 \times 10^5 \leq 1\%$). El subsiguiente análisis por citometría de flujo de los TeABd derivados del paciente de CML reveló una importante población de células no-T de progenitores mieloides CD33 $^+$ representando aproximadamente el 78% de los TeABd de CML. Con el fin de eliminar este subconjunto de células antes del cultivo de las células T TcR $\gamma\delta^+$, en los experimentos siguientes que implicaron células de pacientes CML se añadió un anticuerpo anti-CD33 al cocktail TeABd. El cocktail de anticuerpos resultante TeABd33d, comprendió anticuerpos específicos a CD14, CD16, CD19, CD33, CD56 y glicoforina A.

ES 2 319 942 T3

En un experimento subsiguiente, se aislaron LDMNC de sangre periférica de un paciente (diferente) de CML tal como se describió en el Ejemplo 1 y se enriqueció para TeABd33d tal como se describió en el Ejemplo 2 utilizando el cocktail modificado de anticuerpos descrito anteriormente. El volumen de sangre total inicial fue de 40 ml. El número inicial de LDMNC fue de $8,65 \times 10^7$ y el rendimiento de TeABd33d fue de $1,3 \times 10^6$ (1,5%). Los TeABd33d se expandieron tal como se describió en el Ejemplo 6. se sembraron en cultivo a una densidad de 1×10^5 células/ml en HCBM-2 con $1 \mu\text{g/ml}$ de concanavalina A + 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P. Se expandieron en presencia de concanavalina A + IL-2 + IL-4 + P a un volumen de 5 ml durante un período de 14 días, punto en el cual se precipitaron y lavaron por centrifugación y a continuación se subcultivaron en HCBM-2 con 10 ng/ml IL-2 + 10 ng/ml IL-4 + 5% P. estas células se expandieron a un volumen total de cultivo de 1600 ml durante los siguientes 13 días (la duración total del cultivo fue de 27 días), momento en el que el rendimiento en células fue de $1,2 \times 10^9$. Aunque las células se estaban expandiendo todavía, se cosecharon las células y se utilizaron en este punto. Una gráfica de la cinética de crecimiento se muestra en la Figura 7a.

El análisis por citometría de flujo demostró que el 72% de las células fue $\text{TcR}\gamma\delta^+$ y la mayoría de estas (> 60%) fueron $\text{V}\delta 1^+$, mientras que el 33% fue $\text{V}\delta 2^+$. De nuevo, menos del 3% de las células expresó CD16, indicando que las células NK no se expandieron en este cultivo.

El análisis citogenético utilizando procedimientos de bandejo G estándar demostró que las células expandidas no fueron leucémicas sin anomalías citogenéticas clonales detectables comprendido el cromosoma de Filadelfia que es la marca de CML. El subsiguiente cultivo de las células en HCBM-2 + 5% P en ausencia de IL-2 e IL-4 produjo la muerte celular, indicando que la expansión celular es dependiente de citocinas e indicando que las células cultivadas no estaban transformadas por el procedimiento de cultivo (Figura 7b).

Las células expandidas se examinaron para determinar la presencia de concanavalina A unida a su superficie. Se trataron con anticuerpo de IgG de conejo anti-concanavalina A (RaConA) o con la cantidad equivalente de IgG normal de conejo. A continuación se lavaron y tiñeron con IgG FITC-cabra anticonejo (NRlgG) y se analizaron mediante citometría de flujo. Como control positivo se tiñeron de modo semejante LDMNC recientemente cultivadas en concanavalina A + IL-2 + IL-4 + P (K). La intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células del control positivo (K) teñidas con el anticuerpo de conejo anticoncanavalina A fue muy superior a la MFI obtenida cuando las mismas células se tiñeron con IgG normal de conejo (Tabla 1) indicando la presencia de concanavalina A en la superficie de las células. Por el contrario, la MFI de las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$ fue semejante tanto para el anticuerpo anticoncanavalina A de conejo como para la IgG normal de conejo. Estos datos indican que el subcultivo de las células en IL-2 + IL-4 + P (en ausencia de concanavalina A) resultó en la eliminación de concanavalina A detectable de las células subcultivadas, más probablemente mediante la internalización y el catabolismo o por desprendimiento de la superficie celular.

La actividad citotóxica de las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$ derivadas de paciente CML se confirmó utilizando el ensayo de liberación de calceína descrito en el Ejemplo 6 (Figuras 7c a g).

Las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$ derivadas de paciente CML se criopreservaron en nitrógeno líquido a una concentración de $4,4 \times 10^7$ células/ml en HCBM-2 con 10% P antólogo y 10% DMSO. La recuperación de células viables después de la descongelación fue del 76% y la viabilidad general de las células congeladas fue del 84%. La actividad citotóxica se mantuvo, pero se redujo ligeramente (Figuras 7h a i).

Estos resultados verifican que números terapéuticamente útiles de células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$ funcionalmente citotóxicas se pueden expandir *ex vivo* a partir de una muestra relativamente pequeña de sangre periférica tomada de un paciente CML. Además, estas células no son leucémicas y no están transformadas, no tiene concanavalina A detectable en la superficie y se puede criopreservar para ser utilizadas más adelante.

TABLA 1

Ausencia de Con A en la superficie de las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$ cultivadas

HB1015C1: LDMNC ->TeABd33d -> conA+IL-2+IL-4+P -> IL-2+IL-4+P

K: LDMNC -> conA+IL-2+IL-4+P (control positivo)

	<u>MFI</u>	<u>Proporción *MFI (RaConA)</u>	
	<u>RaConA</u>	<u>NRlgG</u>	<u>(NRlgG)</u>
HB 1015C1	0,726	0,865	0,84
K	5,76	1,32	4,36

* Una proporción ≤ 1 indica que la tinción con anticuerpo de ratón anti-conA (RaConA) es inferior a la tinción de fondo con la IgG normal de conejo (NRlgG).

Estos resultados demuestran que Con A no es detectable en la superficie de las células T $\text{TcR}\gamma\delta^+$

Citación completa de las referencias mencionadas en la memoria

- 5 **Bensussan, A., Lagabrielle, J.F., Castaigne, S., Boisson, N., Miclea, J.M., Benbunan, M., Degos, L.** Human CD3 gamma delta + activated lymphocytes exhibit killer activity *in vitro* against autologous leukemia cells. *Nouv Rev Fr Hematol* 31:129, 1989.
- Boismenu, R., Havran, W.L.** An innate view of gd T cells. *Curr Op Immunol* 9:57, 1997.
- 10 **Bukowski, J.F., Morita, C.T., Brenner, M.B.** Recognition and destruction of virus-infected cells by human gdC-TL. *J. Immunol* 153:5133, 1994.
- Choudhary, A., Davodeau, F., Moreau, A., Peyrat, M.A., Bonneville, M., Jotereau, F.** Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gd tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma. *J Immunol* 154:3932, 1995.
- 15 **Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M., Poquet, Y., Puzo, G., Bonneville, M. y Fournie, J.** Stimulation of human gd T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264:267, 1994.
- Elloso, M.M., Van der Heyde, H.C., Troutt, A., Manning, D.D. y Weidanz, W.P.** Human gamma delta T cell subsetproliferative response to malarial antigen *in vitro* depends on CD4+ T cells or cytokines that signal through components of the IL-2R. *J. Immunol.* 157:2096, 1996.
- 20 **Garcia, V.E., Jullien, D., Song, M., Uyemura, K., Shuai, K., Morita, C.T. y Modlin, R.L.** IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to non-peptide microbial antigens. *J. Immunol.* 160:4322, 1998.
- 25 **Jahn, B., Bergmann, L., Weidmann, E., Brieger, J., Fenchel, K., Schwulera, U., Hoelzer, D., Mitrou, P.S.** Bone marrow-derived T-cell clones obtained from untreated acute myelocytic leukemia exhibit blast directed autologous cytotoxicity. *Leuk Res* 19:73, 1995.
- Kaur, I., Voss, S.D., Gupta, R.S., Schell, K., Fisch, P. y Sondel, P.M.** Human peripheral gd T cells recognize hsp60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *J. Immunol.* 150:2046, 1993.
- 30 **Kitayama, J., Atomi, Y., Nagawa, H., Kuroda, A., Mutoh, T., Minami, M., Juji, T.** Functional analysis of TCRgd+ T cells in tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) of human pancreatic cancer. *Clin Exp Immunol* 93:442, 1993.
- 35 **Lamb, L.S., Henslee-Downey, P.j., Parrish, R.S., Godder, K., Thompson, J., Lee, C., Gee, A.P.** Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *J Hematother* 5:503, 1996.
- 40 **Lang, F., Peyrat, M.A., Constant, P., Davodeau, F., David-Ameline, J., Poquet, Y., Vie, H., Fournie, J.J., Bonneville, M.** *J Immunol* 154:5986, 1995.
- Orsini, D.L.M., Res, P.C.M., Van Laar, J.M., Muller, L.M., Soprano, A.E.L., Kooy, Y.M.C., Tak, P.P. y Koning, F.** A subset of Vd1+ T cells proliferates in response to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines *in vitro*. *Scand. J. Immunol.* 38:335, 1993.
- 45 **Penninger, J., Wen, T., Timms, E., Potter, J., Wallace, V.A., Matsuyama, T., Ferrick, D., Sydora, B., Kronenberg, M. Mak, T.W.** Spontaneous resistance to acute T-cell leukaemias in TCRd1.1Jg4Cg4 transgenic mice. *Nature* 375: 241, 1995.
- 50 **Salerno, A. y Dieli, F.** Role of gd T lymphocytes in immune response in humans and mice. *Crit. Rev. Immunol.* 18:327, 1998.
- Skea, D., Chang, N., Hedge, R., Dabek, B., Wong, T., Wettlaufer, B. y Bell, D.** Large *ex vivo* expansion of human umbilical cord blood CD4+ and CD8+ T cells. *J. Hematotherapy* 8:129, 1999.
- 55 **Skea, D., Hedge, R., Dabek, B., Wettlaufer, B., Wong, T. y Bell, D.** The selective expansion of functional T cell subsets. *J. Hematotherapy and Stem Cell Research* 8:525, 1999.
- Suzuki, Y., Fujimiya, Y., Ohno, T., Katakura, R. y Yoshimoto, T.** Enhancing effect of tumor necrosis factor (TNF)- a, but not IFN-g, on the tumor-specific cytotoxicity of gdT cells from glioblastoma patients. *Cancer Lett.* 140:161, 1999.
- 60 **Wallace, M., Malkovsky, M., Carding, S.R.** Gamma/delta T lymphocytes in viral infections. *J. Leuk Biol* 58:277, 1995.
- 65 **Yamaguchi, T., Fujimiya, Y., Suzuki, Y., Katakura, R. y Ebina, T.** A simple method for the propagation and purification of gdT cells from the peripheral blood of glioblastoma patients using solid-phase anti-CD3 antibody and soluble IL-2. *J. Immunol. Meth.* 205:19, 1997.

ES 2 319 942 T3

Yu, S., He, W., Chen, J., Zhang, F. y Ba, D. Expansion and immunological study of human tumor infiltrating gamma/delta T lymphocytes *in vitro*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119:31, 1999.

Zocchi, M.R., Ferrarini, M., Rugarli, C. Selective lysis of the autologous tumor by dTCS1 + gd + tumor-infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas. *Eur J Immunol* 20:2685, 1990.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 319 942 T3

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento destinado a la expansión de células T TcR $\gamma\delta^+$ de una muestra inicial que comprende:

5 (1) cultivar las células de la muestra inicial en un primer medio de cultivo que comprende (a) un mitógeno de células T, (b) interleucina-2 y (c) interleucina-4; y

10 (2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende (i) interleucina-2 y (ii) interleucina-4 con el fin de expandir las células T TcR $\gamma\delta^+$.

2. Procedimiento destinado a la expansión de células T TcR $\gamma\delta^+$ de una muestra inicial que comprende:

15 (1) cultivar las células de la muestra inicial en un primer medio de cultivos que comprende un medio condicionado, siendo preparado dicho medio condicionado mediante la estimulación de células de la sangre de cordón umbilical humano con mezereina y concanavalina A; y

(2) cultivar las células obtenidas en la etapa (1) en un segundo medio de cultivo que comprende (i) interleucina-2 y (ii) interleucina-4 con el fin de expandir las células T TcR $\gamma\delta^+$.

20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el primer medio de cultivo y el segundo medio de cultivo comprenden suero o plasma.

25 4. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que antes de la etapa (1) las células de la muestra inicial se enriquecen en células T.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que antes de la etapa (1) las células de la muestra inicial se enriquecen en células CD4 $^+$.

30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que antes de la etapa (1) de las células de la muestra inicial se eliminan las células CD14 $^+$, C16 $^+$, CD19 $^+$, CD56 $^+$ y glicoforina A $^+$.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que antes de la etapa (1) de las células de la muestra inicial se eliminan las células T TcR $\alpha\beta^+$.

35 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que antes de la etapa (1) de las células de la muestra inicial se eliminan las células T no TcR $\gamma\delta^+$.

40 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra inicial se selecciona de entre sangre periférica, médula ósea, tejido linfoide, epitelio, timo, hígado, bazo, tejido canceroso, tejido infectado, tejido de ganglio linfático o fracciones de los mismos.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la muestra inicial es sangre periférica humana o una fracción de la misma.

45 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la muestra inicial comprende células mononucleares de baja densidad.

50 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 10, en el que en el primer medio de cultivo el mitógeno de célula T se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,01 y 100 $\mu\text{g/ml}$, la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 ng/ml y la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 ng/ml.

55 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 10, en el que en el primer medio de cultivo el mitógeno de célula T se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 50 $\mu\text{g/ml}$; la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 1 y 100 ng/ml y la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 1 y 100 ng/ml.

60 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 10, en el que en el primer medio de cultivo el mitógeno de célula T se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,5 y 10 $\mu\text{g/ml}$; la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 2 y 50 ng/ml y la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 2 y 50 ng/ml.

65 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 14, en el que el primer medio de cultivo comprende 1 $\mu\text{g/ml}$ de un mitógeno de célula T; 10 ng/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-4.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 14, en el que el mitógeno de célula T es concanavalina A.

ES 2 319 942 T3

17. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el suero o plasma se encuentra presente en una cantidad comprendida entre el 1 y el 25% en volumen.

5 18. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el suero o plasma se encuentran presentes en una cantidad comprendida entre el 2 y el 20% en volumen.

19. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el suero o plasma se encuentran presentes en una cantidad comprendida entre el 2,5 y el 10% en volumen.

10 20. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el suero o plasma se encuentran presentes en la cantidad del 5% en volumen.

15 21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que en el segundo medio de cultivo la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 ng/ml y la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 0,1 y 1.000 ng/ml.

20 22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que en el segundo medio de cultivo la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 1 y 100 ng/ml y la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 1 y 100 ng/ml.

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que en el segundo medio de cultivo la IL-2 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 2 y 50 ng/ml y la IL-4 se encuentra presente en una cantidad comprendida entre 2 y 50 ng/ml.

25 24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el segundo medio de cultivo comprende 10 ng/ml de IL-2 y 10 ng/ml de IL-4.

25. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el medio condicionado se encuentra presente en una cantidad comprendida entre el 1 y el 25%.

30 26. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el medio condicionado se encuentra presente en una cantidad comprendida entre el 2 y el 20%.

35 27. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el medio condicionado se encuentra presente en una cantidad comprendida entre el 2,5 y el 10%.

28. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el medio condicionado se encuentra presente en una cantidad del 5%.

40 29. Procedimiento destinado a la obtención de células T $TcR\gamma\delta^+$ a partir de una muestra de un paciente con leucemia mielógena crónica que comprende:

(1) obtener células mononucleares de baja densidad (LDMNC) de la muestra;

45 (2) eliminar las células $CD33^+$ de entre las células obtenidas en la etapa (1);

(3) cultivar las células obtenidas en la etapa (2) en un primer medio de cultivo que comprende (a) un mitógeno de célula T, (b) interleucina-2 y (c) interleucina-4; y

50 (4) cultivar las células obtenidas en la etapa (3) en un segundo medio de cultivo que comprende (i) interleucina-2 y (ii) interleucina-4 con el fin de expandir las células T $TcR\gamma\delta^+$.

30. Procedimiento según la reivindicación 29, en el que la etapa (2) comprende asimismo eliminar de las células las células $CD14^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, $CD56^+$ y glicoforina A^+ .

55 31. Procedimiento según la reivindicación 29, en el que la etapa (2) comprende asimismo eliminar de las células las células T $TcR\alpha\beta^+$.

60

65

Figura 1

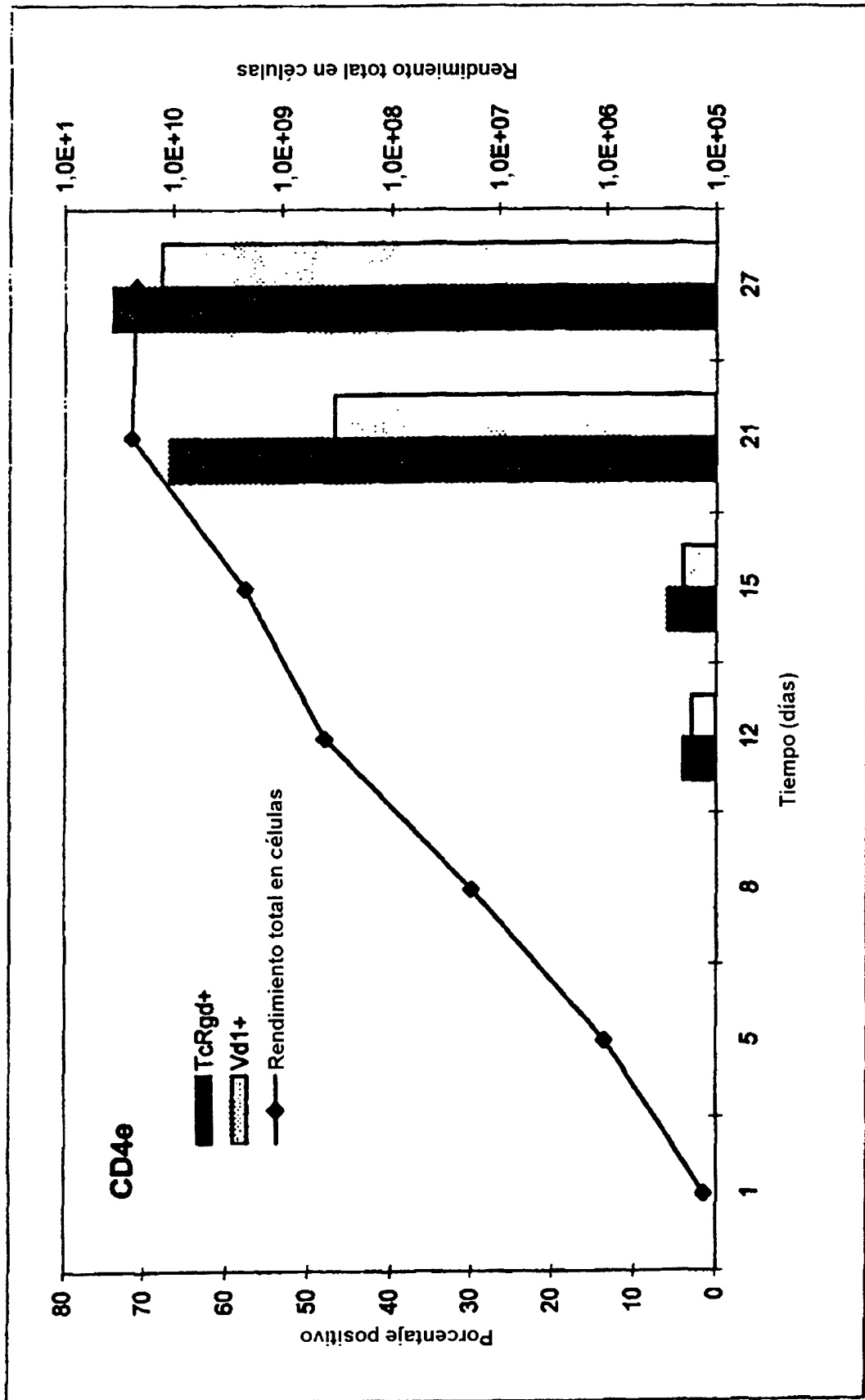


Figura 2

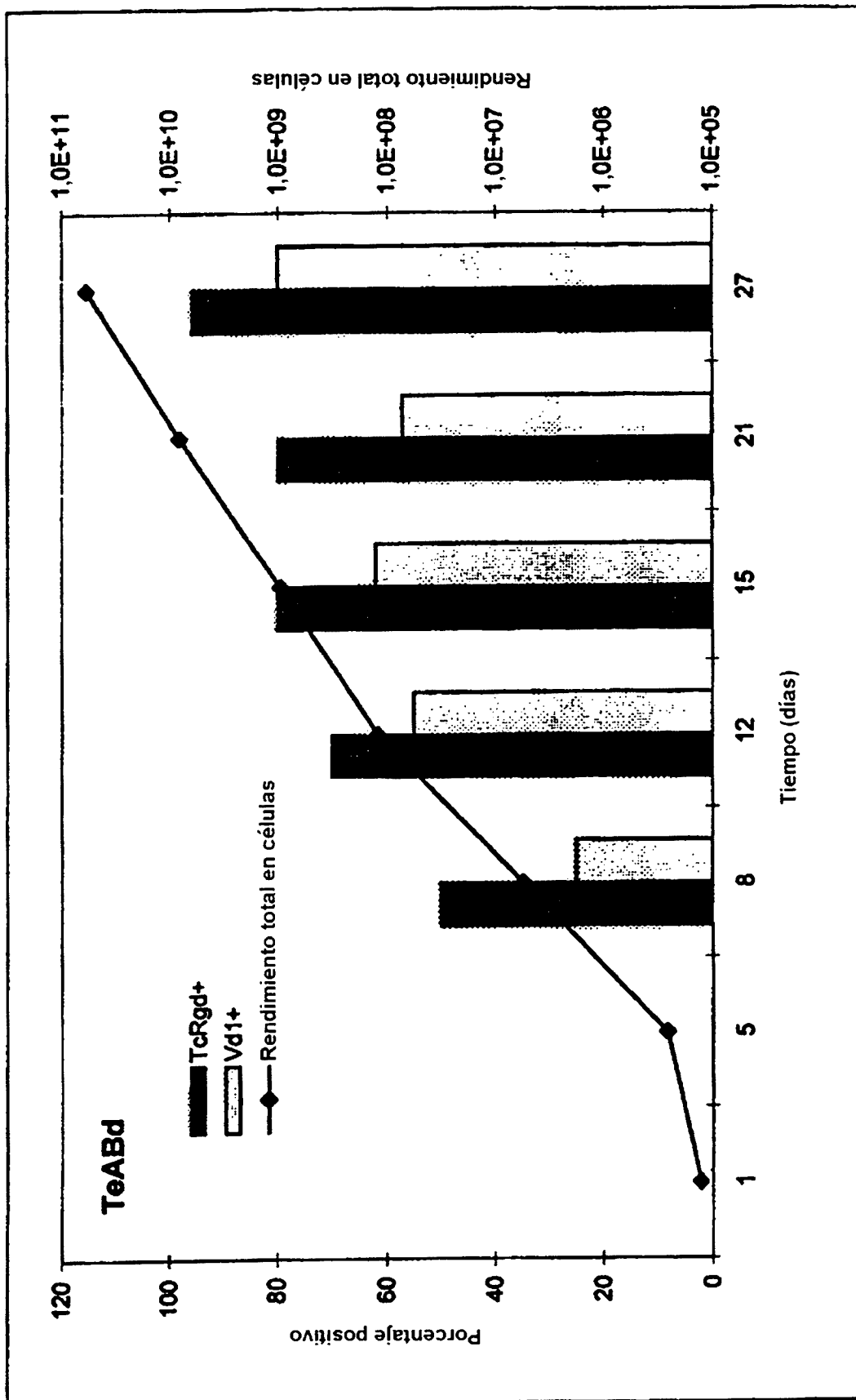


Figura 3

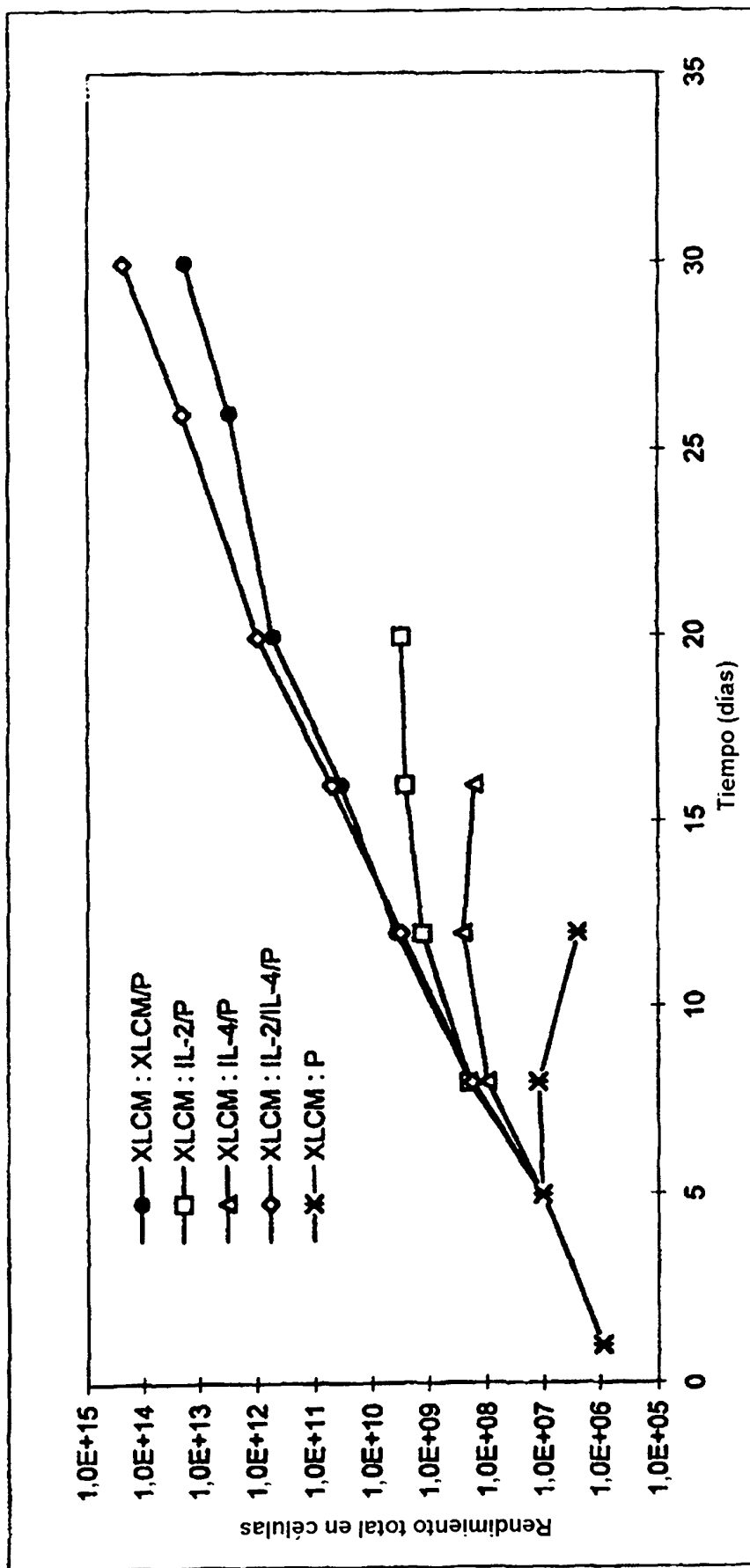


Figura 4

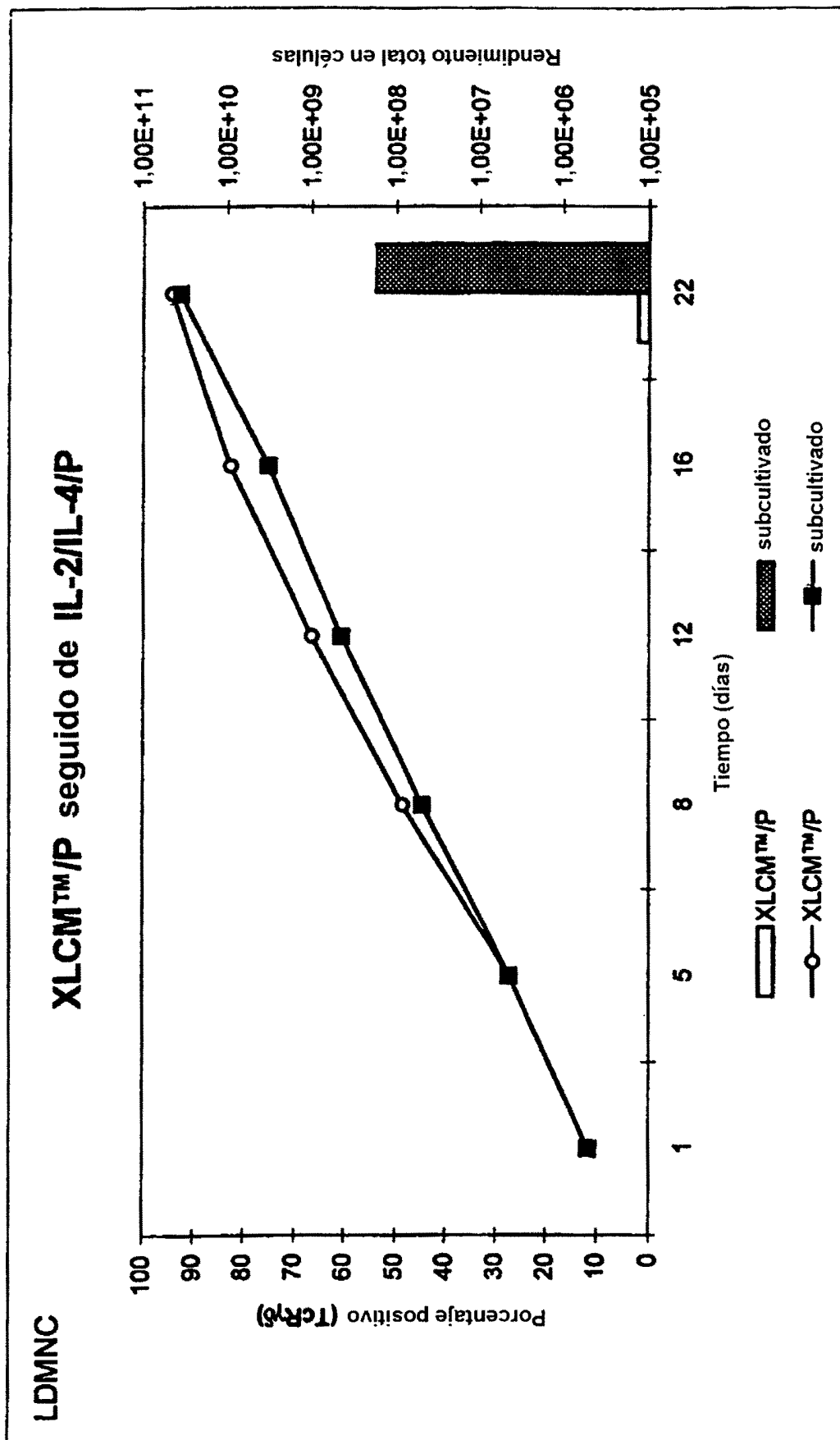


Figura 5

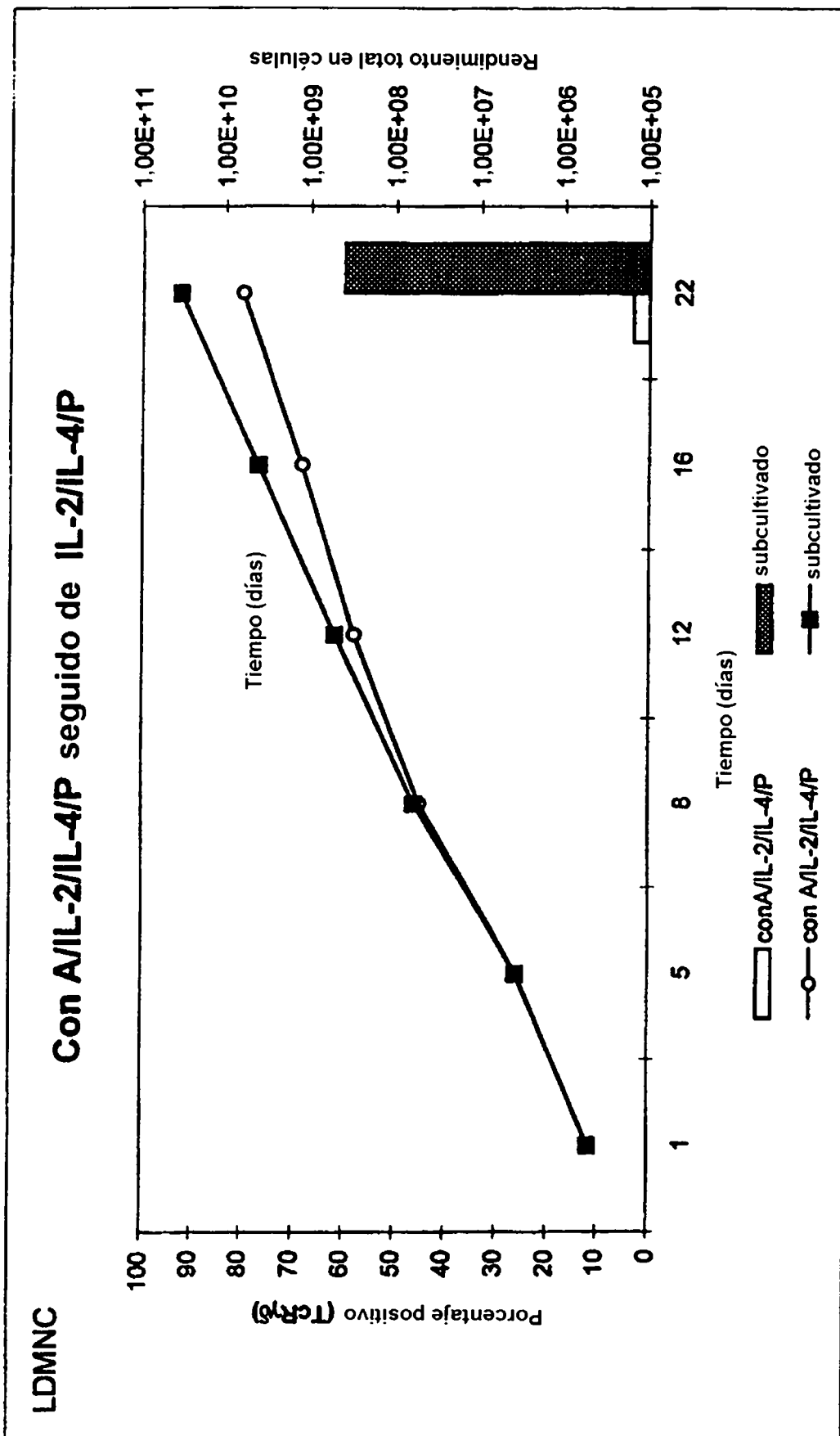
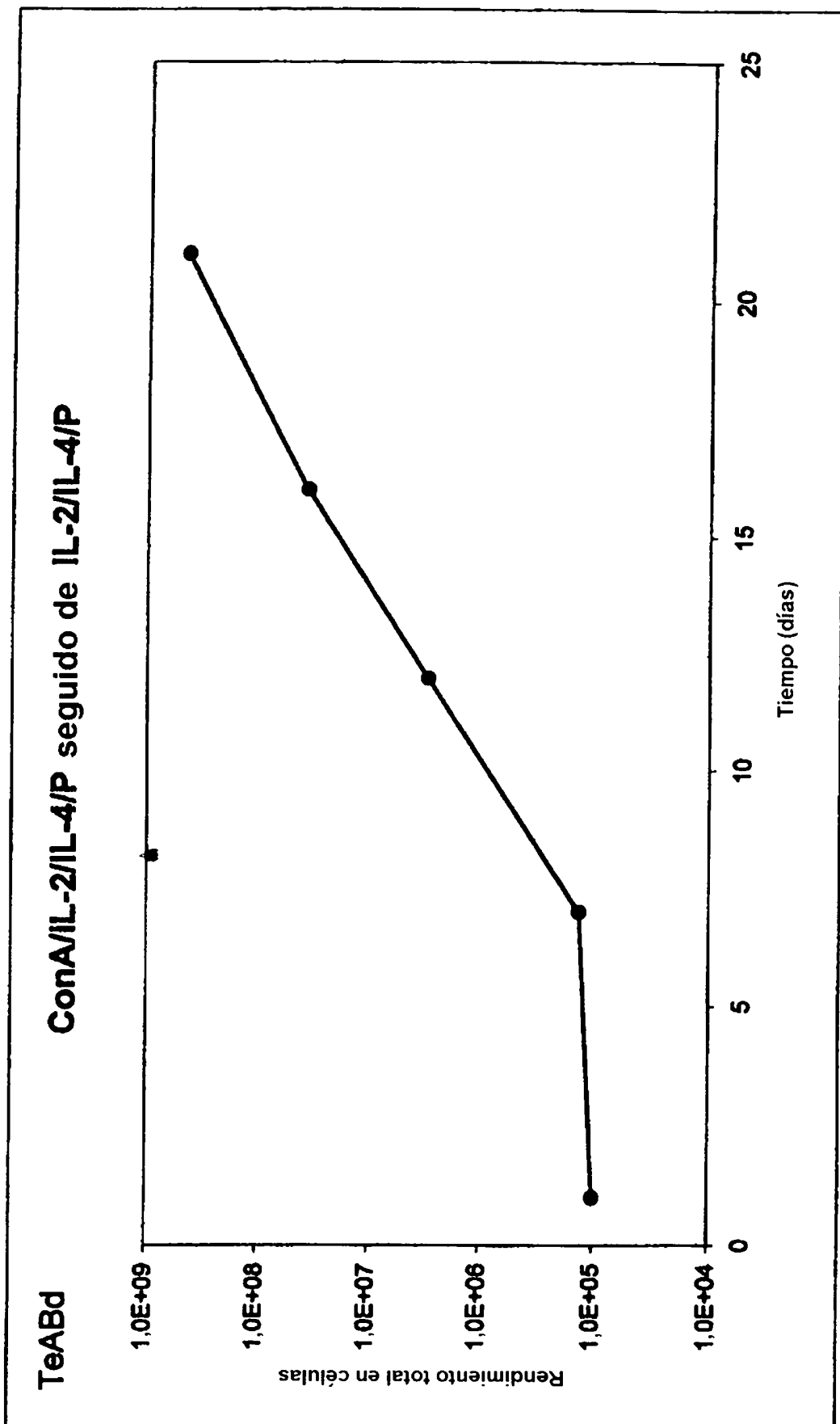
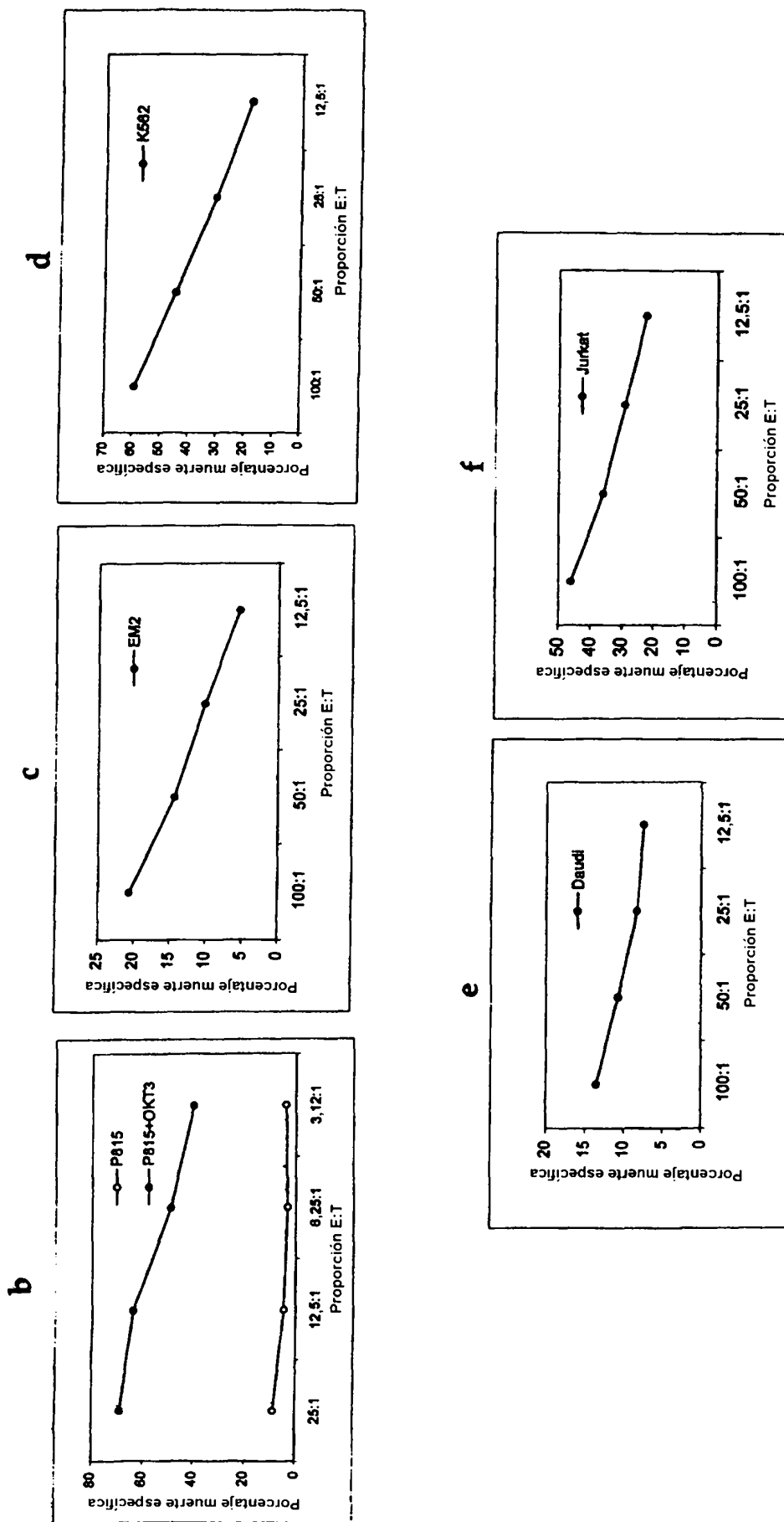


Figura 6a



Continuación Figura 6



Continuación Figura 6

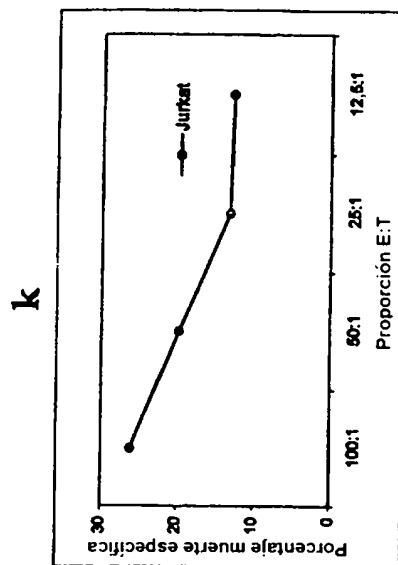
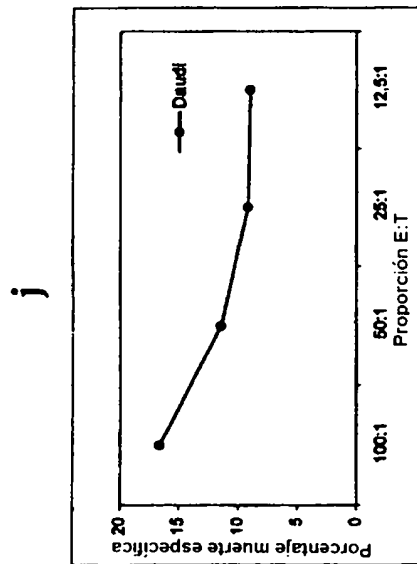
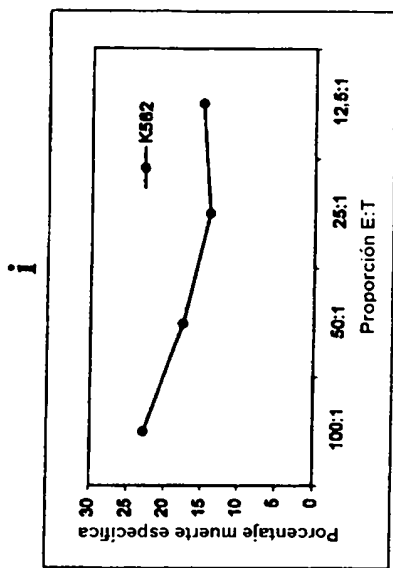
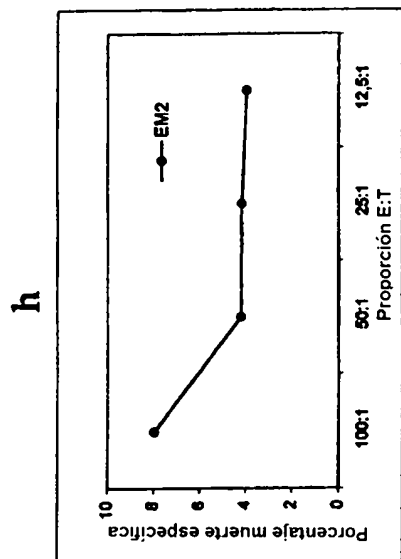
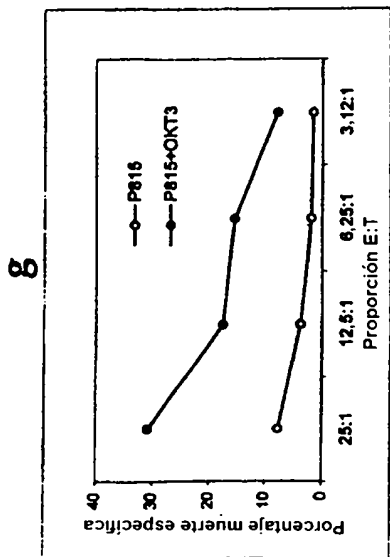


Figura 7a

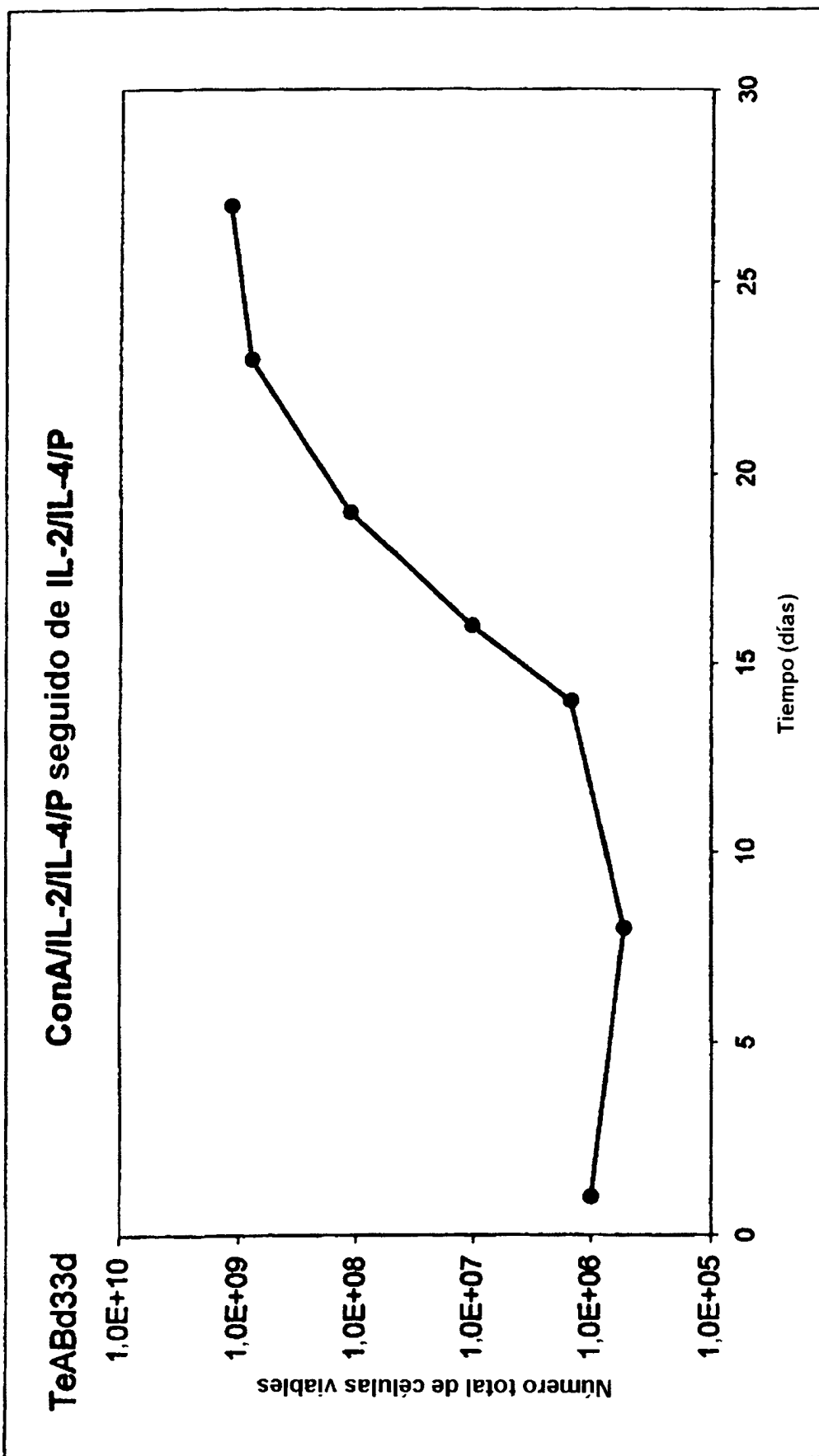
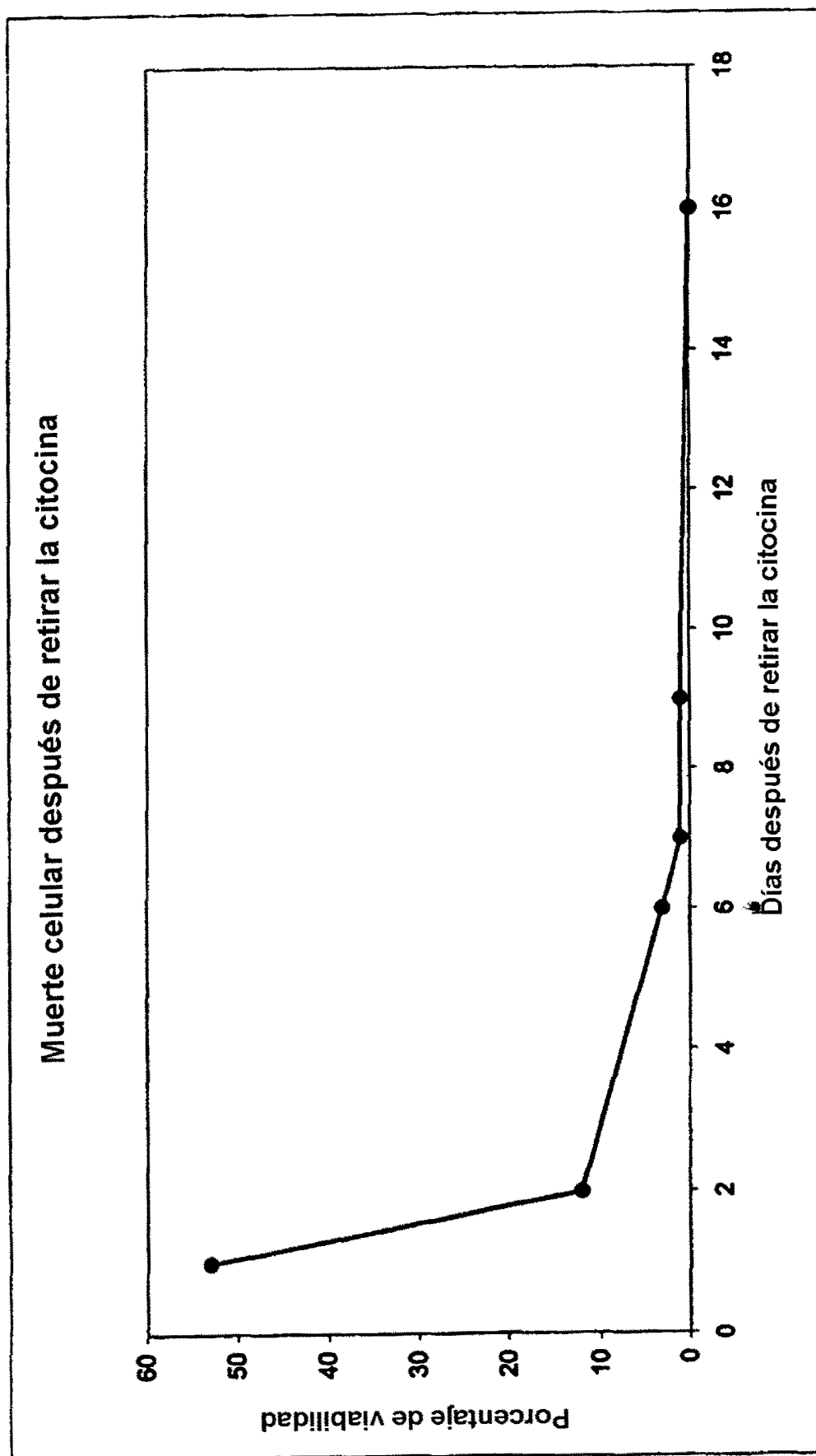
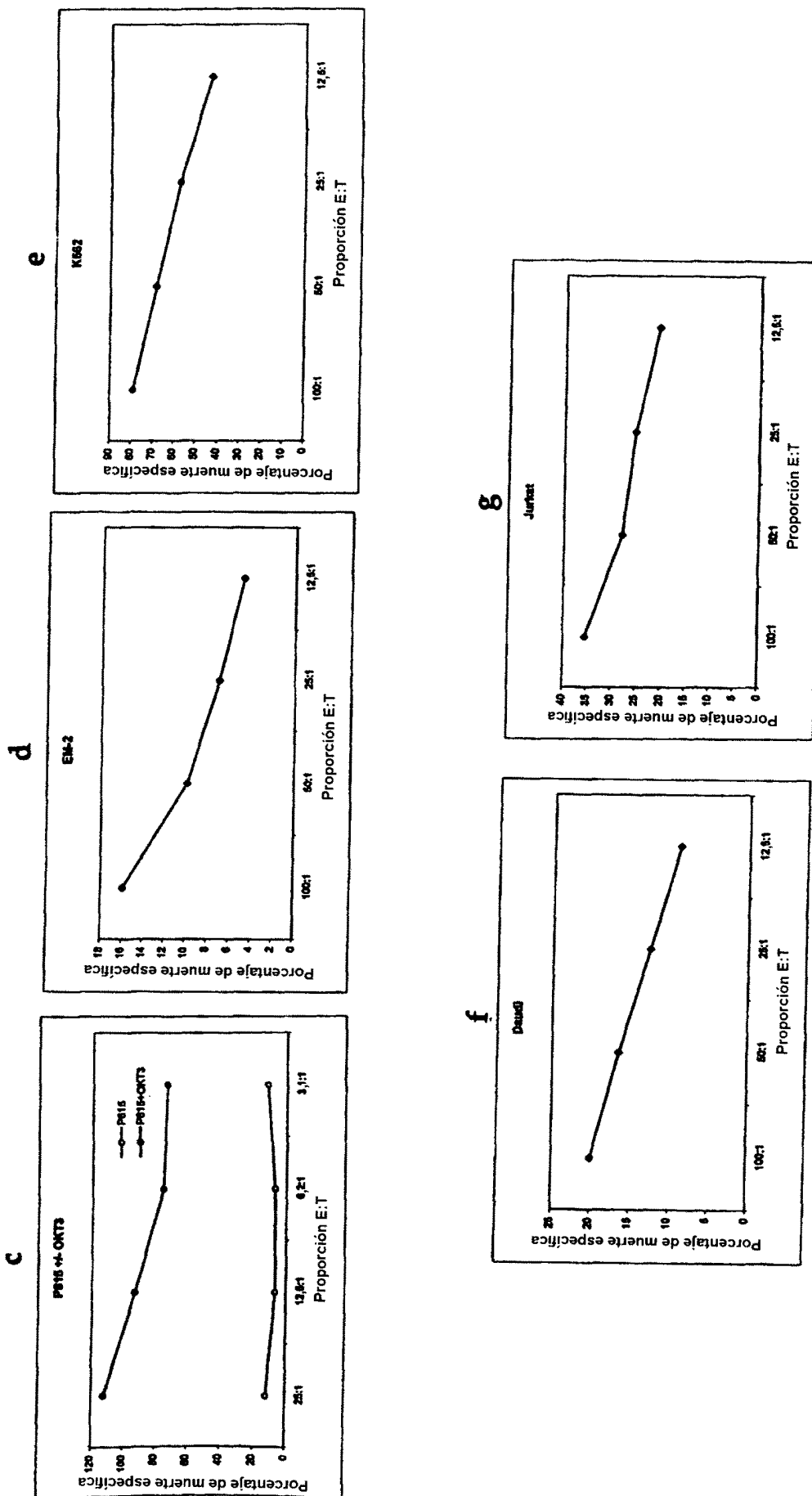


Figura 7b



Continuación Figura 7



Continuación Figura 7

